



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CINVESTAV ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Caracterización bioquímica del aparato fotosintéticos de tres  
diferentes cianobacterias: *Prochlorococcus marinus* MIT9313,  
*Nodularia sp. CCM9* y *Synechococcus PCC 7002***

Tesis que presenta

**M. en C. Jesús Barrera Rojas**

Para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE  
BIOQUÍMICA

Director de tesis:

Dr. Carlos Gómez Lojero

Ciudad de México

Septiembre, 2018

## Resumen

La vida requiere una gran cantidad de energía libre para presentar la diversidad y extensión que podemos observar en el planeta. La fotosíntesis es el mecanismo que mayormente contribuye a este fin, transformando la energía de la luz solar en energía utilizable para reacciones bioquímicas. El suministro de energía por la fotosíntesis ha permitido a la vida cambiar de forma tal, que los factores ambientales no la han cesado. Los organismos fotosintéticos tienen metabolismos para proliferar y sistemas de captación de luz variados, sin embargo, poseen un sistema básico de transducción de energía que se ha generalizado en bacterias y eucariontes. Los organismos con capacidad fotosintética más diversa son los que extraen electrones del agua y al hacerlo, liberan oxígeno molecular (oxofotótrofos). Los oxofotótrofos utilizan dos complejos proteicos transductores de energía llamados fotosistemas (FSI y FSII), los cuales están conectados en serie por una bomba de protones (complejo de citocromos *b<sub>6</sub>f*) y acarreadores de electrones en las membranas, citoplasma y lumen, además de una oxido-reductasa citoplasmática (FNR); para generar equivalentes de oxido-reducción y enlaces de alta energía, ambos acoplados a sus rutas metabólicas. A este proceso se le llama fotosíntesis oxigénica. La información genética que permite a los organismos fotosintéticos realizar este proceso consta de un grupo muy conservado de genes, sin embargo, se encuentran dentro de genomas de unos cuantos millones de pares de bases como en la cianobacteria *Prochlorococcus marinus* MED4, hasta escalar en tamaño unas 150 veces en la planta *Paris japonica*. Esta diversificación se debe a la transferencia masiva de la información fotosintética (genes) en un evento endosimbiótico entre un ancestro de las cianobacterias y un ancestro de los eucariontes fotosintéticos.

Con genomas de diversos tamaños, las Cianobacterias son los únicos procariontes que presentan diferenciación celular. Algunas pueden cambiar su estructura celular para utilizar versiones moleculares del nitrógeno (N<sub>2</sub>) e hidrógeno (H<sub>2</sub>) y/u oxidar moléculas complejas para obtenerlos. Pueden responder a concentraciones bajas de nitrógeno sin cambiar de forma y, además, como respuesta a variaciones de luz (intensidad y longitud de onda) u oligoelementos pueden sustituir y remodelar su maquinaria fotosintética en extremo. Pueden cambiar su forma para reducir su metabolismo como respuesta a condiciones de sustratos limitantes y acelerarlo cuando en el ambiente las concentraciones de sustratos necesarios para su reproducción son las adecuadas.

Pueden vivir en extremos ambientales, donde las concentraciones de sales y la alta temperatura dificultan la vida. Sus membranas celulares contienen mayoritariamente glicolípidos y sulfolípidos por lo que pueden subsistir en ecosistemas pobres en fosfatos.

Tiene asociaciones celulares de complejidad macroscópica; algunas son pequeñas y unicelulares, pero, proliferan desmesuradamente a escala global en los océanos donde existe un movimiento y mezcla de agua muy bajo y, además, el espectro de luz solar se encuentra filtrado. Las cianobacterias se encuentran en prácticamente cualquier nicho ecológico donde la luz y el agua líquida coexisten. Todas estas características las hacen potenciales modelos de estudio desde un nivel molecular hasta aplicaciones de bioingeniería.

Recientemente, la información genética de varias cianobacterias ha permitido dilucidar algunos mecanismos que les permiten proliferar y dispersarse. En este trabajo se analizó el aparato fotosintético, asociado a las membranas tilacoidales, de tres cianobacterias de nichos y morfologías distintos. Los modelos de estudio fueron: la cianobacteria marina unicelular, MIT9313, perteneciente al género *Prochlorococcus*, la cual prolifera en alta concentraciones (aunque constantes) de nutrientes, sin una mezcla mecánica importante donde el espectro de la luz es filtrado (límite de la zona eufótica de los océanos). MIT9313 se caracteriza por contener divinil clorofila *a* y *b* en lugar de clorofila *a* en sus fotosistemas, además de no poseer genes para la formación de un ficobilisoma como casi todas las cianobacterias estudiadas hasta el momento, en su lugar utiliza antenas distales de membrana o Pcb, estas proteínas hidrofóbicas tienen seis pases transmembranales y pertenecen a la familia de proteínas CP43; la cianobacteria formadora de filamentos cortos *Synechococcus* PCC 7002, que fue aislada de un hábitat con alto contenido de nutrientes (estanque de peces), la cual ha mostrado ser un buen modelo de estudio de laboratorio por su crecimiento relativamente rápido y su plasticidad para el análisis molecular y la bioingeniería; y la cianobacteria filamentosa fijadora de nitrógeno *Nodularia* sp. la cual fue aislada de un tapete microbiano obtenido de Cuatro Ciénegas, Coahuila, donde la concentración de agua y luz varían a lo largo del año, y la cual fue catalogada como CCM9.

Los cromóforos característicos de MIT9313 (divinil clorofila *a* y *b*, zeaxantina y  $\alpha$ -caroteno), fueron separados bioquímicamente y sus espectros de absorción y emisión fueron medidos en dos diferentes solventes. Su estructura química fue corroborada por espectros de masas y de fragmentación. En nuestras condiciones de crecimiento los cromóforos presentan una distribución heterogénea en los fotosistemas y su antena distal denominada PcbB. Zeaxantina y divinil clorofila *b* se encuentran asociados mayoritariamente a la antena distal PcbB;  $\alpha$ -caroteno y divinil clorofila *a* se asocian mayoritariamente a los fotosistemas.

En MIT9313 los fotosistemas pueden ser aislados formando supercomplejos solubilizando las membranas tilacoidales con el detergente neutro dodecil maltósido. El PSI forma un trímero y el PSII forma supercomplejos con la antena distal PcbB.

La distribución de divinil clorofilas fue establecida en zonas enriquecidas en cada uno de los componentes del aparato fotosintético separados con gradientes de sacarosa; encontrando que, la zona enriquecida de FSI, FSII y antena PcbB, las relaciones de Chl  $b_2$ /Chl  $a_2$  fueron  $1.98 \pm 0.16$ ,  $1.55 \pm 0.14$  y  $2.52 \pm 0.1$ , respectivamente. Lo anterior mostró que MIT9313 es la cianobacteria con mayor concentración de Chl  $b_2$  hasta ahora reportada. Reforzamos la conclusión de la tesis de maestría donde encontramos que la enzima oxido-reductasa FNR se encuentra asociada a los tilacoides y posiblemente forma un supercomplejo con la bomba de protones *b<sub>6</sub>f*.

*Synechococcus* PCC 7002 y *Nodularia* sp. CCM9 son cianobacterias que utilizan ficobilisomas como antena distal cuando crecen en medios mínimos completos. Sin embargo, en sus genomas existe la evidencia de que podrían utilizar antenas sustitutas del tipo IsiA (proteínas de la familia CP43), las cuales, en otras cianobacterias son expresadas bajo estrés por escasez de hierro en el medio (para CCM9 se utilizó el genoma de la cianobacteria *Nodularia spumigena* CY9414 la cual es muy cercana filogenéticamente). IsiA son proteínas asociadas a los tilacoides que unen clorofila *a* y carotenos. Se ha encontrado que esta proteína se asocia al PSI. En nuestro trabajo encontramos que disminuyendo la concentración de hierro en el medio de crecimiento de PCC 7002: 1) La absorción del ficobilisoma se ve disminuida. 2) El espectro de absorción de las membranas en la zona del rojo ( $Q_y$ ) se *corre* cinco nanómetros hacia el espectro azul. 3) Fue posible detectar a la proteína IsiA co-migrando con el PSI como trímero y monómero. 4) Se corroboró su identidad usando espectrometría de masas.

Para CCM9, se buscaron y encontraron genes de la familia CP43 utilizando *primers* diseñados con base en el genoma de CY9414. En condiciones normales de crecimiento el PSI de CCM9 no presenta una asociación trimérica, sino, dimérica y tetramérica. Cuando se disminuyó la concentración de hierro en su medio de crecimiento encontramos que: 1) La absorción del ficobilisoma se ve disminuida. 2) El espectro de absorción de las membranas en la zona del rojo ( $Q_y$ ) se *corre* siete nanómetros hacia el espectro azul. 3) La fluorescencia del PSI/PSII se ve modificada en condiciones normales de crecimiento con respecto a las condiciones con estrés por escasez de hierro. 4) Fue posible detectar la proteína IsiA. Sin embargo, cuando se utilizó una digestión basada en quimotripsina para el análisis por espectrometría de masas, tres proteínas de familia CP43, fueron detectadas además de IsiA.

Por otra parte, los tres modelos requirieron ajustes metodológicos a diferentes niveles como: tipo de ruptura celular, la solubilización de las membranas usando diferentes concentraciones del detergente dodecil maltósido, la detección e identificación de cromóforos minoritarios (para MIT9313), el uso de diferentes tratamientos de digestión para la identificación proteómica (CCM9) y las condiciones de crecimiento para generar un cambio en el aparato fotosintético.

## Abstract

Life as we know it requires a large amount of free energy to present the diversity and extension that we can observe on the planet. Photosynthesis is the mechanism that contributes mostly for it, transforming the energy of sunlight into usable energy for biochemical reactions. The energy supply through photosynthesis has allowed life to change in such a way that environmental factors have not stopped it. Photosynthetic organisms have varied metabolisms to proliferate and light collection systems; however, they have a basic system of energy transduction that has been generalized in both bacteria and eukaryotes. The organisms with more diverse photosynthetic capacity are those that extract electrons from the water and in doing so, they release molecular oxygen (oxophototrophes). Oxophototrophes use two transducer protein complexes called photosystems I and II (PSI and PSII), which are connected in series by a proton pump (complex of cytochromes *b<sub>6</sub>f*) and electron carriers in the membranes, cytoplasm and lumen, in addition to a cytoplasmic oxide-reductase (FNR), to generate equivalents of oxide-reduction and high energy bonds, both coupled to their metabolic pathways. This process is called oxygenic photosynthesis. This metabolism of the oxophototrophic organisms is within genomes of a few million base pairs as in the Cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* MED4, up to scale 150 times in the plant *Paris japonica*. This diversification is due to the massive transfer of photosynthetic information (genes) in an endosymbiotic event between an ancestor of cyanobacteria and an ancestor of photosynthetic eukaryotes.

For thousands of millions of years, the oxygenic photosynthesis has modeled our planet and the organisms with the oldest conserved designs (genomes) of this process, are the Cyanobacteria. With genomes of varied sizes, Cyanobacteria are the only prokaryotes that present cellular differentiation. Some can change their cellular structure to use molecular versions of nitrogen (N<sub>2</sub>) and hydrogen (H<sub>2</sub>) and / or oxidize complex molecules to obtain them. They can respond to low concentrations of nitrogen without changing shape and, in addition, as a response to variations in light (intensity and wavelength) or in trace elements concentrations they can replace and remodel their photosynthetic machinery. They can change their form to reduce their metabolism in response to conditions of limiting substrates and accelerate it when in the environment the concentrations of substrates necessary for their reproduction are adequate. They can live in extreme environmental conditions, where salt concentrations and high temperature make survival difficult.

Cyanobacteria membranes contain mostly glycol- and sulpholipids, so they can survive in ecosystems with low phosphates concentration. They have cellular associations of macroscopic complexity; some are small and unicellular, but, proliferate disproportionately on a global scale in the oceans where there is a movement and mix

of very low water and, in addition, the spectrum of sunlight is filtered. Cyanobacteria are found in virtually any ecological niche where light and liquid water coexist. All these characteristics make Cyanobacteria a potential model of study from a molecular level to bioengineering applications.

Recently, the genetic information of several cyanobacteria has made possible elucidating some mechanisms that allow them to proliferate and spread. In this work, the photosynthetic apparatus, associated with the thylakoid membranes, of three cyanobacteria from different niches and with different morphologies was analyzed. The study models were: the unicellular marine cyanobacterium cataloged as MIT9313, belonging to the *Prochlorococcus* genus, which proliferates in high concentrations (although constant) of nutrients, without an important mechanical mixture, and where the spectrum of light is filtered (limit of the zone euphotic of the oceans). MIT9313 is characterized by containing divinyl chlorophyll *a* and *b* instead of chlorophyll *a* in its photosystems, in addition to not having genes for the formation of a phycobilisome, like almost all Cyanobacteria studied so far. Instead it uses distal membrane antennas named Pcb. These hydrophobic proteins have six transmembrane helices and belong to the CP43 protein superfamily. The other cyanobacteria model was the short filament-forming *Synechococcus* PCC 7002, which was isolated from a high nutrient habitat (a fish pond), which has been shown to be a good model of laboratory studies because of its relatively rapid growth and its plasticity for molecular analysis and bioengineering. The last model was the nitrogen-fixing filamentous Cyanobacteria *Nodularia* sp. which was isolated from a microbial mat obtained from Cuatro Ciénegas, Coahuila, where the availability of water varied across the year, and which was cataloged as CCM9.

The characteristic chromophores of MIT9313 (divinyl chlorophyll *a* and *b*, zeaxanthin and  $\alpha$ -carotene) were separated biochemically and their absorption and emission spectra were measured in two different solvents. Its chemical structure was corroborated by mass and fragmentation spectra. In our growing conditions, chromophores have a heterogeneous distribution in the photosystems and their distal antenna called PcbB. Zeaxanthin and divinyl chlorophyll *b* are mostly associated with the distal PcbB antenna and  $\alpha$ -carotene and divinyl chlorophyll *a* are mostly associated with photosystems.

In MIT9313 the photosystems can be isolated forming supercomplexes solubilizing the thylakoid membranes with the neutral detergent dodecyl maltoside. The PSI forms a trimer and the PSII forms supercomplexes with the distal PcbB antenna. The distribution of divinyl chlorophylls was established in enriched zones for each one of the components of the photosynthetic apparatus, separated by centrifugation in gradients of sucrose; finding that, in the zone enriched of PSI, PSII and PcbB antenna, the ratios of Chl  $b_2$ /Chl  $a_2$  were  $1.98 \pm 0.16$ ,  $1.55 \pm 0.14$  and  $2.52 \pm 0.1$ , respectively. The above showed that MIT9313 is the cyanobacterium with the highest concentration of Chl

$b_2$  so far reported. We reinforce the conclusion obtained in the master's thesis, where we find that the enzyme oxidase-reductase FNR is a membrane-anchored protein and possibly forms a supercomplex with the proton pump *b<sub>6f</sub>*.

*Synechococcus* PCC 7002 and *Nodularia* sp. CCM9 are cyanobacteria that use phycobilisomes as a distal antenna when they grow in complete minimum media. However, in their genomes there is evidence that they could use substitute antennas of the IsiA type (proteins of the CP43 superfamily as PcbB), which, in other cyanobacteria, are expressed under stress by iron depletion in the medium (for CCM9 the genome used was of the cyanobacterium *Nodularia spumigena* CY9414 which is phylogenetically close). IsiA are proteins associated with thylakoids that bind chlorophyll *a* and carotenes. It has been found that this protein is associated with PSI.

In our work we found that decreasing iron concentration in the PCC 7002 growth medium: 1) The absorption of phycobilisome is diminished. 2) The absorption spectrum of the membranes in the red zone (Q<sub>y</sub>) is shifted five nanometers towards the blue. 3) It was possible to detect the IsiA protein co-migrating with the PSI as a trimer and monomer. 4) We confirmed its identity using mass spectrometry.

For CCM9, genes of the CP43 superfamily were searched using primers designed based on the CY9414 genome. We found *isiA* and *psbC/psaL* genes in CCM9 genome. Under normal growth conditions the PSI of CCM9 does not present a trimeric association, but dimeric and tetrameric can be detected. When the concentration of iron in its growth medium was reduced, we found that: 1) The absorption of phycobilisome is diminished. 2) The absorption spectrum of the membranes in the red area (Q<sub>y</sub>) moves seven nanometers towards the blue spectrum. 3) The fluorescence of the PSI / PSII is modified under normal conditions of growth with respect to the conditions with stress due to iron depletion. 4) It was possible to detect the IsiA protein. However, when a chymotrypsin-based digestion was used for mass spectrometric analysis, three CP43 superfamily proteins were detected in addition to IsiA.

On the other hand, the three models required methodological adjustments at different levels such as: type of cell rupture, solubilization of the membranes using different concentrations of the detergent dodecyl maltoside, detection and identification of minor chromophores (for MIT9313), the use of different treatments of digestion for proteomic identification (CCM9) and growth conditions to generate a change in the photosynthetic apparatus.

# Índice

Resumen .....	i
Abstract .....	iv
Índice .....	7
Abreviaturas .....	11
Índice de Figuras .....	13
Índice de Tablas .....	15
Índice de Figuras Suplementarias.....	17
Índice de Tablas Suplementarias .....	18
Introducción .....	19
Las cianobacterias. ....	19
La fotosíntesis oxigénica .....	22
La clorofila .....	26
Transiciones en el espectro de absorción de las clorofilas .....	30
Biosíntesis de las clorofilas .....	32
Carotenoides.....	36
Biosíntesis de carotenoides en cianobacteria .....	37
Fotosistemas .....	39
Fotosistema I .....	42
Fotosistema II.....	44
Antenas fotosintéticas.....	46
Transferencia de energía por resonancia en las antenas fotosintéticas: Teoría de Förster .....	49
Función de los carotenoides en las antenas fotosintéticas .....	51
Coordinación de clorofilas .....	52
Flujo de electrones impulsado por la luz.....	54
El Fe <sup>2+</sup> como nutriente.....	56
<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313 .....	57
<i>Nodularia</i> sp. CCM9 .....	59
<i>Synechococcus</i> PCC 7002 .....	61
Antecedentes .....	62
Justificación.....	65
Hipótesis.....	66
Objetivos generales .....	67

Objetivos particulares I .....	67
Objetivos particulares II .....	68
Objetivos particulares III.....	68
Materiales y métodos.....	70
Cultivos celulares .....	70
<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313 .....	70
<i>Synechococcus</i> PCC 7002 .....	70
<i>Nodularia sp.</i> CCM9 .....	71
Ruptura celular .....	71
Solubilización de membranas.....	72
Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	72
Geles Nativos claros (CN-PAGE).....	72
Geles desnaturalizantes 2-D SDS-PAGE .....	75
Gradiente de sacarosa.....	78
Primer gradiente .....	78
Segundo gradiente .....	78
Ensayos espectrofotométricos .....	78
HPLC.....	80
Determinación de clorofilas. ....	80
Búsqueda y secuenciación de los genes PsaA, PsaB, IsiA y PsbC/PsaL de <i>Nodularia sp.</i> CCM9.....	81
Espectrometría de masas .....	82
LC-MALDI MS-MS para proteómica.....	82
ESI-QTOF para cromóforos .....	83
Resultados .....	84
Parte I. Aislar el supercomplejo formado por el fotosistema II y la antena distal PcbB en la cianobacteria <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313.....	84
Complejos y supercomplejos en <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313. ....	84
Separación de los complejos fotosintéticos de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313 utilizando gradientes de sacarosa. ....	92
Identificación proteómica de los complejos proteicos separados por gradientes de sacarosa y resueltos por SDS-PAGE mediante espectrometrías de masas .....	95
Parte II. Encontrar la distribución de pigmentos Chl <i>a</i> <sub>2</sub> y Chl <i>b</i> <sub>2</sub> en los complejos fotosintéticos de la cianobacteria <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313.....	99
Extracción, separación e identificación de cromóforos de membranas de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313.....	99

Identificación de los cromóforos del aparato fotosintético de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313 usando espectrometría de masas.....	102
Cálculo de los coeficientes de extinción molar de la divinil clorofila <i>a</i> y divinil clorofila <i>b</i> .....	105
Determinación de la distribución de divinil clorofila <i>a</i> y divinil clorofila <i>b</i> en los gradientes de sacarosa .....	106
Parte III. Caracterización bioquímica del proteoma fotosintético constitutivo e inducible, (por estrés de escasez de Fe <sup>2+</sup> en el medio de crecimiento) de <i>Synechococcus</i> PCC 7002 y <i>Nodularia sp.</i> CCM9....	
Caracterización del aparato fotosintético constitutivo de <i>Synechococcus</i> PCC.7002 utilizando CN-PAGE, 2-D SDS-PAGE. ....	111
Inducción de la expresión de genes <i>isiA</i> utilizando medios mínimos de crecimiento con baja concentración de hierro para <i>Synechococcus</i> PCC 7002 .....	113
Caracterización del aparato fotosintético inducible por estrés por insuficiencia de Fe <sup>2+</sup> de <i>Synechococcus</i> PCC.7002. ....	114
Caracterización del aparato fotosintético constitutivo de <i>Nodularia sp.</i> CCM9.....	120
Identificación proteómica de los complejos del aparato fotosintético de <i>Nodularia sp.</i> CCM9.....	125
Comparación del uso de tripsina y quimotripsina en espectrometría de masas para la identificación de proteínas de membrana.....	134
Análisis <i>in silico</i> de las antenas fotosintéticas de <i>Nodularia spumigena</i> CY9414.....	136
Confirmación de la presencia de los genes <i>isiA</i> y <i>psbC/psaL</i> en <i>Nodularia sp.</i> CCM9. ....	139
Inducción de la expresión de genes <i>CBP</i> con baja concentración de hierro para <i>Nodularia sp.</i> CCM9 .....	140
Análisis espectroscópico del aparato fotosintético de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 .....	141
Complejos y supercomplejos en <i>Nodularia sp.</i> CCM9 en condiciones de escasez de hierro. ....	144
Discusión.....	152
Complejos y supercomplejos del aparato fotosintético de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313.....	152
Caracterización espectroscópica del aparato fotosintético de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313....	155
Zonas en el gradiente de sacarosa enriquecidas con los componentes del aparato fotosintético. ....	157
Cromóforos del aparato fotosintético de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313.....	158
Distribución de cromóforos en fracciones enriquecidas de los complejos y antena del aparato fotosintético de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313.....	160
El aparato fotosintético constitutivo e inducible de <i>Synechococcus</i> PCC.7002.....	162
Conclusiones .....	174
Sobre el aparato fotosintético de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313.....	174
Sobre el aparato fotosintético de <i>Synechococcus</i> PCC 7002.....	176
Sobre el aparato fotosintético de <i>Nodularia sp.</i> CCM9. ....	177
Bibliografía.....	181



## Abreviaturas

ADP	Adenosina difosfato
AP	Aloficocianina
ATP	Adenosina trifosfato
BChl	Bacterioclorofila
CBP	Chlorophyll binding protein
CCM9	<i>Nodularia spumigena</i> CCM9
Chl <i>a</i> <sub>2</sub>	Divinil clorofila <i>a</i>
Chl <i>b</i> <sub>2</sub>	Divinil clorofila <i>b</i>
Chl	Clorofila
Chlida	Clorofilida
<i>cit c</i> <sub>6</sub>	Citocromo <i>c</i> <sub>6</sub>
<i>cit b</i> <sub>6f</sub>	Complejo del citocromo <i>b</i> <sub>6f</sub>
CN	Gel nativo claro
CR	Centro de reacción
CY9414	<i>Nodularia spumigena</i> CY9414
DDM	n Dodecil β D Maltopiranósido (dodecil maltósido)
DOXP	Ruta metabólica para la síntesis de carotenos en cianobacteria basada en deoxi-xilulosa fosfato
e <sup>-</sup>	Electrón
FBS	Ficobilisoma
FBP	Ficobiliproteínas
Fd	Ferredoxina
Fe-S	Centro hierro azufre
FC	Ficocianina
FNR	Ferredoxina-NADP <sup>+</sup> oxido reductasa
FSI	Fotosistema I
FSII	Fotosistema II
g	Gramos
GPP	Geranil geranil pirofosfato
H <sup>+</sup>	Protón
ICT	Estado de transferencia intermolecular de carga
<i>isi</i>	Iron estrés induce gene
kDa	Kilo Daltones
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
MIT9313	<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313
MS	Espectrometría de masas
MS <sup>2</sup>	Análisis de fragmentos (iones) generados a partir de péptidos o metabolitos

NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
nm	Nanómetro
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PC	Plastocianina
PCC 7002	<i>Synechococcus</i> PCC 7002
<i>pcb</i>	Genes para proteínas que unen clorofila en Prochlorofitas.
Pcb	Protein a/b chlorophyll-binding
PE	Ficoeritrina
PQ	Plastoquinona
PQH <sub>2</sub>	Plastoquinol
P <sub>680</sub>	Centro de reacción del FSII en oxofotótrofos que absorbe a 680 nm
P <sub>700</sub>	Centro de reacción del FSI en oxofotótrofos que absorbe a 680 nm
Q	Digestión con quimotripsina
Q <sub>x</sub>	Transición del momento dipolar permitido sobre el eje x de la clorofila
Q <sub>y</sub>	Transición del momento dipolar permitido sobre el eje y de la clorofila
RP-HPLC	Reverse phase high performance liquid chromatography
SG	Gradiente de sacarosa
rRNA16S	Ácido ribonucleico ribosomal de la subunidad 16S
SDS	Dodecil sulfato de sodio
T	Digestión con tripsina
uma	Unidad de masa atómica

## Índice de Figuras

Fig. 1. Árbol filogenético de cianobacteria. ....	21
Fig. 2. Complejos proteicos que participan en la fotosíntesis oxigénica en cianobacteria. ....	25
Fig. 3 Tipos de clorofilas y sus sustituyentes. ....	27
Fig. 4 Radiación electromagnética presente en la biosfera y distribución de los pigmentos fotosintéticos. ....	28
Fig. 5 Espectros de absorción de divinil clorofila a y b. ....	31
Fig. 6 Biosíntesis de la clorofila a y b. ....	35
Fig. 7 Biosíntesis de los principales carotenos en cianobacteria. ....	36
Fig. 8 Síntesis de carotenoides en <i>Prochlorococcus marinus</i> MED4. ....	38
Fig. 9 Cofactores de los centros de reacción tipo I y II. ....	40
Fig. 10 Centros de reacción y antenas proximales de los fotosistemas en cianobacteria. a. CR y antenas proximales del FSI. ....	41
Fig. 11 Subunidades del fotosistema I. ....	43
Fig. 12 Subunidades del fotosistema II. ....	45
Fig. 13 Modelo del ficobilisoma hemidiscoidal de <i>Synechococcus</i> PCC 7335. ....	47
Fig. 14 Topología de las proteínas de la superfamilia CP43-like. ....	48
Fig. 15 Esquema de niveles y transferencia de energía entre la peridina y la clorofila a. ....	52
Fig. 16 Interacciones de la clorofila a y b con proteínas antena en plantas. ....	54
Fig. 17 Flujo de electrones impulsado por la luz. ....	55
Fig. 18 Espectros de absorción de divinil clorofilas (negra) y la clorofila a (azul). ....	59
Fig. 19 Micrografía de <i>Nodularia</i> sp. CCM9. ....	60
Fig. 20 Árbol filogenético de proteínas que une clorofila (CBPs). ....	63
Fig. 21 Micrografías de fotosistemas asociados a proteínas antenas distales en <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313. ....	64
Fig. 22 Clear Native PAGE y su resolución en una segunda dimensión SDS-PAGE de complejos solubilizados de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313. ....	85
Fig. 23. Marcadores de peso molecular para la determinación de masas moleculares grandes. Mitocondrias de corazón de rata fueron solubilizadas y los complejos de la cadena de transporte de electrones fue separada utilizando CN-PAGE. ....	87
Fig. 24 Gradiente de sacarosa de membranas solubilizadas de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313. ...	92
Fig. 25 Espectros de absorción de fracciones del gradiente de sacarosa de membranas solubilizadas de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313. ....	93
Fig. 26 Análisis del gradiente de sacarosa de membranas solubilizadas de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313. ....	94
Fig. 27 Análisis de subunidades de los complejos del aparato fotosintético de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313 separados por gradientes de sacarosa y SDS-PAGE. ....	96
Fig. 28 Cromatograma de cromóforos separados por HPLC extraídos de membranas de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313. ....	100
Fig. 29 Espectros de absorción de cromóforos de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313 separados por HPLC. ....	100
Fig. 30 Espectros de absorción de divinil clorofila a y b. ....	101
Fig. 31 Espectros de masa y fragmentación de las divinil clorofilas. ....	103
Fig. 32 Espectros de fragmentación de espectrometría de masas de la zeaxantina y $\alpha$ -caroteno, extraídos de tilacoides de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313. ....	104
Fig. 33 Coeficientes de extinción molar de divinil clorofila a y b en acetona al 80%. ....	106
Fig. 34 Relación de concentraciones de divinil clorofila a y b. ....	107
Fig. 35 Análisis de complejos por segundo gradiente. ....	108
Fig. 36 Perfil de las fracciones del segundo gradiente de sacarosa. ....	109
Fig. 37. Geles nativos claros de fracciones de los gradientes de sacarosa (1er y 2do). ....	110

Fig. 38. CN-PAGE de membranas de <i>Synechococcus</i> PCC 7002 solubilizadas con dodecil maltósido en condiciones normales de crecimiento.....	111
Fig. 39. 2-D SDS-PAGE de membranas de <i>Synechococcus</i> PCC 7002 en condiciones normales de crecimiento.....	112
Fig. 40. Espectro de absorción de células completas de <i>Synechococcus</i> PCC 7002 crecidas en medio completo (curva azul) y con deficiencia de hierro (curva negra).....	114
Fig. 41. Complejos del aparato fotosintético de <i>Synechococcus</i> PCC 7002 en dos condiciones de crecimiento separadas por CN-PAGE.....	115
Fig. 42. 2-D SDS-PAGE de complejos del aparato fotosintético de <i>Synechococcus</i> PCC 7002 en dos condiciones de crecimiento.....	117
Fig. 43 CN-PAGE de membranas de <i>Nodularia</i> sp. CCM9 solubilizadas con distintas concentraciones de dodecil maltósido con tinción de Coomassie blue.....	121
Fig. 44 Migración comparativa de Marcadores solubles y Marcadores hidrofóbicos.....	122
Fig. 45 Comparación de la movilidad electroforética de complejos de la cadena respiratoria (MCR) de mitocondria y marcadores de peso molecular solubles (solubles) en geles CN-PAGE.....	123
Fig. 46 2-D SDS-PAGE de los complejos del aparato fotosintético <i>Nodularia</i> sp. CCM9.....	124
Fig. 47 Clear Native PAGE y su resolución en una segunda dimensión SDS-PAGE de complejos solubilizados de <i>Nodularia</i> sp. CCM9.....	126
Fig. 48 Representación gráfica de los péptidos detectados por espectrometría en la banda 3 del CN-PAGE de <i>Nodularia</i> sp. CY9414.....	135
Fig. 49 Modelo tridimensional de la proteína predicha para el grupo de genes CBPV.....	137
Fig. 50 Árbol filogenético formado por los genes que predicen la proteína PsbC/psaL (grupo CBPV) en el grupo de cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos.....	137
Fig. 51 Clúster de genes isiA, isiB y proteínas homologas a CP43 (CBP).....	138
Fig. 52 Productos de PCR de los genes isiA y psbC/psaL de <i>Nodularia</i> sp. CCM9.....	139
Fig. 53 Espectro de absorción de células de <i>Nodularia</i> sp. CCM9 en condiciones normales de crecimiento (azul) y con escasez de hierro (1:210) en el medio de crecimiento (negro).....	140
Fig. 54 Análisis espectrofotométrico de células de <i>Nodularia</i> sp. CCM9 en condiciones de crecimiento normal.....	142
Fig. 55 Análisis espectrofotométrico de células de <i>Nodularia</i> sp. CCM9 en condiciones de bajo hierro.....	143
Fig. 56 Complejos del aparato fotosintético de <i>Nodularia</i> sp. CCM9 en dos condiciones de crecimiento separadas por CN-PAGE.....	144
Fig. 57 CN-PAGE y 2-D SDS-PAGE del aparato fotosintético de membranas de <i>Nodularia</i> sp.....	145
Fig. 58 Modelos de los supercomplejos del aparato fotosintético de tres diferentes cianobacterias....	180

## Índice de Tablas

Tabla 1. Cantidad de átomos de Fe <sup>2+</sup> en cada enzima o acarreador en el flujo de electrones impulsado por luz en cianobacterias..	56
Tabla 2. Marcadores de peso molecular usados en CN-PAGE.	73
Tabla 3. Concentraciones finales para gradientes de poliacrilamida.	74
Tabla 4. Composición de buffers para electroforesis clear native (CN-PAGE).	74
Tabla 5. Marcadores de peso molecular para 2-D SDS-PAGE y SDS-PAGE.	75
Tabla 6. Volúmenes finales para geles SDS-PAGE. El volumen final es suficiente para formar 1 gel en placas de vidrio de 14 x 18 cm.	76
Tabla 7. Solución digestora 2X para proteínas. A partir de esta solución se obtiene la solución digestora 1X, tomando una relación 1:1 con agua bidestilada.	77
Tabla 8. Identificación proteómica de bandas B1 a B10 del gel CN-PAGE (Fig. 22a) utilizando espectrometría de masas.	89
Tabla 9. Identificación proteómica de bandas B* a la B11 del gel CN-PAGE (Fig. 34a) utilizando espectrometría de masas.	91
Tabla 10. Identificación proteómica de subunidades del FSI en las fracciones del gradiente de sacarosa separadas por SDS-PAGE.	97
Tabla 11. Identificación proteómica de subunidades del FSII en las fracciones del gradiente de sacarosa separadas por SDS-PAGE.	98
Tabla 12. Identificación proteómica de subunidades del citocromo b <sub>6</sub> f, FNR y F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATP Sintasa en las fracciones del gradiente de sacarosa separadas por SDS-PAGE.	98
Tabla 13. Identificación proteómica de la banda del gel CN-PAGE correspondiente a la condición de crecimiento con medio completo de <i>Synechococcus</i> PCC 7002 (+Fe) <sup>a</sup> .	118
Tabla 14. Identificación proteómica de la banda del gel CN-PAGE correspondiente a la condición de crecimiento con disminución de hierro en el medio de crecimiento de <i>Synechococcus</i> PCC 7002 (-Fe) <sup>a</sup> .	119
Tabla 15. Identificación proteómica de banda 1 en CN-PAGE de <i>Nodularia</i> sp. CCM9 utilizando quimotripsina.	127
Tabla 16. Identificación proteómica de banda 1 en CN-PAGE de <i>Nodularia</i> sp. CCM9 utilizando tripsina.	128
Tabla 17. Identificación proteómica de banda 2 en CN-PAGE de <i>Nodularia</i> sp. CCM9 utilizando quimotripsina.	129
Tabla 18. Identificación proteómica de banda 2 en CN-PAGE de <i>Nodularia</i> sp. CCM9 utilizando tripsina.	130
Tabla 19. Identificación proteómica de banda 3 en CN-PAGE de <i>Nodularia</i> sp. CCM9 utilizando quimotripsina.	131

Tabla 20. Identificación proteómica de banda 3 en CN-PAGE de <i>Nodularia</i> sp. CCM9 utilizando tripsina. .....	132
Tabla 21. Identificación proteómica de la banda 1 en CN-PAGE de <i>Nodularia</i> sp. CCM9 -Fe (Fig. 57) utilizando quimotripsina.....	147
Tabla 22. Identificación proteómica de la banda 1 en CN-PAGE de <i>Nodularia</i> sp. CCM9 - (Fig. 57) utilizando tripsina. ....	148
Tabla 23. Identificación proteómica de la banda 2 en CN-PAGE de <i>Nodularia</i> sp. CCM9 -Fe (Fig. 57) utilizando quimotripsina.....	149
Tabla 24. Identificación proteómica de la banda 2 en CN-PAGE de <i>Nodularia</i> sp. CCM9 -Fe (Fig. 57) utilizando tripsina. ....	149
Tabla 25. Identificación proteómica de la banda 3 en CN-PAGE de <i>Nodularia</i> sp. CCM9 -Fe (Fig. 57) utilizando quimotripsina.....	150
Tabla 26. Identificación proteómica de la banda 3 en CN-PAGE de <i>Nodularia</i> sp. CCM9 -Fe (Fig. 57) utilizando tripsina. ....	151

## Índice de Figuras Suplementarias

Fig. S1 Espectros de fluorescencia de emisión a 77 K de membranas solubilizadas de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313.	188
Fig. S2 Espectros de fluorescencia de emisión a 77 K de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313 y <i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803.	188
Fig. S3 Espectros de fragmentación de carotenoides no identificados, extraídos de tilacoides de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313.	189
Fig. S4 Espectros de fluorescencia a 77 K de la fracción 3 de gradiente de sacarosa de membranas solubilizadas de <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313.	190
Fig. S5. Árbol filogenético de las proteínas CBP (CP43-like) de las cianobacterias <i>Leptolyngbya sp.</i> cepa JSC-1 y <i>Nodularia spumigena</i> CY9414.	191

## Índice de Tablas Suplementarias

Tabla S1. Identificación proteómica de banda 4 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando quimotripsina.	192
Tabla S2. Identificación proteómica de banda 4 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando tripsina.	192
Tabla S3. Identificación proteómica de banda 5 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando quimotripsina.	193
Tabla S4. Identificación proteómica de banda 5 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando tripsina.	194
Tabla S5. Identificación proteómica de banda 6 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando quimotripsina.	195
Tabla S6. Identificación proteómica de banda 6 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando tripsina.	195
Tabla S7. Identificación proteómica de banda 7 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando quimotripsina.	196
Tabla S8. Identificación proteómica de banda 7 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando tripsina.	196
Tabla S9. Identificación proteómica de banda 8 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando quimotripsina.	197
Tabla S10. Identificación proteómica de banda 8 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando tripsina.	198
Tabla S11. Identificación proteómica de banda 9 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando quimotripsina.	200
Tabla S12. Identificación proteómica de banda 9 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando tripsina.	200
Tabla S13. Identificación proteómica de banda 10 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando quimotripsina.	201
Tabla S14. Identificación proteómica de banda 10 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando tripsina.	201
Tabla S15. Identificación proteómica de banda 11 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando quimotripsina.	202
Tabla S16. Identificación proteómica de banda 11 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando tripsina.	202
Tabla S17. Identificación proteómica de banda 12 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando quimotripsina.	203
Tabla S18. Identificación proteómica de banda 12 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando tripsina.	204
Tabla S19. Identificación proteómica de banda 13 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando quimotripsina.	204
Tabla S20. Identificación proteómica de banda 13 en CN-PAGE de <i>Nodularia sp.</i> CCM9 utilizando tripsina.	2044

## Introducción

### Las cianobacterias.

Las cianobacterias son organismos procariotes fotoautótrofos, gramnegativos, que han prevalecido en la tierra durante al menos 2,800 millones de años. Se les atribuye la generación de la atmosfera actual y por lo tanto la posibilidad de la generación controlada de fuego ( $O_2$  como comburente), la protección necesaria que requirieron los organismos para la colonización de los continentes ( $O_3$ ) y permitir el desarrollo de sistemas y órganos complejos como el vuelo del colibrí y el cerebro humano (fosforilación oxidativa), además de la formación de los depósitos de hierro que hoy explotamos ( $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ ). Son los únicos procariotas que presentan diferenciación celular. Al modificar su estructura celular pueden preservarse en condiciones de escasez de nutrientes, compartamentalizar la fijación de nitrógeno, formar colonias y dispersarse. Contribuyen de manera importante a los ciclos del carbono y nitrógeno; contribuyen con el ~50% de la producción fotosintética global, y tan solo el género de cianobacterias marinas *Trichodesmium* fija entre 20 y 40 Tg ( $\times 10^{12}$  g) de nitrógeno al año (**Westberry & Siegel, 2006**).

Una teoría ampliamente aceptada sugiere que una antigua cianobacteria realizó una endosimbiosis con un antiguo eucarionte dando origen al ancestro de las algas y plantas en un evento que ocurrió una sola vez. Este organismo utilizó la capacidad fotosintética de la antigua cianobacteria para obtener energía, transformándola en el organelo que hoy llamamos cloroplasto en algas verdes, rodoplasto en algas rojas y cianelas en glaucofitas. En posteriores simbiosis (eucarionte-eucarionte) se heredó a otros organismos la misma capacidad de las cianobacterias para realizar la fotosíntesis oxigénica como es el caso de los euglénidos (provenientes de algas verdes) y los la mayoría de los dinoflagelados (provenientes de algas rojas). Existen organismos que han tenido otros eventos endosimbióticos y han perdido la capacidad fotosintética, pero conservan vestigios membranales de los organelos fotosintéticos.

Las cianobacterias presentan una gran diversidad morfológica, siendo: unicelulares, filamentosas o ramificadas. Algunas viven en agua dulce, agua salobre o agua salada; pueden ser termo tolerantes, hiper salinas e incluso mantener una relación

simbiótica en líquenes y algunos animales como caracoles marinos. Clásicamente, las cianobacterias se dividen taxonómicamente en 5 grupos con base en su morfología y la forma en que se multiplican (**Rippka et al., 1979**).

La subdivisión I está constituida por las Chroococcales, pueden ser células solas o colonias y su reproducción es por fisión binaria, una a la vez. La subdivisión II son las Pleurocapsales, estas se reproducen por fusiones múltiples en los tres planos, creando células hijas denominadas baeocitos.

La subdivisión III es denominada Oscillatoriales, son cianobacterias filamentosas que no presentan diferenciación celular. La subdivisión IV o Nostocales, comprende células filamentosas que presentan diferenciación celular y pueden fijar nitrógeno. La subdivisión V o Stigonematales, presentan todas las características de la subdivisión IV, pero, además, pueden ser ramificadas debido a que pueden dividirse en más de un plano.

Otra forma de relacionar la diversidad filogenética de las cianobacterias consiste en alinear la secuencia de bases del RNA ribosomal 16S (rRNA16S) y/o secuencia de aminoácidos de proteínas constitutivas (*house-keeping*). Un ejemplo de árbol filogenético derivado de un alineamiento de proteínas house-keeping se presenta en la **Fig. 1**. Puede observarse que la clasificación morfológica clásica de **Rippka et al., (1979)**, se sobreponen en algunos casos al estudio genético de **Shih et al., (2013)** el cual alinea 31 secuencias de proteínas muy conservadas, además del rRNA 16S, de las 126 especies de cianobacterias que cuentan con su genoma completamente secuenciado. Para las cianobacterias unicelulares, por ejemplo, se demuestra que no son monofiléticas y que la característica de uni- o multicelular no apareció una sola vez en la diversificación de las cianobacterias (triángulos numerados del 1 al 8, **Fig. 1**).

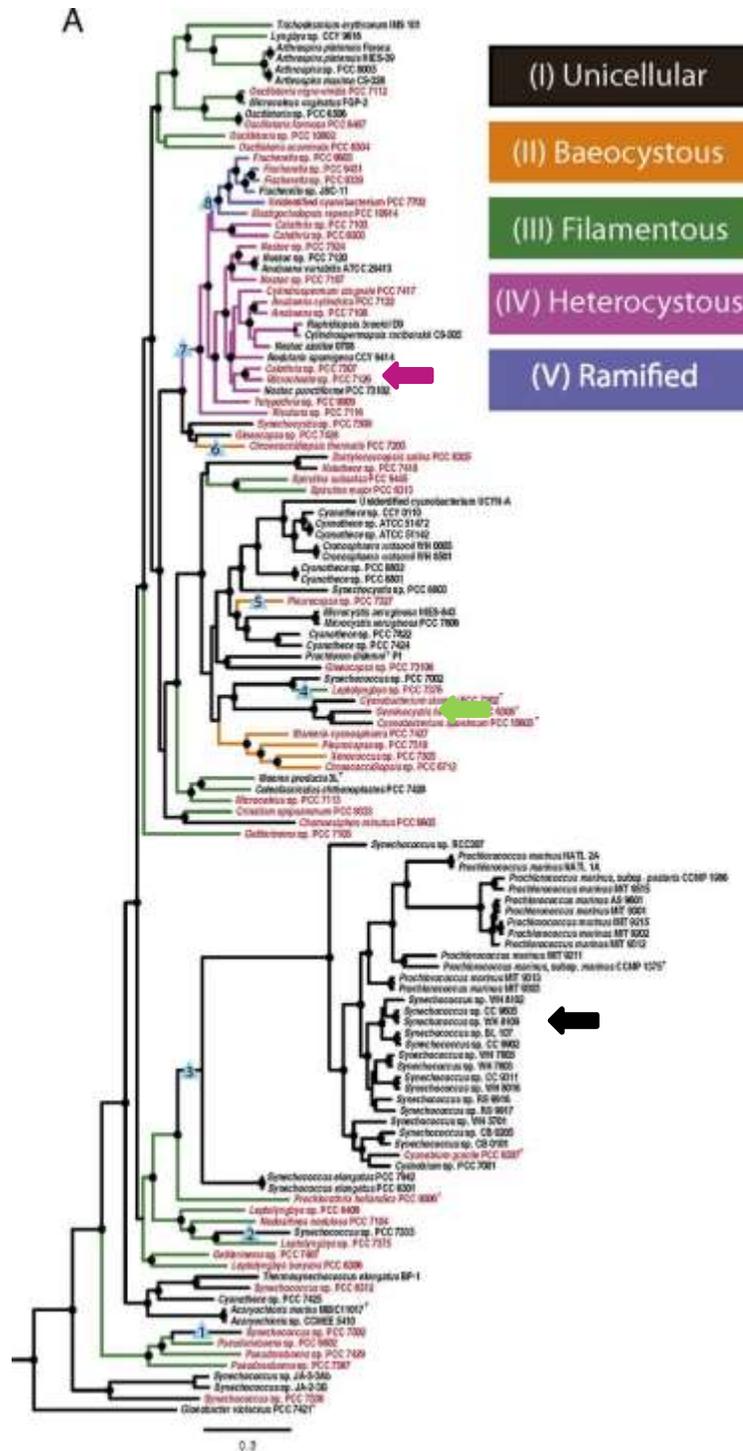


Fig. 1. Árbol filogenético de cianobacterias. El color de la rama indica el tipo de morfología según la clasificación clásica de Rippka. Las especies en rojo y triángulos numerados del uno al ocho indican las especies secuenciadas por el grupo de trabajo de Kerfeld y las transiciones de morfología, respectivamente (Shih, et al., 2012). Las flechas indican la posición de las especies que se utilizaron para este estudio, negra MIT9313, verde PCC 7002 y en rosa la cianobacteria más cercana a CCM9, CY9414.

Recientemente se han caracterizado cianobacterias con la capacidad de remodelar su aparato fotosintético como respuesta a estrés por escasez de nutrientes, modificaciones de temperatura y tipo de luz disponible en sus ecosistemas. Estas remodelaciones incluyen la sustitución de antenas, fotosistemas completos e inclusive cromóforos, mostrando una gran diversidad de estrategias y recursos para hacer uso de su capacidad fotosintética en condiciones adversas o ecosistemas distintos.

### **La fotosíntesis oxigénica.**

La fotosíntesis oxigénica (FO) es el proceso bioquímico más eficiente de transducción de energía solar a energía química, la cual es usada para formar y romper enlaces en el metabolismo de los organismos fotosintéticos y de incontables seres vivos a través de las cadenas tróficas. Las cianobacterias y sus descendientes simbióticos la realizan (oxofotótrofos). A lo largo de miles de años han desarrollado distintos mecanismos de captación de luz, sin embargo, el sistema básico de escisión del agua, el centro de reacción y los aceptores en el flujo del electrón se encuentran muy conservados en todos estos organismos. Una y otra vez se ha puesto de manifiesto la plasticidad del proceso completo de la fotosíntesis oxigénica por organismos que se han adaptado a prácticamente todos los climas y condiciones en la tierra donde hay agua y luz (**Blankenship, 2010**).

La FO requiere de dos fotosistemas trabajando en serie, donde un flujo de electrones impulsado por la luz se encuentra conectado por el complejo de citocromos b<sub>6</sub>f (cit b<sub>6</sub>f), la fuente de electrones es el agua y dichos electrones son acumulados en moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, las cuales son muy estables y son denominadas equivalentes de oxido-reducción. Los complejos proteicos que participan en la FO en cianobacteria se ilustran en la **Figura 2**.

El primer paso de la FO consiste en la captación de la energía luminosa y su posterior transferencia a los fotosistemas. Las cianobacterias poseen pigmentos (proteínas que unen cromóforos) cuyo espectro de absorción y de emisión específico les permite captar y transferir la cantidad exacta de energía hacia los fotosistemas y realizar una separación de cargas que propicia un flujo de electrones.

La separación de cargas se realiza en los llamados “centros de reacción” en el interior de los fotosistemas. Consisten en un par especializado de clorofilas finamente coordinados por las proteínas del centro de reacción. Cuando un cuanto de energía llega al par especializado se promueve la transferencia de un electrón a un primer aceptor. La transferencia de este electrón sigue una cuesta de un potencial de oxidación-reducción negativo a uno positivo. Existe un par especializado para cada fotosistema. El fotosistema I (FSI) cuenta con un dímero de epímeros de clorofila *a* cuya diferencia de absorción entre sus estados reducido y oxidado se puede identificar a 700 nm y por ello es llamado P700.

Para el fotosistema II (FSII) el par especializado está compuesto por un dímero de clorofila *a* y la diferencia de absorción entre su estado reducido y oxidado se puede identificar a 680 nm y por ello es denominado P680. El flujo del electrón deja un “hueco” en el par especial de clorofilas. Esta deficiencia de un electrón es cubierta por la transferencia de un nuevo electrón proveniente de un arreglo de cuatro átomos de manganesos y uno de calcio (4Mn-Ca) vía un residuo de tirosina (**Fromme and Grotjohann, 2008**). Este proceso se repite cuatro veces, un electrón a la vez, acumulando cuatro equivalentes de oxidación-reducción en la molécula de 4Mn-Ca.

Una vez que se llega a este estado de oxidación el potencial de oxidación-reducción es capaz de despojar de sus electrones a dos moléculas de agua, liberando oxígeno molecular y protones en el lumen del tilacoide. Para cubrir el hueco electrónico del FSI, los electrones son provistos por las proteínas solubles plastocianina (PC) o por el citocromo  $c_6$  (cit  $c_6$ ).

Estos electrones provienen del evento fotoquímico que se lleva a cabo en P680. Cuando el último aceptor del FSII, la plastoquinona, se encuentra reducida (por dos electrones), esta se libera del fotosistema y se acumula en la bicapa lipídica de los tilacoides. Al ser hidrofóbica, esta molécula difunde entre los sulfolípidos hasta que es oxidada por el citocromo *b<sub>6</sub>f* (cit *b<sub>6</sub>f*).

El complejo de cit *b<sub>6</sub>f* cataliza la oxidación y reducción de quinonas para bombear protones desde el citoplasma al lumen del tilacoide y transfiere los electrones provenientes de las quinonas hacia los acarreadores proteicos en el lumen. La PC y el cit *c<sub>6</sub>* son los encargados de transferir los electrones del cit *c<sub>6</sub>* hacia P700 (algunas cianobacterias poseen genes para ambas proteínas y alguna solo uno de los dos). Previamente el evento fotoquímico en P700 transfirió el electrón a través de una serie de aceptores desde el lado luminal al lado citoplasmático del tilacoide, donde una proteína hidrosoluble llamada ferredoxina es reducida. La ferredoxina puede llevar los electrones como poder reductor a otras rutas metabólicas, sin embargo, este poder reductor también es acumulado al reducir la molécula NADP<sup>+</sup>. Este proceso requiere de una proteína oxido-reductora que transfiere los electrones de la ferredoxina al NADP<sup>+</sup> la cual es llamada FNR (Ferredoxina- NADP<sup>+</sup> reductasa)

Los electrones que han sido transportados a través de los complejos proteicos y los acarreadores generan un potencial protón-motriz entre la cara luminal y la cara citoplasmática de los tilacoides. La escisión del agua (4 H<sup>+</sup>), la reducción de la plastoquinona en el lado citoplasmático y su oxidación en el lado luminal por el cit *b<sub>6</sub>f*, la reducción del NADP<sup>+</sup>, contribuyen a la generación de una diferencia de pH la cual es disipada por la ATP Sintasa generando Adenosina trifosfato (ATP) en el proceso. Estos equivalentes energéticos se distribuirán en toda la célula y serán utilizados por rutas anabólicas como la fijación del CO<sub>2</sub> en forma de hidratos de carbono.

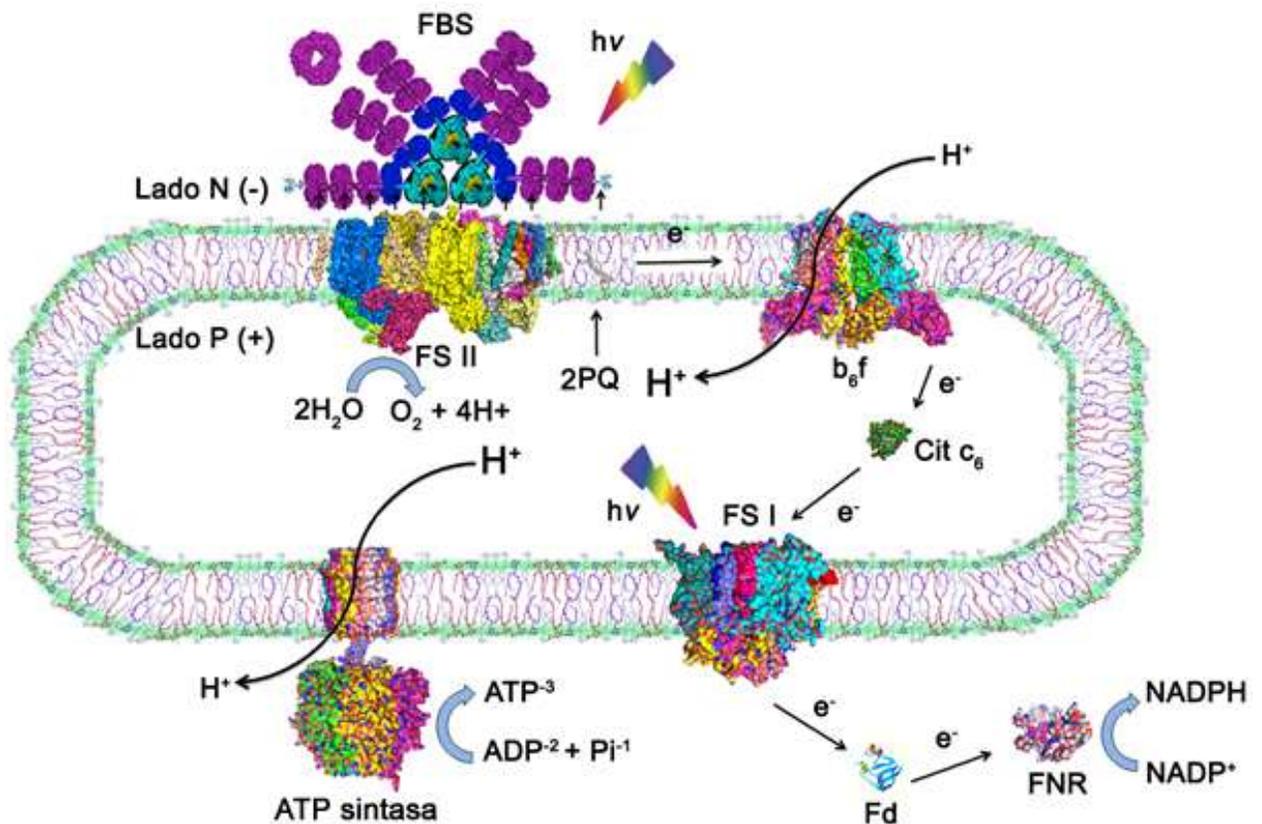
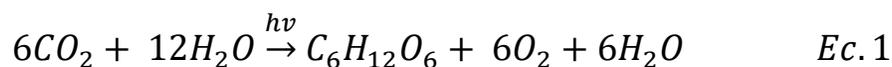


Fig. 2. Complejos proteicos que participan en la fotosíntesis oxigénica en cianobacterias. Se esquematiza el flujo de  $e^-$  impulsado por la luz, los complejos proteicos y moléculas que participan en este proceso (ver texto). Las abreviaturas significan: FBS, ficobilisoma;  $h\nu$ , energía de la luz; FSII, fotosistema II; FSI, fotosistema I;  $e^-$ , electrones; PQ, plastoquinonas;  $b_6f$ , complejo de citocromos  $b_6f$ ;  $c_6$ , citocromo  $c_6$ ; Fd, ferredoxina; FNR, ferredoxina-NADP<sup>+</sup> oxidorreductasa; ATP y ADP adenosinas trifosfato y difosfato, respectivamente; NADP<sup>+</sup> y NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado y reducido, respectivamente; H<sup>+</sup>, protones. Modificado de **Barrera-Rojas et al., 2016**.

La ecuación global que describe a la fotosíntesis oxigénica simplifica el proceso de fijación de carbono. Al CO<sub>2</sub> se le adicionan electrones que son *arrancados* de moléculas de agua para formar azúcares y cuyo producto de desecho es el oxígeno molecular. La energía de este proceso es proporcionada por la luz solar (Ec. 1).



## La clorofila

La clorofila es un cromóforo ubicuo entre los oxofotótrofos, es una molécula tetrapirrólica, de 5 estructuras cíclicas y un átomo de magnesio coordinado por cuatro nitrógenos cuyos espectros de absorción varían dependiendo de los tipos de sustituyentes y su estado de oxidación (**Fig. 3**). Tiene la capacidad de absorber la energía contenida en la luz y transferirla hacia los centros de reacción de los fotosistemas donde un *par especial* de clorofilas realizan la separación de cargas e inician el flujo de electrones a través de la membrana tilacoidal. Los cambios en los sustituyentes del macrociclo de la clorofila modifican sus características absorptivas. En la **figura 3** se muestran los cambios en los sustituyentes y la modificación de su probabilidad de absorción; la clorofila *a* (Chl *a*), por ejemplo, tiene un máximo de absorción a 665 nm, si el grupo metilo en el carbono 7 (R7) se intercambia por un formilo, se obtiene clorofila *b* (Chl *b*) y la absorción máxima se modifica en 13 nm (652 nm).

Los primeros organismos fotosintéticos utilizaban un tipo de clorofila denominada bacterioclorofila la cual absorbe luz de menor energía (mayor longitud de onda) que la clorofila de los oxofotótrofos. La Chl *a* puede alcanzar un potencial de oxido-reducción que es capaz de sustraer electrones del agua vía la molécula de 4Mn-Ca en el FSII. El sistema de electrones  $\pi$  deslocalizados en la estructura de la Chl *a*, le confiere la cualidad de absorber luz en dos regiones del espectro visible: la región de Soret entre 410 y 435 nm y la región del rojo entre 660 y 665 nm (la absorción varía dependiendo del solvente en el que se mida). La Chl *a* tiene altos coeficientes de extinción molar ( $\sim 10^5 M^{-1} cm^{-1}$ ) lo que le permite absorber eficientemente la luz en estas longitudes de onda generando un estado excitado de larga duración. Todas estas características son esenciales para poder utilizar la energía del sol presente en la biosfera y llevar a cabo una reacción fotoquímica (**Green, 2003; Hooper, 2012**).

Las clorofilas no están libres en las membranas tilacoidales, su foto-reactividad es muy alta y pueden causar daño oxidativo, por lo que se encuentran embebidas en proteínas que las mantienen fijadas dentro de las membranas de los tilacoides.

A lo largo de ~2, 800 millones de años, la evolución ha seleccionado secuencias de aminoácidos que mantienen en una posición *rigurosa* a las clorofilas y cofactores de los centros de reacción, cualquier cambio modifica las longitudes de onda de absorción y la transferencia de energía y de electrones en los fotosistemas, por lo que algunos autores mencionan que los cofactores de la fotosíntesis en los fotosistemas se encuentran finamente *sintonizados*. Cambios *minúsculos* en la secuencia de las proteínas provocan la pérdida de una capacidad fotosintética eficiente, por lo que los centros de reacción se encuentran muy conservados en todos los organismos que realizan fotosíntesis, desde las cianobacterias hasta las plantas superiores.

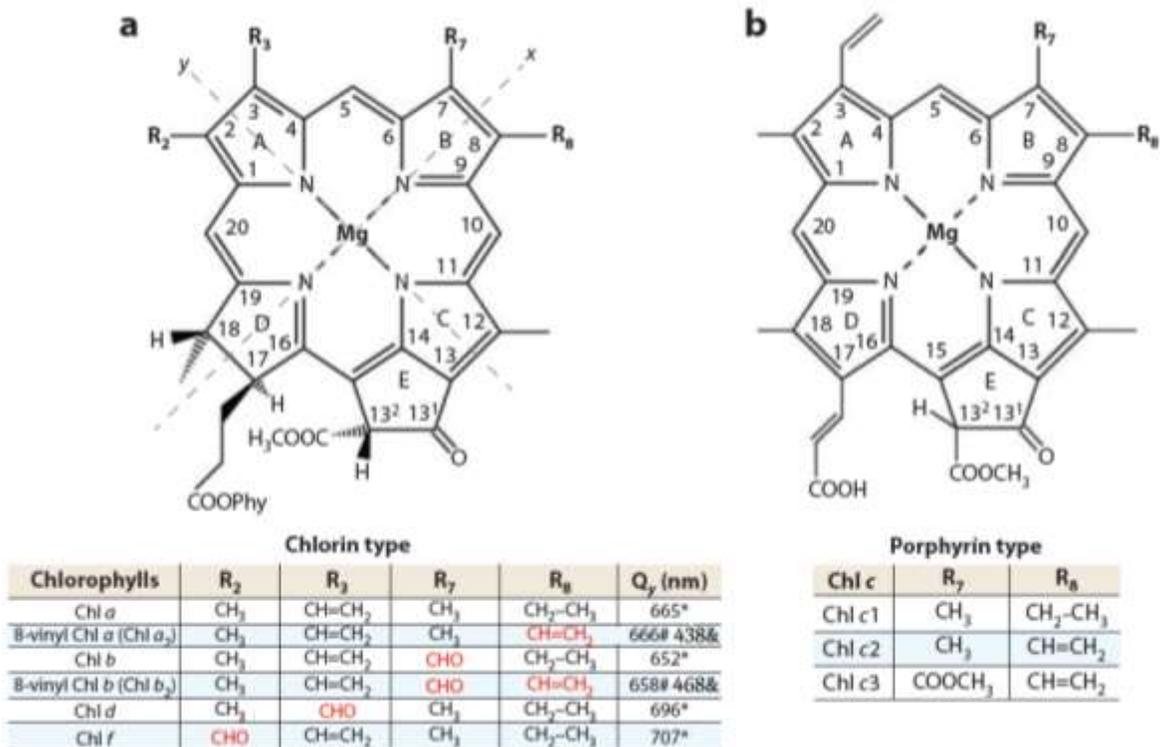


Fig. 3 Tipos de clorofilas y sus sustituyentes. a) Tipo de clorinas, tiene una cadena hidrocarbonada o fitol en el anillo D y los sustituyentes que corresponden para cada clorofila. Q<sub>y</sub> es la longitud de onda de máxima absorción en la orientación espacial “y” de la nube electrónica. b) Tipo porfirina, no tienen fitol y tienen un doble enlace entre C17 y C18, correspondiente a las clorofilas tipo c. \*Mediciones hechas en metanol al 100%, # Mediciones hechas en una mezcla de metanol-acetona, & Soret en acetona 80% (modificado de **Chen et al., 2014**).



Una forma de clasificar a los procariotas oxofotótrofos es por el tipo de cromóforos que contienen sus holoproteínas (proteínas que unen cromóforos). Hasta antes de 1977 las cianobacterias eran bacterias que contenían Chl *a* y ficobiliproteínas, (estos dos pigmentos y su fluorescencia les confieren el tono cian con el que eran comúnmente asociadas) y el grupo de los *Prochlorales* contenía los demás organismos procariotas que realizaban fotosíntesis oxigénica y que además de clorofila *a* contenían clorofila *b* en lugar de ficobiliproteínas. Dos organismos son representativos de este grupo taxonómico; *Prochloron* (Lewin, 1975), un simbiote del invertebrado *Ascidias* y *Prochlorotrix* (Burger-Wiersma et al. 1986), una bacteria filamentosa de vida libre.

En 1988 la Dra. Penny Chisholm aisló un organismo marino muy pequeño que contenía de igual manera un tipo de clorofila *b* (divinil clorofila *b* ó Chl *b*<sub>2</sub>) además de divinil clorofila *a* (Chl *a*<sub>2</sub>). Descubrió diversas especies del género ahora denominado *Prochlorococcus*, que, por contener estos tipos de clorofilas, pueden vivir desde la superficie marina hasta el límite de la zona fótica (-200 m), donde predominan y por lo que ahora se sabe, son los organismos más abundantes del picoplanton marino y contribuye de manera importante a la producción de oxígeno y biomasa a escala global (Chisholm et al., 1988). Ninguno de estos tres organismos contiene las ficobiliproteínas necesarias para formar un ficobilisoma, lo cual sugirió que podrían ser descendientes directos del primer cloroplasto debido a que contiene clorofila *b* y las proteínas antena son parte integral del tilacoide igual que en eucariontes oxofotótrofos. Sin embargo, estudios posteriores del rRNA 16S sitúa a estos organismos muy adelante en el árbol genealógico del súper reino cianobacteria, descartando la teoría del ancestro del cloroplasto. La especie de cianobacteria viva que tiene más semejanza con el cloroplasto es *Gloeobacter violaceus*, vive en agua dulce y no tiene membrana tilacoidal, por lo que sus maquinaria fotosintética esta embebida en la membrana citoplasmática, conteniendo además un enorme ficobilisoma de aproximadamente 10 MDa y carece de clorofila *b*. Estudios recientes sobre las secuencias de la subunidad PsaL del FSI y sus asociaciones en supercomplejos sugieren que el cloroplasto podría descender de una antigua cianobacteria filamentosa (Li et al., 2014).

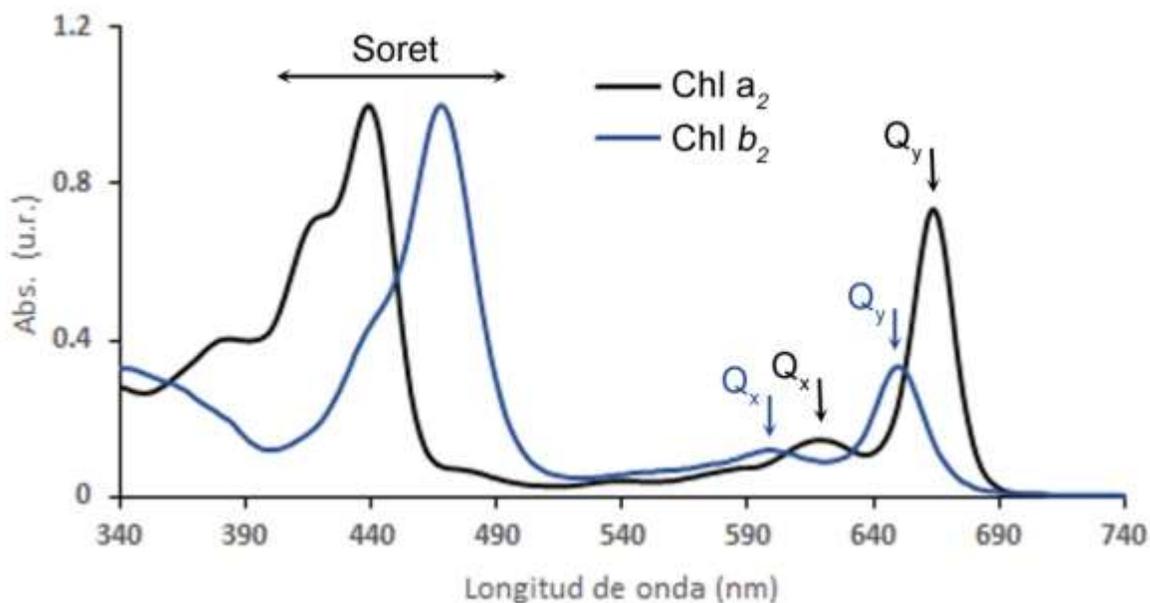
## Transiciones en el espectro de absorción de las clorofilas

Las clorofilas presentan dos bandas de absorción en las regiones azul (400-470 nm) y roja del espectro visible (600-700 nm), lo cual está definido por su estructura química, es decir, las características de los espectros de absorción de cada tipo de clorofila están relacionadas con las distintas modificaciones químicas en la periferia del macrociclo y su estado de oxidación (**Fig. 3**). El espectro de absorción nos da información de la estructura química de la molécula y muestra la probabilidad de que a fotones de cierta longitud de onda (energía) sean absorbidos por la nube de electrones de dicha molécula (**Fig. 5**). Cuando una molécula de clorofila absorbe un fotón, la energía eleva un electrón a un orbital exterior (más energético) y se denomina estado excitado del electrón, a cada espacio entre orbitales le corresponde una cantidad de energía puntual. Es necesario que el fotón incidente tenga dicho valor de energía para elevar un electrón desde su orbital en estado basal (HOMO) hasta un orbital vacío energéticamente superior (LUMO). El arreglo de los dobles enlaces alternados en la molécula de clorofila (llamado vía de resonancia), le confieren los valores energéticos de absorción en el lado del espectro azul y rojo los cuales corresponde a la energía precisa que pueden llevar a sus electrones a un estado excitado. Para las bacterioclorofilas, clorofilas, carotenos y bilinas cuyos colores percibimos, las longitudes de onda de estos fotones están entre los 400 y 820 nm (espectro visible y cercano infrarrojo).

Cuando un electrón salta a un nivel energético superior se dice que la molécula se encuentra en un estado excitado designado como *singulete*. En un tiempo muy corto (del orden de los 10 ns) la energía absorbida puede ser reemitida al medio por dos diferentes procesos: la fluorescencia y, los procesos no radiativos; o puede ser utilizada en el proceso fotoquímico. La fluorescencia es un fenómeno de relajación en el cual se emite un cuanto de luz de menor energía que el absorbido, permitiendo que el electrón excitado regrese a su estado basal. Este fenómeno puede ser seguido por el espectro de emisión de la molécula que absorbe y el cual dará información sobre el entorno cercano de la molécula y las características de la energía emitida.

Los fenómenos no radiativos consisten en la liberación de la energía absorbida por medio de la disipación calorífica. Este proceso se favorece sobre el de fluorescencia cuando la molécula posee una superposición de subestados entre el estado excitado y el estado fundamental, es decir, la energía se emitirá en pequeños incrementos los cuales no generan calor. Finalmente, el proceso fotoquímico es aquel donde la energía absorbida es utilizada para generar un flujo de electrones, este fenómeno requiere de un par especializado de clorofilas (**Chen, 2014**).

La banda de absorción en la zona roja del espectro que va de los 640 a los 690 nm es llamada *transición de momento permitida*  $Q_y$ . Esta es la zona de absorción de menor energía y de la cual, la energía es liberada por la clorofila en forma de fluorescencia. Esta banda está correlacionada con las modificaciones estructurales de la molécula sobre el eje y de la molécula de clorofila (**Fig. 3a**). Así mismo, las modificaciones sobre el eje x (**Fig. 3a**), se ven reflejadas en el tamaño y forma de la zona del espectro de absorción  $Q_x$  (**Fig. 5**).



*Fig. 5 Espectros de absorción de divinil clorofila a y b. Se indican las transiciones de momento permitidas  $Q_y$  y  $Q_x$  para Chl a<sub>2</sub> (negro) y Chl b<sub>2</sub> (azul). Los cromóforos fueron separados por HPLC, el solvente de elución fue evaporado y las muestras fueron resuspendidas en acetona 80%.*

Los espectros de absorción de la Chl  $a_2$  y Chl  $b_2$  mostrados en la figura 5, son ejemplos de modificaciones en el espectro de absorción debidas a modificaciones estructurales. En los picos entre 630 y 690 nm, los cuales corresponden al eje  $y$  de las Chl $_2$ , el cual transecta la molécula del carbono C17 al C7 (**Fig. 3a**). La oxidación del grupo metilo del C7 (R7 en **Fig. 3a**) de la Chl  $a_2$  para formar la Chl  $b_2$ , disminuye la probabilidad de absorción en la zona de rojo  $Q_y$  debido a la modificación de la nube electrónica por la electronegatividad del átomo de oxígeno (**Hooper, 2012**). Estas modificaciones tienen relevancia en la absorción y transferencia de energía de los fotosistemas; además, están relacionadas con los ligandos con los que se coordinan cada tipo de clorofila y el ensamblaje de las antenas (ver más adelante, Holoproteínas antena).

## Biosíntesis de las clorofilas

Las clorofilas tienen como precursor la protoporfirina IX, al igual que los hemos y la cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>), este se forma de la condensación de glutamato en plantas, *ACRhaea* y *Cyanobacteria* (**Fig. 6, flecha 1a**), o succinil-coenzima A y glicina en *Fungi*,  $\alpha$ -proteobacterias y animales (**Fig. 6, flecha 1b**).

El primer paso en la síntesis de la clorofila es la unión de un átomo de magnesio a la estructura de la protoporfirina IX, esta reacción es muy costosa, requiere de 15 ATP's por átomo de magnesio (**Fig. 6, flecha 4**), y es realizada por una enzima quelatasa. La estructura proteica de esta enzima se encuentra muy conservada desde las cianobacterias hasta las plantas superiores.

El siguiente paso consiste en la metilación del propionato que se encuentra unido al carbono C13 (**Fig. 3a, Fig. 6, flecha 6**). Esta reacción es realizada por la enzima S-adenosil-L-methionina transferasa (SAM), la cual es una de las denominadas donadoras universales de metilos, debido a que realiza esta misma función en diferentes rutas metabólicas.

El siguiente paso es la ciclación del quinto anillo (o anillo E) a través de una reacción de oxidación y la adición de un oxígeno, la cual formará la 8-vinil protoclorofilida (**Fig. 6, flecha 7**), justo este iso-ciclo es lo que distingue a la clorofila de otros tetrapirroles. La enzima encargada de esta reacción es llamada Mg-Protoporfirina IX monometil éster ciclasa y en cianobacterias es dependiente de oxígeno.

Los siguientes dos pasos consisten en la reducción de enlaces insaturados. El primero de ellos es llevado a cabo por una reductasa dependiente de NADPH la cual reduce el doble enlace del vinilo del carbono 8. Esta enzima no está presente en el genoma del género *Prochlorococcus*, así que la 8-vinil protoclorofilida continúa en el proceso biosintético hacia la Chl *a*<sub>2</sub>.

En el caso de las otras cianobacterias la protoclorofilida *a* (metabolito con el vinilo reducido) y la 8-vinil protoclorofilida, en *Prochlorococcus*, son reducida en el anillo D, entre el carbono C17 y C18 (**Fig. 6, flecha 9**) por una reductasa dependiente de luz. Esta enzima es muy peculiar ya que puede reducir ambos sustratos con la misma velocidad, es decir, tiene la misma afinidad por ambos y es de las pocas enzimas que se sabe son activadas al absorber luz.

El último paso es la esterificación de la cadena hidrocarbonada o fitol al metabolito clorofilida para formar la Chl *a*<sub>2</sub> o la Chl *a* (**Fig. 6, 10**). Esta reacción es realizada por la Sintasa de clorofila *a*. Existen otras cuatro clorofilas: *b*, *c*, *d* y *f*, las cuales se encuentran en el aparato fotosintético de algunos oxofotótrofos (**Fig. 3**).

Para la síntesis de clorofila *b* se parte de la clorofilida *a*, a la cual se le agrega un formilo en el carbono C7 por la enzima clorofilida *a* oxigenasa (CAO) usando NADPH y una deshidratación que no requiere enzima (**Fig. 6b**). CAO es una enzima de Rieske, que se encuentra conservada en todos los organismos oxofotótrofos, sin embargo, esta similitud no es muy clara para el género *Prochlorococcus* (**Rocap et al., 2003**). La Sintasa de Chl *d*, no se ha identificado, sin embargo, se sabe por experimentos con oxígeno maCRado (O<sup>18</sup>) que esta se obtiene a partir de Chl *a*.

El reciente descubrimiento de la Sintasa de la Chl *f*, en la cianobacteria *Leptolyngbya* JSC-1, mostró que un parálogo de la subunidad D1 o PsbA (parte del centro

de reacción del FSII) es la responsable de tal reacción. Esta enzima une clorofilas y por lo tanto lleva a cabo una reacción dependiente de la luz, o fotooxidación (**Ho, et al., 2016**).

Las bacterioclorofilas (BChl) que son utilizadas en la maquinaria fotosintética de las bacterias que no producen oxígeno (anoxigénicas), requieren pasos extra para su síntesis partiendo de la clorofila *a*. Aunque biosintéticamente la Chl *a* podría considerarse más antigua que las BChl's, la primera es exclusiva de los oxofotótrofos, que son los organismos con las proteínas de los fotosistemas más *modernas* (más derivadas en los análisis filogenéticos), lo cual despierta interrogantes en la evolución de los pigmentos y las proteínas que los unen en el proceso de la fotosíntesis (**Hohmann-Marriott & Blankenship, 2011**).

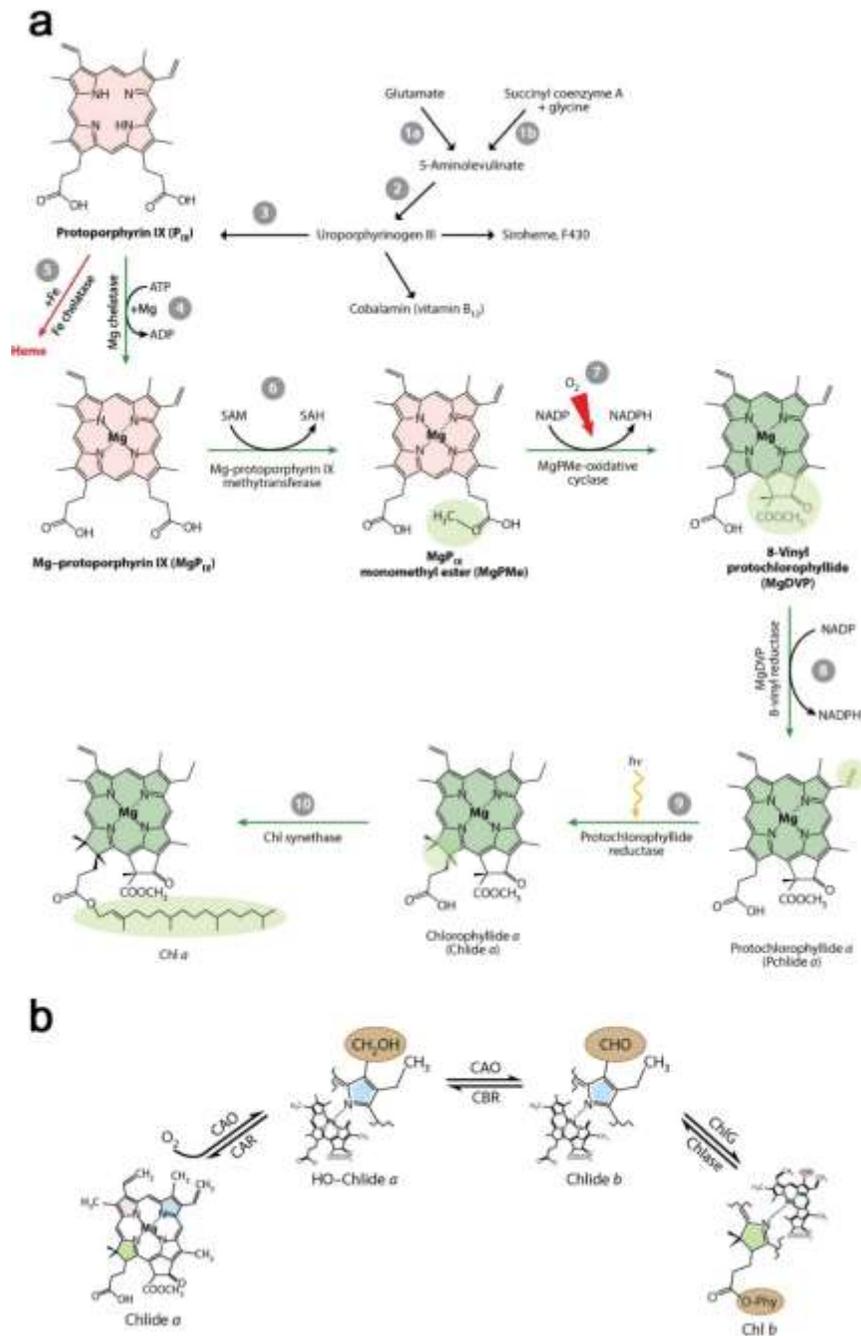
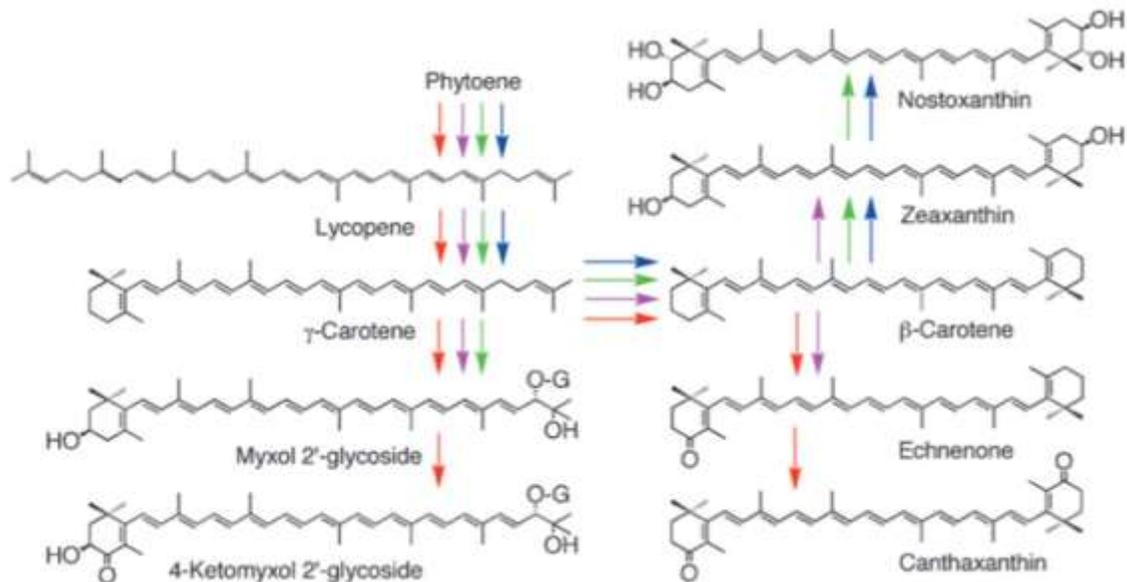


Fig. 6 Biosíntesis de la clorofila a y b. **a.** La protoporfirina IX es el precursor de todas las clorofilas y los hemos. Esta se puede obtener por dos vías: la condensación del glutamato y por la unión de succinil coenzima A y glicina. Se pueden describir 10 pasos desde la formación de 5 aminolevulinato hasta la clorofila a (flechas verdes). En este proceso están involucradas variadas enzimas que en general se encuentran muy conservadas en todos los oxofotótrofos. **b.** La síntesis de la Chl b parte de la clorofilida a (Chlide a) en dos pasos sucesivos de oxidación La enzima oxigenasa CAO sustituye el metilo del anillo II por un formilo. Posteriormente es esterificada con el fitol. Modificado de **Chen (2014)**.

## Carotenoides

La transferencia de energía en los fotosistemas y antenas de los oxofotótrofos, además de las clorofilas involucra a otros cromóforos llamados carotenoides. Estas moléculas están formadas por una estructura isoprenoide de enlaces alternados que les permite absorber energía entre los 400 y 550 nm. Presentan una cadena lineal de 22 carbonos y pueden ser cíclicos o acíclicos en los extremos (**Fig. 7**). Se pueden clasificar en dos tipos: carotenos, los cuales solo contiene moléculas de carbono e hidrogeno y las xantofilas, que además contiene oxígeno (hidroxi, epoxi y ceto carotenos).



*Fig. 7 Biosíntesis de los principales carotenos en cianobacteria. Las flechas de colores representan las rutas metabólicas en las cianobacterias: Anabaena y Nostoc (roja), Synechocystis (morada), Thermosynechococcus (verde) y Synechococcus (azul). Modificado de Takachi & Mochimaru, 2007.*

Los carotenoides no solo funcionan como cromóforos que absorben y transfieren energía a la Chl, además, evitan los estados excitados de la clorofila ( $Chl^3$ ) y el estado singulete del oxígeno (disipando su energía en forma de calor) y están involucrados en el ensamble y estabilidad de los fotosistemas (**Frank et al., 1999**).

Estas moléculas son sintetizadas por una amplia gama de organismos en los tres dominios de la vida, las cianobacterias se caracterizan por sintetizar carotenos como el  $\beta$ -caroteno, sus derivados hidroxilados: zeaxantina y nostoxantina, los cetocarotenos: equinenona y canthaxantina y los gluco-carotenos: myxol-glucósido y oscillol diglicósido (Takaichi & Mochimaru, 2007).

## Biosíntesis de carotenoides en cianobacteria

La biosíntesis de los carotenos inicia con el isoprenoide de cinco átomos de carbono, isopentenil pirofosfato (IPP), el cual es el precursor, además, de los terpenos, quinonas y esteroides. El IPP se puede sintetizar por dos rutas metabólicas diferentes: la ruta clásica del mevalonato y la ruta de la deoxi-xilulosa fosfato (DOXP). En cianobacteria solo se encuentran las enzimas para la ruta DOXP. Ocho moléculas de IPP en total, se condensan: primero tres moléculas y posteriormente una molécula más para tener el isoprenoide de 20 carbonos llamado geranyl pirofosfato (GPP). Posteriormente dos moléculas de GPP son condensadas para formar el primer caroteno llamado fitoeno. Se requieren cuatro desaturaciones para la formación de licopeno (Fig. 7).

Las enzimas relacionadas con la síntesis de otros carotenos como el  $\beta$ -caroteno, son llamadas ciclasas, en MIT9313 existen dos proteínas que realizan la ciclación del licopeno en uno de los extremos: CrtL-b y CrtL-e. CrtL-e es la enzima que cicla la inona en posición alfa para el  $\alpha$ -caroteno a partir de licopeno (Stickforth *et al.*, 2003). De manera interesante, CrtL-e puede formar también  $\beta$ -caroteno a partir de  $\gamma$ -caroteno (Fig. 8). Los carotenos presentes en *Prochlorococcus marinus* MED4 muestran que existen hidroxicarotenos (criptoxantina y zeaxantina) pero no cetocarotenos ni glucocarotenos (Takachi & Mochimaru, 2007). Sin embargo, se ha demostrado que la composición de carotenos en el aparato fotosintético depende de las condiciones de crecimiento, como la intensidad de la luz y la disponibilidad de nitrógeno (Olaizola & Duerr, 1990).

La producción de cetocarotenos y mixol-glucósidos, se ha reportado para algunas cianobacterias (**Takaichi et al., 2005**). Estas moléculas son de gran interés y solo apenas se están determinando sus estructuras químicas y su función en el aparato fotosintético de cianobacterias, algas y plantas.

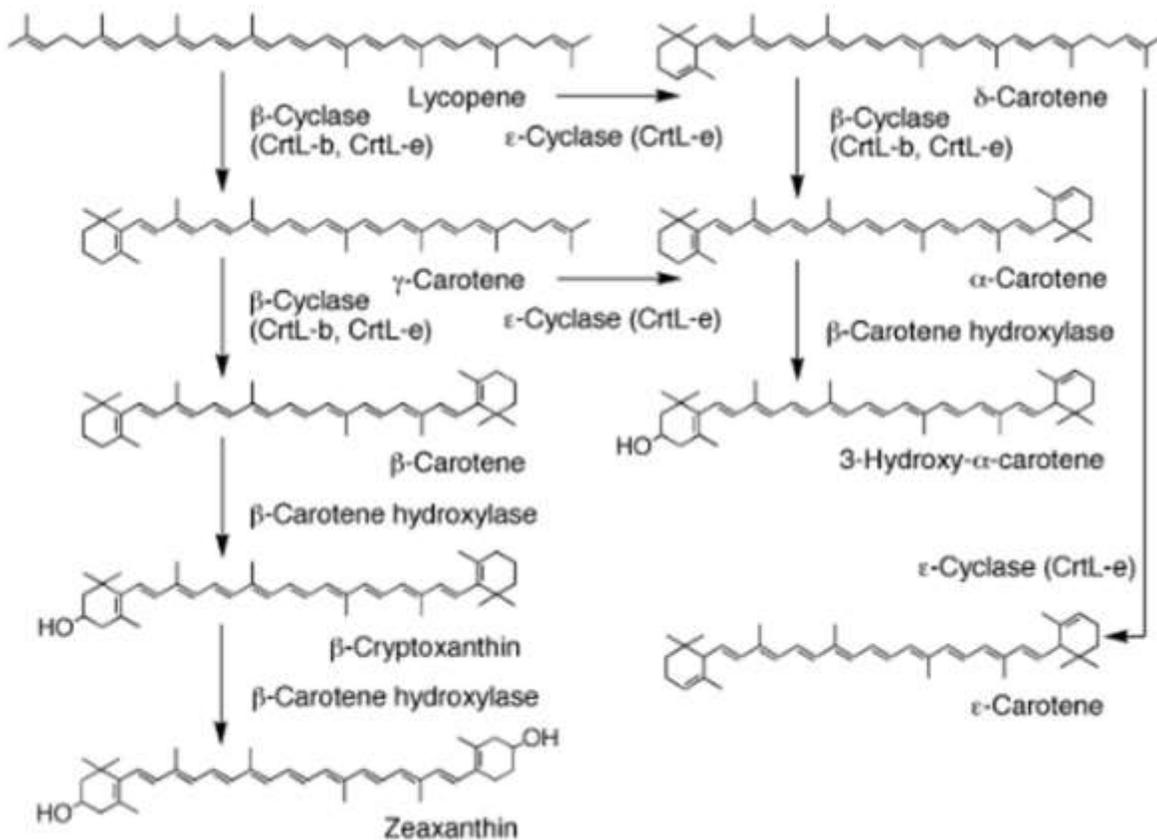


Fig. 8 Síntesis de carotenoides en *Prochlorococcus marinus* MED4. Los nombres de las enzimas ciclasas se encuentran indicadas entre paréntesis (**Takachi & Mochimaru, 2007**).

## Fotosistemas

Los fotosistemas son arreglos de proteínas asociadas a los tilacoides que coordinan diversos cofactores y se encuentran asociados como multímeros cuyas masas moleculares pueden ser del orden de los mega Daltones (MDa.). Los fotosistemas se pueden dividir en dos secciones físicas: el centro de reacción (CR) y las antenas proximales.

En los CRs hay un par especializado de clorofilas, donde la energía luminosa es transformada en un flujo de electrones. Los electrones fluyen a través de otras clorofilas o feofitinas (primer aceptor) hasta llegar a una quinona, si el siguiente cofactor es otra quinona se trata de un CR del tipo Q o tipo II, si el CR tiene un núcleo de átomos de hierro-azufre (Fe-S) se trata de un CR del tipo Fe-S o tipo I. Solo los organismos oxofotótrofos cuentan con ambos tipos de CR, el tipo Q en el PSII y el tipo Fe-S en el PSI trabajando en serie (**Fig. 9**).

El centro de reacción del PSI en cianobacterias produce un reductor muy fuerte (-1 V) que es capaz de reducir al  $\text{NADP}^+$ . El centro de reacción del PSII produce un oxidante muy fuerte (+1.2 V) que es capaz de arrancar electrones del agua, la cual es un donador muy débil de electrones. Se ha hipotetizado que estos dos centros tienen un antepasado común del cual evolucionaron debido a que la topología de sus hélices transmembranales y arreglo de los cofactores es muy parecida, aunque las secuencias de aminoácidos de ambos centros de reacción no presentan una relación importante (**Blankenship, 1992**).

Los cofactores de los centros de reacción se encuentran coordinados entre dos subunidades de cinco  $\alpha$ -hélices transmembranales cada una. Estas proteínas no son idénticas, por lo que, a esta asociación se le denomina heterodímero (**Fig. 10**). En otras bacterias anoxigénicas, los cofactores del centro de reacción están coordinados por proteínas idénticas u homodímeros.

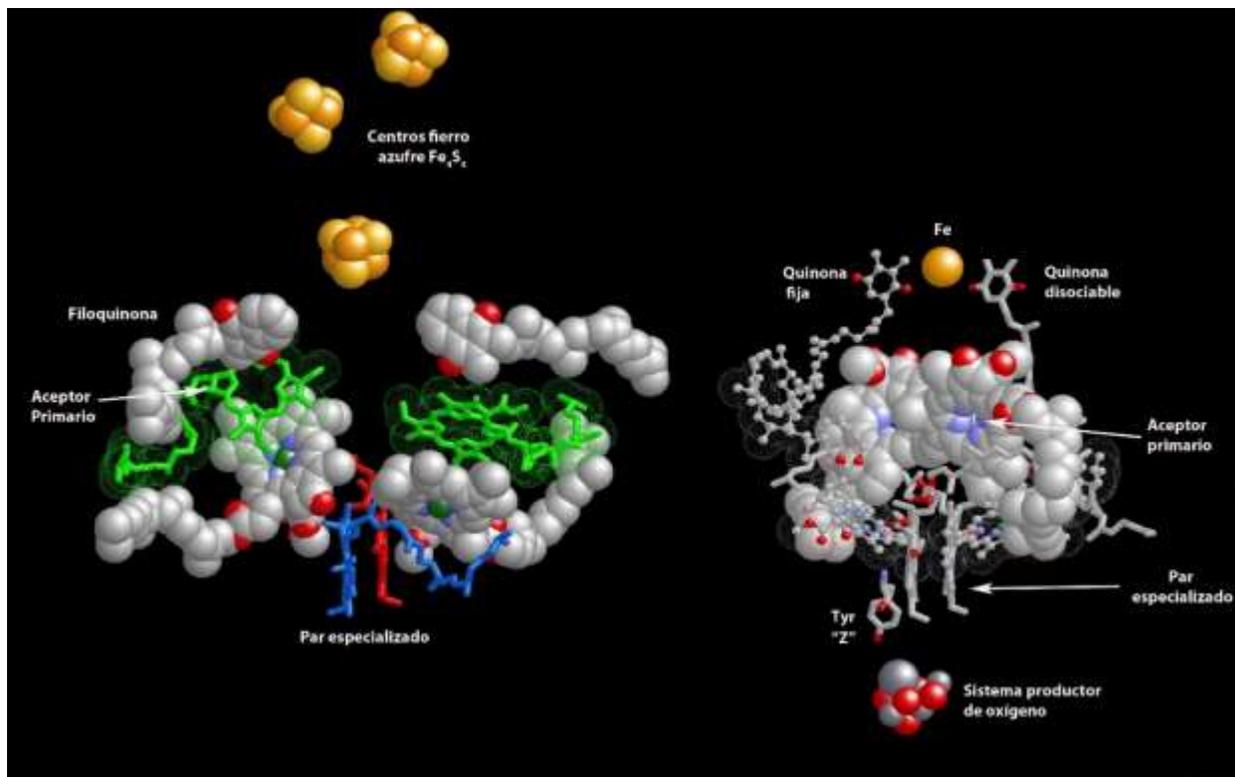
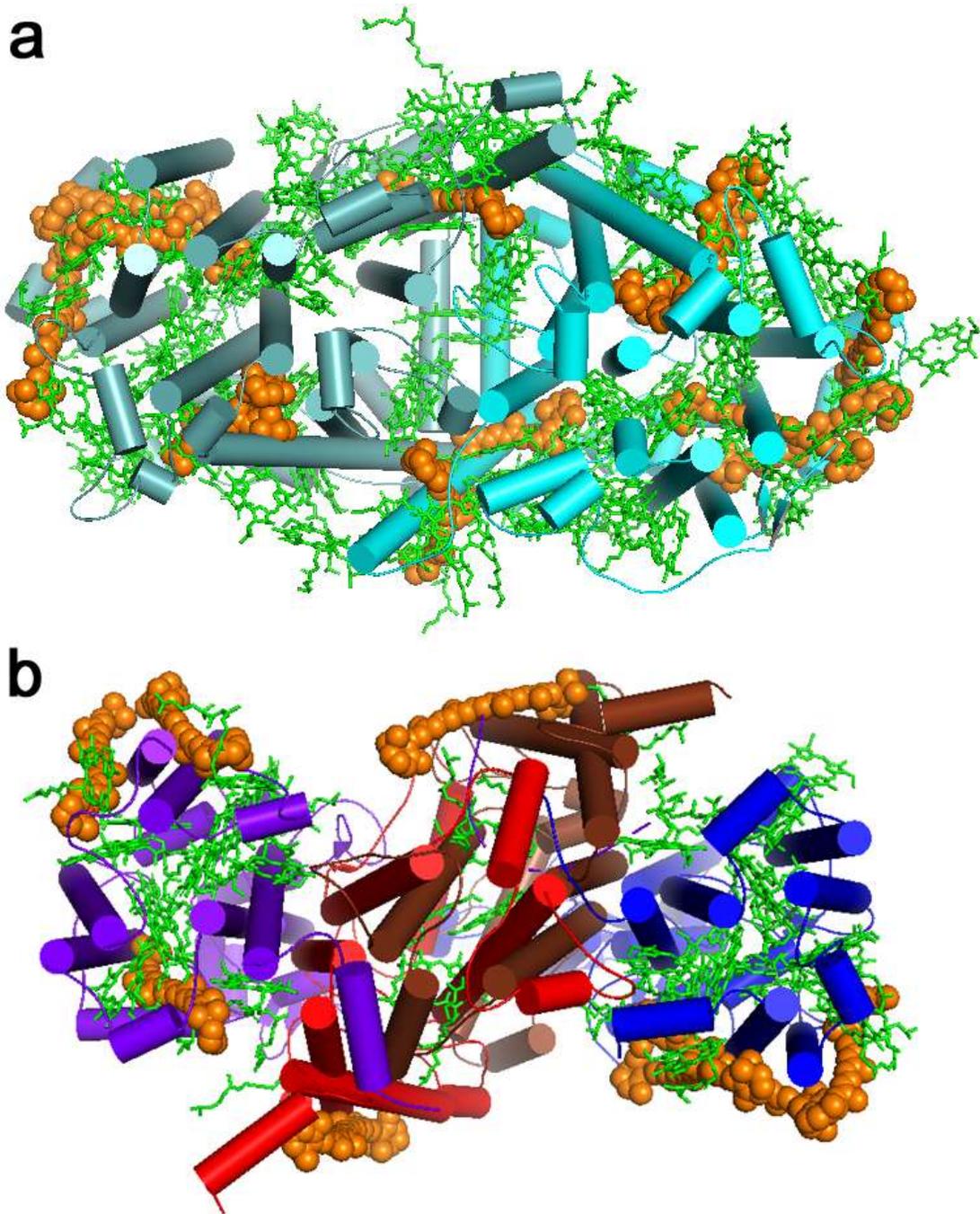


Fig. 9 Cofactores de los centros de reacción tipo I y II. Izquierda. Cofactores del CR tipo I o Fe-S presentes en el FSI. Se muestra el par especializado de clorofilas o P700 (rojo y azul), las clorofilas o aceptores primarios (verde), las filoquinonas (esferas blancas y rojas) y los centros Fe-S (esferas amarillas y ocre). Derecha. Cofactores del CR tipo II o Q presentes en el FSII. Se muestra el complejo productor de oxígeno (esferas grises y rojas), la tirosina activa o Z (bastones blancos), el par especializado de clorofilas o P680 (bastones blancos), las feofitinas o primeros aceptores (esferas blancas), las quinonas (bastones y esferas pequeñas blancas) y el átomo de hierro (amarillo). Modificado de *Barrera-Rojas et al., 2016*.

La mayor parte de las clorofilas y carotenos (Car) en los fotosistemas, se encuentran coordinadas por seis  $\alpha$ -hélices transmembranales y son denominadas antenas proximales. En el FSI los genes de las antenas proximales se encuentran fusionados con los genes del CR, por lo que, los productos génicos son proteínas de 11  $\alpha$ -hélices transmembranales (PsaA y PsaB), en total estas dos proteínas pueden contener hasta 79 Chl y 13 Car (**Fig. 10a**). En el FSII las antenas proximales son las proteínas CP43 y CP47, las cuales coordinan 13 Chl, 4 Car y 16 Chl, 5 Car, respectivamente (**Fig. 10b**).



*Fig. 10 Centros de reacción y antenas proximales de los fotosistemas en cianobacteria. a. CR y antenas proximales del FSI. Se muestran en cilindros las  $\alpha$ -hélices de las subunidades PsaA (gris) y PsaB (cian), estas subunidades contienen las clorofilas de las antenas proximales. b. CR y antenas proximales del FSII. Se muestran en cilindros las  $\alpha$ -hélices de las subunidades del CR PsbA (rojo) y PsbD (café) y las antenas proximales CP43 (morado) y CP47 (azul). Las clorofilas se muestran en bastones verde y los carotenos en esferas naranjas. Se usaron los cristales del PDB 2AXT (Loll et al., 2005) y 1JB0 (Fromme et al., 2001) para modelar el FSII y FSI, respectivamente.*

## Fotosistema I

El cristal del FSI de *Thermosynechococcus elongatus* (Fromme *et al.*, 2001) está compuesto por 12 subunidades. Las subunidades PsaA y PsaB, constituyen el 64 por ciento de la masa molecular total de un monómero del FSI (Fig. 11, superficie translúcida). Las subunidades PsaC, PsaD y PsaE se encuentran unidas a PsaA y PsaB por el lado del citoplasma. Estas subunidades coordinan los centros Fe-S y permiten el *anclaje* de la proteína ferredoxina (Fig. 11, tonos rojos). Siete subunidades pequeñas rodean el heterodímero PsaA-B. Las subunidades PsaL, PsaI y PsaM se encuentran próximas a Chl y Car. Se encuentran dispuestas en la parte interna del trímero del PSI (Fig. 11, tonos azules) y se ha descrito que participan en la transferencia de energía entre monómeros. PsaL tiene tres pases transmembranales, coordina tres Chl, un átomo de calcio y dos carotenos. Esta subunidad es el área de contacto entre los monómeros del FSI. En el lado contrario de la zona de trimerización del PSI se localizan las subunidades hidrofóbicas PsaF, PsaJ y PsaX, a estas subunidades se encuentran próximas algunas Chl y Car (Fig. 11, tonos violetas). PsaF es una proteína que presenta tres dominios, uno de cada lado de la membrana y una hélice hidrofóbica. Esta subunidad está involucrada en el *anclaje* del acarreador de electrones soluble plastocianina en el lumen del tilacoide. La subunidad PsaK se encuentra a un lado de PsaA y coordina una molécula de Chl.

En total 127 cofactores de los cuales 96 son Chl y 22 son carotenos, se encuentran unidos a proteínas hidrofóbicas en el FSI. Al comparar el cristal de cloroplasto de plantas (PDB 2O01) con el de cianobacterias (PDB 1JB0), 80 Chl se encuentran en la misma posición, es decir, durante los miles de millones de años que separan el evento endosimbiótico de los actuales organismos fotosintéticos (plantas y cianobacterias) la topología de la mayoría de las Chl del FSI se han conservado (Amunts *et al.*, 2007).

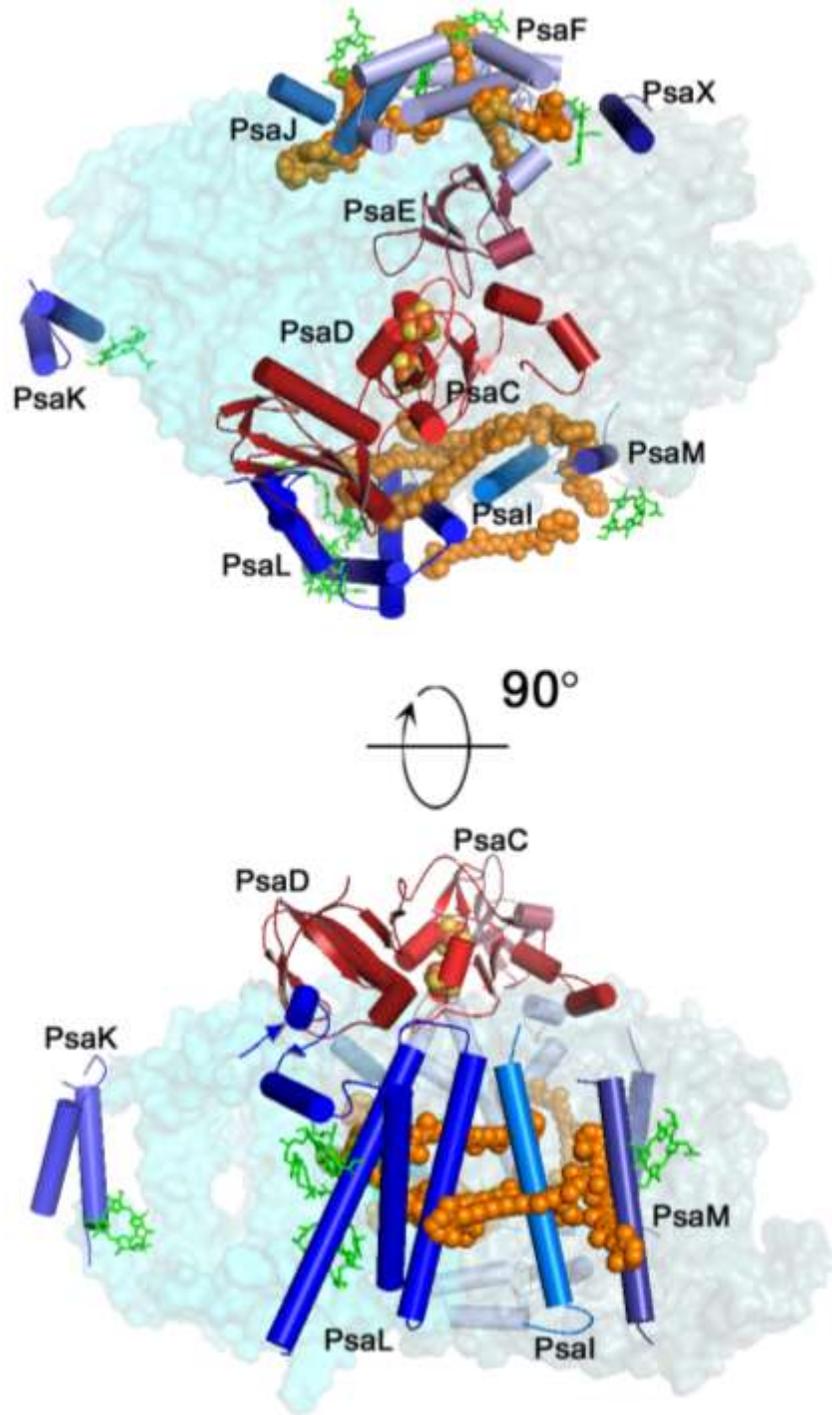


Fig. 11 Subunidades del fotosistema I. En colores translucidos se muestra las subunidades del centro de reacción de la figura 9a. Arriba. Vista citoplasmática. Abajo. Vista lateral de la zona de trimerización. Los nombres de cada subunidad que rodean el centro de reacción se indican (Psa). Los cofactores que se encuentran cerca de cada subunidad se encuentran indicados de la siguiente manera: clorofilas bastones verdes; carotenos esferas naranja; núcleos Fe-S rojo y amarillo. Figura realizada usando el cristal del PDB 1JB0 (Fromme, et al., 2001).

## Fotosistema II

El cristal del FSII de *Thermosynechococcus vulcanus* (Tanaka, *et al.*, 2017) muestra 19 subunidades de las 22 asignadas a su estructura. El centro de reacción formado por las subunidades PsbA y PsbD, junto con las antenas proximales CP47 (PsbB) y CP43 (PsbC), constituyen el 46 % de la masa molecular total de un monómero del FSII (**Fig. 12**, superficie translúcida). El FSII al contrario del FSI no presenta subunidades que sobresalgan en el lado citoplasmático, solo en el lado luminal del tilacoide. Las subunidades PsbO, PsbU y PsbV son proteínas hidrosolubles y las dos últimas son características de cianobacterias (**Fig. 12**, tonos azules). Solo PsbO, se encuentra también en plantas. Estas tres proteínas están involucradas en la estabilización del sistema productor de oxígeno, formado por cuatro átomos de manganeso y uno de calcio (**Fig. 12**, esferas 4Mn-Ca). De manera interesante, PsbV coordina un grupo hemo y su estructura es muy parecida al acarreador de electrones luminal, citocromo  $c_6$ . Las subunidades intrínsecas de membrana que rodean el centro de reacción son PsbE, PsbF, PsbH, PsbJ, PsbK y PsbZ. Dos de ellas, PsbE y PsbF, coordinan un grupo hemo. Su función aún no ha sido dilucidada, sin embargo, su delección resulta en la pérdida de función del FSII (**Pakrasi et al.**, 1988). En la zona de dimerización se encuentran las subunidades PsbL, PsbM y PsbT, las cuales forman contactos hidrofóbicos con lípidos y permiten la formación del dímero del FSII.

El FSII coordina 35 Chl y 11 Car. A diferencia de la antena proximal del FSI, a la del FSII le faltan las 50 clorofilas de la zona central. Se ha sugerido que la falta de estas Chl está relacionada con la diferencia de eficiencia entre el FSI (99.5%) y el FSII (80%), además, de la notoria dominancia de la fluorescencia de este último en los espectros de emisión de organismos fotosintéticos (**Fromme & Grotjohann**, 2008). Los carotenos en este cristal fueron modelados utilizando el  $\beta$ -caroteno debido a la falta de resolución, sin embargo, en análisis del FSII de plantas, utilizando crio-microscopía y que alcanzan más resolución, se puede distinguir una distribución heterogénea de estos pigmentos. Los  $\beta$ -carotenos se encuentran en zonas cercanas al centro de reacción, mientras que las xantofilas se encuentran en las antenas distales (PDB 3JCU).

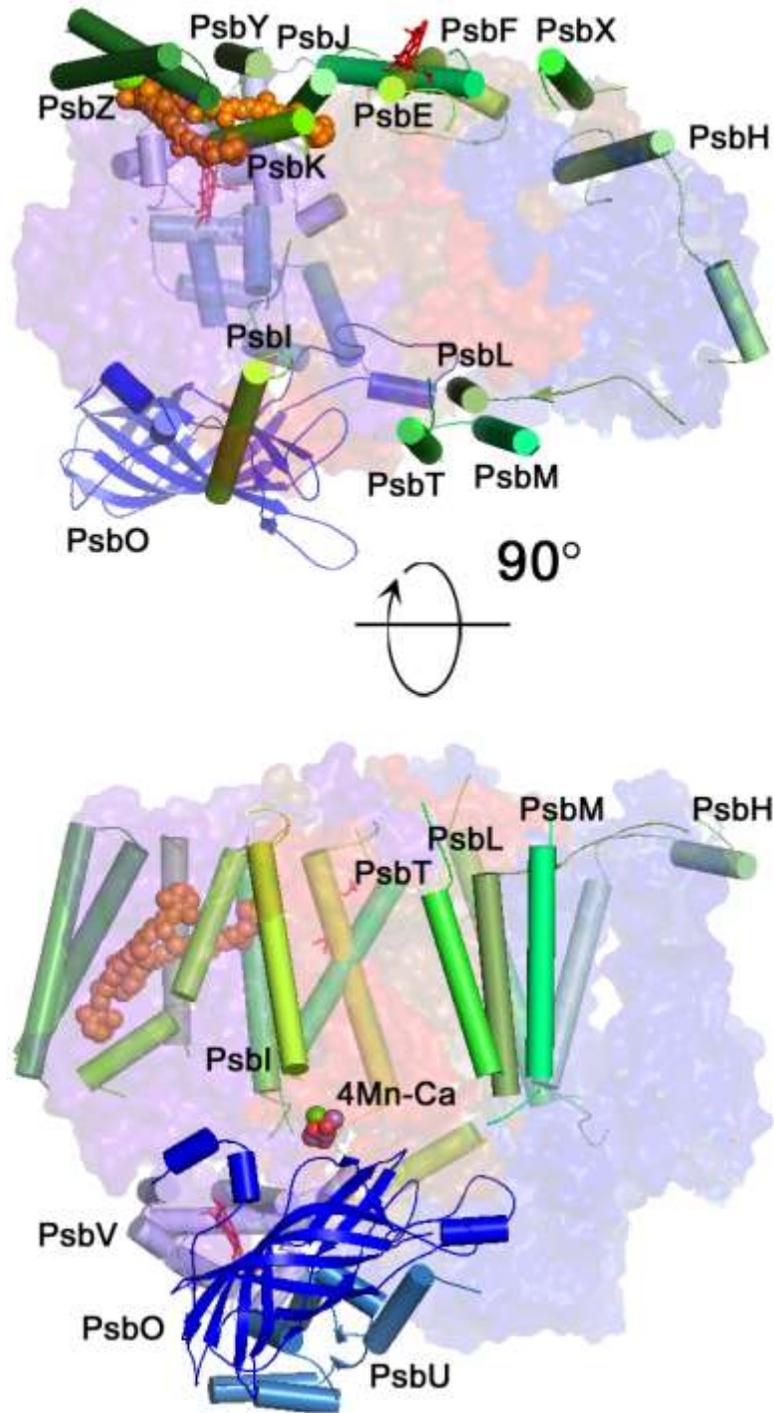


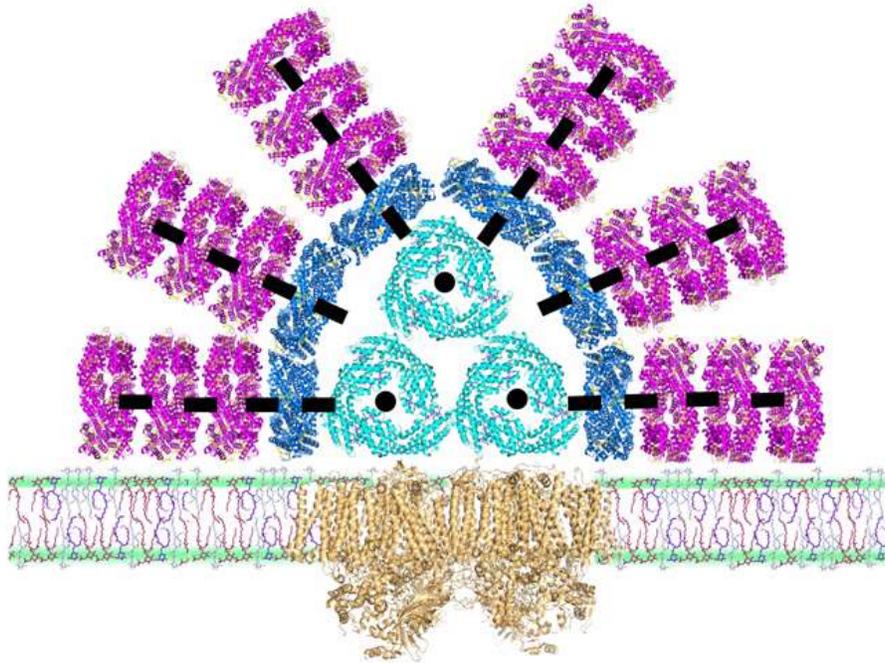
Fig. 12 Subunidades del fotosistema II. En colores translucidos se muestra las subunidades del centro de reacción de la figura 9b. Arriba. Vista citoplasmática. Abajo. Vista lateral de la zona de dimerización. Los nombres de cada subunidad que rodean el centro de reacción se indican (Psb). Los cofactores que se encuentran cerca de cada subunidad se encuentran indicados de la siguiente manera: clorofilas bastones verdes; carotenos esferas naranja; núcleos Fe-S rojo y amarillo. Figura realizada usando el cristal del PDB 5B66 (Tanaka, et al., 2017).

## Antenas fotosintéticas

Las antenas fotosintéticas (antenas) son una asociación de cromóforos unidos o coordinados por los residuos de aminoácidos de una proteína, y, cuya función primordial es la de aumentar la cantidad de luz absorbida y transferir su energía a los CR de los fotosistemas. Las antenas que se han descrito hasta el momento pueden utilizar tres tipos de cromóforos: las clorofilas (incluyendo la bacterioclorofila y clorofilas *c-like*), las ficobilinas y los carotenoides. En cianobacterias existen familias de proteínas que unen específicamente a cada cromóforo.

Todas las antenas fotosintéticas de cianobacterias comparten ciertas características. Absorben luz de longitudes de onda en los espectros visible e infrarrojo cercano. Al absorber la luz se genera un estado excitado, el cual debe tener una vida media suficientemente larga y el arreglo de los cromóforos debe ofrecer una ruta de transferencia de la energía hacia los centros de reacción.

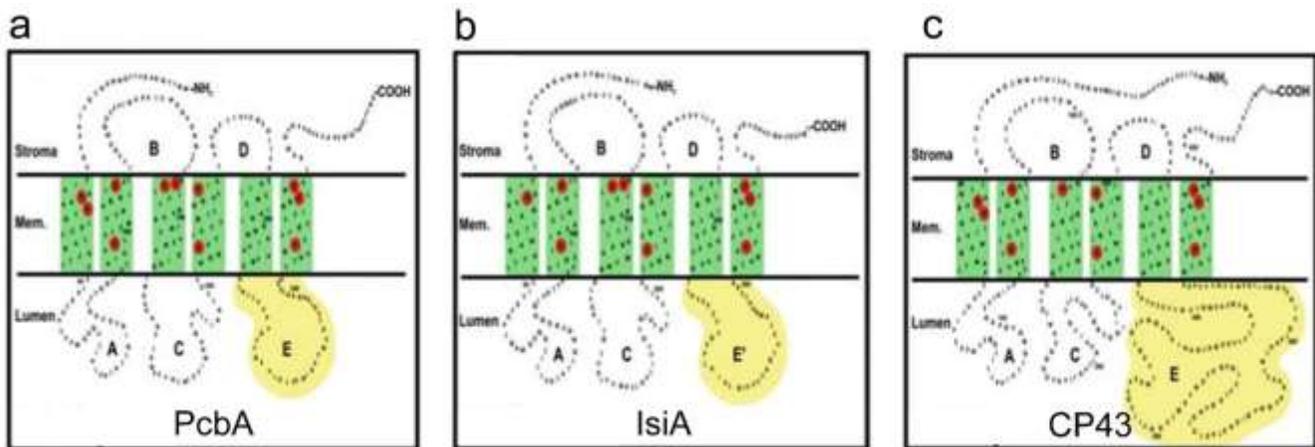
Las ficobilinas son estructuras tetrapirrólicas no cíclicas que se encuentran, en su mayoría, unidas covalentemente a residuos de cisteína en proteínas hidrofílicas llamadas ficobiliproteínas. Éstas forman estructuras hexaméricas en forma de anillos que a su vez se agrupan para formar estructuras cilíndricas o *rods*. Los *rods* pueden ser de ficoeritrina o ficocianina. La ficoeritrina (FE) tiene un máximo de absorción a ~575 nm y usa como cromóforos la ficoeritrobilina y en menor medida la ficourobilina. La ficocianina (FC) se encuentra en todas las cianobacterias (excepto en Prochlorofitas), tiene un pico máximo de absorción a ~620 nm y usa la ficocianobilina como cromóforo. Los brazos se acomodan siguiendo un *patrón* termodinámico que permite la transferencia de energía hacia un *core* de aloficocianina (~650 nm). Este tipo de proteína une al cromóforo ficocianobilina. Estos tres tipos de holoproteínas se encuentran ensambladas por proteínas *linkers* formando el ficobilisoma (FBS). Este complejo macromolecular se encuentra asociado a los tilacoides por el lado citoplasmático, donde puede transferir la energía captada a los fotosistemas (**Fig. 13**). Complementan la absorción de la luz debida a las antenas de clorofila, absorbiendo la zona de espectro electromagnético correspondiente al color verde.



*Fig. 13 Modelo del ficobilisoma hemidiscooidal de Synechococcus PCC 7335. Se muestra su núcleo tricilíndrico de aloficocianina (aqua) y brazos compuestos de ficocianina (azul) y ficoeritrina (morado). En dorado se encuentra el dímero del fotosistema II, principal aceptor de la energía captada por el ficobilisoma. Modificado de **Barrera-Rojas et al., 2016**.*

Las clorofilas y los carotenoides se encuentran coordinados o unidos a proteínas de la superfamilia CP43-like. Esta superfamilia de proteínas son hidrofóbicas de seis  $\alpha$ -hélices transmembranales que coordinan Chl's en residuos de histidina y glutamina, los cuales se encuentran conservados en cianobacterias (**Fig. 14, círculos rojos**). Cerca del 67% de los genomas de cianobacterias actualmente secuenciados, contiene genes que codifican para proteínas CP43-like (**Shih et al., 2013**). Dentro de esta familia se encuentran las proteínas del CR del FSI, PsaA y PsaB (solo las últimas seis  $\alpha$ -hélices del N-terminal); las proteínas antena del PSII, CP43 y CP47 (**Fig. 14c**); las proteínas antenas de Prochlorofitas que unen Chl *a/b* o Pcb (**Fig. 14a**); las proteínas antena de estrés inducidas por escasez de hierro en el medio o Isi (**Fig. 14b**); y algunas proteínas hipotéticas cuya secuencia de aminoácidos sugiere que unen Chl's y Car's (**Shih et al., 2013**), pero cuya expresión e inclusión en el aparato fotosintético solo se ha probado para la cianobacteria *Leptolyngbya* sp. cepa JSC-1 (**Shen et al., 2016**).

El ficobilisoma y los fotosistemas con Chl *a* son el sello característico de las cianobacterias. Sin embargo, existen géneros de cianobacterias bien definidos que no usan ficobilisoma y además de Chl *a*, usan Chl *b* en sus antenas membranales (anteriormente descritos en la sección: La clorofila). *Prochloron sp.* y *Prochlorothrix* contienen Chl *a* y Chl *b* y, *Prochlorococcus marinus* contienen Chl *a*<sub>2</sub> y Chl *b*<sub>2</sub>. Estos dos tipos de Chl *b* se encuentran asociados a proteínas denominadas Pcb (Protein a/b chlorophyll-binding). Estas proteínas pertenecen a la superfamilia CP43-like, poseen 6  $\alpha$ -hélices transmembranales, pero difieren de CP43 por la ausencia de ~100 aminoácidos en el *loop* entre la  $\alpha$ -hélice 5 y la 6 (C-Terminal). Esta característica es compartida con las proteínas inducibles por estrés de hierro, IsiA (**Fig. 14**).



*Fig. 14 Topología de las proteínas de la superfamilia CP43-like. a Proteína que une Chl a/b en Prochlorofitas (351 aa; 38.36 kDa). b Proteína inducida por escasez de hierro (342 aa; 37.22 kDa). c Antena proximal del FSII, CP43 (472 aa; 51.76 kDa). La diferencia en el número de aminoácidos es atribuida principalmente a la cantidad de ellos en el loop E (amarillo). Los sitios conservados de unión a clorofila se indica en círculos rojos (modificada de **Chen & Bibby, 2005**).*

## Transferencia de energía por resonancia en las antenas fotosintéticas: Teoría de Förster

En la fotosíntesis, decenas de cromóforos cercanos (no más de 5 nm) anclados a proteínas tiene la capacidad de absorber y transferir la energía en un proceso denominado transferencia de energía por resonancia de Förster (1948). Este fenómeno no-radiativo ocurre en el orden de los nanosegundos y es muy sensible a la variación de distancia entre el aceptor y el donador (Ec. 2). La descripción matemática de este fenómeno lo define como, un proceso de transferencia de energía derivada de una interacción de resonancia inductiva por la transferencia de momento dipolar entre dos moléculas. Este proceso es llamado *interacción de Coulomb dipolo-dipolo*, la cual varía inversamente a la sexta potencia de la distancia entre una molécula donadora y otra aceptora según la ecuación de Förster para la transferencia de energía entre un fluoróforo y un cromóforo (Ec. 2).

Un ejemplo clásico de un fenómeno resonante donde hay transferencia de energía, es el que ocurre entre dos diapasones finamente *sintonizados*. Cuando un diapasón vibra, puede transferir su energía mecánica por medio del aire al otro diapasón. En las antenas la energía transferida entre cromóforos no es mecánica sino definida por la longitud de onda y la frecuencia, que puede ser definida por un campo vectorial eléctrico y un magnético, es decir, electromagnética. Cuando la luz es absorbida por un cromóforo (molécula donadora), su estado excitado está definido por una función de onda, la cual se debe traslapar con la función de onda del estado basal de otro cromóforo (molécula aceptora). Este proceso se ve modificado, por la orientación de las moléculas ( $\kappa$ ), el solapamiento del espectro de emisión del donador con el espectro de absorción del aceptor ( $J_F$ ) y el tipo de solvente donde se realicen las mediciones ( $n$ ). Aunque lo anterior sugiere que existe transferencia de energía radiativa, no es así. La fluorescencia no está involucrada directamente en el proceso de transferencia de energía de Förster, aunque es una función para poder calcularla.

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \frac{9(\ln 10)\kappa^2\phi_D J_F}{128\pi^5 N_A n^4} \frac{1}{R^6} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

$k_T$  = Energía de transferencia

$\tau_D$  = Tiempo de vida del donador (estado excitado)

$\phi_D$  = Eficiencia cuantica de la fluorecencia del donador

$\kappa$  = Factor de orientación de las moleculas donadora y aceptora

$N_A$  = Número de Avogadro

$J_F$  = Sobrelapamiento del espectro de fluorescencia del donador y el espectro de absorción del acceptor

$R$  = Distancia entre la molécula donadora y la aceptora

$n$  = Índice refractivo promedio de el medio en la región de sobrelapamiento de los espectros

Aunque la teoría de la transferencia de la energía de excitación de Förster es un modelo que describe la transferencia de energía de la ficocianina hacia la Chl a en cianobacterias, existen casos donde no es aplicable. Para distancias entre cromóforos menores a 5 Å las interacciones entre los orbitales moleculares ganan relevancia, actualmente se conocen algunas aproximaciones a estos casos llamados: acoplamiento electrónico y sobrelapamiento de orbitales moleculares. Estos modelos se basan en el hecho de que los electrones no están asociados con una molécula en particular cuando los orbitales se encuentran tan cerca que se sobrelapan (**Braslavsky et al., 2008**).

## Función de los carotenoides en las antenas fotosintéticas

Como se ha mencionado con anterioridad los carotenoides están involucrados en varios procesos dentro del fenómeno fotosintético. Ayudan al plegamiento y estabilidad de los fotosistemas y antenas, protegen a los organismos contra el daño oxidativo debido a especies reactivas del oxígeno, tienen la capacidad de desactivar (*quenching*) el estado triplete de la Chl ( $\text{Chl}^3$ ) y tienen la capacidad de absorber energía, la cual, dependiendo de su intensidad, puede ser disipada o transferida a la Chl. Los carotenoides aumentan la absorción de los organismos fotosintéticos en la región del color azul y verde, complementando el uso del espectro característico de la biosfera (**Fig. 4**).

El estudio de la transferencia de energía de los carotenoides a las clorofilas es complicado, debido a que no puede ser descrita satisfactoriamente por la teoría de Förster, debido a la cercanía de ambos cromóforos en los fotosistemas y antenas. Además, los carotenoides presentan la peculiaridad de no absorber luz en su primer estado de excitación ( $S_1$ ), sino, en su segundo estado de excitación ( $S_2$ ). A partir de  $S_2$  los carotenoides pueden transferir energía al nivel energético de la banda  $Q_x$ , o previamente, presentar un proceso de relajación energética vibracional hacia  $S_1$  para después transferir la energía al nivel energético de la banda  $Q_y$  (**Fig. 15**) de la Chl. Después de la absorción de la energía de la luz, la relajación puede *estabilizarse* en orden de los  $5 \times 10^{-16}$  s en el nivel  $S_1$ . Este estado solo está permitido para la disipación o transferencia de energía por eso se le llama *dark state*. En estos niveles de energía la polaridad del carotenoide es relevante para definirlos, logrando tener estados más energéticos que  $S_1$  (**Fig. 15, líneas punteadas**). La energía de  $S_2$  y  $S_1$  se transfiere a los estados permitidos de las bandas  $Q_x$  y  $Q_y$ , con una variación de tres órdenes de magnitud, aunque la más probable es la más lenta; de  $S_1$  a  $Q_y$ , 63%, con respecto  $S_2$  a  $Q_x$ , 25 % (**Fig. 15, línea continua y línea ancha**). La transición energética de vida más larga es la fluorescencia de la Chl *a*, con los  $3.7 \times 10^{-9}$  s de vida media (**Zigmantas et al., 2002**).

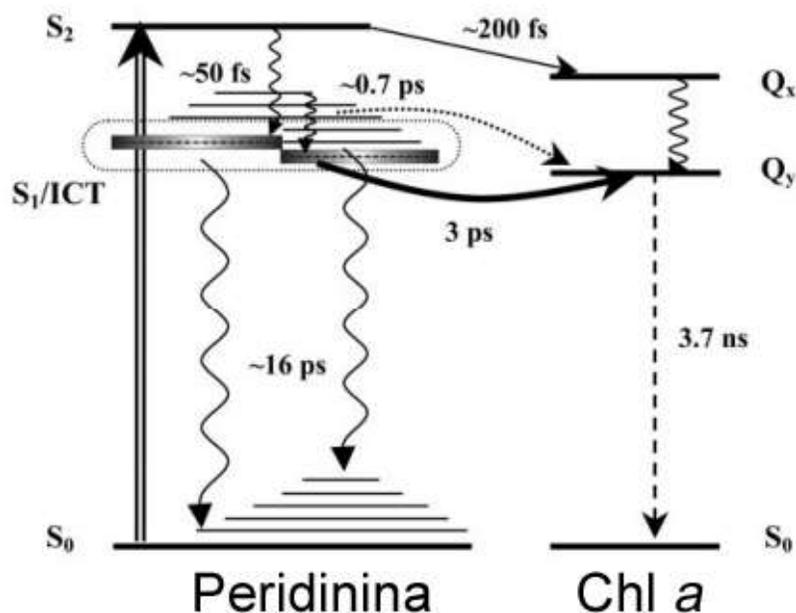


Fig. 15 Esquema de niveles y transferencia de energía entre la peridinina y la clorofila a.  $S_0$  denota los estados basales de ambas moléculas. La xantofila peridinina absorbe energía de magnitud igual a su segundo estado excitado ( $S_2$ ). En este fenómeno existen procesos de relajación entre 50 fs y 0.7 ps hacia el primer estado de excitación  $S_1$  o a un estado de transferencia intermolecular de carga o ICT (líneas de puntos). La transferencia de energía a la Chl a se da entre los 200 fs y los 3 ps hacia las bandas  $Q_x$  y  $Q_y$ , respectivamente. La probabilidad de que la transferencia de energía se realice de  $S_1$ /ICT a  $Q_y$  es más alta (flecha ancha). El retorno al estado basal de la clorofila  $S_0$  se da en el orden de los 3.7 ns (línea discontinua). Modificado de **Zigmantas et al., 2002**.

## Coordinación de clorofilas

Las modificaciones estructurales de las clorofilas no solo les dan las características absortivas sobre las que funciona el aparato fotosintético. Además, establecen el tipo de asociación con las proteínas antena. La Chl a es considerada un ácido de Lewis, es decir, posee orbitales vacíos que pueden aceptar un par de electrones para formar un enlace coordinado. La Chl a puede encontrarse coordinada por el grupo rico en electrones, imidazol, del aminoácido histidina, por cadenas laterales amidas y por moléculas de agua.

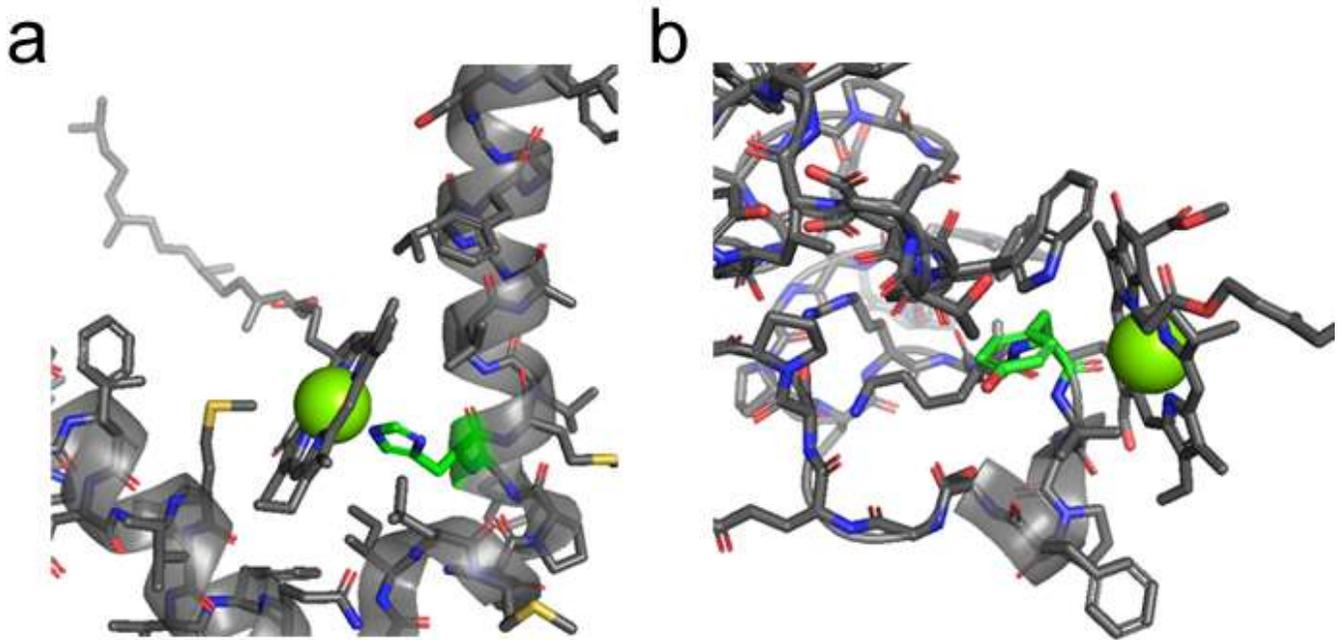
Cuando es introducido un átomo de oxígeno en la Chl *b* la nube electrónica sufre un reacomodo. Los electrones son atraídos a la zona periférica del tetrapirrol en dirección del eje X (**Fig. 3a**). Esta redistribución debilita la absorción en la banda  $Q_y$  con respecto a la Chl *a* (**Fig. 5**).

La carga positiva del átomo de magnesio se encuentra ahora menos *apantallada* por los electrones  $\pi$ , por lo que se coordina con grupos que contienen un dipolo fijo, como el agua, el grupo carbonilo del esqueleto peptídico o grupos que contengan oxígeno.

El oxígeno del grupo formilo del carbono 7 forma puentes de hidrogeno, proporcionando estabilidad adicional a la coordinación de la Chl *b* y la estructura de las antenas cosechadoras de luz en plantas (**Hooper et al., 2007**).

Un ejemplo directo de la coordinación selectiva de las clorofilas se puede observar en el cristal de FSII de espinaca que fue cristalizado unido a su antena distal LHCII (PDB 3JCU). El grupo lateral de la histidina número 198 de la cadena A (PsbA) coordina el átomo de magnesio de la Chl *a* en la posición 405 (**Fig. 16a**). En esta unión el átomo de magnesio se comporta como un ácido de Lewis (aceptor de electrones) y el imidazol del residuo de histidina como una base de Lewis (donadora de electrones). El oxígeno del carbonilo del residuo de tirosina número 24 de la cadena G (subunidad del trímero del LHCII) coordina el átomo de magnesio de la Chl *b* en la posición 231 (**Fig. 16b**).

La nube electrónica del tetrapirrol de la Chl *b* es redistribuida debido al oxígeno del formilo del C7, el átomo de magnesio reduce el valor de su pK por la reducción de la densidad electrónica en su entorno. La carga positiva del magnesio se expresa con mayor intensidad e interactúa preferentemente con ligandos con carácter negativo e incluso con el extremo negativo de moléculas dipolares (**Hooper et al., 2007; Hooper, 2012**)

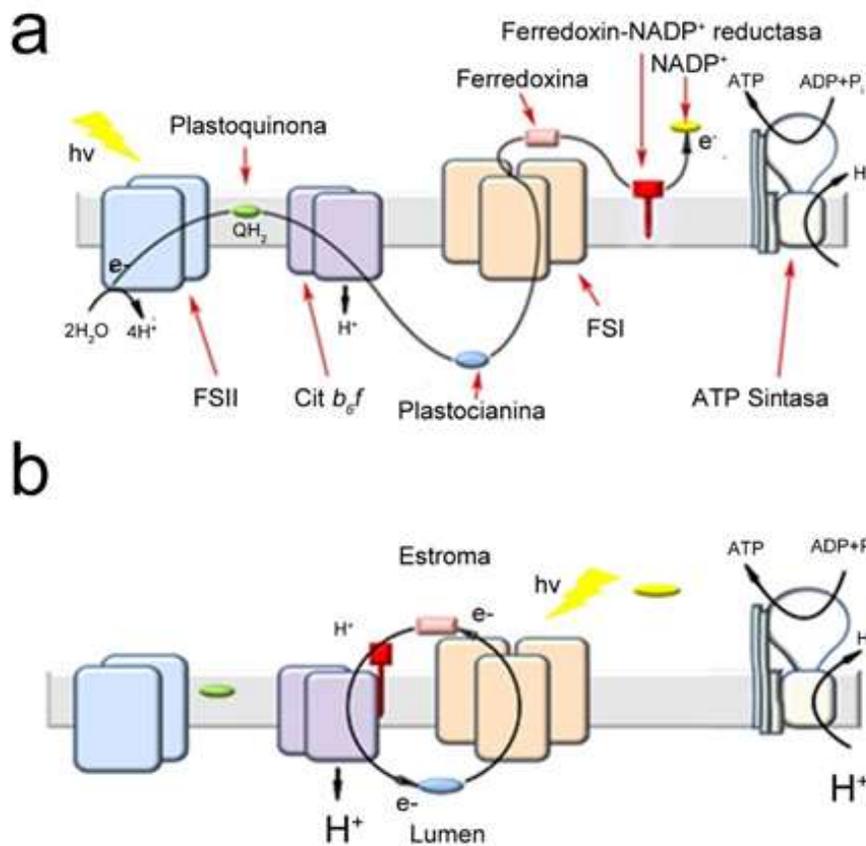


*Fig. 16 Interacciones de la clorofila a y b con proteínas antena en plantas. a. Clorofila a coordinada por el grupo imidazol de un residuo de histidina (H198: subunidad A). b. Clorofila b coordinada por el grupo carbonilo (esqueleto peptídico) de un residuo de tirosina (Y24: subunidad G). En gris se muestran las  $\alpha$ -hélice. Los residuos de aminoácidos se muestran en bastones. Los átomos de magnesio de las clorofilas se muestran en esferas verdes; los átomos siguen el siguiente código: oxígeno, rojo; nitrógeno, azul; azufre amarillo. Los átomos de carbono de los residuos que coordinan el átomo de magnesio de las clorofilas se resaltan en verde. Se utilizó el cristal del FSII de espinaca con PDB 3JCU.*

## Flujo de electrones impulsado por la luz

Como ya se ha mencionado, los fotosistemas son parte de una compleja maquinaria que produce ATP y NADPH en el llamado flujo no cíclico de electrones. Acoplan su función por medio del citocromo  $b_6f$ , un complejo hetero-oligomérico que cataliza la oxidación del plastoquinol proveniente del FS II y reduce al citocromo  $c_6$  o a la plastocianina (PC), los cuales transportarán los electrones al FS I, para finalmente ser transferidos de la ferredoxina (Fd) al  $\text{NADP}^+$  por medio de la FNR. En este flujo se bombean protones del citoplasma al lumen generando un gradiente que es utilizado por la ATP Sintasa para generar ATP (**Fig. 17a**). Existe un proceso donde los electrones son ciclados a través del FSI, la Fd, el  $b_6f$  y la PC o el  $c_6$ .

Este flujo cíclico se inicia por el desacoplamiento del FSII en el flujo de electrones. El FSI se oxida cediendo un electrón del lado citoplasmático, el cual retornara por el lado luminal, para regresarlo a su estado basal (**Fig. 17b**). El flujo cíclico no es productivo en sí mismo a menos que la energía del fotón sea acumulada. Esto sucede porque el flujo de electrones se encuentra acoplado a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana de los tilacoides por el  $b_6f$ . Al existir un gradiente de protones o fuerza protón-motriz, el complejo proteico ATP Sintasa puede utilizarlo para generar enlaces entre el ADP y el fosfato inorgánico (Pi) para formar ATP.



*Fig. 17 Flujo de electrones impulsado por la luz. a) Flujo no cíclico de electrones. En este mecanismo participa el FS II y el FS I acoplados por el complejo del citocromo  $b_6f$ , en él se produce NADPH a partir de los electrones cedidos por el  $H_2O$  y ATP usando el gradiente de protones vía la ATP Sintasa. b) Flujo cíclico de electrones. Este mecanismo funciona para obtener un balance entre ATP y NADPH. Al ciclar los electrones se genera el gradiente protomotriz, pero no se reduce NADPH. El esquema se muestra a la enzima ferredoxin-NADPH oxido reductasa unida a la membrana tilacoidal por un dominio hidrofóbico en *Prochlorococcus marinus* MIT9313 (Tesis de maestría, Barrera, 2013)*

## El Fe<sup>2+</sup> como nutriente

Se ha demostrado que la concentración de Fe<sup>2+</sup> limita el crecimiento del fitoplancton en vastas regiones del océano. Debido a las condiciones oxidantes que prevalecen en los nichos de las cianobacterias la forma de hierro que se puede encontrar es Fe<sup>3+</sup> y cuya concentración aproximada a pH 7 es de 10<sup>3</sup> iones (mL<sup>-1</sup>), debido a que en esta forma es insoluble y normalmente se encuentra formando hidróxidos (**Martin et al., 1994**). Este elemento es esencial en todos los procesos metabólicos donde hay transporte de electrones. Las enzimas que participan en el flujo de electrones impulsado por la luz requieren 57 átomos de Fe para que su forma funcional tenga los cofactores necesarios para transportar dichos electrones (**Tabla 1**).

*Tabla 1. Cantidad de átomos de Fe<sup>2+</sup> en cada enzima o acarreador en el flujo de electrones impulsado por luz en cianobacterias. No se menciona ninguna relación estequiometría, el pool de ferredoxina es el componente que mayor cantidad de Fe<sup>2+</sup> contiene en proporción debido al número de estas proteínas.*

Enzima o acarreador	Cofactor	N. de átomos de Fe <sup>2+</sup>
<b>Dímero Fotosistema II</b>	Hemos del <i>Cit b-552</i> Fe no hémico entre Q <sub>A</sub> y Q <sub>B</sub>	4
<b>Dímero del Complejo del citocromo b<sub>6</sub>f</b>	Hemo b <sub>L</sub> , hemo b <sub>H</sub> y hemo x en el <i>Cit b<sub>6</sub></i> Hemo del <i>Cit f</i> 2Fe-2S en la proteína de Rieske	12
<b><i>Cit c<sub>6</sub></i> o <i>Cit c-553</i></b>	Hemo del citocromo	1
<b>Trímero del Fotosistema I</b>	4Fe-4S de F <sub>x</sub> 4Fe-4S de F <sub>A</sub> 4Fe-4S de F <sub>B</sub>	36
<b>Ferredoxina</b>	2Fe-2S	2

Las cianobacterias han desarrollado dos sistemas para hacer frente la baja concentración de este elemento: usando sideróforos y reduciendo la cantidad de enzimas que usan Fe<sup>2+</sup> como cofactor o en sus síntesis.

La ferredoxina transporta electrones a varias rutas metabólicas, muy probablemente la mayor concentración de Fe<sup>2+</sup> usada en la fotosíntesis y fijación de nitrógeno se encuentra en el *pool* de ferredoxina. Quizá es por lo que, un mecanismo de adaptación a la escasez de Fe<sup>2+</sup> es la sustitución de la ferredoxina por una proteína que no requiere ese elemento para acarrear los electrones.

La flavodoxina es una proteína que usa como cofactor flavina mononucleótido, la cual se puede reducir y oxidar para transportar los electrones. En cianobacteria el gen *isiB* codifica para la flavodoxina, la cual es regulada por la proteína Fur, la cual tiene un átomo de Fe<sup>2+</sup> como cofactor. En condiciones normales de Fe<sup>2+</sup>, Fur es un represor (**Havaux et al. 2005**). Generalmente el gen de la flavodoxina se transcribe junto con el gen *isiA*, el cual codifica para una holoproteína de seis pasajes transmembranales de la superfamilia CP43-like (IsiA), la cual se ha demostrado se asocia al FS I en condiciones de bajo Fe en el medio de crecimiento (**Bibby et al., 2001; Bibby et al., 2003**).

### ***Prochlorococcus marinus* MIT9313**

*Prochlorococcus* es un género diverso de cianobacterias marinas con relevancia ambiental, trófica y de productividad fotosintética (**Chisholm et al., 1988; Goericke & Repeta, 1993; Goericke & Welschmeyer, 1993**). Las células de *Prochlorococcus* son abundantes en amplias áreas de ecosistemas oligotróficos en el océano (**Bouman et al., 2006, Johnson et al., 2006; Partensky et al., 1999**). Diferentes *ecotipos* (ver cuadro 2 en **Coleman & Chisholm, 2007**) de este género se distribuyen a través de una columna de agua en la zona fótica del océano con una correlación fisiológica y genética (**Hess et al., 2001**). La selección natural de *ecotipos* de *Prochlorococcus* ha sido estudiada en relación con la presión evolutiva ejercida por el ambiente oligotrófico y la disponibilidad de luz.

Se ha sugerido que la reducción de tamaños y la información genómica en el género *Prochlorococcus* son una modificación para mejorar la absorción de nutrientes, luz y economizar las funciones celulares por la retención exclusiva de los genes necesarios para proliferar bajo las condiciones ambientales y las necesidades del metabolismo. Aunque, las interacciones de *Prochlorococcus* con otros organismos (cianófagos y heterótrofos), además del entorno físico han ido ganando relevancia en el estudio evolutivo de este género (**Biller et al., 2014; Coleman & Chisholm, 2007; Partensky & Gaczar, 2010; Sullivan et al., 2005**).

*Prochlorococcus marinus* MIT9313 (MIT9313) es una cianobacteria de forma oval muy pequeña entre 0.6 y 1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro. Su genoma de 2.4 Mpb se encuentra totalmente secuenciado y anotado. Tiene un contenido de GC del 50.7% y no presenta motilidad. Es un mesófilo autóctono de ambientes marinos oligotróficos y fue aislado por la Dra. Penny Chisholm de la corriente del golfo (**Rocap et al., 2003**). MIT9313 no contiene genes para producir un ficobilisoma funcional, sin embargo, utiliza antenas integrales de membrana como antenas distales llamadas Pcb (Protein *a/b* chlorophyll binding). En el genoma de MIT9313 existen dos genes que codifican para dos proteínas, *pcbA* y *pcbB*. Se ha demostrado que *pcbA* es inducible por escasez de  $\text{Fe}^{2+}$  y su producto génico es una antena distal del FSI; *pcbB* por su parte es una antena distal del FSII y es constitutiva (**Bibby et. al. 2003**). MIT9313 posee una peculiaridad más. No solo no usa el ficobilisoma como antena distal, sino además utiliza divinil clorofila *a* (Chl  $a_2$ ) y *b* (Chl  $b_2$ ) en su aparato fotosintético. El uso de Chl  $b_2$  en sus antenas distales les permite utilizar la luz azul del fondo marino (**Fig. 18**).

Esta cianobacteria es un modelo de estudio que permitirá caracterizar un aparato fotosintético que utiliza antenas distales membranales de manera constitutiva supliendo la función del ficobilisoma. Incorpora a sus holoproteínas un tipo de clorofila *b*, atípica en *Cyanobacteria*. Más aún, el tipo de clorofila *a* y *b* que utiliza para realizar la fotosíntesis no es usada por ningún otro organismo fotosintético fuera de su género. La distribución de estas clorofilas en los fotosistemas y antena, además de las asociaciones que se formen entre ellos es de nuestro interés.

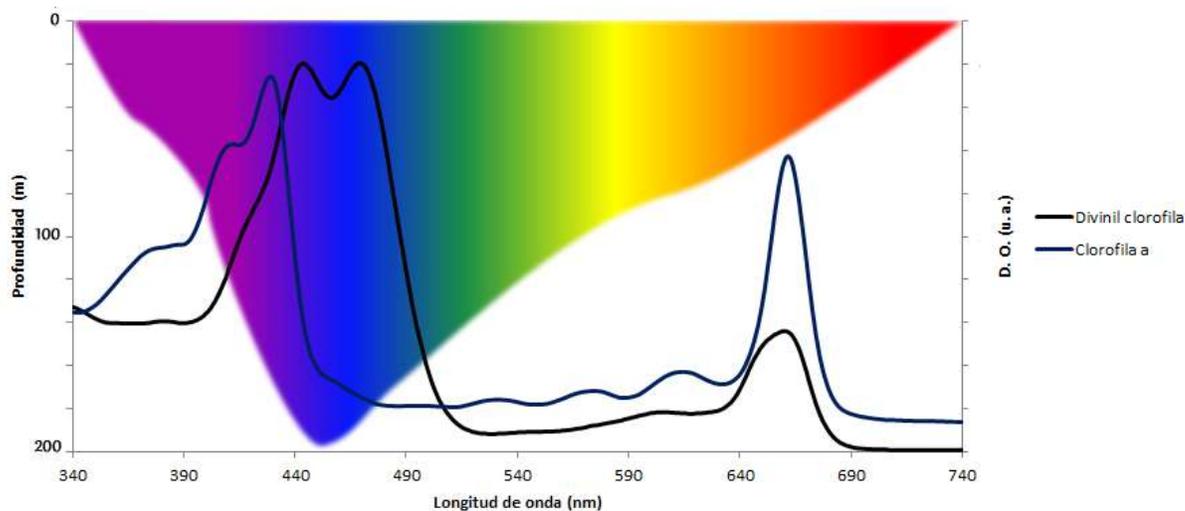


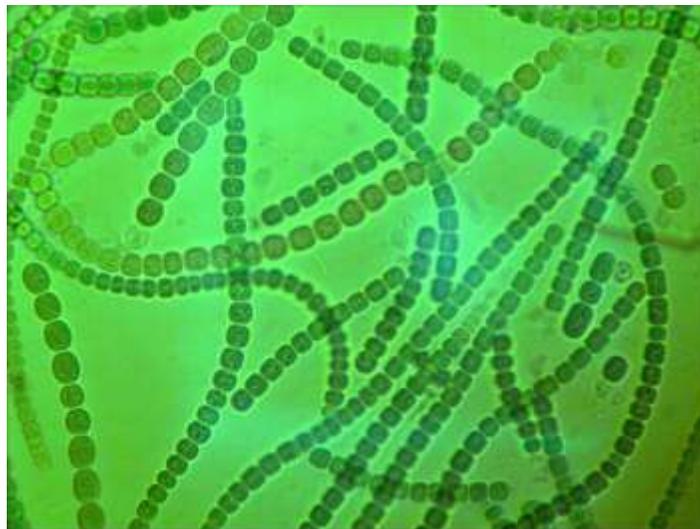
Fig. 18 Espectros de absorción de divinil clorofilas (negra) y la clorofila a (azul). Los máximos de absorción corresponden a la longitud de onda del color azul. La luz solar es absorbida a lo largo del espectro en el agua oceánica, a profundidades de hasta 200 metros la luz azul es la única disponible, justo donde la divinil clorofila b tiene mayor coeficiente de extinción molar. (Johnson et al., 1999).

### ***Nodularia* sp. CCM9**

La cianobacteria *Nodularia* sp. CCM9 fue aislada por el Dr. Carlos Gómez Lojero de un tapete microbiano proveniente de Cuatro Ciénegas, Coahuila, una zona que emergió del mar hace aproximadamente 90 millones de años (McDowell and Clabaugh, 1979) y en la que prevalece un clima seco semicálido, la precipitación media anual se encuentra en el rango de los 100 a 345 milímetros (INEGI). La M. en C. Lourdes E. Leyva aisló el ADN de CCM9 y amplificó las secuencias del 16S rARN y la zona ITS encontrando un 97% y 87% de identidad, respectivamente, con la cianobacteria *Nodularia spumigena* CY9414 (Fig. 19). Esta cianobacteria fue aislada de las aguas salobres del mar Báltico, es filamentosa, capaz de diferenciarse celularmente formando heterocistos para la fijación de nitrógeno; aquinetos para sobrevivir largo tiempo en forma latente hasta que las condiciones ambientales sean adecuadas para su crecimiento y hormogonias, estructuras celulares que les permiten dispersarse e iniciar nuevas colonias.

Cy9414 posee un cromosoma circular de 5.486 Mpb, de las cuales se han anotado 5294 proteínas (Voß *et al.*, 2013). Realizando un análisis *in silico* en el genoma de *Nodularia spumigena* CY9414, se puede dar cuenta de la presencia de 2 genes que codifican para proteínas que responden a estrés por disminución de Fe<sup>2+</sup> (*isi*), además de 3 genes que posiblemente codifiquen para holoproteínas.

La cianobacteria CCM9 ha tenido, posiblemente, 90 millones de años para evolucionar de manera aislada de la especie más cercana, en un medio ambiente diferente, lo cual presenta innumerables preguntas sobre sus características. La cercanía filogenética con una cianobacteria (CY9414) cuyo genoma se encuentra totalmente secuenciado permite la búsqueda de genes que codifican para proteínas que forman parte del aparato fotosintético. Este modelo de estudio nos permitirá estudiar los fotosistemas y su asociación con distintas antenas distales. Los tres genes putativos de antenas podrían tener o no una regulación dependiente de la concentración de hierro en el medio de crecimiento y en caso de hacerlo podríamos estudiar su asociación con los fotosistemas.



*Fig. 19 Micrografía de Nodularia sp. CCM9. Se utilizó una alícuota del cultivo celular de CCM9, BG11 con 0.1 M NaCl y se tomó una fotografía con el objetivo de inmersión 100x.*

## ***Synechococcus* PCC 7002**

*Synechococcus* sp. PCC 7002 fue aislada en 1961 por Chase Van Baalen de corrales de peces en la Isla Maguyes en Puerto Rico. El organismo crece en agua salobre, es unicelular, pero tiende a formar filamentos cortos de entre dos y cuatro células durante el crecimiento exponencial, su temperatura óptima de crecimiento es de 38 °C. Las células miden entre 1.5 y 2.5  $\mu\text{m}$  de longitud y carecen de ficoeritrina y ficoeritrocianina. Puede crecer heterotróficamente usando glicerol como sustrato, requiere vitamina B<sub>12</sub> para crecer. La duplicación de esta cianobacteria es una de la más rápida conocida, con un tiempo aproximado de 3.5 horas en condiciones óptimas (intensidad de la luz  $\sim 250$  fotones  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ; urea como fuente de nitrógeno y 2 % (v/v) de CO<sub>2</sub>). Es extremadamente tolerante a altas intensidades de luz y es transformable.

El genoma de PCC 7002 se encuentra totalmente secuenciado, contiene 3 Mpb en un cromosoma circular y se han anotado 3187 proteínas (Genbank ID: CP000951.1). Cuenta con un operón donde se encuentran juntos los genes *isiA* e *isiB* los cuales se ha mostrado son expresados bajo estrés por disminución de Fe<sup>2+</sup>, cuyos productos génicos son una antena accesoria integral de membrana (IsiA) y una proteína acarreadora de electrones soluble (flavodoxina), respectivamente (**Leonhard and Straus, 1992**). Este modelo de estudios es ampliamente utilizado por la facilidad con que se puede modificar genéticamente. Aunque se han demostrado los incrementos del nivel del mensajero para los genes *isi*, no se ha descrito los productos génicos cuando existe escasez de hierro en el medio de cultivo. Este modelo de fácil crecimiento en el laboratorio nos permitirá caracterizar una antena inducible IsiA y su asociación con los fotosistemas, posiblemente de manera exclusiva con el FSI.

## Antecedentes

Cuando un nutriente se encuentra disminuido se presentan cambios en la expresión génica y remodelación del aparato fotosintético. Por ejemplo, cuando la concentración de hierro se encuentra disminuida, *Synechosystis* PCC 6803 disminuye la cantidad de ficobiliproteínas y expresa proteínas intrínsecas de membrana que unen clorofila, denominadas, Iron Estrés Inducible o Isi (**Laudenbach et. al, 1988; Bibby et al., 2001**). Estas proteínas comparten un antepasado común con PsbC o CP43 (antena proximal del FS II) de plantas y cianobacterias, los aminoácidos involucrados en la unión de clorofila son muy conservados (**Fig. 20**).

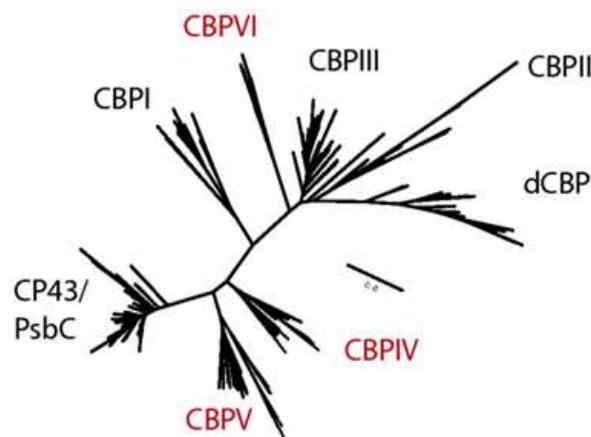
Análisis *in silico* muestran que en la teCRera parte de los genomas de cianobacterias (hasta ahora secuenciados) contienen genes para proteínas hidrofóbicas que unen clorofila (**Shih et al., 2013**). Estas proteínas de 6 pases transmembranales corresponden a una superfamilia de proteínas denominadas CP43-like. Los genes de esta superfamilia se encuentran dispersos en todos los géneros de cianobacteria y muchos se encuentran regulados por distintos factores ambientales como estrés oxidativo (**Yousef et al., 2003**), intensidad de la luz (**Havaux et al., 2005**) y nutrientes (**Geiß et al., 2003**).

Se ha demostrado que algunas de las proteínas CP43-like forman supercomplejos con los fotosistemas y funcionan como antenas distales para dispersar el exceso de luz o aumentar el área de captación. Dentro de esta superfamilia destacan las proteínas inducibles por escasez de hierro IsiA, las proteínas distales constitutivas que unen Chl *a/b*, Pcb.

Para *P. marinus* existen micrografías (**Fig. 21**) que muestran la formación de súper complejos tanto entre las antenas inducibles PcbA y el FSI, y constitutivamente entre PcbB y el FSII (**Fig. 20**, dCBP). La posible función de estas proteínas es hacer eficiente la captura de luz para cada fotosistema, sin embargo, no existe una descripción bioquímica de estas estructuras.

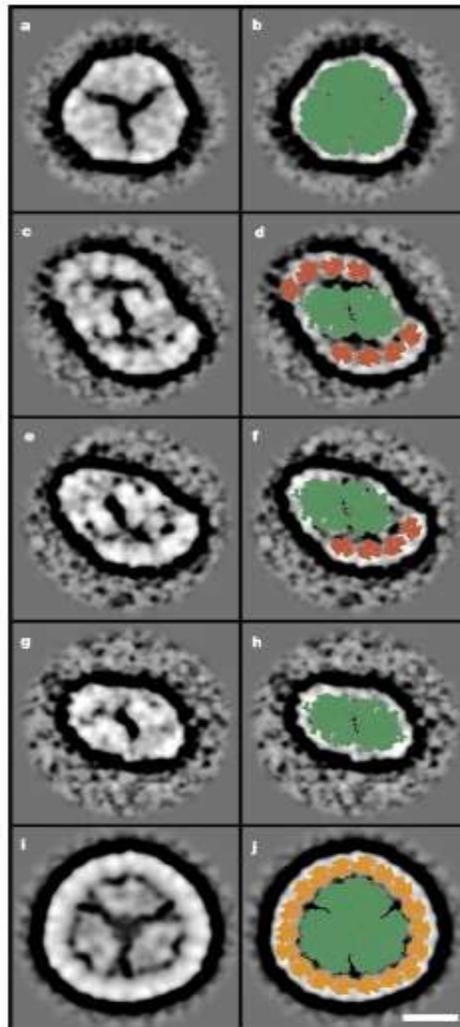
Para PCC 7002 existe evidencia que posee un gen correspondiente a una proteína de membrana que une clorofila (**Fig. 20**, CBPIII) y cuya expresión se encuentra aumentada en condiciones de bajo hierro en el medio de crecimiento (**Leonhard & Straus, 1992**). Debido a que *Nodularia sp.* CCM9 es una especie recién aislada, no existe ninguna evidencia de la presencia de genes pertenecientes a la superfamilia CP43. Sin embargo, existen reportes de análisis genómico de que la especie más cercana filogenéticamente, *Nodularia spumigena* CY9414, posee genes del tipo CP43-like (**Fig. 20**, CBPIV-VI).

El estudio bioquímico de las proteínas de membrana es un reto formidable; sustituir el ambiente lipídico sin alterar la estructura y función de éstas es el primer paso. Un punto a nuestro favor es que las proteínas fotosintéticas son las más abundantes de la membrana tilacoidal, sin embargo, las estructuras son muy grandes y lábiles. El uso de detergentes para solubilizar las proteínas membranales es uno del método más utilizados, sin embargo, los resultados que se obtienen varían entre estructuras y organismos, no existe un método infalible que funcione siempre.



*Fig. 20* Árbol filogenético de proteínas que une clorofila (CBPs). En rojo se encuentran proteínas del estudio realizado por Kerfeld et al., en 2012, en el que se secuenciaron 54 genomas cianobacteriales. En negro se encuentran las proteínas con que se contaba antes de este estudio. Las proteínas homologas a PsbC/CP43 tienen un origen evolutivo en común con el gen psbC. Los grupos CBPIV, -V y -VI contienen histidinas y glutaminas conservadas donde se une clorofila en otras holoproteínas, aunque experimentalmente no se ha comprobado del todo. Las proteínas IsiA (holoproteínas inducibles) pertenecen al grupo CBPIII y Pcb (antenas del género *Prochlorococcus*) a los grupos dCBP, CBPI y CBPII. Es de notar que al grupo -V pertenecen los genes con fusión psbC/psaL.

Durante el proyecto de maestría (Tesis de maestría de **Barrera, 2013**) trabajamos con el detergente n-Dodecil  $\beta$ -D Maltopiranosido (DDM), el cual es denominado un detergente *suave*. Solubilizando membranas tilacoidales de MIT9313, este detergente nos permitió separar el FSI como trímero y monómero, además del monómero del FSII. Por otro lado, nos dio indicios de un posible supercomplejo formado por el complejo del citocromo *b<sub>6</sub>f* y la enzima ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa (FNR).



*Fig. 21 Micrografías de fotosistemas asociados a proteínas antenas distales en Prochlorococcus marinus MIT9313. Partículas aisladas de células crecidas en presencia (a, c, e, g) o ausencia (i) de hierro. Se muestra las estructuras en rayos X del trímero del fotosistema I (verde b, j) o el fotosistema II (verde d, f, h). Las proteínas antenas distales se muestran en rojo o naranja. Barra de escala 100 Å (Bibby, et al., 2003).*

## Justificación

Diversos sistemas de captación de luz han sido descritos y caracterizados a lo largo de varios linajes de bacterias, algas y plantas. Las soluciones para hacer más eficiente la captación de luz son diversas y en cianobacterias se han reportado estudios que muestran la remodelación del aparato fotosintético como respuesta a cambios medioambientales, principalmente la concentración de nutrientes y la intensidad y tipo de luz (**Bibby, et al., 2001; Bibby, et al., 2003; Shen et al., 2016; Gan et al., 2014**).

Para poder estudiar sistemas de captación de luz que funcionan enteramente por proteínas antena membranales es apropiado utilizar organismos de nichos diferentes y que presentan información genética de proteínas CP43-like como MIT9313, CCM9 y 7002. La caracterización de estos organismos fotosintéticos a nivel molecular dará información comparativa sobre sistemas de captación eficientes de luz solar seleccionadas evolutivamente. La información que se genera en este tipo de estudios impacta directamente sobre la bioingeniería de organismos fotosintéticos. Utilizar la energía del sol para generar productos de interés (como biocombustibles, moléculas para la industria farmacéutica, etc.) es un área de investigación que requiere información de las características y funcionamiento de la maquinaria fotosintética para después emularla sintéticamente o transferirla a organismos modificados genéticamente con fines específicos.

Por otra parte, es poca la información disponible sobre las especies de cianobacterias presentes en nichos ecológicos de nuestro país. La oportunidad de caracterizar un organismo aislado de un ecosistema con las características de Cuatro Ciénegas, Coahuila, reforzará la necesidad de dar la importancia y cuidar estos recursos naturales, siendo las cianobacterias solo una parte de extensas cadenas tróficas que han prevalecido durante incontables años en estos nichos ecológicos.

## Hipótesis

- I. **En *Prochlorococcus marinus* MIT9313 la relación de Chl  $b_2$ /Chl  $a_2$  es mayor en las antenas distales que en los fotosistemas I y II.**
- II. **La proteína PcbB es la antena distal del fotosistema II en *Prochlorococcus marinus* MIT9313, por lo que esta debe estar formando un supercomplejo con dicho fotosistema en condiciones normales de crecimiento.**
- III. Aunque se ha reportado el aumento en el mRNA del gen *isiA* en la cianobacteria *Synechococcus* PCC 7002 al reducir la concentración de  $Fe^{2+}$  en el medio de crecimiento (Leonhard & Straus, 1992), no se ha estudiado el producto génico y su participación en el aparato fotosintético. **El producto génico del gen *isiA* es una antena distal que se asocia al FSI en la cianobacteria *Synechococcus* PCC 7002.**
- IV. Considerando que: 1) que la secuencia de la subunidad 16S rRNA, la cianobacteria más cercana a CCM9 es *Nodularia spumigena* CY9414 con un 97% de identidad y, 2) cuando realizamos un análisis *in silico* en el genoma de CY9414, encontramos los genes correspondientes a proteínas homologas a IsiA e IsiB, además, en el mismo grupo otros 3 genes de la superfamilia de antenas CP43-like (nsp\_37450, nsp\_37500 y nsp\_35710). **Al reducir la concentración de  $Fe^{2+}$  en el medio de crecimiento de CCM9 se expresará el gen *isiA*, cuyo producto génico participará en la captación de luz y su transferencia formando complejos con los fotosistemas (*isiA* u homólogos de CP43). Además, se espera detectar la expresión de alguno de los genes nsp\_37450, nsp\_37500 y nsp\_35710, como respuesta a la escasez de fierro.**

## Objetivos generales

- I. Aislar el supercomplejo formado por el FSII con su antena distal (PcbB) en la cianobacteria *Prochlorococcus marinus* MIT9313.
- II. Encontrar la distribución de pigmentos *Chl a<sub>2</sub>* y *Chl b<sub>2</sub>* en los complejos fotosintéticos de la cianobacteria MIT9313.
- III. Comparar bioquímicamente el proteoma fotosintético constitutivo con el inducible, (disminuyendo la concentración de Fe<sup>2+</sup> en el medio de crecimiento) de las cianobacterias CCC9 y *Synechococcus* PCC 7002 utilizando métodos de electroforesis en geles de poliacrilamida y espectrometría de masas.

## Objetivos particulares I

- ✓ Encontrar un método de ruptura celular que permita preservar el supercomplejo FSII-PcbB en la cianobacteria *Prochlorococcus marinus* MIT9313.
- ✓ Encontrar la concentración de detergente DDM necesaria para solubilizar el supercomplejo FSII-Pcb de las membranas de los tilacoides.
- ✓ Separar por gradiente de sacarosa y electroforesis nativa los supercomplejos solubilizados de membranas tilacoidales.
- ✓ Identificar los componentes del supercomplejo utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE y 2-D SDS-PAGE).
- ✓ Confirmar la identidad del supercomplejo utilizando MS.

## Objetivos particulares II

- ✓ Extraer el total de las divinil clorofilas en el solvente en el que se conocerán los coeficientes de extinción molar de cada una de las divinil clorofilas. Evitar la feofitización de la muestra debido a la sustitución del átomo de Mg por H<sup>+</sup>. En todos los pasos conducentes a su extracción se cuidará de tener una base como el hidróxido de amonio para evitar la acidificación. Además de prevenir la foto degradación de dichos cromóforos.
- ✓ Obtener los valores del coeficiente de extinción para Chl *a*<sub>2</sub> y Chl *b*<sub>2</sub> en el solvente que se utilizó para extraerlas.
  - a) Separar los pigmentos extraídos por HPLC y confirmar su identidad por MS.
  - b) Obtener los espectros de absorción de Chl *a*<sub>2</sub> y Chl *b*<sub>2</sub> en acetona al 80% para obtener sus coeficientes de extinción molar.
- ✓ Utilizando gradientes de sacarosa obtener fracciones enriquecidas del FSI, la antena distal (PcbB) y el FSII.
- ✓ Extraer los pigmentos de cada uno de los complejos con el solvente en el que se obtuvieron los coeficientes de extinción molar y medir los espectros de absorción.
- ✓ Obtener la estequiometría de Chl *a*<sub>2</sub> y Chl *b*<sub>2</sub> utilizando un sistema de ecuaciones simultáneas que relacionen los parámetros obtenidos (**Arnon, 1949**).

## Objetivos particulares III

- ✓ Obtener las membranas de los tilacoides utilizando un medio de ruptura celular adecuado para preservar la estructura nativa de los complejos fotosintéticos.
- ✓ Identificar la presencia del gen *isiA* en la cianobacteria CCM9 utilizando PCR.
- ✓ Encontrar la concentración de Fe<sup>2+</sup> necesaria para que se induzca la expresión de *isiA* en las cianobacterias CCM9 y *Synechococcus* PCC 7002.
- ✓ Solubilizar las antenas constitutivas e inducibles utilizando el detergente neutro dodecil maltósido, asegurándose de preservar los complejos proteicos.
- ✓ Separar las holoproteínas constitutivas e inducibles solubilizadas, por una técnica electroforética (CN-PAGE como primera dimensión y SDS-PAGE como segunda

dimensión) e identificar los componentes por peso molecular aparente y por espectrometría de masas.

- ✓ Identificar en SDS-PAGE las subunidades de las holoproteínas por su peso molecular aparente y por espectrometría de masas.

## **Materiales y métodos**

Algunas técnicas se transcriben de la tesis de maestría Barrera-Rojas J., 2013 y las modificaciones realizadas se indican.

### **Cultivos celulares**

#### ***Prochlorococcus marinus* MIT9313**

Se utilizó agua de mar basada en el medio mínimo AMP1 como en [chisholmlab.mit.edu/protocols/amp1.doc](http://chisholmlab.mit.edu/protocols/amp1.doc). Las células mantuvieron a una concentración de 1.18  $\mu\text{M}$  de cloruro férrico. Las células fueron crecidas en un volumen de 18 L alcanzando hasta 6 g de células en dos meses con una intensidad de luz blanca continua de 1.2  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . La temperatura fue mantenida a 19 °C. El cultivo se burbujeo moderadamente con aire.

Nota: El inóculo resultó ser muy sensible a cambios bruscos de temperatura (comunicación personal con Jorge ZaCRo Mendoza).

#### ***Synechococcus* PCC 7002**

Se siguieron las condiciones de crecimiento como en **Gómez et. al. 2003**. Se utilizó medio mínimo A<sup>+</sup> suplementado con 4  $\mu\text{g/L}$  de vitamina B12. Se usó luz blanca con una intensidad de 250  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . El cultivo se inició inoculando 15 mL de medio suplementado con cloruro férrico 14.4  $\mu\text{M}$  por 48 h a 38 °C y burbujeo constante (5% CO<sub>2</sub>). El cultivo se escaló hasta poder contar con 300 mL con D.O.<sub>750</sub> = 2.0. Para la escasez de hierro se utilizaron 3 diluciones sucesivas de 300 mL en 1.8 L. Las temporalidades de crecimiento fueron 2, 4 y 6 días para cada cultivo hasta alcanzar una concentración final de 66.6 nm de cloruro férrico.

Nota: Las células mostraron clorosis bastante marcada en la última dilución y la cantidad de biomasa fue baja con respecto a células crecidas con sus medios mínimos completos.

### ***Nodularia sp. CCM9***

Las células aisladas por Lourdes E. Leyva Castillo identificadas como CCM9 fueron obtenidas de un consorcio microbiano de color verde (*tapete microbiano*) de suelo con estiaje e hidroperíodos correspondientes a un desierto (pero con presencia de cuerpos de agua) proveniente de Cuatro Ciénegas en el Estado de Coahuila.

Las células se crecieron en medio mínimo BG11 con 0.2 M de NaCl con 22  $\mu\text{M}$  de citrato férrico amoniacal. Se usó luz blanca con una intensidad de  $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . La temperatura fue de 22° C y los cultivos recibieron burbujeo de aire con  $\text{CO}_2$  al 2%. La remoción del hierro se efectuó siguiendo las diluciones seriadas de la misma manera que para *Synechococcus* PCC 7002. La densidad óptica de biomasa no se determinó por la forma de crecimiento filamentoso de CCM9. Las temporalidades de crecimiento fueron 4, 6 y 8 días para cada cultivo hasta alcanzar una concentración final de 101.8 nM de citrato férrico amoniacal.

### **Ruptura celular**

Todos los pasos se realizaron buscando mantener 4 °C. Todas las células se lavaron con buffer de ruptura (Tris 50 mM pH 7.4, azida de sodio 0.1%, EDTA 10 mM y PMSF 1 mM) con una relación 1:9 (w/v). Las células en buffer de ruptura se centrifugaron a 16, 000 RPM por 20 min. Las células se mezclaron con arena de mar (libre de materia orgánica) en una relación 1 a 3 (w/w). Para la ruptura celular se utilizó un mortero como en **Lerma & Gómez-Lojero** (1987). Se removieron las estructuras celulares intactas a 5, 000 RPM por 10 min. Del sobrenadante, se aislaron las membranas tilacoidales a 27, 000 RPM por 15 min.

Las membranas se resuspendieron en buffer de muestra (ácido 6-aminocaproico 750 mM, Bis-Tris-HCl 50 mM pH 7.0) y se alícuotaron a una concentración 1 mg de Chl \*  $\text{mL}^{-1}$ . Las alícuotas se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido y se preservaron a -70 °C por hasta seis meses.

## Solubilización de membranas

Para solubilizar las membranas de los tilacoides se utilizó el detergente suave y neutro n Dodecyl  $\beta$ -D maltopyranoside (DDM), isómero  $\beta > 99\%$  de Affimetrix o Sigma. Se tomaron alícuotas de un stock al 20% (w/v) en agua, se guardó 4 °C. Se usaron concentraciones distintas de DDM para solubilizar los tilacoides de *Nodularia sp.* CCM9. Para *Prochlorococcus marinus* MIT9313 y *Synechococcus* PCC 7002 se usó 1% (w/v) de detergente para solubilizar los tilacoides. Para la solubilización se utilizó un agitador magnético durante 30 min a mínima velocidad. Las membranas no solubilizadas se separaron de los complejos por ultracentrifugación en el rotor 755Ti a 27, 000 RPM por 15 min. Las muestras se protegieron de la luz y se mantuvieron todo el tiempo a 4°C. Se midió la clorofila de cada solubilizado para cargar en el gradiente de sacarosa o los geles de poliacrilamida.

## Electroforesis en gel de poliacrilamida

### Geles Nativos claros (CN-PAGE)

Los geles no-desnaturalizantes clear native (CN-PAGE) se realizaron en placas de vidrio de 14 x 16 cm con *peines* de 5 pozos para cargar un máximo de 500  $\mu$ L de muestra. Para formar los geles con un gradiente de poliacrilamida del 4 al 13% se usaron dos conos invertidos con soluciones del 4 y 13% respectivamente. Se utilizaron los Marcadores de peso molecular que se muestran en la **tabla 2**. El procedimiento se basó en lo reportado por **Wittig & Schägger** (2007).

Para el gel de separación se agregaron los volúmenes necesarios de los stocks que se muestran en la **tabla 3** para obtener 12 mL de poliacrilamida al 4% y 12 ml de poliacrilamida al 13%.

- a) El gradiente de poliacrilamida se realizó usando unos conos invertidos formadores de gradiente con agitación moderada.
- b) Para el gel de condensación se agregaron los volúmenes necesarios de los stocks que muestra la **tabla 3** para obtener 5 mL de poliacrilamida al 4%. Este se colocó en las placas inmediatamente después de formar el gradiente de poliacrilamida para asegurar una corrida constante.

Todos los pasos siguientes se realizaron a 4 °C

- c) Por cada 100 µL de muestra se adicionaron 3 µL de rojo de Ponceau al 0.3% como frente de color. Se cargó un mínimo de 50 µg de clorofila de muestra y 200 µg de Marcadores para la tinción con Coomassie y un mínimo de 500 µg de clorofila para realizar el 2-D SDS-PAGE.
- d) La electroforesis se corrió a 5 mA constantes por cada placa de gel, limitando el voltaje a no más de 500V, aproximadamente por 6 horas. En la **tabla 4** se muestran los buffers de cátodo y ánodo para CN-PAGE.

*Tabla 2. Marcadores de peso molecular usados en CN-PAGE.*

Marcador	Peso molecular (kDa)
Tiroglobulina	660
Ferritina	440
Aldolasa	232
Catalasa	157

Tabla 3. Concentraciones finales para gradientes de poliacrilamida.

Stock	Concentración final para gel de separación al 4% (12 mL)	Concentración final para gel de separación al 13% (12 mL)	Concentración final para gel de condensación al 4% (5 mL)
Acrilamida 48.5% - Bis acrilamida 1.5%	4%	13%	4%
Buffer 3X (ácido 6-aminocaproico 1.5 M, Bis-Tris-HCl 150 mM pH 7.0)	1X	1X	1X
Glicerol 79.5%	20%	5%	-
H <sub>2</sub> O	Cantidad necesaria para aforar a 12mL	Cantidad necesaria para aforar a 12mL	Cantidad necesaria para aforar a 5 mL
Persulfato de amonio	0.27%	0.27%	0.27%
TEMED	0.027%	0.027%	0.027%

Tabla 4. Composición de buffers para electroforesis clear native (CN-PAGE).

Reactivo	Cátodo	Ánodo
Tricina	-	50 mM
Bis Tris	50 mM pH 7.0	15 mM
Dodecil Maltósido	-	0.01%

## Geles desnaturalizantes 2-D SDS-PAGE

Los geles desnaturalizantes de segunda dimensión (2-D SDS-PAGE) se realizaron en placas de 14 x 18 cm. Se utilizó una cámara de electroforesis CBS Scientific modelo DASGH-250 y una fuente Bio Rad Power PAC-1000.

El procedimiento está basado en artículo de **Schägger and von Jagow** (1987). A continuación, se describe.

- a) Se cortaron los geles CN-PAGE en tiras de 2 cm de ancho (un poco menos del ancho del pozo).
- b) Las tiras se colocaron en buffer de digestión para geles 2D (DTT 20 mM, SDS 2.5%, Glicerol al 10%, Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8) durante 2 horas en agitación constante.
- c) Se acomodaron en la parte superior de las placas antes de armarlas, se dejó espacio en uno de los lados para colocar un único pozo para los Marcadores de peso molecular (**tabla 5**).

*Tabla 5. Marcadores de peso molecular para 2-D SDS-PAGE y SDS-PAGE.*

Marcador	Peso molecular (kDa)
Albumina Sérica Bovina	65
Ovoalbúmina	45
Quimiotripsinógeno	25
Lisozima de huevo	14.3
Citocromo C de caballo	12.5

- d) Se colocaron las concentraciones necesarias para tener un gel de separación al 14% (**tabla 6**). Se colocó hasta alcanzar un centímetro por debajo del gel cortado del CN-PAGE.

Tabla 6. Volúmenes finales para geles SDS-PAGE. El volumen final es suficiente para formar 1 gel en placas de vidrio de 14 x 18 cm.

Stock	Volúmenes finales para gel de separación al 14% (36 mL)	Volúmenes finales para gel de condensación al 4% (6 mL)
Acrilamida 30% - Bis acrilamida 0.938%	16.8 mL	0.8 mL
Tris 3 M-HCl 1M, SDS 0.3%	12 mL	1.5 mL
Glicerol 79.5%	4.8 mL	-
H <sub>2</sub> O	2.4 mL	3.7 mL
Persulfato de amonio	150 µL	40 µL
TEMED	15 µL	8 µL

- e) Se colocaron las concentraciones necesarias para tener un gel de condensación al 4% (**tabla 6**), teniendo cuidado de no cubrir la tira del gel del CN-PAGE o BN-PAGE.
- f) Se corrió la electroforesis durante 35 horas con las siguientes variables: 3 horas 35 volts constantes, 30 horas a 95 volts constantes y 2 horas a 125 volts constantes.
- g) Dependiendo de la concentración de clorofila cargada en la primera dimensión se procede a teñir el gel con azul de Coomassie (más de 450 µg de Chl) o Plata (menos de 450 µg de Chl).

Se usaron geles SDS-PAGE para resolver las proteínas separadas por gradiente de sacarosa. Previamente se precipitó la proteína usando el método de ácido tricloroacético. Se formaron los geles en placas de vidrio de 14 x 18 cm. Se utilizó una cámara de electroforesis CBS Scientific modelo DASGH-250 y una fuente Bio Rad Power PAC-1000. La técnica completa se describe a continuación.

- a) Se armaron las placas con los volúmenes mostrados en la **tabla 6**, para formar un gel de separación al 14% y en la parte superior un gel de condensación al 4%. Se utilizaron peines de 16 pozos a los cuales se les puede colocar hasta 150 µL de muestra aproximadamente. El gel de separación se encuentra un centímetro por debajo del límite inferior de los pozos.
- b) La proteína precipitada de las fracciones del gradiente de sacarosa se resuspendió con solución digestora 1X (**tabla 7**), se incubó durante 20 min en baño de agua a 60 °C.

*Tabla 7. Solución digestora 2X para proteínas. A partir de esta solución se obtiene la solución digestora 1X, tomando una relación 1:1 con agua bidestilada.*

Reactivo	Concentración (2X)
Tris pH 8	100 mM
SDS	10%
DTT	4%
Glicerol	30%
Azul de Bromofenol	0.02%

- c) De igual manera se incubaron Marcadores de peso molecular (**tabla 7**) con solución digestora 2X durante 20 min en baño de agua a 60 °C.
- d) Las muestras se cargaron a los pozos y se inició la electroforesis a 35 volts constantes durante tres horas, 95 volts constantes durante 30 horas y 125 volts constantes durante 2 horas.
- e) Dependiendo de la concentración de clorofila cargada por pozo se procedió a teñir el gel con azul de Coomassie o con Plata.

## **Gradiente de sacarosa**

### **Primer gradiente**

Se realizaron gradientes de sacarosa continuos desde 0.25 M a 2M. La sacarosa fue disuelta en buffer con 100 mM de NaCl, 50 mM de Bis Tris pH 7, 1 mM de PMSF, 0.01% de dodecil maltósido y 10 mM de EDTA. Los gradientes se ultracentrifugaron a 50,000 RPM por 3 h a 4 °C. Los gradientes colectaron en alícuotas de 1 mL en tubos Eppendorf por medio de una bomba peristáltica de Pharmacia Biotech P-1 y se guardaron a 4 °C protegidos de la luz.

### **Segundo gradiente**

Fracciones de interés provenientes del primer gradiente se dializaron utilizando membranas de diálisis (Spectrapor, M.W cut off 12-14 kDa, Spectrum medical industries Inc., LA, USA). Se dializaron toda la noche en un buffer con 100 mM de NaCl, 50 mM de Bis Tris pH 7, 1 mM de PMSF, 0.01% de dodecil maltósido y 10 mM de EDTA. A continuación, las fracciones fueron concentradas en centricones (YM10, 10 kDa, Millipore, Bredford, MA, USA) utilizando el rotor JA-20 a 4,500 RPM, a 4 °C. El tiempo utilizado dependió de la cantidad de clorofila. Las fracciones dializadas y concentradas se cargaron en gradientes formados de la misma manera y ultracentrifugados de la misma manera que en la sección anterior. Las fracciones fueron alicuotadas para procesarlas 1 mL por fracción.

## **Ensayos espectrofotométricos**

De las fracciones obtenidas del gradiente de sacarosa se realizaron varias mediciones para generar los perfiles de separación de los complejos membranales. Entre ellas se encuentran la refractometría usando el refractómetro de Abbe para corroborar la linealidad del gradiente y los espectros de absorción para ver los máximos de absorción de los complejos proteicos separados y la actividad de diaforasa de la FNR usando un espectrofotómetro Hitachi U-3310.

## **Refractometría**

Se utilizó un refractómetro de Abbé Bausch & Lomb para medir la concentración de sacarosa y verificar que el gradiente es lineal. Tomando una alícuota (3  $\mu\text{L}$  aprox.) se midió la refracción de cada una de las 18 fracciones. El refractómetro se ajustó a cero con agua. Los valores fueron graficados y se ajustaron a la ecuación de una recta para calcular su correlación.

## **UV-Vis**

Las fracciones de los gradientes de sacarosa fueron colocadas en celdas de cuarzo de 1 cm de paso de luz para medir sus espectros de absorción. Se usó el espectrofotómetro Hitachi U-3310 acoplado al software Hitachi UV Solution 2.1, se midió la absorción desde 740 a 340 nm.

## **Fluorescencia a baja temperatura**

Las muestras con absorción mayor o igual a 2 se mezclaron con glicerol para obtener 50% de concentración final. Las muestras se colocaron en celdas de poliestireno (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) y se congelaron en nitrógeno líquido por 5 min. Rápidamente se colocaron en el fluorómetro (DW2) y se obtuvieron los espectros.

## **Actividad enzimática de diaforasa para la ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa.**

Aprovechando la actividad de deshidrogenasa de la enzima FNR se puede medir el cambio de color del 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), un reactivo de Hill que cambia su espectro de absorción cuando se reduce. Se siguieron los pasos que a continuación se describen:

- a) Se tomaron alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se adicionaron: 1 175  $\mu\text{L}$  de agua, 75  $\mu\text{L}$  de Tris 1 M pH 8, 45  $\mu\text{L}$  de DCPIP 5 mM, 18  $\mu\text{L}$  de NADPH 10 mg/mL Tris 50 mM, pH 8.
- b) Se agitaron por inversión rápidamente y se midió el cambio de absorción durante un minuto a 600 nm.

## HPLC

Para la determinación de los espectros de absorción y separación de los pigmentos de *Prochlorococcus marinus* MIT9313 se siguió el protocolo de **Moore et. al. 1995**. Se utilizó un HPLC Waters con bombas de gradiente para solventes automáticas de 5 entradas. Los espectros fueron leídos con un detector con arreglo de diodos (PDA) Waters 966 de 340 a 740 nm en un intervalo de 2 s. Se utilizó una columna 100-5-C18 Kromasil (AkzoNobel, Amsterdam, Netherlands), 4.6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula y 100 Å de tamaño de poro. Se corrió un gradiente de solventes de la siguiente composición: A, metanol:10 mM acetato de amonio (85:15); B, metanol; C, acetona. El gradiente consistió en un flujo de 1.5 mL min<sup>-1</sup> con las siguientes variaciones: 0 min, 0% B, 0%C; 5 min, 92%B, 2%C; 12 min, 100%B, 0%C; 15 min, 90%B, 10%C; 18 min, 40%B, 60%C; 20-24min, 20%B, 80%C; 26-35 min, 0%B, 0%C. Los datos fueron analizados con el software Millenium 3.2.

### Determinación de clorofilas.

A partir de los espectros de absorción de las muestras con clorofila (CCM9 y 7002) se utilizaron los valores del coeficiente de extinción molar a 663 nm reportados para la clorofila *a* en acetona al 80%, en mg/mL. Para las divinil clorofilas se determinaron los coeficientes de extinción molar. Se utilizaron cromóforos extraídos y separados por HPLC correspondientes a Chl *a*<sub>2</sub> y *b*<sub>2</sub>. El solvente de elución fue evaporado y los cromóforos fueron resuspendidos en acetona al 80%. Los espectros de absorción fueron interpolados utilizando los datos reportados por **Shedbalkar & Rebeiz** en 1992.

Para la determinación de las concentraciones de divinil clorofila en los gradientes de absorción, los cromóforos fueron extraídos utilizando acetona al 80% y las siguientes ecuaciones fueron usadas:

$$[Chl a_2] = [(2.18 * A^{664}) - (A^{654})] / 112.99$$

$$[Chl b_2] = [(1.98 * A^{654}) - (A^{664})] / 51.56$$

## Búsqueda y secuenciación de los genes PsaA, PsaB, IsiA y PsaC/PsaL de *Nodularia sp. CCM9*.

La extracción de DNA de CCC9 se realizó con fenol, usando lisozima y SDS para la ruptura celular. El diseño de *primers* se realizó alineando la secuencia de aminoácidos de las proteínas de *Nodularia spumigena* CY9414 usando la herramienta Blastp del NCBI y se eligieron las zonas más conservadas. Los primers se comprobaron *in silico* con el software online *Oligo analyzer* para comprobar su estructura secundaria (hairpin) y la formación de dímeros y la Tm optima de PCR. Para el gen *psbC/psaL* se diseñaron los primers *forward* 5'catccagcattaaactcactccaagactta3' y el *reverse* 5'ggcgctcatgttgctcatgcgggttaatt3'.

Para el gen *isiA*: *forward* 5'ataccacccaaagagtaagaaagaatcgct3' y el *reverse* 5'ttggcgaagcgggcattaccagcccaccaa3'. Para *psaA* se utilizaron dos pares de primers para permitir una buena secuenciación: *forward* N.1 5'attagctctccggagcgagaggaaaagaa3', *reverse* N.1 5'aaaccaaagctgtggaagcctaagaaaata3' y *forward* N.2 5'caattgtgtatattcaccaccatattgtg3', *reverse* N.2 5'agatcctggctaaatgttgaaatttcgtt3'. Para *psaB* de la misma manera se utilizaron dos pares de primers para cubrir la totalidad del gen: *forward* N. 1 5'cattcttcacgcacacatcctttcagta3', *reverse* N. 1 5'actacgaccccgaacaaaacaaaggcaacg3' y *forward* N. 2 5'tatattgctggcttcttgatggttggtgct3', *reverse* N. 2 5'ataattcctaatactataggagtaatt3'.

## Espectrometría de masas

### LC-MALDI MS-MS para proteómica

Las proteínas que se analizaron por espectrometría de masas (MS) fueron obtenidas de geles CN-PAGE y 2-D SDS-PAGE. Los fragmentos de gel fueron lavados y centrifugados de la siguiente manera: se lavaron con agua; se lavaron con 50% (v/v) de acetonitrilo en agua; se lavaron con acetonitrilo mezclado con bicarbonato de amonio 100 mM (01:01); se lavaron con 100% de acetonitrilo.

Las soluciones de lavado se retiraron con micropipeta después de una breve centrifugación de las muestras. Las proteínas en los fragmentos de gel se carbamidometilaron y se digirieron con tripsina. Los péptidos resultantes fueron tratados como se ha descrito en **Shevchenko et. al**, (1996). Estos péptidos se purificaron y se concentraron utilizando *Zip tip* de resina cargada (Zip Tip, Millipore, Billerica, MA, USA).

Los péptidos tripsinizados se concentraron a un volumen aproximado de 10  $\mu\text{L}$ . Nueve  $\mu\text{L}$  fueron separados por LC utilizando: precolumna ChromXP Trap Column C18-CL (Eksigent, Redwood City CA), 350  $\mu\text{m}$  X 0.5 mm, 120 Å tamaño de poro, 3  $\mu\text{m}$  tamaño de partícula. Las muestras fueron desaladas con 0.1% TFA en agua a un flujo de 5  $\mu\text{L}$   $\text{min}^{-1}$  durante 10 min. Los péptidos fueron separados en una columna Waters BEH130 C18; 75  $\mu\text{m}$  X 150 mm, 130 Å tamaño de poro, 1.7  $\mu\text{m}$  tamaño de partícula, usando un HPLC Ekspert nanoLC 425 (Eksigent, Redwood City CA). Como fase móvil se usaron los siguientes solventes: A, 0.1% TFA en agua; B 0.1% TFA en acetonitrilo. Las variaciones del gradiente se realizaron de la siguiente manera: 0-3 min 10% B (90% A), 35 min 60% B (40% A), 36-45 min 90 % B (10% A), 46 a 120 min 10% B (90% A). Se uso un flujo de 300 nL  $\text{min}^{-1}$ . Las fracciones eluidas se mezclaron automáticamente con una solución de 2 mg  $\text{mL}^{-1}$  de la matriz acido alfa-ciano-4-hidroxicinamico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en 0.1%TFA y 50% de acetonitrilo. La mezcla de péptidos y matriz fueron depositados en una placa Opti-TOF con 384 sitios usando un MALDI Ekspot (Eksigent, Redwood City CA) con una velocidad de 30 s por sitio y un flujo de la matriz de 1.6  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Estas muestras se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 Plus (ABSciex, Framingham MA). Cada espectro MS fue adquirido por la

acumulación en un rango de masas de 850-4000 Da por la acumulación de información proveniente de 1, 000 disparos. La intensidad del láser fue de 3,100. Los 100 iones más intensos con una señal de ruido mínima fueron seleccionados para su fragmentación. Los iones seleccionados se fragmentaron por Collision Induced Dissociation (CID) y adquiridos de 3,000 disparos con una intensidad de laser de 3,800. Los espectros de fragmentación fueron comparados contra la información del genoma de las cianobacterias MIT9313, CCM9 y 7002 usando el software Protein Pilot v. 2.0.1 (ABSciex, Framingham MA). Se uso un algoritmo Paragon. La detección (threshold) fue limitada a un valor de 2 para obtener un porcentaje de confiabilidad del 99%. Además, la identificación de las proteínas se ajustó a un FDR menor de 5%. Las proteínas identificadas fueron agrupadas usando ProGroup algorithm ajustado para minimizar la redundancia.

### **ESI-QTOF para cromóforos**

Los cromóforos separados por HPLC se inyectaron directamente en un espectrómetro de masas 3200 Qtrap con fuente ESI (ABSciex, Framingham, MA) a una velocidad de flujo de 10  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Los iones se analizaron en modo positivo. Todos los espectros se generaron usando *Enhanced MS* (EMS) como modo de escaneo bajo los siguientes parámetros en la fuente de ionización: Curtain Gas (CUR) = 10; Ion Spray Voltage (IS) = 5,500; Temperatura (TEM) = 100 ° C; Ion Source Gas 1 (GS1) = 10; Ion Source Gas 2 (GS2) = 0; Declustering Potential (DP) = 70; Entrance Potential (EP) = 10. Todos los espectros de fragmentación (MS/MS) fueron generados del ion precursor usando high collision gas (CAD) y *Product Ion* como modo de escaneo. La rampa de energía de colisión fue de 5 a 130 V por 3 min. Los espectros obtenidos fueron interpretados manualmente para determinar la estructura molecular. A las muestras conteniendo carotenoides, se les añadieron 0.2% de ácido tricloroacético y 0.2% de hexafluor-isopropanol (HFIP) para mejorar la ionización.

## Resultados

### Parte I. Aislar el supercomplejo formado por el fotosistema II y la antena distal PcbB en la cianobacteria *Prochlorococcus marinus* MIT9313.

#### Complejos y supercomplejos en *Prochlorococcus marinus* MIT9313.

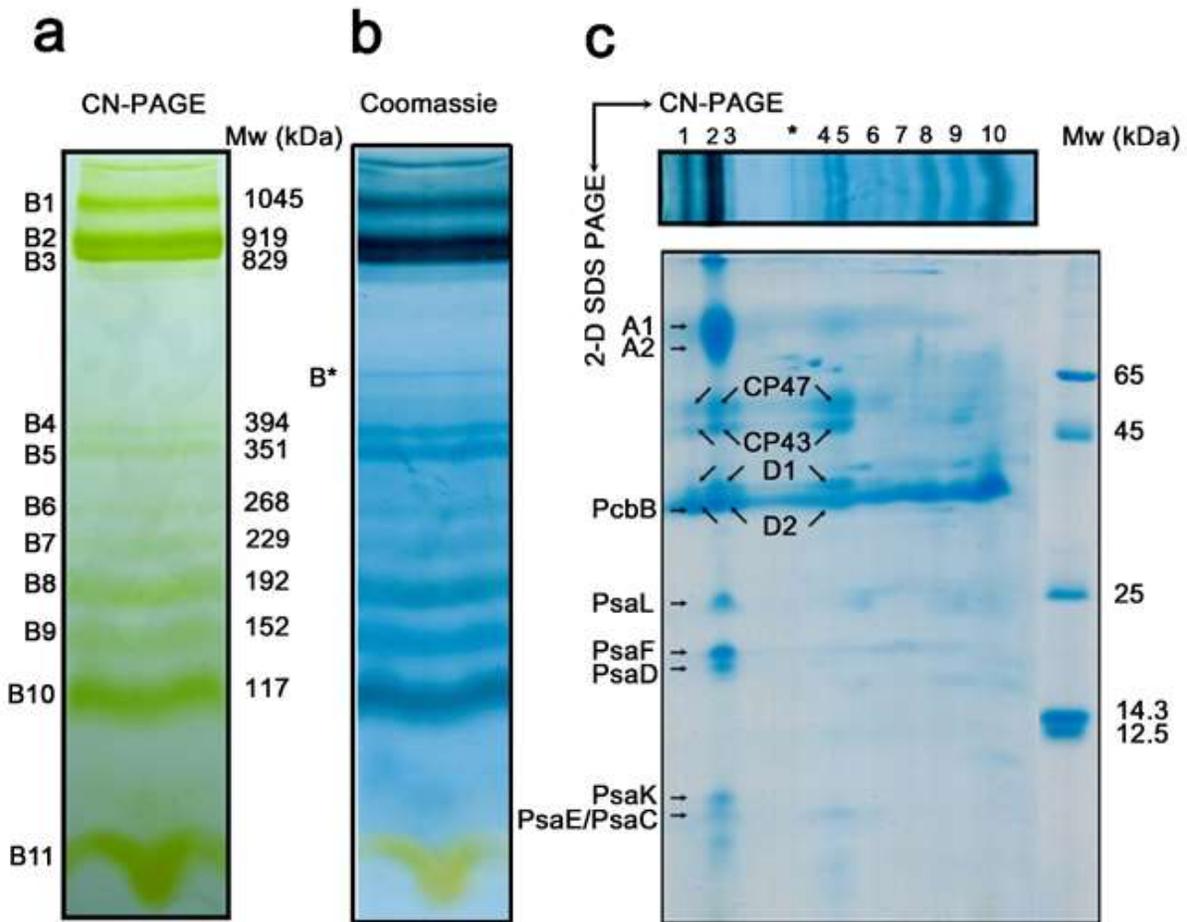
Para poder separar los complejos del aparato fotosintético de MIT9313 usando un enfoque bioquímico se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes con un gradiente de 4 al 13% (CN-PAGE). Las membranas solubilizadas con DDM fueron aplicadas en el gel y la electroforesis fue realizada a valores bajos de corriente eléctrica. Cuando la electroforesis concluyó se pudo distinguir un patrón definido de 11 bandas verdes (B1-B11, **Fig. 22a**). Al teñir el gel con azul de Coomassie, además de las bandas correspondientes a las proteínas que unen DVChls se pudo apreciar una banda delgada extra (**Fig. 22b, B\***).

Como primera aproximación para conocer las identidades de los complejos proteicos en las bandas, se realizó una *digestión* (reducción y solubilización de las proteínas) y las subunidades fueron separadas en una segunda dimensión desnaturizante basada en SDS-PAGE (**Fig. 22c**).

La segunda dimensión mostró un *patrón electroforético* cuyas proteínas mostraron pesos moleculares aparentes cercanos a las subunidades de los fotosistemas. El patrón electroforético de la banda B1 (Fig. 22a) se resolvió en varias subunidades (*manchas*), las de más alto peso molecular alrededor de los 50 kDa, las cuales correspondería a las antenas proximales CP47 y CP43; las de 35 kDa corresponderían a las subunidades del centro de reacción (CR) D1 y D2 del FSII, este patrón electroforético es característico del FSII. Además, en los 35 kDa es posible notar que existe un spot de mayor intensidad relativa. Dado que la proteína antena PcbB tiene un peso molecular teórico de 38.54 kDa, muy probablemente corresponda a una co-migración de una de la subunidad del centro de reacción del FSII, D2 (~39 kDa) y dicha antena.

La banda B2, mostro manchas por encima de los 65 kDa, los cuales corresponderían a las subunidades A1 y A2 del centro de reacción y la antena proximal (*core*) del FSI. Se asignaron las identidades de algunas manchas, cuya migración

corresponde a un peso molecular teórico muy cercano a las subunidades de bajo peso molecular del FSI: PsaL (20 kDa), PsaF (18.4 kDa), PsaD (15.7 kDa), PsaK (8.9 kDa) y PsaE/PsaC (~8 kDa) (**Fig. 22c**). Éste es el patrón electroforético del FSI de MIT9313.



*Fig. 22 Clear Native PAGE y su resolución en una segunda dimensión SDS-PAGE de complejos solubilizados de Prochlorococcus marinus MIT9313. a. Clear Native del aparato fotosintético de MIT9313. b. Tinción de Coomassie. c. 2-D SDS PAGE del aparato fotosintéticos separado por CN-PAGE. Las etiquetas son descritas en el texto.*

La masa molecular aparente de la banda B\*, que se detectó solo en la tinción con azul de Coomassie Blue, sugiere la presencia de un complejo proteico que no una DVChls, probablemente la ATP sintasa. Sin embargo, el patrón electroforético no fue intenso ni completamente atribuible a dicho complejo.

De manera interesante, las siguientes bandas verdes (B6 a B10) no se resolvieron en patrones electroforéticos complejos. A lo largo del gel de segunda dimensión se puede observar una banda continua en un peso molecular aparente cercano al esperado para la antena distal PcbB (38.5 kDa).

Los pesos moleculares aparentes de las bandas verdes en el gel CN-PAGE fueron calculados utilizando los complejos proteicos de la cadena respiratoria de mitocondria en corazón de rata como Marcadores de peso molecular (**Fig. 23**). El tejido cardiaco de rata se homogenizó y se centrifugó. El sobrenadante se guardó, en alícuotas a -70 °C hasta su utilización (ver materiales y métodos). La fracción homogenizada fue solubilizada con 1% de DDM y cargada a un gel CN-PAGE (MCR, **Fig. 23a**), junto con membranas de MIT9313 y Marcadores solubles de alto peso molecular (MS, **Fig. 23a**) para realizar una comparación.

Para comprobar la identidad y asignar el peso molecular de las bandas correspondientes a los complejos de la cadena respiratoria, se realizó una segunda dimensión desnaturizante (**Fig. 23b**). Comparando el patrón electroforético con lo reportado en la literatura se asignó la identidad y peso molecular de los complejos de la cadena respiratoria 1 al V (**Meyer et al., 2007; Wittig et al., 2010**). Resulto fácil reconocer el patrón electroforético del Complejo V debido a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  y el del Complejo I, por sus abundantes subunidades (**Fig. 23b**).

Posteriormente, el peso molecular aparente de las bandas verdes fue calculado utilizando el software Image Lab (Bio-Rad) (**Fig. 22a**). Con la finalidad de determinar la identidad y estequiometrias de los complejos presentes en cada una de las bandas del gel CN-PAGE, se cortaron las once bandas y se procesaron para realizar un análisis por espectrometría de masas (**Fig. 22a**, B1-B11).

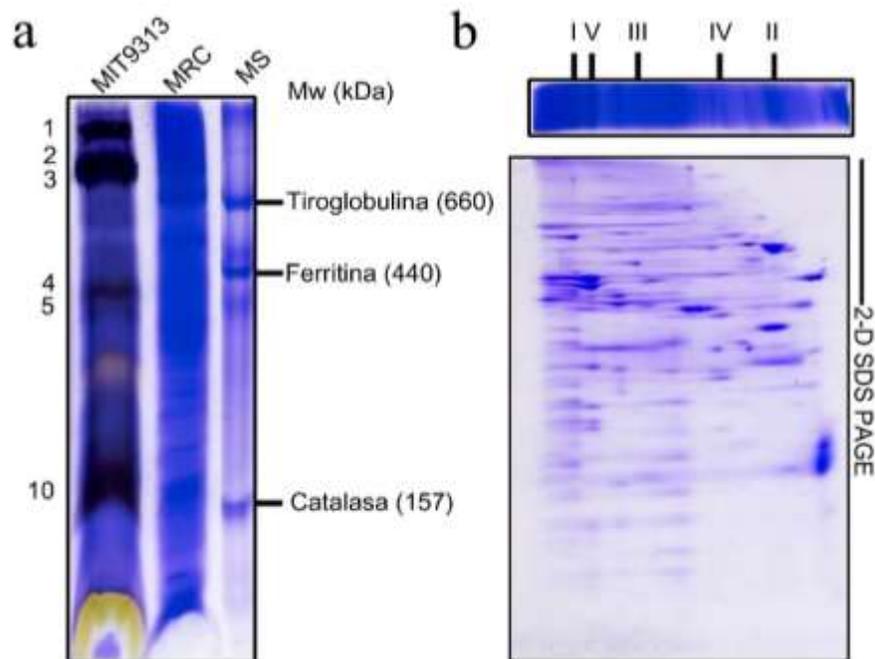


Fig. 23. Marcadores de peso molecular para la determinación de masas moleculares grandes. Las mitocondrias de corazón de rata se solubilizaron y los complejos de la cadena de transporte de electrones se separaron utilizando CN-PAGE. a. Se separaron en el mismo gel, membranas solubilizadas de MIT9313 (MIT9313), Complejos de la cadena de transporte de electrones de mitocondria (MCR) y proteínas solubles (MS) para comparar su migración en el gel. b. Para determinar la identidad de las bandas del gel CN-PAGE se realizó una segunda dimensión desnaturizante. La identidad de los complejos se determinó por el patrón electroforético de las subunidades. Los números romanos indican el número del complejo. Las bandas del gel de MIT9313 fueron enumeradas como en el gel de la Fig. 22.

En la **Tabla 8**, se muestran las proteínas identificadas por MS en B1 a B10. La **Tabla 9** contiene las proteínas identificadas por MS de B\* y B11.

En los resultados de MS para la banda B1 (1,045 kDa), se identificaron subunidades del FSII, las cuales tuvieron los valores de confiabilidad más altos de todas las identificaciones. Se identificó el CR (D1, D2) y las antenas proximales (CP47, CP43), además, una de las subunidades del citocromo *b*<sub>559</sub> (PsbF). Solo la subunidad PsaL (XI) de FSI fue identificada. En esta banda, la antena proximal PcbB fue identificada con su valor más alto de confiabilidad (**Tabla 8**).

En B2 y B3 (919 y 829 kDa, respectivamente) se identificaron el CR y las antenas proximales del FSII. Para el FSI, el *core* (A1 y A2) y las subunidades que rodean el centro de reacción embebidas en la membrana (PsaF, PsaK y PsaL). Además, la proteína que transfiere los electrones por el lado citoplasmático del FSI a la ferredoxina, PsaD (**Tabla 8**).

En B4 y B5 (394-351 kDa) se detectaron pocas subunidades. La subunidad del CR, D1 del FSII y sus antenas proximales CP47 y CP43. En estas bandas, la proteína antena PcbB fue identificada con su valor de confiabilidad más bajo (**Tabla 8**).

En B\* (~500 kDa) se identificó solo la subunidad  $\alpha$  de la ATP sintasa. Además, el CR y las antenas proximales del FSII. Parte del *core* del FSI, A2 y la subunidad PsaL. De manera interesante se identificó un regulador de nitrógeno (Q7V5R4), la deshidrogenasa de gliceraldehido 3-fostato y una porina putativa. La antena distal PcbB fue identificada con valores bajos de confiabilidad (**Tabla 9**).

En B6 (268 kDa) se identificaron las dos subunidades del CR, y la antena proximal CP47 del FSII. Además, se identificó el citocromo *f* del complejo de citocromos *b<sub>6</sub>f*.

En la B7 (229 kDa) se identificó otra de las subunidades del *b<sub>6</sub>f*, la proteína hierro azufre de Rieske. De manera interesante, en esta banda y por primera vez en este experimento, se encontró la proteína ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa.

Por otro lado, a partir de B8 a B11, fueron identificadas las subunidades de la ATP Sintasa. En B8 fueron identificadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , b y b'. En B9 se identificaron  $\beta$ ,  $\alpha$ , a, b y  $\delta$ . Y en B10 solo las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Ningún péptido de la proteína reguladora  $\epsilon$ , ni de la subunidad hidrofóbica *c*, fueron detectados en estas bandas, sin embargo, en B11 La subunidad  $\alpha$  fue detectada en B\*

Un mayor número de subunidades del *b<sub>6</sub>f* fueron identificadas en B8 y B9. En B8 (192 kDa) se identificaron el citocromo *b<sub>6</sub>* y el citocromo *f*. En B9 (152 kDa), además de los dos anteriores, también fue identificada la proteína hierro azufre de Rieske. (**Tabla 9**).

Para el FSII en B8 fueron detectadas las antenas proximales CP43 y CP47, además de las subunidades PsbL, PsbJ, PsbO y la subunidad del CR, D2. De manera

interesante se identificó la proteína Psb27, involucrada en el ensamblaje del FSII. En B9 se identificaron las subunidades del FSII: PsbU, PsbL, PsbJ, PsbF, además de las antenas proximales CP47 y CP43. En B10 se identificaron pocas proteínas correspondientes a la antena proximal CP43, la subunidad  $\beta$  de la ATP Sintasa, y la antena distal PcbB.

En B11 se identificaron las subunidades  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , b y b' de la ATP Sintasa; las subunidades el CR del PSII y sus antenas proximales CP47 y CP43, además de la subunidad PsbO. De manera interesante se identificó por primera vez la subunidad PsbY (asociada al CR) y la proteína de ensamble Ycf48 (PMT\_1895). Por otra parte, se identificaron sorpresivamente, péptidos de la subunidad  $\beta$  del pigmento ficoeritrina. Previamente en la banda 9 se identificaron péptidos para la subunidad  $\alpha$ -ficoeritrina, siendo MIT9313 una cianobacteria sin ficobilisoma funcional, es interesante encontrar los *vestigios* de su antepasado fotosintético que si poseía ficobilisomas. La función y el por qué se mantiene aún la maquinaria de síntesis de estos pigmentos en el genoma del género *Prochlorococcus* no está del todo clara (**Tabla 9**).

Tabla 8. Identificación proteómica de las bandas B1 a B10 del gel CN-PAGE (Fig. 22a) utilizando espectrometría de masas.

Banda <sup>a</sup>	UniProt ID <sup>b</sup>	Coverage total	Coverage > 95%	Gen <sup>c</sup>	Masa teórica (kDa) <sup>b</sup>	Función <sup>d</sup>
B1	Q7TTH6	57.8	18.1	<i>psbA</i>	39.41	D1
	Q7V5A7	70.1	27	<i>psbB</i>	56.16	CP47
	Q7V6H9	68.8	17.8	<i>psbC</i>	50.9	CP43
	Q7V6I0	61.2	18.8	<i>psbD</i>	39.32	D2
	Q7V4Q1	69.3	44.8	<i>psbF</i>	5.44	VI (Cit <i>b</i> <sub>559</sub> )
	Q7V4P9	73.8	24.6	<i>psbJ</i>	6.88	PsbJ
	Q7V6U4	59.1	27.4	<i>pcbB</i>	38.54	PcbB
	Q7V512	60.9	16.5	<i>psaL</i>	20.07	IX (PSI)
	B2 y B3	Q7TTH6	65	11.7	<i>psbA</i>	39.41
Q7V5A7		64.3	22.9	<i>psbB</i>	56.16	CP47
Q7V6H9		55.9	14.4	<i>psbC</i>	50.9	CP43
Q7V6I0		35.8	3.7	<i>psbD</i>	39.32	D2
Q7V8Y4		97	67.6	<i>psaE</i>	7.64	IV (PSI)
Q7V6U4		42	9.7	<i>pcbB</i>	38.54	PcbB
Q7V510		46	3.7	<i>psaA</i>	84.98	A1
Q7V511		33.7	4.5	<i>psaB</i>	83.23	A2
Q7V564		66.1	21.1	<i>psaD</i>	15.75	PsaD
Q7V659		62.9	17.6	<i>psaF</i>	18.43	III (PSI)
Q7V7Q1		59.3	18.6	<i>psaK</i>	8.99	X (PSI)
Q7V512	35.2	16.5	<i>psaL</i>	20.07	IX (PSI)	
B4 y B5	Q7TTH6	37.7	14.5	<i>psbA</i>	84.98	D1

	Q7V5A7	23.7	20.9	<i>psbB</i>	56.16	CP47
	Q7V6H9	20.2	9.2	<i>psbC</i>	50.90	CP43
	Q7V6U4	26.2	9.7	<i>pcbB</i>	38.54	PcbB
B6	Q7V5A7	79.8	24.9	<i>psbB</i>	56.16	CP47
	Q7V6U4	73.1	17.1	<i>pcbB</i>	38.54	PcbB
	Q7TTH6	64.5	14.5	<i>psbA</i>	39.41	D1
	Q7V6I0	69.8	9.1	<i>psbD</i>	39.32	D2
	Q7V653	69.3	8.3	<i>petA</i>	33.33	Cit f
B7	Q7TTH6	70.6	15.3	<i>psbA</i>	39.41	D1
	Q7V6U4	44.2	14.5	<i>pcbB</i>	38.54	PcbB
	Q7V5A7	59	12.3	<i>psbB</i>	56.16	CP47
	Q7V6H9	63	6.2	<i>psbC</i>	50.90	CP43
	Q7TUUW1	65.8	7.9	<i>petH</i>	40.89	FNR
	Q7V6I0	37.3	3.7	<i>psbD</i>	39.32	D2
	Q7V654	34.8	8.4	<i>petC</i>	18.86	Rieske prot.
B8	Q7V6U4	58.2	43.1	<i>pcbB</i>	38.54	PcbB
	Q7V4Q0	41	41	<i>psbL</i>	4.46	PsbL
	Q7V6H9	38.7	31.3	<i>psbC</i>	50.90	CP43
	Q7V5A7	41.9	25.4	<i>psbB</i>	56.16	CP47
	Q7V4P9	43	24.6	<i>psbJ</i>	6.88	PsbJ
	Q7V653	28	22.9	<i>petA</i>	33.33	Cit f
	Q7V6I0	25	18.8	<i>psbD</i>	39.32	D2
	Q7V4Y4	27.9	12.5	<i>psbO</i>	29.06	PsbO
	Q7V5B9	25.2	9.6	<i>petB</i>	24.57	Cit b <sub>6</sub>
	Q7V5S4	33.1	9.2	<i>atpG</i>	16.72	b' - Fo
	Q7TUUW1	50	9	<i>petH</i>	40.89	FNR
	Q7V511	22.4	8.5	<i>psaB</i>	83.23	A2
	Q7V5S5	63.3	6.9	<i>atpF</i>	18.72	b - Fo
	Q7TUU3	19.1	6.1	<i>psb27</i>	16.19	Psb27
	Q7V5S7	23.7	5.7	<i>atpA</i>	54.04	$\alpha$ - F <sub>1</sub>
	Q7V5S8	33.8	5.6	<i>atpC</i>	35	$\gamma$ - F <sub>1</sub>
	Q7TTH6	26.2	5.3	<i>psaA</i>	84.98	A1
B9	Q7V653	83.8	58.3	<i>petA</i>	38.54	Cit f
	Q7TV66	74.1	45	<i>psbU</i>	13.10	PsbU
	Q7V4Q0	76.9	41	<i>psbL</i>	4.46	PsbL
	Q7V5U2	74.1	40.9	<i>atpD</i>	52.13	$\beta$ - F <sub>1</sub>
	Q7V6U4	50.2	34	<i>pcbB</i>	38.54	PcbB
	Q7V5A7	49.8	31.1	<i>psbB</i>	56.16	CP47
	Q7V6H9	52	30.9	<i>psbC</i>	50.90	CP43
	Q7V4P9	73.8	24.6	<i>psbJ</i>	6.88	PsbJ
	Q7V6I0	46.1	16.8	<i>psbD</i>	39.32	D2
	Q7V512	32	16.5	<i>psaL</i>	20.07	XI
	Q7V4Q1	73.4	16.3	<i>psbF</i>	5.44	Cit b <sub>559</sub>
	Q7V5S7	54.2	16	<i>atpA</i>	54.04	$\alpha$ - F <sub>1</sub>
	Q7V5B9	39.4	15.5	<i>petB</i>	24.74	Cit b <sub>6</sub>
	Q7V5S2	53.5	12.4	<i>atpB</i>	27.17	a - Fo
	Q7TTH6	33.5	11.7	<i>psaA</i>	84.98	A1 PSI
	Q7V590	56.1	10.9	<i>cpeA</i>	16.97	$\alpha$ Ficoeritrina
	Q7V654	29.2	8.4	<i>petC</i>	18.86	Rieske prot.
	Q7V5S6	63.1	8.2	<i>atpH</i>	19.70	$\delta$ - F <sub>1</sub>
	Q7V5S5	70.3	6.9	<i>atpF</i>	18.72	B - Fo
	Q7V511	26.4	6.2	<i>psaB</i>	83.23	A2 (FSI)
	Q7V9A0	69.5	5.3	PMT_0054	20.52	Ycf37
	Q7TUUW1	40.1	4	<i>petH</i>	40.89	FNR

B10	Q7V6U4	55.1	33.7	<i>pcbB</i>	38.54	PcbB
	Q7V5U2	57.5	18.2	<i>atpD</i>	52.13	$\beta$ - F <sub>1</sub>
	Q7V6H9	47.7	6.2	<i>psbC</i>	50.90	CP43

<sup>a</sup> Análisis de las bandas, B1 (1046 kDa), B2 (920 kDa), B3 (830 kDa), B4 (394 kDa), B5 (351 kDa), B6 (268 kDa), B7 (229 kDa), 8 (1046 kDa), 9 (920 kDa) y 10 (830 kDa).

<sup>b</sup> ID de proteínas y masa molecular predicha de la base de datos UniProt.

<sup>c</sup> Datos obtenidos del genoma de *Prochlorococcus marinus* MIT9313 Gen Bank ID: BX548175.1.

<sup>d</sup> La función de las proteínas fue correlacionada por los ortólogos del cristal con PDB 1JB0 para el FSI, PDB 1VFS para Cit b6f, ATP Sintasa 5DN6 y 3WU2 para el FSII.

Tabla 9. Identificación proteómica de las bandas B\* y B11 del gel CN-PAGE (Fig. 34a) utilizando espectrometría de masas.

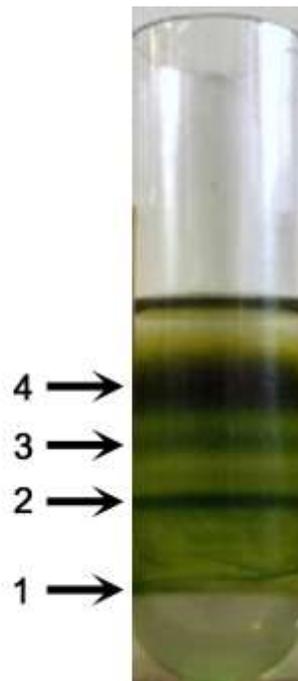
Banda <sup>a</sup>	UniProt ID <sup>b</sup>	Coverage total	Coverage > 95%	Gen <sup>c</sup>	Masa teórica (kDa) <sup>b</sup>	Función <sup>d</sup>
B*	Q7V5A7	61.0	14.5	<i>psbB</i>	39.41	CP47
	Q7TTH6	37.7	11.7	<i>psbA</i>	56.16	D1
	Q7V6H9	39.1	4.5	<i>psbC</i>	50.9	CP43
	Q7V511	31.1	2.5	<i>psaA</i>	84.98	A1
	Q7V6I0	43.9	6.6	<i>psbD</i>	39.32	D2
	Q7V6U4	30.0	9.7	<i>pcbB</i>	38.54	PcbB
	Q7V512	56.1	16.6	<i>psaL</i>	20.07	IX (FSI)
	Q7V5S7	44.6	2.6	<i>atpA</i>	54.04	$\alpha$
B11	Q7V6U4	55.4	25.4	<i>pcbB</i>	56.16	PcbB
	Q7V5U2	68.9	14.5	<i>atpD</i>	50.9	$\beta$
	Q7V5S6	48.9	17.0	<i>atpH</i>	39.32	$\delta$
	Q7V6I0	32.2	5.4	<i>psbD</i>	7.64	D2
	Q7V6H9	29.2	5.4	<i>psbC</i>		CP43
	Q7TTH6	26.8	5.0	<i>psbA</i>		D1
	Q7V4Q3	37.9	7.2	<i>psaB</i>	83.23	A2
	Q7V4P9	64.6	24.6	PMT_1895	15.75	Ycf48
	Q7TUS2	30.8	11.3	<i>atpC</i>	14.04	$\epsilon$
	Q7V5A7	29.0	3.9	<i>psbB</i>	20.07	CP47
	Q7V4Y4	34.1	6.5	<i>psbO</i>	84.98	PsbO
	Q7V589	48.6	7.2	<i>cpeB</i>	56.16	$\beta$ -ficoeritrina
	Q7V6I1	27.7	9.9	<i>ycf4</i>	50.90	Ycf4
	Q7V653	17.4	5.8	<i>petA</i>	38.54	Cit f
	Q7V5S8	57.9	3.2	<i>atpG</i>	56.16	$\gamma$
	Q7V5S5	50.0	7.0	<i>atpF</i>	38.54	b
	Q7V564	54.9	8.5	<i>psaD</i>	39.41	PsaD
	Q7V5S4	64.2	5.3	<i>atpG'</i>	39.32	b'
	Q7V654	21.9	11.8	<i>petC</i>	33.33	Rieske
	P59909	42.1	23.7	<i>psbY</i>	39.41	PsbY
Q7V512	18.7	11.2	<i>psaL</i>	38.54	PsaL	

<sup>a</sup> Análisis de las bandas, B\* (~500kDa), B11 (~50 kDa).

<sup>b, c, d</sup> Como en la tabla 8.

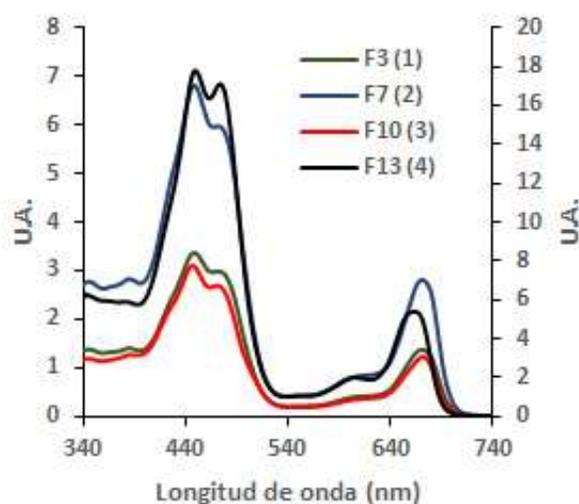
## Separación de los complejos fotosintéticos de *Prochlorococcus marinus* MIT9313 utilizando gradientes de sacarosa.

Las membranas de los tilacoides de MIT9313 se solubilizaron con 1% de DDM. La fracción solubilizada se cargó en un gradiente lineal de sacarosa (SG) y los complejos proteicos se separaron en bandas verdes visibles (**Fig. 24**). Una primera suposición basada en los pesos moleculares y la estabilidad de los complejos fotosintéticos podemos suponer que la banda más densa podría corresponder al trímero del FSI (1,090 kDa, **Fromme et. al. 2001**), la segunda a monómeros del FSI y FSII (350 kDa, **Umena et. al. 2011**), la tercera a subestructuras de los fotosistemas y la cuarta a subestructuras de los fotosistemas y la antena distal PcbB (de ~350-200 kDa).



*Fig. 24 Gradiente de sacarosa de membranas solubilizadas de *Prochlorococcus marinus* MIT9313. Se formaron gradientes lineales con concentraciones de 0.25 M a 2 M de sacarosa. Las flechas de la izquierda indican las cuatro bandas características encontradas en los gradientes y que corresponden a las holoproteínas.*

Los gradientes fueron colectados en 18 fracciones de 1 mL cada una para realizar las mediciones de los espectros de absorción y generar el perfil del SG. En la **figura 25** se muestran los espectros característicos (F3, F7, F10 y F14) correspondientes a las bandas verdes de la **figura 24**. La relación Soret/ $Q_y$  ( $S/Q_y$ ) de los espectros de absorción muestran variaciones en las cuatro fracciones. Sabiendo que la relación  $S/Q_y$  de la Chl  $a_2$  es menor que la de la Chl  $b_2$  (ver **Fig. 5**) podríamos inferir que la distribución de Chl  $a_2$  y Chl  $b_2$  es heterogénea a lo largo del gradiente debido a que las distintas estructuras del aparato fotosintético coordinan de manera no homogénea las divinil clorofilas (**Fig. 25**).



*Fig. 25 Espectros de absorción de fracciones del gradiente de sacarosa de membranas solubilizadas de Prochlorococcus marinus MIT9313. El número de cada fracción está acompañada de la letra F. Las fracciones fueron colectadas del fondo a la parte superior del gradiente de sacarosa y los números entre paréntesis corresponden a las bandas verdes del SG (Fig. 24).*

Tomando en cuenta que la relación de Chl  $b_2$ /Chl  $a_2$  en los complejos fotosintéticos debe ser tal que asegure la transferencia de la energía desde las antenas distales a los centros de reacción, es decir, desde una mayor energía (<650 nm) a una menor (680 nm para FSII y 700 nm para FSI). Según la relación de los picos en los espectros de absorción, parece ser que la cantidad de Chl  $b_2$  es mayor en la fracción ligera del gradiente (F14) y la concentración de Chl  $a_2$  es mayor en las fracciones más densas (F3 y F7).

Los espectros de absorción de todas las fracciones fueron graficados a 681 y 651 nm, debido a que las características absorptivas para la Chl  $a_2$  muestran una mayor probabilidad de absorber luz a 681 nm que la Chl  $b_2$  y, viceversa a 651 nm.

Con lo anterior se generó un perfil el cual nos permite un primer acercamiento cualitativo de la distribución de las DVChls (**Fig. 26**). Las fracciones ligeras del gradiente de sacarosa (F12 a F17), muestran mayor absorción en la zona de alta probabilidad de absorción de la Chl  $b_2$  a 651 nm. Las fracciones más densas de la fracción F2 a F7, muestran de la misma manera mayor absorción a 651 nm, sin embargo, la relación Chl  $b_2$ / Chl  $a_2$  parece constante. Las fracciones intermedias F8 a F11 muestran una relación Chl  $b_2$ / Chl  $a_2$  cercana a uno. Como rutina, la actividad de FNR fue determinada por el cambio de absorción a 600 nm por la reducción del 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), debido a la transferencia de electrones del NADPH vía la FNR (**Fig. 26**, línea roja).

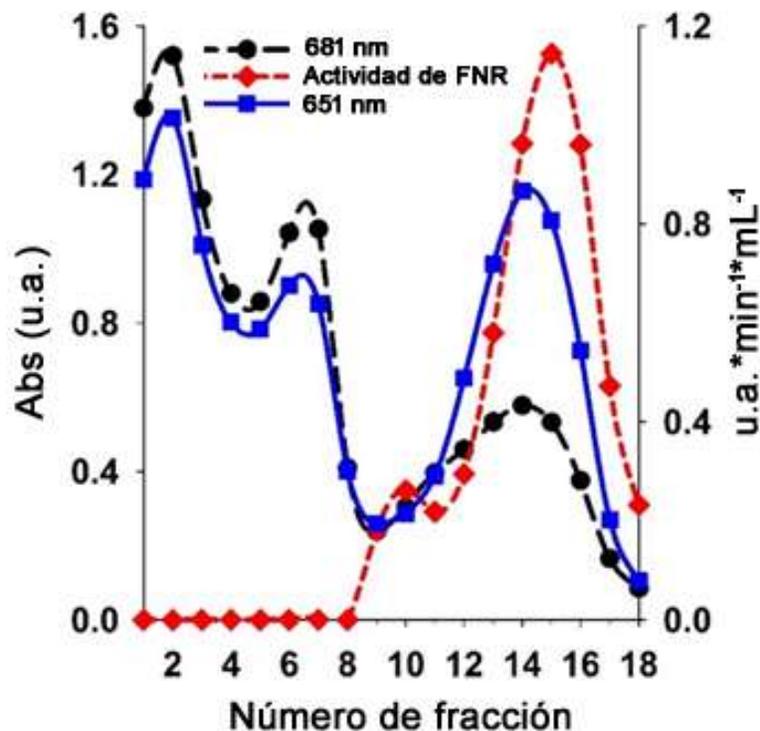


Fig. 26 Análisis del gradiente de sacarosa de membranas solubilizadas de *Prochlorococcus marinus* MIT9313. Las absorciones a 681 y 651 nm de las 18 fracciones son mostradas en negro y azul, respectivamente. Se pueden notar los tres picos correspondientes a las tres bandas más intensas del gradiente de sacarosa de la fig. 23. La actividad de dióxido de nitrógeno reductasa (FNR) es mostrada en rojo. Estos experimentos se han realizado refinando la técnica mostrada para gradientes de sacarosa en la tesis de maestría de Barrera-Rojas J, 2013.

Estos experimentos muestran reproducibilidad y se han realizado con algunas variantes desde la tesis de maestría (Barrera-Rojas J, 2013). De manera interesante se nota un pico *sutil*, de actividad en la fracción 10 y cuya densidad se explicaría por la asociación de FNR con otras proteínas (o con ella misma). Como se concluyó en la tesis de maestría, la FNR presenta un dominio cuya secuencia de aminoácidos tiene un índice de hidropatía negativo, el cual predice una  $\alpha$ -hélice y es posible encontrarla asociada a la membrana tilacoidal en MIT9313.

### **Identificación proteómica de los complejos proteicos separados por gradientes de sacarosa y resueltos por SDS-PAGE mediante espectrometrías de masas**

Los SG mostraron reproducibilidad y las tres bandas verdes más intensas fueron una constante. En todos los casos se generó el perfil para localizar los picos de absorción y notar si se presentaba una diferencia en la distribución de Chl  $a_2$  y Chl  $b_2$ , lo cual no fue positivo (**Fig. 27a**). Los espectros fueron medidos y graficados, para la Chl  $a_2$ , a 681 nm y para la Chl  $b_2$ , a 651 nm. Para conocer la identidad de las bandas verdes en el SG, las proteínas en cada una de las fracciones fueron precipitadas, reducidas y solubilizadas con SDS para disociar los complejos y separar sus subunidades utilizando un gel desnaturante SDS-PAGE (**Fig. 27b**).

Como primera aproximación, el patrón electroforético de los fotosistemas resolvió tentativamente la identidad y distribución de los complejos a lo largo del gradiente. De la fracción 1 a la 7 se pueden observar las subunidades pesadas características del FSI por encima de los 65 kDa (PsaA y PsaB), mostrando mayor intensidad aparente en la tinción con azul de Coomassie en las fracciones 2 y 6. A partir de la fracción 6 se puede observar un bandeo que puede ser atribuido a las antenas proximales CP47 y CP43 del FSII alrededor de los 50 kDa y para el centro de reacción D1 y D2 alrededor de los 35 kDa. La mayor intensidad de estas bandas se encuentra en las fracciones 10 y 11. Para corroborar las identidades de las proteínas en las fracciones las bandas indicadas en la **figura 27b** fueron cortadas y tratadas para su análisis por espectrometría de masas.

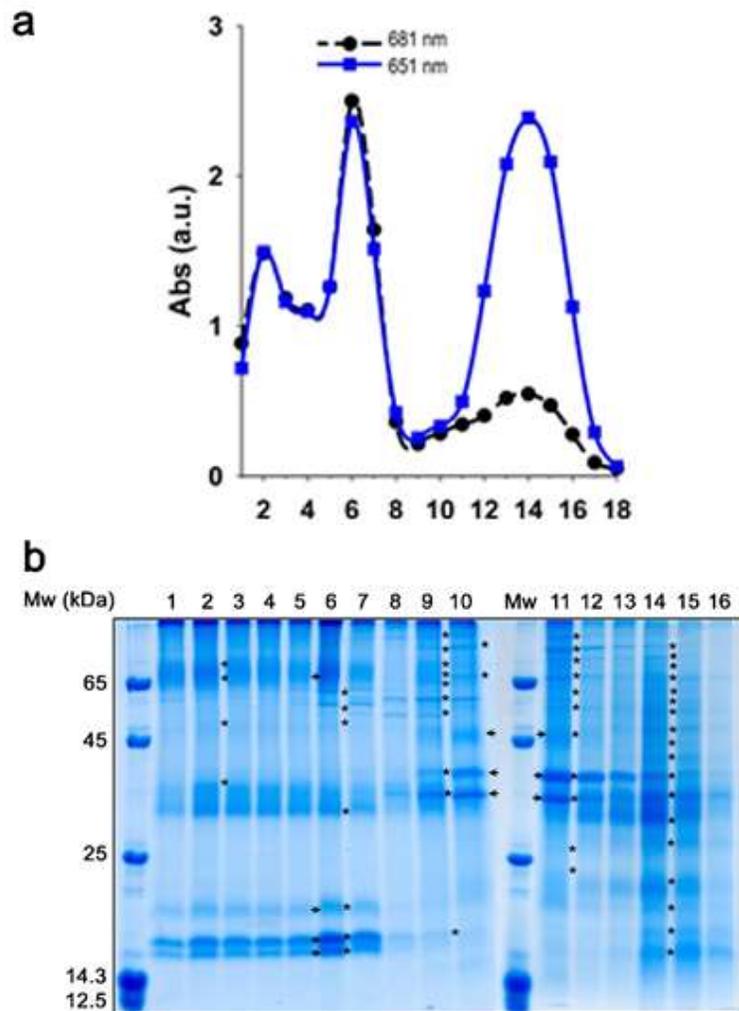


Fig. 27 Análisis de subunidades de los complejos del aparato fotosintético de *Prochlorococcus marinus* MIT9313 separados por gradientes de sacarosa y SDS-PAGE. a. Perfil del gradiente de sacarosa y la distribución característica de divinil clorofilas. b. SDS-PAGE de proteínas precipitadas de las fracciones del gradiente de sacarosa. Las bandas indicadas fueron cortadas y procesadas para su análisis por espectrometría de masas.

Los resultados mostraron que subunidades correspondientes al FSI están presentes en las fracciones 2, 6, 9, 10 y 11. Las subunidades del core A1 y A2 (PsaA y PsaB, respectivamente) fueron identificadas en las bandas 2, 6, 9 y 10 y, en la banda 11 solo A2 fue identificada. Las subunidades PsaL, PsaF y PsaD también fueron identificadas en las fracciones densas 2, 6 e incluso en la 9. Sin embargo, la detección de péptidos con mayor confiabilidad correspondió a la fracción 6 del SG (**Tabla 10**).

Tabla 10. Identificación proteómica de subunidades del FSI en las fracciones del gradiente de sacarosa separadas por SDS-PAGE.

Número de fracción <sup>a</sup>	ID UniProt <sup>b</sup>	Gen <sup>c</sup>	Masa predicha (KDa) <sup>b</sup>	Número de veces detectadas	Péptidos únicos	Coverage (%)	Subunidad <sup>d</sup>
2	Q7V659	<i>psaA</i>	84.9	4	9	12	PSI-A1
	Q7V511	<i>psaB</i>	83.2	3	11	14.7	PSI-A2
	Q7V564	<i>psaD</i>	15.7	4	5	43	PSI-II
	Q7V511	<i>psaF</i>	18.4	2	3	21	PSI-III
	Q7V511	<i>psaL</i>	20.1	2	4	26	PSI-XI
6	Q7V659	<i>psaA</i>	84.9	5	8	10.8	PSI-A1
	Q7V511	<i>psaB</i>	83.2	5	11	14.6	PSI-A2
	Q7V564	<i>psaD</i>	15.7	6	28	90	PSI-II
	Q7V511	<i>psaF</i>	18.4	4	10	51	PSI-III
	Q7V511	<i>psaL</i>	20.1	6	23	52	PSI-XI
	Q7V611	PMT_1178	20.7	1	3	20.9	Ycf4
9	Q7V659	<i>psaA</i>	84.9	6	11	13.9	PSI-A1
	Q7V511	<i>psaB</i>	83.2	7	13	17.5	PSI-A2
	Q7V564	<i>psaD</i>	15.7	5	10	57	PSI-II
	Q7V511	<i>psaF</i>	18.4	2	21	53	PSI-III
	Q7V511	<i>psaL</i>	20.1	5	3	15	PSI-XI
10	Q7V659	<i>psaA</i>	84.9	1	8	10.6	PSI-A1
	Q7V511	<i>psaB</i>	83.2	2	7	10.3	PSI-A2
	Q7V564	<i>psaD</i>	15.7	1	3	26	PSI-II
	Q7V511	<i>psaL</i>	20.1	1	3	21	PSI-XI
11	Q7V511	<i>psaB</i>	83.2	2	5	9.7	PSI-A2
	Q7V9A0	PMT_0054	20.5	1	3	22	Ycf37

<sup>a</sup> Números correspondientes a las fracciones del gradiente de sacarosa cargadas en el gel SDS-PAGE (Fig. 27b).

<sup>b, c, d</sup> Parámetros como en tabla 8.

Las subunidades detectadas para el FSII se encontraron en las fracciones 2, 6, 9, 10, 11 y 14. Fueron detectadas las subunidades del centro de reacción D1 y D2, además de las antenas proximales CP43 y CP47 en todas las fracciones, excepto en las dos primeras fracciones, donde D1 no fue detectada. La antena distal PcbB fue detectada en todas las fracciones. La zona del gradiente donde se detectaron las subunidades del FSII con mayor cobertura corresponde a las fracciones 10 y 11 (**Tabla 11**). Para los complejos citocromo *b<sub>6f</sub>* y ATP Sintasa, solo se detectaron péptidos de sus subunidades en la fracción 14. Para el citocromo *b<sub>6f</sub>* solo dos de sus siete subunidades fueron detectadas; cit *b<sub>6</sub>* y cit *f*. Para la ATP Sintasa se identificaron tres subunidades del dominio F<sub>1</sub>; las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\delta$ . Para el dominio hidrofóbico F<sub>0</sub> solo se identificó la subunidad b. Confirmando la reproducibilidad, se detectaron seis péptidos únicos para la enzima FNR en la fracción 14 (PetH, **Tabla 12**).

Tabla 11. Identificación proteómica de subunidades del FSII en las fracciones del gradiente de sacarosa separadas por SDS-PAGE.

Número de fracción <sup>a</sup>	ID UniProt <sup>b</sup>	Gen <sup>c</sup>	Masa predicha (KDa) <sup>b</sup>	Número de veces detectadas	Péptidos únicos	Coverage (%)	Subunidad <sup>d</sup>
2	Q7V5B9	<i>psbB</i>	56.16	2	9	21	PSII-CP47
	Q7V6H9	<i>psbC</i>	50.9	3	6	13	PSII-CP43
	Q7V6I0	<i>psbD</i>	39.32	3	3	9	PSII-D2
6	Q7V6U4	<i>pcbB</i>	38.54	4	12	25	Antena-PcbB
	Q7V5B9	<i>psbB</i>	56.16	5	15	33	PSII-CP47
	Q7V6H9	<i>psbC</i>	50.9	3	5	13	PSII-CP43
	Q7V6I0	<i>psbD</i>	39.32	4	4	14	PSII-D2
9	Q7V6U4	<i>pcbB</i>	38.54	9	12	29	Antena-PcbB
	Q7TTH6	<i>psbA</i>	39.41	5	4	15	PSII-D1
	Q7V5B9	<i>psbB</i>	56.16	9	25	38	PSII-CP47
	Q7V6H9	<i>psbC</i>	50.9	6	6	15	PSII-CP43
10	Q7V6I0	<i>psbD</i>	39.32	9	5	20	PSII-D2
	Q7V6U4	<i>pcbB</i>	38.54	7	11	29	Antena-PcbB
	Q7TTH6	<i>psbA</i>	39.41	1	5	18.4	PSII-D1
	Q7V5B9	<i>psbB</i>	56.16	2	24	36.7	PSII-CP47
	Q7V6H9	<i>psbC</i>	50.9	2	5	11.4	PSII-CP43
	Q7V6I0	<i>psbD</i>	39.32	2	8	23.4	PSII-D2
11	Q7V6U4	<i>pcbB</i>	38.54	2	8	15.4	Antena-PcbB
	Q7TTH6	<i>psbA</i>	39.41	4	5	18.4	PSII-D1
	Q7V5B9	<i>psbB</i>	56.16	11	21	39.0	PSII-CP47
	Q7V6H9	<i>psbC</i>	50.9	6	4	11.4	PSII-CP43
14	Q7V6I0	<i>psbD</i>	39.32	8	6	19.1	PSII-D2
	Q7V6U4	<i>pcbB</i>	38.54	9	10	28	Antena-PcbB
	Q7TTH6	<i>psbA</i>	39.41	3	4	12.3	PSII-D1
	Q7V5B9	<i>psbB</i>	56.16	12	8	14.7	PSII-CP47
	Q7V6H9	<i>psbC</i>	50.9	13	8	15.1	PSII-CP43
	Q7V6I0	<i>psbD</i>	39.32	10	4	9.7	PSII-D2
	Q7V6U4	<i>pcbB</i>	38.54	17	16	27.1	Antena-PcbB

<sup>a</sup> Números correspondientes a las fracciones del gradiente de sacarosa cargadas en el gel SDS-PAGE (Fig. 27b).

<sup>b, c, d</sup> Parámetros como en tabla 8.

Tabla 12. Identificación proteómica de subunidades del citocromo *b<sub>6</sub>f*, FNR y *F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>* ATP Sintasa en las fracciones del gradiente de sacarosa separadas por SDS-PAGE.

Número de fracción <sup>a</sup>	ID UniProt <sup>b</sup>	Gen <sup>c</sup>	Masa predicha (KDa) <sup>b</sup>	Número de veces detectadas	Péptidos únicos	Coverage (%)	Subunidad <sup>d</sup>
14	Q7V653	<i>petA</i>	33.3	2	4	22.9	Cit <i>f</i>
	Q7V5B9	<i>petB</i>	24.5	3	4	27	Cit <i>b<sub>6</sub></i>
	Q7TUW1	<i>petH</i>	40.8	5	6	20	FNR
14	Q7V5S7	<i>atpA</i>	54.0	1	3	7.3	$\alpha$ subunit <i>F<sub>1</sub></i>
	Q7V5U2	<i>atpD</i>	52.1	1	4	9.2	$\beta$ subunit <i>F<sub>1</sub></i>
	Q7V5S5	<i>atpF</i>	18.7	1	6	37	b subunit <i>F<sub>0</sub></i>
	Q7V5S6	<i>atpH</i>	19.7	1	5	24	$\delta$ subunit <i>F<sub>1</sub></i>

<sup>a</sup> Números correspondientes a las fracciones del gradiente de sacarosa cargadas en el gel SDS-PAGE (Fig. 27b).

<sup>b, c, d</sup> Parámetros como en tabla 8.

## Parte II. Encontrar la distribución de pigmentos Chl $a_2$ y Chl $b_2$ en los complejos fotosintéticos de la cianobacteria *Prochlorococcus marinus* MIT9313

### Extracción, separación e identificación de cromóforos de membranas de *Prochlorococcus marinus* MIT9313.

Conociendo la identidad de los complejos en las bandas verdes del SG y sabiendo que el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de cada DVChl, a lo largo del espectro visible, puede relacionarse con su concentración cuando la dispersión es baja, se procedió a iniciar los experimentos para determinar sus valores y encontrar la estequiometría en las fracciones del SG de manera cuantitativa.

La literatura muestra algunos valores para ambas DVChls y sus feofitinas disueltas en éter y acetona al 80% (**Shedbalkar & Rebeiz, 1992**). Se procedió a extraer y separar las DVChls para correlacionar su espectro de absorción con los valores de su  $\epsilon$  reportados para acetona al 80%. Para comparar nuestros espectros y separación de las DVChls con los reportados en la literatura, se realizó una extracción de cromóforos de las membranas tilacoidales de MIT9313. Los cromóforos se extrajeron con metanol al 90% y 0.1 N de  $\text{NH}_4\text{OH}$  para evitar la acidificación del solvente y con ello la feofitinización de las DVChl (sustitución de magnesio por protón). La extracción metanólica se inyectó en un HPLC fase reversa en una columna C18 para separar sus componentes. La fase móvil consistió en un gradiente con disminución de hidropatía con respecto al tiempo. Los cromóforos eluyeron después del minuto 5 (**Fig. 28**). En algunos casos, la identificación de los cromóforos fue posible por las características absorptivas de su estructura química y lo reportado en la literatura (**Goericke & Repeta 1992; Goericke & Repeta 1993**).

El primer cromóforo eluyó a los 5.77 min y presentó el espectro de absorción característico de las clorofilas tipo *c* (**Zapata et al., 2006, Fig. 28a**). Se identificó el espectro de absorción y tiempo de retención de la zeaxantina y el  $\alpha$ -caroteno a los 8.91 y 22 min, respectivamente (**Fig. 29b**). Se detectaron, además, tres distintos carotenos a los 11.03, 11.62 y 17.83 min (**Fig. 29c**).

Los espectros de absorción son característicos de cada molécula, sin embargo, en el caso de los carotenoides suelen ser muy parecidos y es difícil identificarlos solo con esta caracterización.

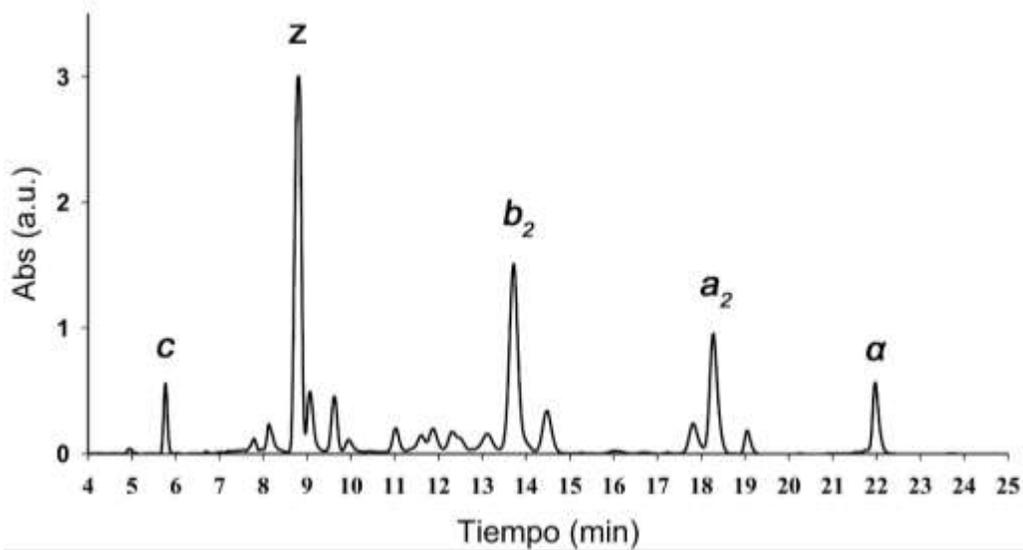


Fig. 28 Cromatograma de cromóforos separados por HPLC extraídos de membranas de *Prochlorococcus marinus* MIT9313. La identidad asignada se basó en los espectros de absorción de cada pico y fueron: c, Clorofila c-like; z, Zeaxantina;  $b_2$  Chl  $b_2$ ;  $a_2$  Chl  $a_2$ ;  $\alpha$ ,  $\alpha$ -caroteno. Algunos picos mostraron los mismos espectros de absorción que algunos de los cromóforos identificados, posiblemente por la formación de aductos con las sales presentes en el gradiente de solventes (dato no mostrado). La absorción fue tomada a 465 nm.

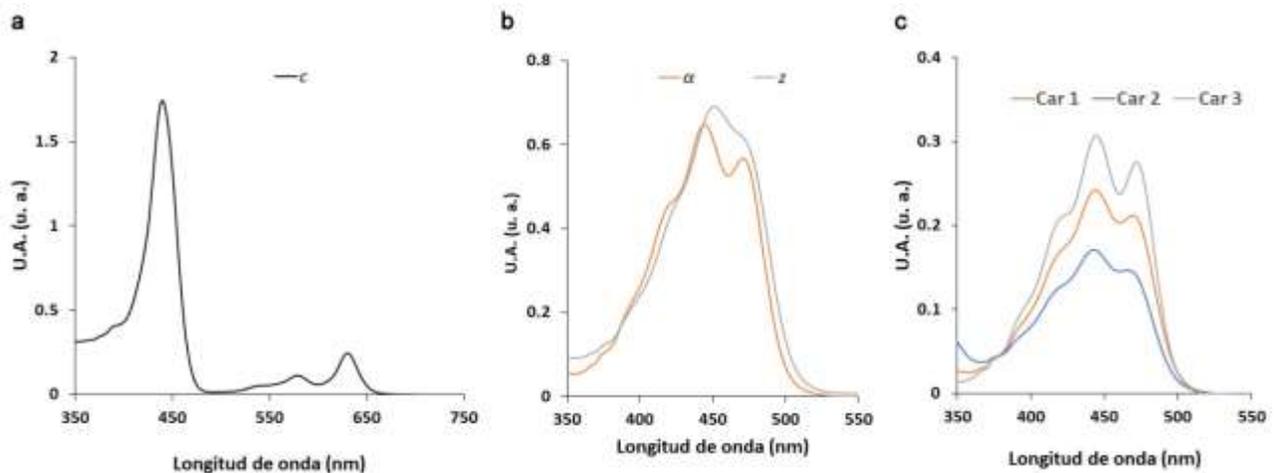
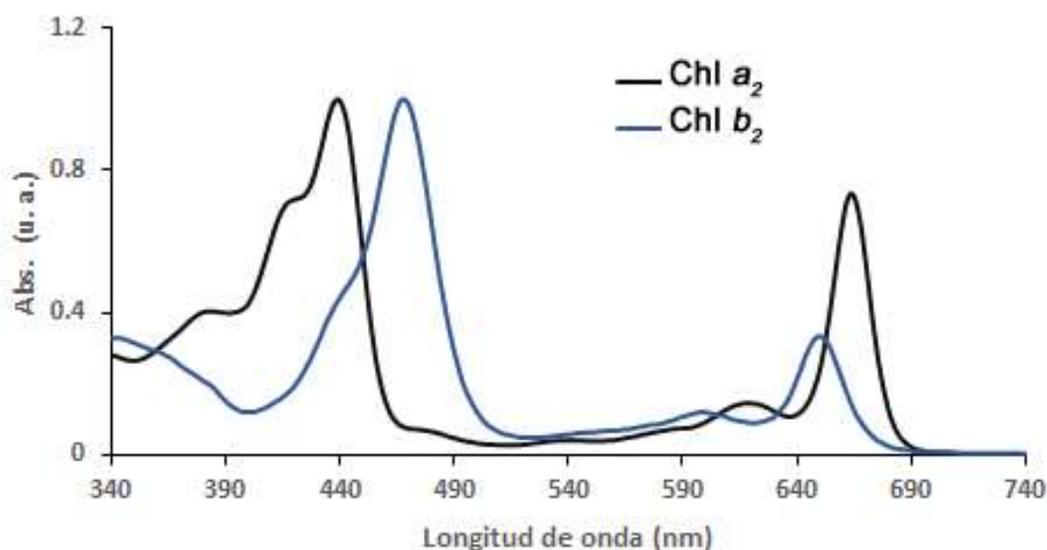


Fig. 29 Espectros de absorción de cromóforos de *Prochlorococcus marinus* MIT9313 separados por HPLC. a. Espectro de absorción de una clorofila tipo c, elución 5.77 min. b. Espectros de absorción de  $\alpha$ -caroteno ( $\alpha$ ), tiempo de elución 22 min y zeaxantina (z), tiempo de elución 8.91 min. c. Espectros de absorción de tres carotenos no identificados, los tiempos de elución son: Car 1, 11.03; Car 2, 11.62; Car 3, 17.83. Ver figura 28.

La Chl  $a_2$  y Chl  $b_2$  eluyeron a los 18.27 y 13.73 min respectivamente (**Fig. 28**). El DAD (diode array detector) del equipo de HPLC mostró espectros característicos de cromóforos ya reportados. La **Figura 30** muestra los espectros de absorción de la Chl  $a_2$  y Chl  $b_2$  a los tiempos de elución descritos. A partir de estos espectros no se pueden calcular los  $\epsilon$  dado que los cromóforos se encuentran disueltos en una mezcla de solventes del gradiente del HPLC. Para Chl  $a_2$ , 85% de buffer B y 15% de buffer C; Chl  $b_2$ , 95.5% de buffer B y 4.5% de buffer C (ver materiales y métodos).



*Fig. 30 Espectros de absorción de divinil clorofila a y b. Los espectros se obtuvieron de la medición tomada por el sistema de arreglo de diodos del HPLC. Las divinil clorofilas se encuentran disueltas en las siguientes mezclas de solventes: Chl  $a_2$ , 85% de metano y 15% de acetona; Chl  $b_2$ , 95.5% de metanol y 4.5% de acetona.*

## Identificación de los cromóforos del aparato fotosintético de *Prochlorococcus marinus* MIT9313 usando espectrometría de masas

Los cromóforos separados por HPLC fueron analizados por espectrometría de masas para descartar una posible contaminación que afecte la absorción y por ende la determinación del coeficiente de extinción molar. Las fracciones de cromóforos separados por HPLC fueron inyectadas directamente en un espectrómetro de masas con una fuente de ionización basada en electrospray (ESI).

Para la fracción cuyo espectro de absorción corresponde a la Chl  $a_2$  se detectó un ion de masa 890.4 m/z, correspondiente al ion  $[M]^+$  de la Chl  $a_2$  ( $C_{55}H_{70}MgN_4O_5$ ), cuya masa monoisotópica calculada es de 890.520 Da. (**Fig. 31a**, inserto). El ion 890.4 m/z fue fragmentado y los iones identificados se muestran en la **figura 31a**. El ion de masa 613 m/z corresponde a la pérdida de la cadena hidrocarbonada o fitol  $[M+H-278]^+$ . Otros iones fueron detectados y calculados manualmente para asignar las pérdidas de masa. El ion  $[M+H-278-32]^+$  correspondería a la pérdida de metanol y el ion  $[M+H-278-60]^+$  correspondería a la pérdida de un grupo carboximetilo, ambos posteriores a la pérdida del fitol (**Juin et al., 2015**). El ion correspondiente a la masa 948.4 m/z detectado en la fracción correspondiente a la Chl  $a_2$  (**Fig. 31a**, inserto), fue fragmentado encontrando el mismo patrón que para el ión 890.4 m/z (dato no mostrado).

Para la fracción cuyo espectro de absorción corresponde a la Chl  $b_2$ , se detectó un ion de masa 905.4 m/z el cual corresponde al ion  $[M+1]^+$  de la Chl  $b_2$  ( $C_{55}H_{68}MgN_4O_6$ ), cuya masa monoisotópica calculada es de 904.4 Da. De la misma manera que para la Chl  $a_2$ , en el espectro de fragmentación, fue posible detectar un ion con la pérdida de masa correspondiente a la pérdida del fitol (626.7 m/z), metanol (595.2 m/z) y el grupo carboximetilo (567 m/z, **Fig. 31b**).

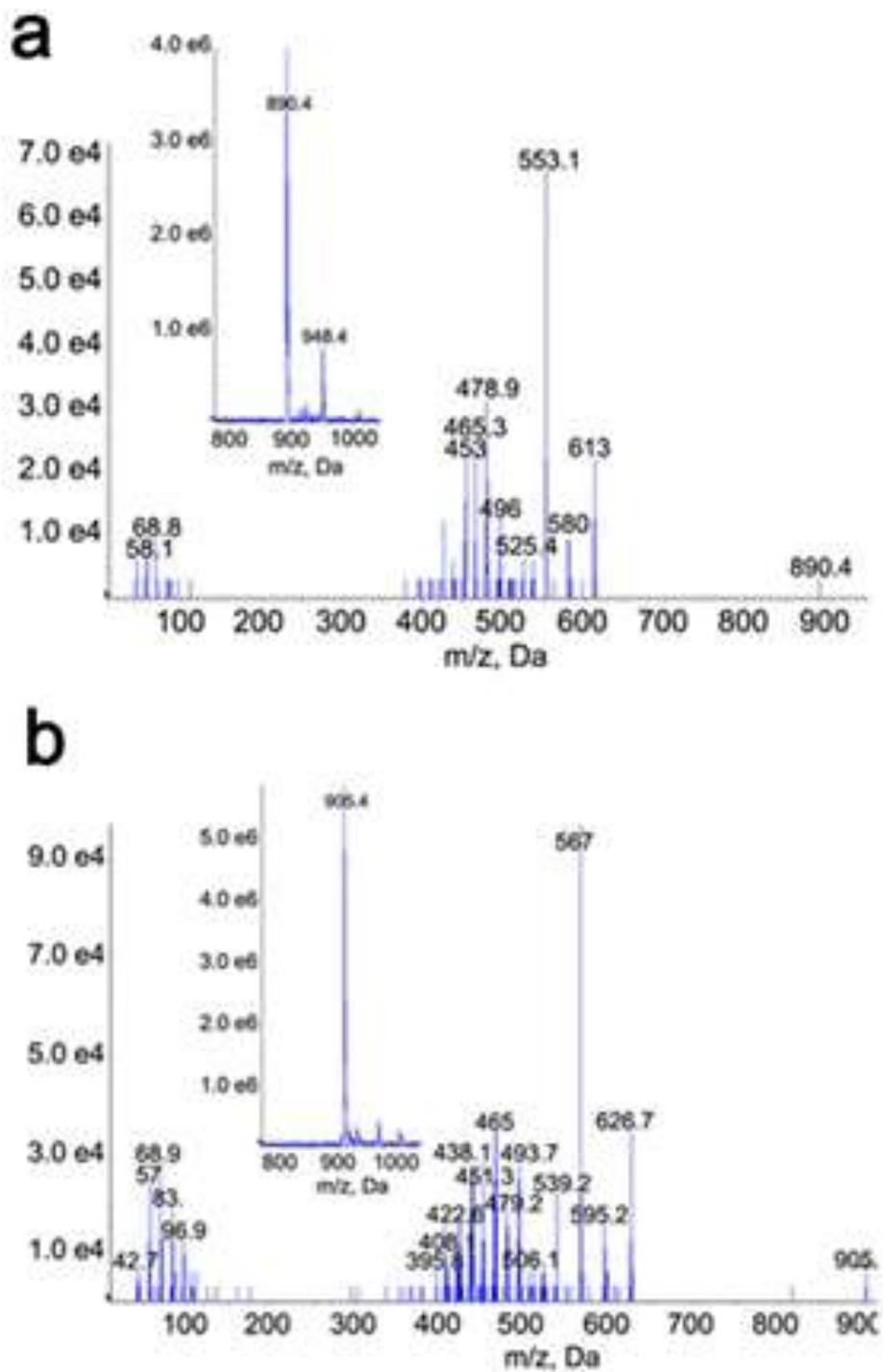


Fig. 31 Espectros de masa y fragmentación de las divinil clorofilas. a. Espectro de fragmentación del ion (inserto) ion  $[M^{\bullet}]^+$  de la Chl  $a_2$  (890.4). b. Espectro de fragmentación del ion (inserto) ion  $[M+1]^+$  de la Chl  $b_2$  (905.4).

Otros cromóforos fueron analizados de la misma manera. Los carotenoides zeaxantina y  $\alpha$ -caroteno mostraron iones con las masas esperadas de 568.5 m/z y 536.4 m/z, respectivamente. Los espectros de fragmentación mostraron iones de baja masa que corresponderían a la fragmentación de la cadena isoprenoide que es idéntica en ambos carotenoides (**Fig. 32**). Los tres carotenoides no identificados fueron procesados de la misma manera. Sus espectros de fragmentación se muestran en la **figura S4**.

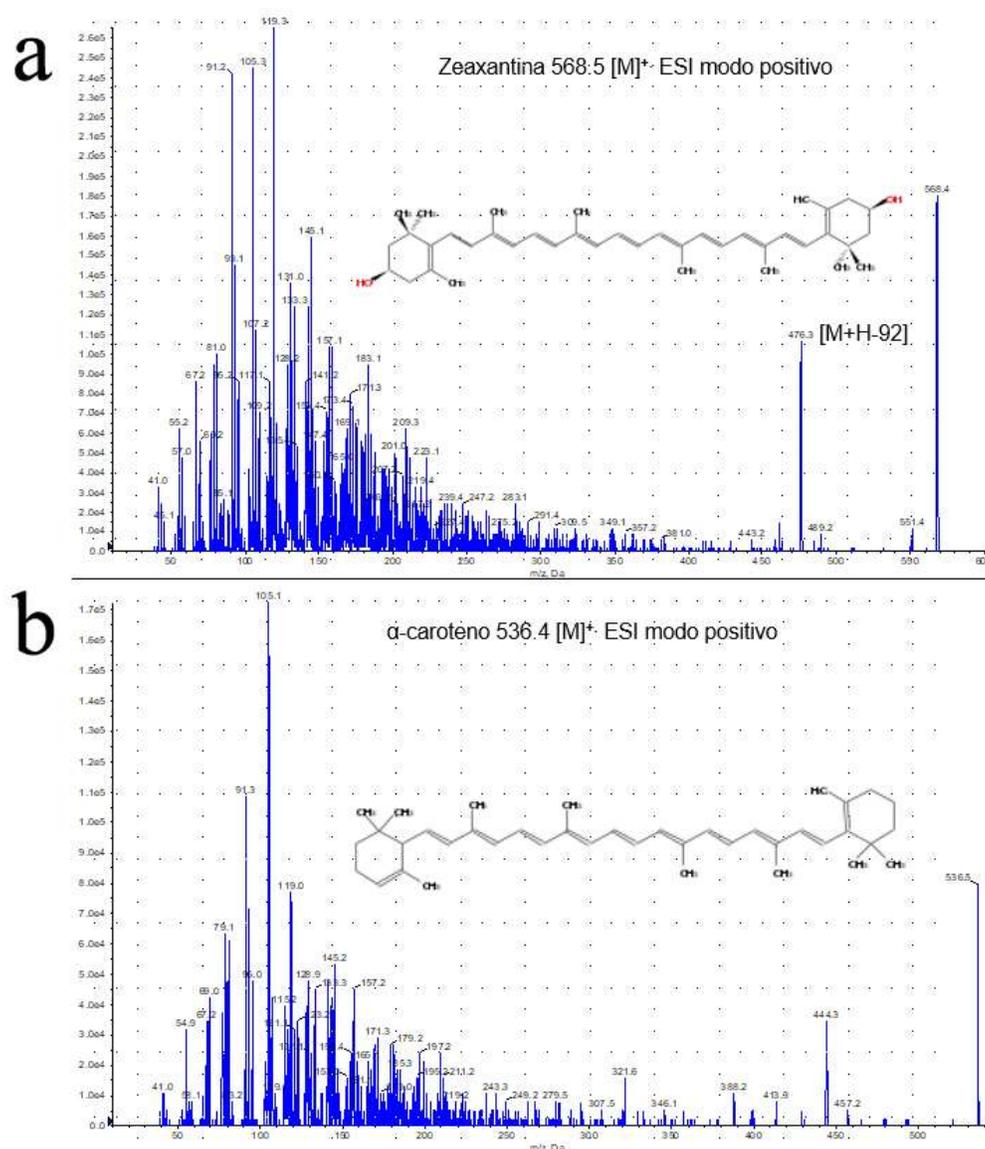


Fig. 32 Espectros de fragmentación de espectrometría de masas de la zeaxantina y  $\alpha$ -caroteno, extraídos de tilacoides de *Prochlorococcus marinus* MIT9313.

## **Cálculo de los coeficientes de extinción molar de la divinil clorofila a y divinil clorofila b.**

Teniendo en cuenta que las fracciones de las DVChls separadas por HPLC mostraron una pureza aceptable en el análisis de espectrometría de masas se procedió con los experimentos para obtener un espectro de absorción en el solvente indicado (acetona 80%) y poder calcular los  $\epsilon$ . Para ello, los solventes en las fracciones fueron evaporados y las muestras fueron resuspendidas en acetona al 80% para obtener los espectros de absorción. Se generó una relación lineal con el valor del  $\epsilon$  a 663 nm, publicado por **Shedbalkar & Rebeiz**, (1992) y los demás valores de absorción fueron correlacionados uno a uno para obtener los  $\epsilon$  a lo largo de todo el espectro de absorción (**Fig. 33**). Se puede observar que el valor del  $\epsilon$  en la zona del Soret es mayor para la Chl  $b_2$  que para la Chl  $a_2$ .

Cuando los valores de los  $\epsilon$  fueron graficados se detectó que la forma de la curva no se ajustaba del todo a los reportados por **Shedbalkar & Rebeiz**, (1992). La relación  $S/Q_y$  de nuestros espectros fue de 2.88 para la Chl  $b_2$  y el valor reportado fue de 2.45.

Para el caso de la Chl  $a_2$  no hubo una diferencia importante. **Goericke & Repeta** (1992) reportan una discrepancia parecida y atribuyen la diferencia a una contaminación por lípidos cuando la determinación del  $\epsilon$  fue realizada por **Shedbalkar & Rebeiz**, (1992).

Se utilizaron los valores del  $\epsilon$  en la zona del rojo para determinar las concentraciones de DVChl en las fracciones del SG. Aunque se trata de una mezcla compuesta en esa zona del espectro la absorción de los carotenos es nula y permite diferenciar las DVChl de otros posibles cromóforos. Los cromóforos en las fracciones del gradiente de sacarosa fueron extraídos con acetona (volumen final 80%), se centrifugaron para eliminar la dispersión y los espectros de absorción fueron *leídos* de 340 a 740 nm.

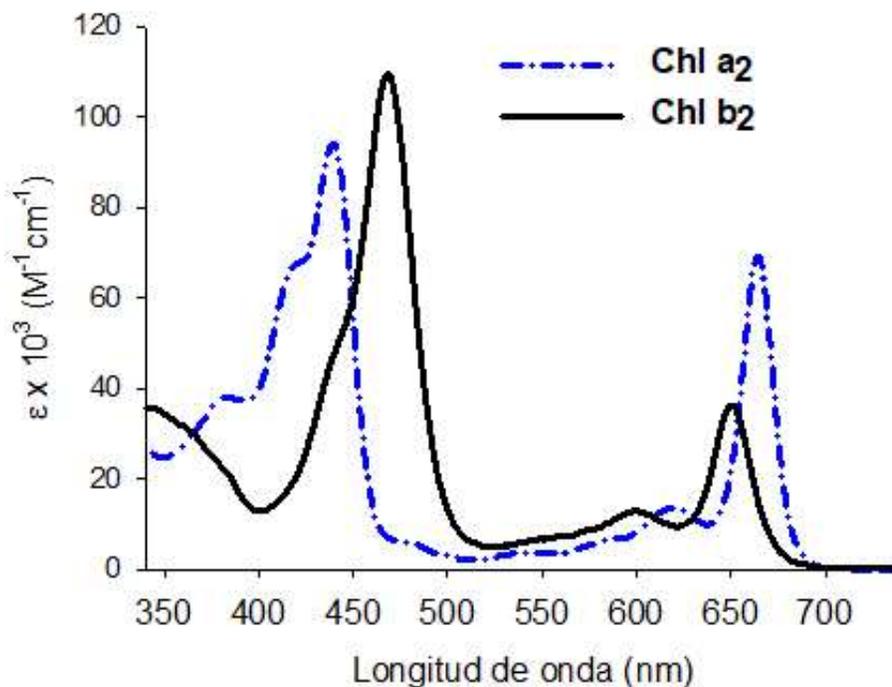


Fig. 33 Coeficientes de extinción molar de divinil clorofila a y b en acetona al 80%. Los espectros de absorción fueron interpolados y correlacionados con los valores reportados a 663 nm por *Shedbalkar & Rebeiz*, (1992). Los valores del coeficiente de extinción molar corresponden a valores del cromóforo en acetona al 80%.

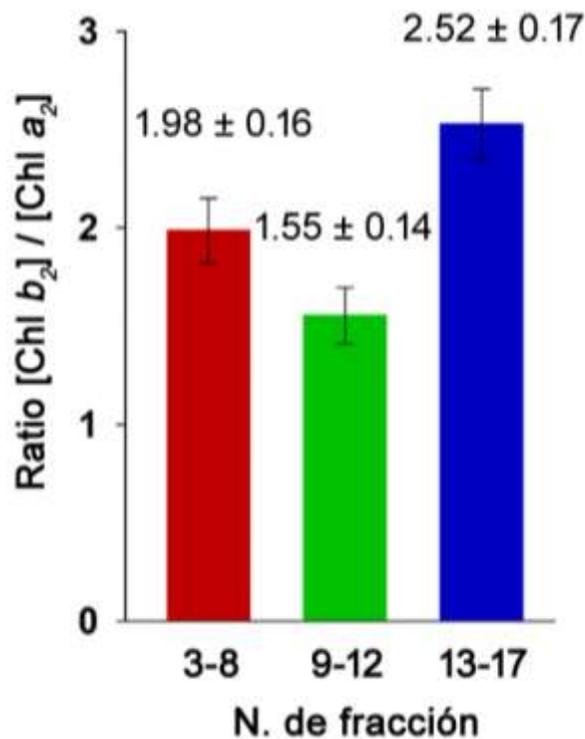
### Determinación de la distribución de divinil clorofila a y divinil clorofila b en los gradientes de sacarosa

Considerando que los resultados de espectrometría de masas mostraron que las fracciones densas (2 y 6) tienen mejores determinaciones y mostraron mayor número de subunidades para el FSI (**Tabla 10**), además de que el patrón electroforético corresponde de manera dominante a dicho fotosistema (**Fig. 27b**), asumimos que las fracciones 3-8 se encuentran enriquecidas en FSI. Por otra parte, las fracciones intermedias (9-11) mostraron mejores determinaciones y mayor número de subunidades para el FSII (**Tabla 11**) y de la misma manera el patrón electroforético corresponde a las subunidades de dicho fotosistema (**Fig. 27b**), asumimos que las fracciones 9-12 se encuentran enriquecidas en FSII.

Para la antena distal PcbB el patrón electroforético más intenso se encuentra en las fracciones 13 a la 17, asumimos que dichas fracciones corresponden a zonas enriquecidas de la antena distal PcbB.

Las concentraciones de Chl  $a_2$  y  $b_2$  fueron determinadas a lo largo del gradiente utilizando un sistema de ecuaciones lineales y los valores del  $\epsilon$  a 664 y 654 nm para ambas DVChls (ver materiales y métodos, **Fig. 33**). El cociente Chl  $b_2$ /Chl  $a_2$  fue calculado y mostró valores mayores a 1 en todas las fracciones del SG (**Fig. 34**).

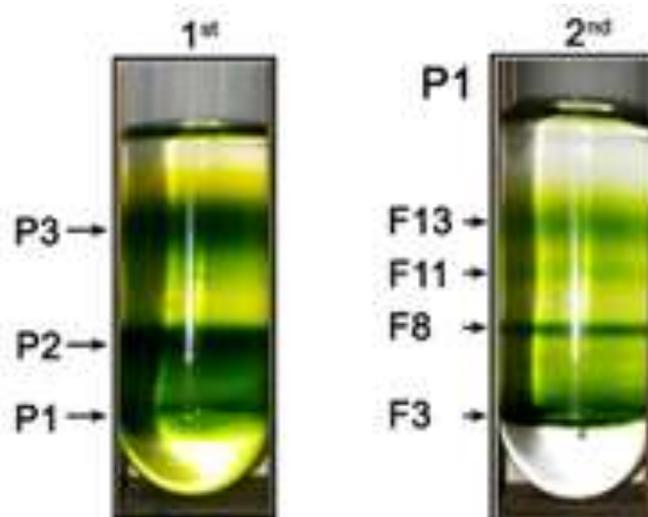
Para la zona enriquecida del FSI se encontró una relación aproximada de 1 Chl  $a_2$  por cada 2 Chl  $b_2$ . Para la zona enriquecida del FSII se encontró la relación más pequeña, teniendo 2 Chl  $a_2$  por cada 3 Chl  $b_2$ . Finalmente, en la zona correspondiente a la antena PcbB se encontró la relación más alta, teniendo 2 Chl  $a_2$  por cada 5 Chl  $b_2$ .



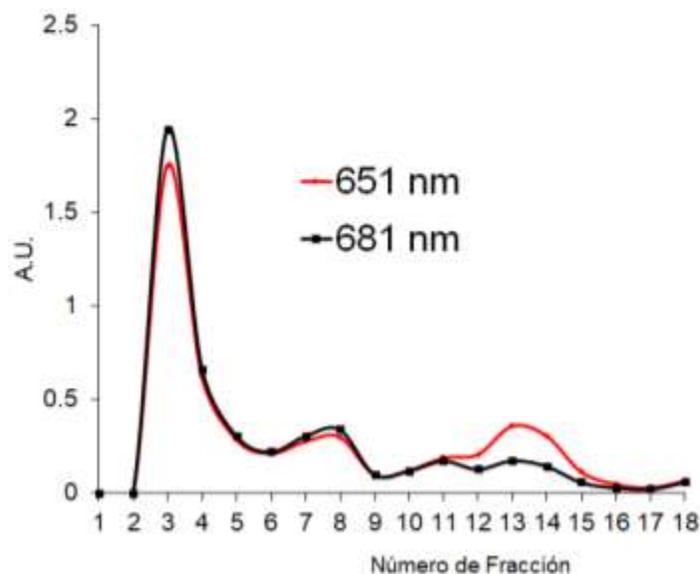
*Fig. 34 Relación de concentraciones de divinil clorofila a y b. Las zonas del gradiente fueron promediadas. Para 3-8,  $n=30$ ; 9-12,  $n=20$ ; 13-17,  $n=25$ .*

Por otro lado, se observó que existe co-migración de la antena distal PcbB a lo largo de todo el gradiente de sacarosa. Para probar su contribución al cálculo de la relación  $\text{Chl } b_2/\text{Chl } a_2$  en la zona enriquecida del PSI, se concentraron y dializaron fracciones correspondientes a esta zona y se cargaron en un segundo gradiente con las mismas condiciones y densidades de sacarosa (**Fig. 35**).

Los segundos gradientes de fracciones densas (P1) mostraron una distribución de bandas verdes parecida al primer gradiente (**Fig. 35**). Al caracterizar espectroscópicamente las fracciones del segundo gradiente, la curva correspondiente a la  $\text{Chl } a_2$  (681 nm) mostró una mayor absorción que la  $\text{Chl } b_2$  (651 nm) en las fracciones 3 y 8, sin embargo, la diferencia en todas las demás fracciones no parece tener una contribución significativa que modifique el cálculo obtenido en el primer gradiente de sacarosa (**Fig. 36**).



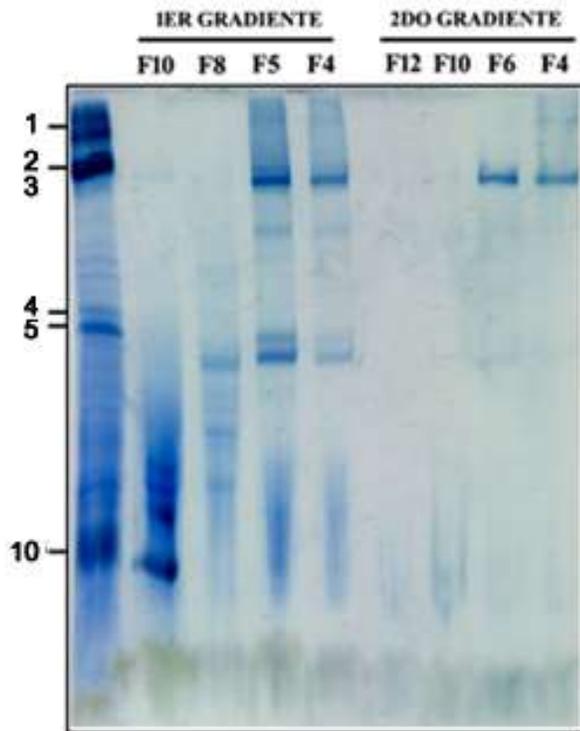
*Fig. 35 Análisis de complejos por segundos gradiente. La banda verde en el fondo del gradiente se dializó y se cargó en un segundo gradiente (2nd).*



*Fig. 36 Perfil de las fracciones del segundo gradiente de sacarosa. La curva roja muestra la absorción preferente de la Chl  $b_2$  y la curva negra muestra la absorción preferente de la Chl  $a_2$ .*

Por otra parte, sabiendo que la técnica CN-PAGE mostró una buena resolución para los complejos fotosintéticos de MIT9313 (**Fig. 22**) y con el fin de comprobar la riqueza de complejos en los gradientes de sacarosa (1ero y 2do, **Fig. 35**), algunas fracciones se dializaron y se cargaron en geles CN-PAGE buscando preservar la estabilidad de los complejos y se compararon con membrana solubilizadas de MIT9313 (**Fig. 37**). Las fracciones F4 y F5 del primer gradiente mostraron cierto grado de mezcla de FSI (trímero, banda 2; monómero, banda 4) y FSII (monómero, banda 5). Sin embargo, se puede notar que estas fracciones están enriquecidas con FSI, dado que la intensidad de la banda del monómero del FSII es baja con respecto a las dos bandas del FSI (**Fig. 37a**). Para la fracción F8 se puede notar que se encuentra enriquecida en FSI. Para la fracción 10 fue posible notar subestructuras de complejos que migraron en el peso molecular aparente de la antena PcbB (**Fig. 37a**, 10). Las bandas de las fracciones F4 y F6 del segundo gradiente mostraron un enriquecimiento mayor de FSI. Sin embargo, la cantidad de proteína que se obtiene para las fracciones 10 y 12 no permiten que se distingan bandas intensas en el gel. Se utilizaron membranas solubilizadas como referencia y se comprobó la identidad de cada banda por su ya conocido patrón electroforético (**Fig. 37b**).

a



b

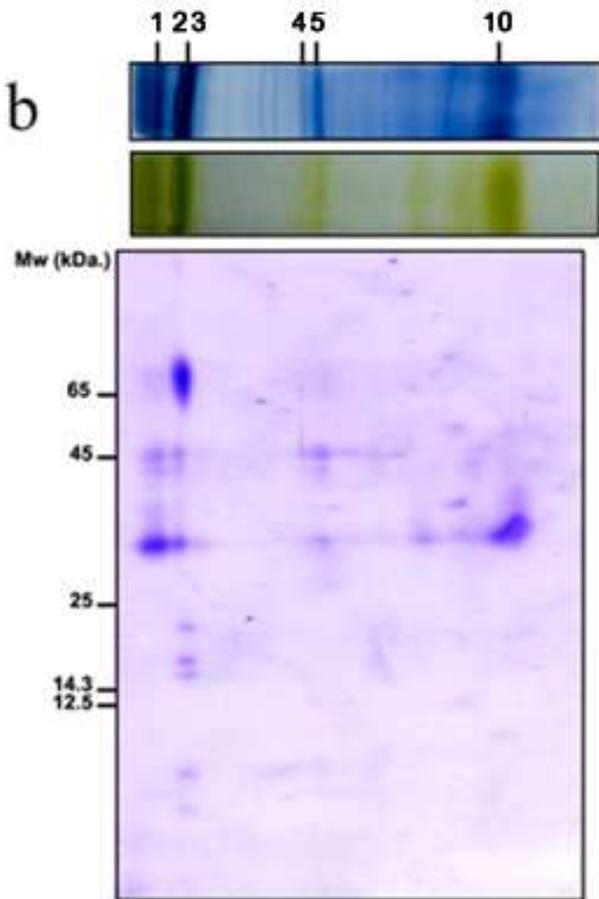


Fig 37. Geles nativos claros de fracciones de los gradientes de sacarosa (1er y 2do). **a.** En el primer carril se cargaron membranas solubilizadas como referencia. Las fracciones se dializaron y se cargaron en el gel agregando 0.02% de detergente dodecil maltosido. Se cargaron las fracciones indicadas de los dos gradientes de sacrosa. **b.** Se comprobó la identidad de las bandas de las membranas solubilizadas usando una segunda dimensión desnaturizante.

### Parte III. Caracterización bioquímica del proteoma fotosintético constitutivo e inducible, (por estrés de escasez de Fe<sup>2+</sup> en el medio de crecimiento) de *Synechococcus* PCC 7002 y *Nodularia* sp. CCM9.

#### Caracterización del aparato fotosintético constitutivo de *Synechococcus* PCC.7002.

De la misma manera que se realizó para MIT9313, las células de *Synechococcus* PCC 7002 (PCC 7002) fueron cosechadas y mezcladas con arena de mar para la ruptura celular. Los tilacoides fueron separados y solubilizados con 1% de DDM (w/v) y cargados en un gel CN-PAGE para separar sus complejos fotosintéticos. La **figura 38** muestra un gel representativo de complejos del aparato fotosintético de PCC 7002 separados por CN-PAGE. En este experimento se cargaron además membranas de MIT9313 para comparar la migración de los complejos que ya identificamos en la sección anterior. Se pudieron detectar algunas bandas verdes con el mismo patrón de migración en ambas cianobacterias. Las bandas 2 y 3; 4 y 5 de MIT9313 presentan una *contraparte* de peso molecular muy parecido en PCC 7002.

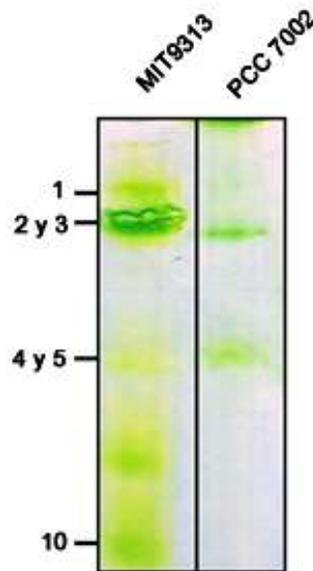
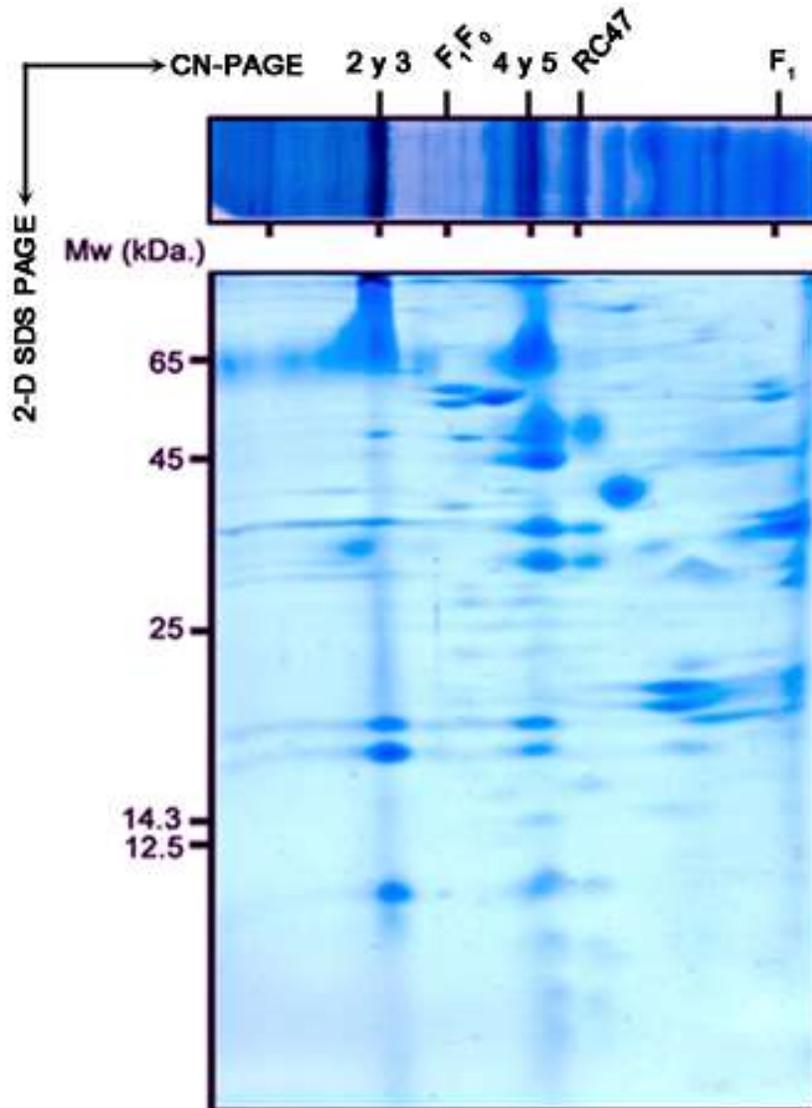


Fig. 38. CN-PAGE de membranas de *Synechococcus* PCC 7002 solubilizadas con dodecil maltósido en condiciones normales de crecimiento. En el primer carril se cargaron membranas de MIT9313 como referencia para determinar por peso molecular aparente los complejos proteicos de PCC 7002.

Los complejos separados en el gel se desnaturalizaron para poder separarlos en una segunda dimensión basada en un gel SDS-PAGE. Geles CN sobrecargados de proteína se utilizaron para este fin. Por otra parte, geles con menor cantidad de proteína se utilizaron para ser teñidos con azul de Coomassie. Se observaron otras bandas correspondientes a proteínas que no unen clorofila (**Fig. 39**, parte superior).



*Fig. 39. 2-D SDS-PAGE de membranas de Synechococcus PCC 7002 en condiciones normales de crecimiento. El gel de primera dimensión se trató para realizar una segunda dimensión desnaturizante utilizando un gel al 10% de poliacrilamida. Los números 2 y 3; 4 y 5, son los números de referencia del gel CN-PAGE de MIT9313 (Fig. 35). Debido al patrón electroforético de las bandas rotulada como  $F_1F_0$  y  $F_1$ , sugieren la presencia de la ATP Sintasa y algunas subestructuras (respectivamente). CR47 es una subestructura del FSII compuesta del centro de reacción y la antena CP47.*

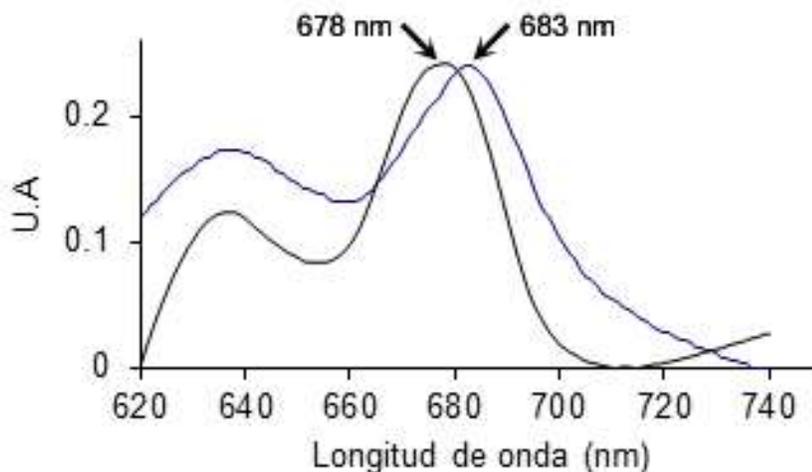
La tinción con azul de Coomassie del gel de segunda dimensión (**Fig. 39**, parte inferior) mostró un patrón electroforético que permitió asignar las identidades de los complejos en las bandas del gel CN-PAGE. Fue posible reconocer patrones electroforéticos de la ATP Sintasa por encima de los 350 kDa y de posibles subestructuras por debajo de los 200 kDa. La banda señalada como 2 y 3 mostró el patrón electroforético del FSI. Una mancha intensa por encima de los 65 kDa correspondiente a las subunidades grandes del *core*, A1 y A2. Además de subunidades por debajo de los 25 kDa correspondientes a las subunidades ligeras que rodean el *core*. Las bandas 4 y 5 mostraron una mejor separación en este experimento. Los patrones electroforéticos corresponden a monómeros del FSI y FSII respectivamente. El FSII no fue encontrado formando dímeros. Las antenas distales CP47 y CP43 fueron detectadas cerca de los 45 kDa, seguidas de las subunidades del centro de reacción a los ~35 kDa. De manera interesante, en las bandas 4 y 5, fue posible reconocer el patrón electroforético del FSII; sin embargo, la mancha correspondiente a la antena proximal CP43, cercano a los 45 kDa no fue visible.

### **Inducción de la expresión de genes *isiA* utilizando medios mínimos de crecimiento con baja concentración de hierro para *Synechococcus* PCC 7002**

Los patrones electroforéticos obtenidos para *Prochlorococcus marinus* MIT9313, resultaron útiles para la asignación de las identidades de las bandas en geles de tilacoides solubilizados de PCC 7002. Se pudo determinar que el FSI es posible encontrarlo formando trímeros y monómeros; el FSII solo fue detectado como monómero y la ATP Sintasa fue posible detectarla formando una estructura estable en el peso molecular que le corresponde (~500 kDa). Una vez determinados los complejos presentes en la condición normal de crecimiento se procedió a hacer la inducción de los genes del aparato fotosintético cuya expresión aumenta en condiciones de escasez de hierro en el medio de crecimiento (**Leonhard and Straus, 1992**).

En las resiembras de las células de PCC 7002 se utilizaron diluciones sucesivas para obtener una concentración final de hierro de 1:210 en el medio de crecimiento. Se

tomaron muestras de células crecidas en medio completo (como control, +Fe) y bajo disminución de hierro en el medio (-Fe). Se midieron los espectros de absorción de ambas condiciones y se compararon (**Fig. 40**). Fue posible identificar un corrimiento del espectro de 5 nm hacia el color azul en la condición -Fe, además, de una disminución en la absorción en la zona del ficobilisoma (~630 nm). Este cambio es indicativo de que el aparato fotosintético se ha modificado (**Bibby et al., 2001**).



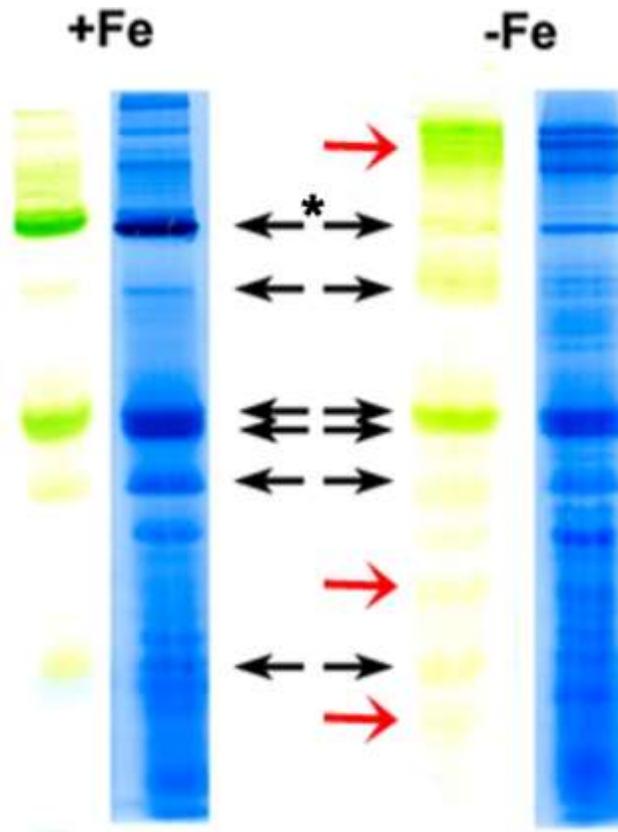
*Fig. 40. Espectro de absorción de células completas de Synechococcus PCC 7002 crecidas en medio completo (curva azul) y con deficiencia de hierro (curva negra). Se utilizó una dilución 1:210 de  $Fe^{2+}$  para inducir la modificación del aparato fotosintético. La curva azul presenta un máximo a los 683 nm y la curva negra a los 678 nm.*

### **Caracterización del aparato fotosintético inducible por estrés por insuficiencia de $Fe^{2+}$ de Synechococcus PCC.7002.**

Las células crecidas en baja concentración de hierro fueron cosechadas y se realizó la ruptura celular con arena de mar y mortero. Las membranas fueron solubilizadas con 1% de DDM (w/v) y los complejos del aparato fotosintético fueron separados utilizando geles CN-PAGE (**Fig. 41**). Se utilizaron membranas solubilizadas de células de PCC 7002 en condiciones +Fe para comparar el patrón electroforético.

Después de la electroforesis CN-PAGE se pudo distinguir que el patrón de bandas mostró similitudes importantes entre ambas condiciones (+Fe y -Fe), sin embargo, se pudieron notar otras bandas verdes en la condición de bajo hierro (**Fig. 41**, -Fe). Se cargó

la misma concentración de clorofila en ambos carriles correspondientes a ambas condiciones de crecimiento para poder realizar una comparación más específica. Se pudo distinguir que algunas bandas variaron en intensidad cuando fueron teñidas con Coomassie (asterisco y flecha roja superior).



*Fig. 41. Complejos del aparato fotosintético de Synechococcus PCC 7002 en dos condiciones de crecimiento separadas por CN-PAGE. Del lado izquierdo de la zona de flechas se muestran un gel representativo con y sin tinción de Coomassie para complejos obtenido de células crecidas en medio completo (+Fe) y del lado derecho se muestran un gel representativo con y sin tinción (con azul de Coomassie) para complejos obtenidos de células crecidas en medio con una dilución 1:210 de hierro (-Fe). Las flechas negras indican las bandas verdes en común de ambas condiciones. Las flechas rojas indican las nuevas bandas verdes que aparecen en la condición -Fe. En ambos gels se cargó la misma concentración de clorofila. Note que la banda maCRada con un asterisco presenta una intensidad de tinción diferente.*

De manera interesante nuevas bandas verdes aparecieron con mayor intensidad en la zona de alto peso molecular, sugiriendo la presencia de supercomplejos en la

condición de -Fe. Además, otras bandas verdes fueron detectadas en la zona de bajo peso molecular (flechas rojas).

Los complejos en los geles CN-PAGE se desnaturalizaron y se procedió a realizar una segunda dimensión desnaturalizante basada en SDS-PAGE (**Fig. 42**). La condición donde las células fueron crecidas con el medio completo (**Fig. 42**, +Fe) se resolvieron patrones electroforéticos muy parecidos a los resultados previamente mostrados en la **Figura 39** para el FSI (trímero y monómero), FSII (monómero) y la ATP Sintasa ( $F_1F_0$ ).

Cuando las células fueron crecidas a una dilución 1:210 de hierro, fueron detectadas manchas de proteínas que no aparecen en la condición de +Fe (**Fig. 42**, flechas rojas). Los complejos proteicos que aparecieron en la condición -Fe y no se encuentran en la condición +Fe se indican en la **figura 41**, en flechas rojas. A partir de su patrón electroforético, en la segunda dimensión, los manchas con el peso molecular aparente por encima de los 25 kDa posiblemente podrían corresponder a la proteína inducible por estrés por bajo hierro, IsiA (37.59 kDa). Analizando el patrón electroforético de los demás complejos fue posible asignarles una identidad. Las bandas por encima de los 500 kDa, corresponden al trímero del FSI. La siguiente banda corresponde a la ATP Sintasa, la cual presenta dos manchas por encima de los 50 kDa correspondientes a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del dominio  $F_1$ . Las siguientes bandas muestran el patrón electroforético del FSI, el FSII y la su subestructura CR47. Las últimas bandas corresponden a las ficobiliproteínas que se precipitaron junto con las membranas y que en la condición de -Fe aparecen en menor cantidad. En el gel CN-PAGE se puede notar su color cian correspondiente a las ficobiliproteínas (**Fig. 41**).

En otras especies de cianobacterias, se ha reportado que, en condiciones de estrés por insuficiencia de hierro en el medio de crecimiento, la proteína antena IsiA se expresa y puede encontrarse formando supercomplejos con el FSI. Para identificar la presencia de IsiA en nuestras condiciones de crecimiento, se cortaron bandas de los geles CN-PAGE en la zona de peso molecular donde el trímero del FSI debería de

encontrarse. Se tomo una *rebanada* de gel de ambas condiciones, al mismo peso molecular para su análisis por espectrometría de masas, buscando comparar la presencia de componentes proteicos expresados diferencialmente (**Fig. 42**, rectángulos rojos).

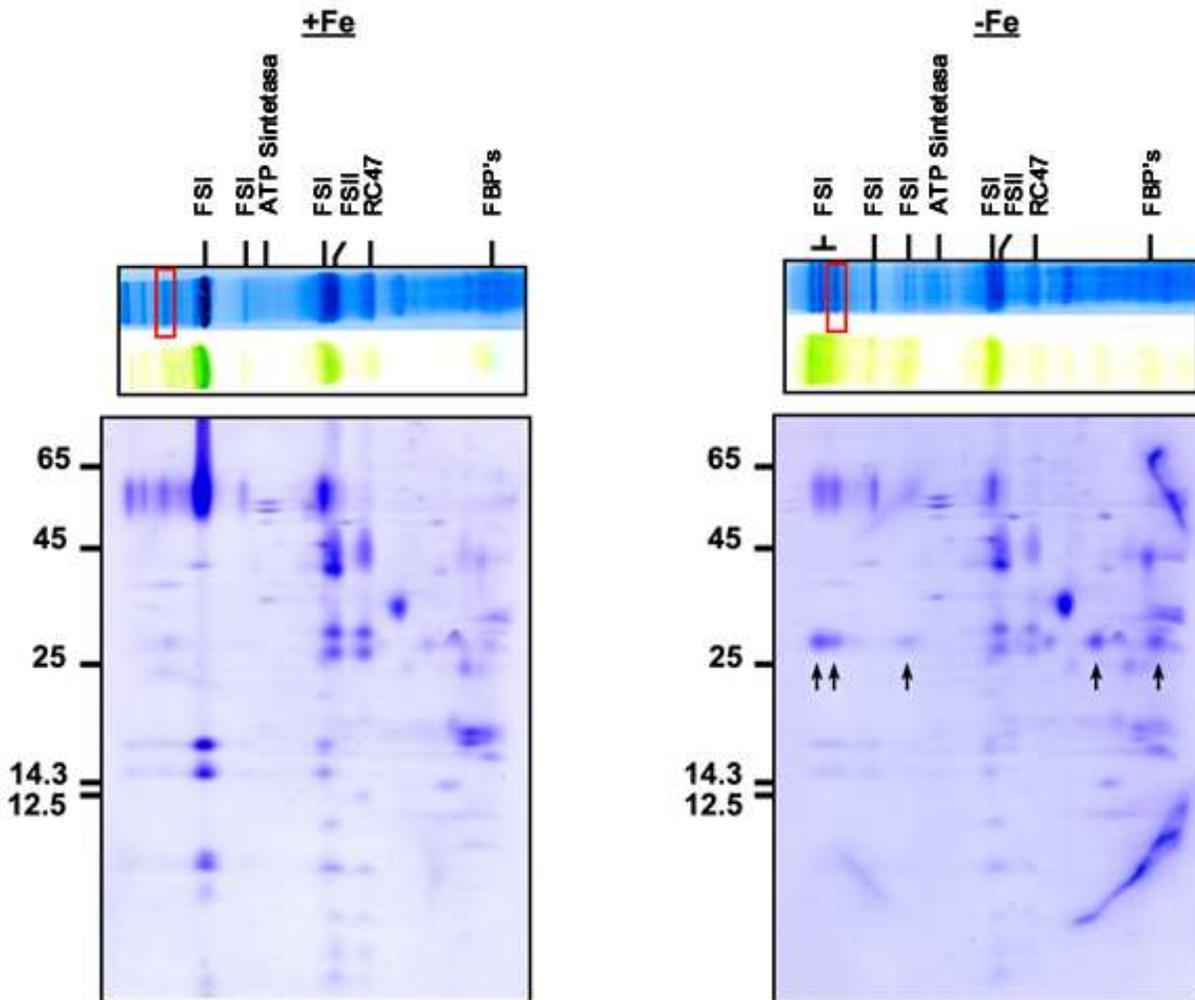


Fig. 42. 2-D SDS-PAGE de complejos del aparato fotosintético de *Synechococcus* PCC 7002 en dos condiciones de crecimiento. La condición +Fe (izquierda) es un gel representativo de las subunidades correspondientes a los complejos del aparato fotosintético presentes en condiciones normales de crecimiento. Se pueden identificar manchas analizadas anteriormente (**Fig. 39**). La condición -Fe (derecha) muestra un gel representativo de las subunidades correspondientes a los complejos del aparato fotosintético presentes en condiciones de bajo hierro en el medio de crecimiento. Las flechas negras indican las manchas correspondientes a proteínas inducidas por esta condición y que probablemente correspondan a la antena distal IsiA (37.5 kDa). En la parte superior de cada gel se indica el complejo del aparato fotosintético al que corresponde el patrón electroforético de la segunda dimensión (ver texto). Los recuadros rojos indican la zona del gel que se trató para su análisis por espectrometría de masas.

El análisis por espectrometría de masas de la banda de gel de la condición +Fe identifico cinco subunidades del FSI (**Tabla 13**). El centro de reacción formado por PsaA (A1) y PsaB (A2); las subunidades de tres pases transmembranales PsaF y PsaL; y la subunidad citoplasmática PsaC. De manera interesante se encontraron subunidades del ficobilisoma; ApcE, *linker* que organiza el *core* de aloficocianinas; CpcG, el *linker* que une las aloficocianinas con las ficocianinas; además el *Rod-linker*, el cual une los hexámeros de ficocianina en los brazos del ficobilisoma. Otras proteínas fueron detectadas; B1XLZ8, un tipo de estomatina de 36.8 kDa; una proteína prohibitina, involucrada en el mantenimiento del aparato fotosintético; B1XJA7, una proteína de membrana no caracterizada de 14.2 kDa; y PsbB, una de las subunidades que forman el centro de reacción del FSII (**Tabla 13**).

Tabla 13. Identificación proteómica de la banda del gel CN-PAGE correspondiente a la condición de crecimiento con medio completo de *Synechococcus PCC 7002 (+Fe)*<sup>a</sup>.

Subunidad <sup>b</sup>	Unused Score <sup>c</sup>	Coverage total (%)	Coverage (>95%)	ID UniProt <sup>d</sup>	Péptidos (>95%) <sup>e</sup>
Rod-linker	10.08	54.83	24.48	Q05237	5
B1XLZ8	8.05	34.34	14.76	B1XLZ8	5
Prohibitina	6	27.14	15.36	B1XL96	3
PsaF	6	39.05	18.93	B1XJF1	3
PsaB	4.06	5.457	3.547	P17155	2
PsaL	4	23.68	17.76	Q54753	2
PsaC	2.93	44.44	32.1	P31087	4
CpcG	2.05	47.58	4.032	Q05238	1
ApcE	2.03	7.449	1.693	O68973	1
PsaA	2	4.195	1.488	P17154	1
PsbB	2	7.692	2.564	B1XPN4	1
B1XJA7	2	8.8	8.8	B1XJA7	1

<sup>a</sup> Condición de crecimiento con medio mínimo suplementado con 14.4  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ .

<sup>b</sup> La función de las proteínas fue correlacionada por los ortólogos del cristal con PDB 1JB0 para el FSI, PDB.

<sup>c</sup> Valor que relaciona la confiabilidad de la proteína identificada basado en un score asignado para el porcentaje de cobertura de cada uno de los péptidos. Un péptido con una cobertura del 99% le corresponde un valor de unused score de 2, dado por la fórmula  $\text{Unused score} = -\log(1 - (\% \text{confidencialidad}/100))$ . El valor es la suma de todas las aportaciones de los péptidos detectados.

<sup>d</sup> ID de proteínas en la base de datos UniProt.

<sup>e</sup> Numero de péptidos detectados para cada proteína.

El análisis por espectrometría de masas de la banda de gel de la condición -Fe identifico también cinco subunidades del FSI (**Tabla 14**). Las mismas subunidades del FSI que fueron detectadas en la condición anterior, PsaA (A1), PsaB (A2), PsaF, PsaL y PsaC. Los scores y numero de péptidos detectados fueron muy parecidos. Se detectó nuevamente la proteína prohibitina (B1XL96), además de otras dos proteínas no caracterizadas B1XR65 y B1XR78. De manera interesante no se detectaron péptidos de las proteínas, ni los *linkers* que conforman el ficobilisoma. Además, se encontraron péptido con una confiabilidad mayor al 99% (unused score 2.13) correspondiente a la proteína antena inducible IsiA (**Tabla 14**, negritas).

Tabla 14. Identificación proteómica de la banda del gel CN-PAGE correspondiente a la condición de crecimiento con disminución de hierro en el medio de crecimiento de *Synechococcus PCC 7002 (-Fe)<sup>a</sup>*.

- Fe <sup>a</sup>	Unused Score <sup>b</sup>	Coverage total (%) <sup>c</sup>	Coverage (>95%) <sup>d</sup>	ID UniProt <sup>e</sup>	Péptidos (>95%) <sup>f</sup>
PsaF	6	43.2	30.18	B1XJF1	3
PsaB	5.66	10.23	5.184	P17155	3
<b>IsiA</b>	<b>2.13</b>	<b>12.57</b>	<b>2.632</b>	<b>P31157</b>	<b>1</b>
PsaC	2.02	33.33	16.05	P31087	1
B1XR65	2	5.298	0.508	B1XR65	1
PsaL	2	28.95	6.579	Q54753	1
PsaA	2	4.06	1.488	P17154	1
Prohibitin	2	15.36	6.429	B1XL96	1
B1XR78	2	15.97	2.941	B1XR78	1

<sup>a</sup> Condición de crecimiento con medio mínimo suplementado con 68 nM de Fe<sup>2+</sup>.

<sup>b, c, d y e</sup> Igual que en tabla 13.

## Caracterización del aparato fotosintético constitutivo de *Nodularia sp. CCM9*.

De la misma manera que se realizó para MIT9313 y PCC 7002, las células de *Nodularia sp. CCM9* (CCM9) se cosecharon y se mezclaron con arena de mar para romperlas con un mortero. Los tilacoides fueron separados y solubilizados con 1% DDM (w/v); la fracción solubilizada fue separada utilizando un gel CN-PAGE. Después de la electroforesis a baja corriente (5 mA), se lograron identificar bandas verdes, sin embargo, no fue posible identificar y asignar la identidad de dichas bandas al compararlas con lo obtenido para MIT9313 y PCC 7002 (no mostrado). Se procedió a utilizar distintas concentraciones de DDM (0.5, 1, 2 y 3% w/v) para solubilizar los tilacoides y de igual manera, los complejos solubilizados se cargaron en un gel CN-PAGE. En las distintas concentraciones no se observó disociación de complejos o un patrón de bandeo distinto; sin embargo, se observó enriquecimiento de las bandas (**Fig. 43**). Nuevamente, los complejos del aparato fotosintético de CCM9 en el gel CN-PAGE mostraron un patrón de bandeo y peso molecular aparente (respecto a los Marcadores hidrosolubles) sin relación con los patrones electroforéticos obtenidos para MIT9313 (**Fig. 35**) y PCC 7002 (**Fig. 41a**). De manera interesante, se observaron bandas cuyo peso molecular aparente superaba el peso correspondiente al del trímero del FSI (**Fig. 43**, \* y ^). Lo anterior sugirió la presencia de supercomplejos distintos a los encontrados para nuestras otras dos especies de cianobacterias.

Como primer paso en la identificación de las bandas se realizó el cálculo del peso molecular aparente, utilizando Marcadores solubles y Marcadores hidrofóbicos (complejos de la cadena de transporte de electrones de mitocondrias de corazón de rata). En estos experimentos se utilizó un enfoque diferente al utilizado para MIT9313 (**Fig. 36**).

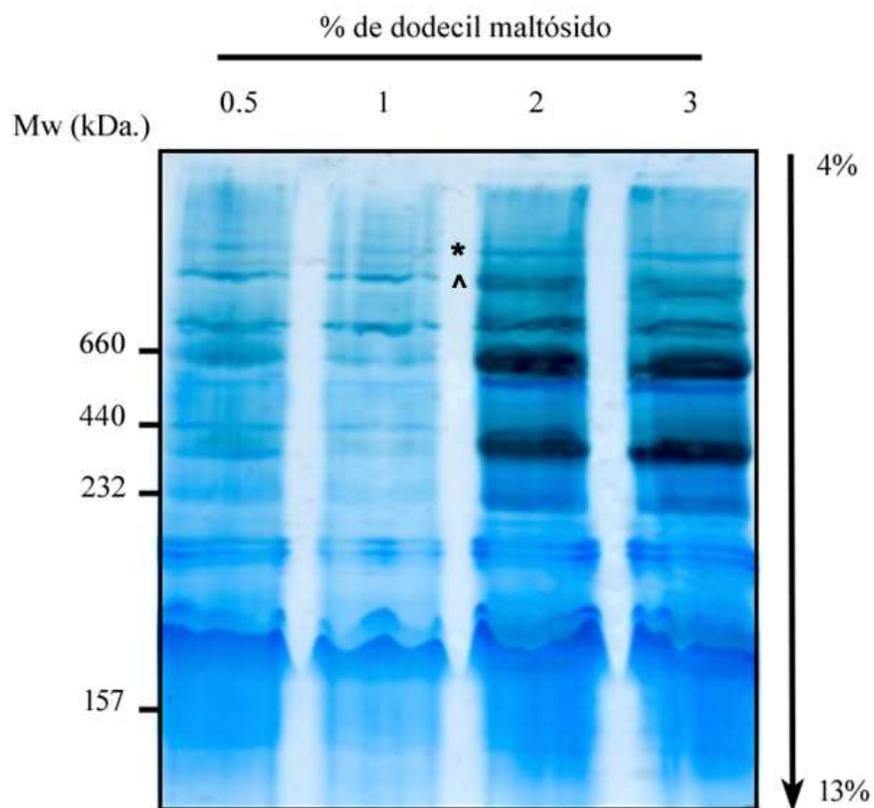


Fig. 43 CN-PAGE de membranas de *Nodularia* sp. CCM9 solubilizadas con distintas concentraciones de dodecil maltósido con tinción de azul de Coomassie. La electroforesis se realizó en un gradiente del 4 al 13% de poliacrilamida. Se utilizaron las concentraciones de DDM (w/v): 0.5, 1, 2 y 3%. \* y ^ indican las bandas de alto peso molecular. En cada carril se cargó el mismo volumen de la fracción solubilizada.

En un mismo gel CN-PAGE se cargaron Marcadores solubles (solubles) y Marcadores hidrofóbicos (MCR, **Fig. 44a**). Las bandas correspondientes a los MCR se resolvieron en una segunda dimensión desnaturalizante (**Fig. 44b**). Para determinar su identidad, el patrón electroforético obtenido se comparó con lo reportado en la literatura para los complejos de la cadena respiratoria (**Meyer et al., 2007; Wittig et al., 2010**). Fue posible reproducir el patrón electroforético que se obtuvo en los experimentos de CN-PAGE para los complejos fotosintéticos de *Prochlorococcus marinus* MIT9313 (**Fig. 23b**).

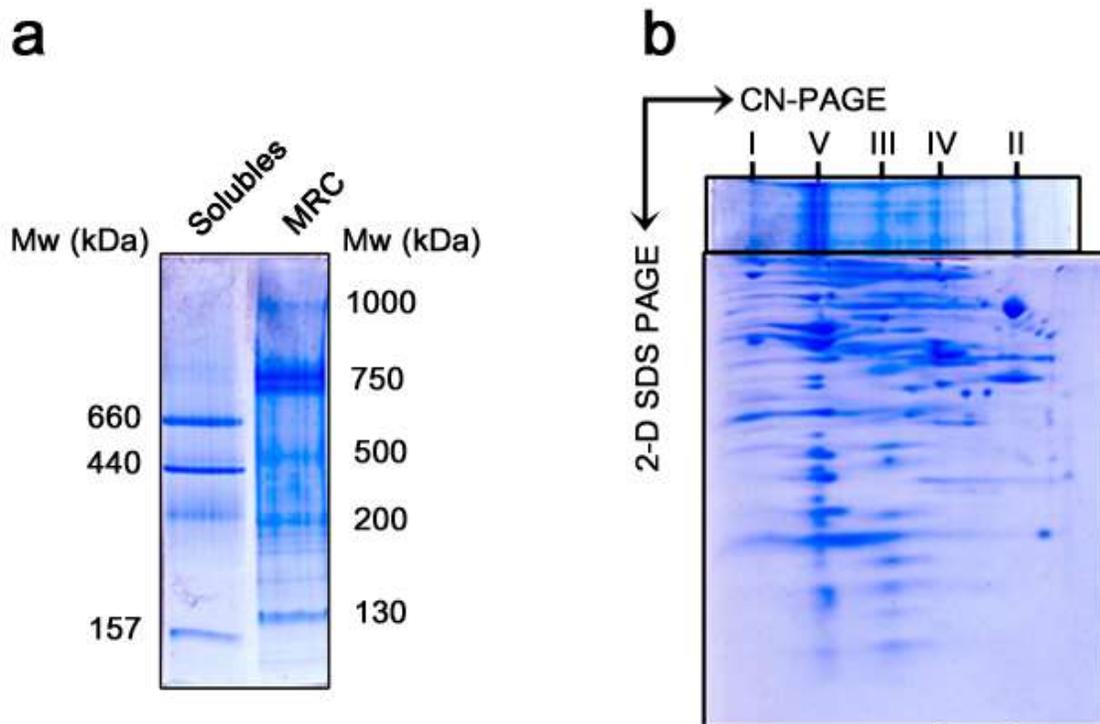
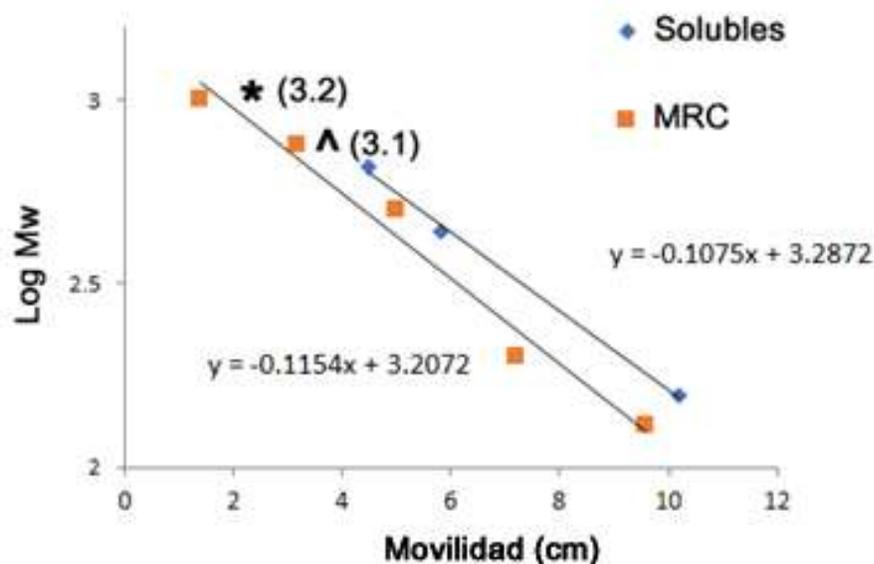


Fig. 44 Migración comparativa de Marcadores solubles y Marcadores hidrofóbicos. a. CN-PAGE de Marcadores solubles (tiroglobulina, Ferritina y catalasa) e hidrofóbicos (complejos de la cadena de transporte de electrones de la cadena respiratoria de mitocondria de corazón de rata, MCR). b. 2-D SDS PAGE de MCR. Las identidades de los complejos (números romanos) fueron determinados por comparación del patrón electroforético con lo reportado por **Witting et al., 2010** y **Reifschneider et. al. 2006**.

Los valores de movilidad electroforética y peso molecular teórico de los complejos de la cadena respiratoria (MCR) se graficaron y se generó una correlación lineal. El mismo procedimiento se utilizó para encontrar una relación lineal entre la movilidad electroforética y el su peso molecular teórico de los Marcadores solubles (**Fig. 45**). Las ecuaciones obtenidas mostraron que, aproximadamente, por cada 790 kDa de los Marcadores solubles corresponden a 1000 kDa de los complejos hidrofóbicos.

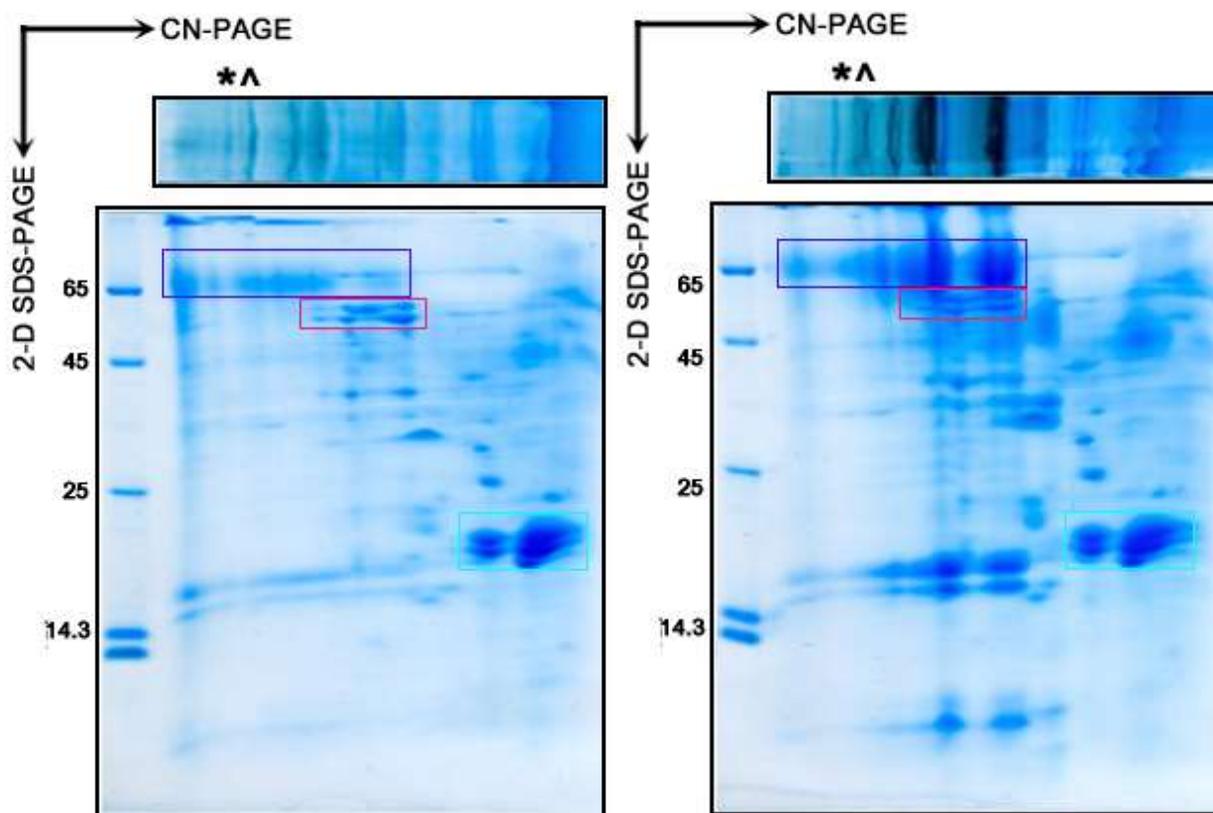
Con este resultado se calcularon los pesos moleculares aparentes de las bandas del gel CN-PAGE de los complejos proteicos de CCM9. Los valores para las bandas de alto peso molecular se obtuvieron extrapolando la ecuación mostrada en la **figura 45** para los Marcadores hidrofóbicos (MRC). Para la banda denotada como \* se obtuvo un valor de 1,584 kDa y para la banda denotada como ^, 1,258 kDa



*Fig. 45 Comparación de la movilidad electroforética de complejos de la cadena respiratoria (MRC) de mitocondria y Marcadores de peso molecular solubles (solubles) en geles CN-PAGE. Se graficó la movilidad relativa de las bandas correspondientes a los Marcadores solubles (rombos azules) y los complejos hidrofóbicos (cuadros anaranjados). Se generó una aproximación lineal de su movilidad y los valores para \* y ^ se extrapolaron de la ecuación de complejos hidrofóbicos.*

Para asignar una posible identidad de estos supercomplejos y demás bandas en el gel CN-PAGE, se realizó una segunda dimensión desnaturizante basada en SDS-PAGE (**Fig. 46**). El patrón electroforético del gel de segunda dimensión mostró que las bandas de alto peso molecular \* y ^ corresponden a asociaciones del FSI. El patrón electroforético del FSI fue resuelto para varias bandas del gel CN-PAGE (**Fig. 46**, recuadro morado).

Además, fue posible determinar el patrón electroforético de la ATP Sintasa (**Fig. 46**, recuadro rojo) y las ficobiliproteínas (**Fig. 46**, recuadro cian). Se probó, además, que las bandas en el gel CN-PAGE, donde se utilizaron distintas concentraciones de DDM para solubilizar los complejos fotosintéticos de CCM9 (**Fig. 43**), presentaran el mismo patrón electroforético variando solo en la intensidad de la tinción con azul de Coomassie (**Fig. 46**).



*Fig. 46 2-D SDS-PAGE de los complejos del aparato fotosintético *Nodularia sp. CCM9*. Se utilizaron dos geles CN-PAGE con diferentes concentraciones de DDM, la figura de la izquierda corresponde al uso de 0.5% de DDM y la figura de la derecha a 3% DDM (**Fig. 43**). Las bandas en el gel CN-PAGE se desnaturalizaron en un gel desnaturalizante al 10%. El recuadro azul muestra los característicos manchas de las subunidades del centro de reacción del FSI (~80 kDa). El recuadro rojo muestra los característicos manchas de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la ATP Sintasa (~50 kDa). El recuadro cian muestra los característicos manchas de las ficobiliproteínas.*

## Identificación proteómica de los complejos del aparato fotosintético de *Nodularia sp. CCM9*.

Se realizaron distintos experimentos para validar la reproducibilidad del patrón electroforético de complejos membranales solubilizados de CCM9 en geles CN-PAGE (n=7). Uno de los geles representativos fue cortado en 13 bandas, las cuales fueron procesadas para su análisis usando espectrometría de masas (**Fig. 47**). Para estos experimentos, con la ayuda de Emmanuel Ríos Castro y Omar Bernal N. se propuso utilizar dos enfoques de digestión para la obtención de péptidos ionizables. Por un lado, se aplicó el enfoque tradicional utilizando tripsina para la digestión de las proteínas en las bandas del gel, y cuya especificidad de corte en los aminoácidos polares lisina y arginina es alta. Por otro lado, sabiendo que la mayor parte de las proteínas del aparato fotosintético se encuentran embebidas dentro de la membrana tilacoidal (por su carácter hidrofóbico), se decidió utilizar quimotripsina (corte no tan específico en aminoácidos *voluminosos*, triptófano, tirosina, fenilalanina y metionina) como enzima de corte y comparar los resultados con el enfoque tradicional.

Los resultados confirmaron las identidades tentativas para los patrones electroforéticos correspondientes a cada complejo del aparato fotosintético en el gel CN-PAGE. Además, se obtuvieron identificaciones de proteínas involucradas en otras rutas metabólicas como, síntesis de clorofilas y carotenos, proteínas de la cadena respiratoria, porinas y transporte, elongación de acil-CoAs, etc. Las tablas que a continuación se describen fueron procesadas para quimotripsina y tripsina (se indica cada caso). Se utilizó como convención de buena identificación para las proteínas los valores correspondientes para al menos un péptido con una cobertura mayor a 99%, que equivale a un valor de *unused score* de 2, dado por la fórmula  $Unused\ score = -\log(1 - (\%confidencialidad / 100))$ . Se utilizó el software Protein Pilot de Sciex para analizar los datos. A continuación, se describen las subunidades identificadas en las tres primeras bandas correspondientes a los supercomplejos del gel CN-PAGE (**Tablas 15-20**), las identificaciones de las otras bandas se encuentran en el material suplementario (**Tablas Supp. 1-22**).

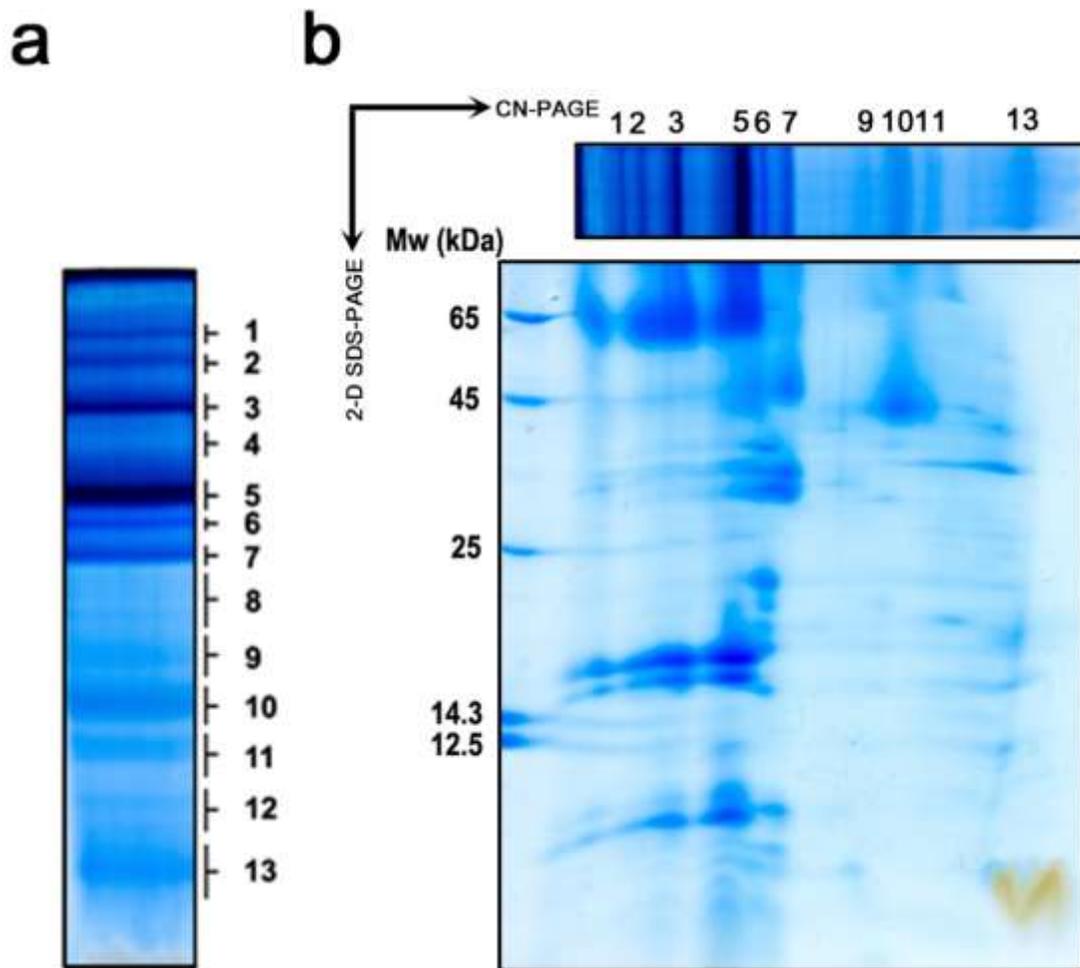


Fig. 47 Clear Native PAGE y su resolución en una segunda dimensión SDS-PAGE de complejos solubilizados de *Nodularia sp. CCM9*. a. El gel CN-PAGE fue cortado en 13 bandas para su análisis usando espectrometría de masas. b. Segunda dimensión desnaturalizante para la comprobación y reproducibilidad del patrón electroforético. La banda 1 y 2 corresponden a \* y ^ de la figura 46, respectivamente.

La identificación proteómica de la banda más pesada utilizando quimotripsina (Q) mostro siete subunidades del FSI (PsaL, PsaE, PsaD, PsaF, A2, A1 y PsaC) y tres subunidades del FSII (D2, CP47 y PsbE; **Tabla 15**). Se detectaron, además, péptidos para dos porinas putativas (A0ZKC9 y W6FXQ8), una desacetilasa (A0ZKK4), una proteína con motivos repetidos (A0ZHL1) y una proteína de ocho pases transmembranales de la familia UPF0182.

Tabla 15. Identificación proteómica de banda 1 en CN-PAGE de *Nodularia sp. CCM9* utilizando quimotripsina.

Banda 1		Quimotripsina	
UNUSED	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
2.1	0.0	W6G9X4	UPF0182 protein NSP_50390
26.3	18.4	A0ZKC9	Putative porin
4.1	10.6	W6FXQ8	Putative porin
5.2	6.8	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
4.1	5.3	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
20.0	32.4	A0ZBQ1	Photosystem I reaction center subunit XI (PsaL)
12.0	77.1	A0ZB92	Photosystem I reaction center subunit IV (PsaE)
33.7	77.0	A0ZLE1	Photosystem I reaction center subunit II (PsaD)
13.3	42.1	A0ZBQ3	Photosystem I reaction center subunit III (PsaF)
49.9	24.5	A0ZAN9	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2
26.8	17.7	A0ZAP0	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1
4.0	61.1	W6FPY2	Photosystem I iron-sulfur subunit VII (PsaC)
2.6	4.4	A0ZHL1	Pentapeptide repeat family protein
2.3	2.3	A0ZKK4	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase
2.2	11.0	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha

<sup>a</sup> Números correspondientes a la banda del gel CN-PAGE de *Nodularia sp. CCM9* (Fig. 47a).

<sup>b</sup> Valor que relaciona la confiabilidad de la proteína identificada basado en un score asignado para el porcentaje de cobertura de cada uno de los péptidos. Un péptido con una cobertura del 99% le corresponde un valor de unused score de 2, dado por la fórmula  $\text{Unused score} = -\log(1 - (\% \text{confidencialidad}/100))$ . El valor es la suma de todas las aportaciones de los péptidos detectados.

<sup>c</sup> ID de proteínas de la base de datos UniProt.

<sup>d</sup> Datos obtenidos del genoma de *Nodularia spumigena* CY9414. Gen Bank ID: CP007203.1. La función de las proteínas fue correlacionada por los ortólogos del cristal con PDB 1JB0 para el FSI, PDB 1VFS para Cit b6f, ATP Sintasa 5DN6 (Morales-Ríos, *et al.*, 2015) y 3WU2 para el FSII.

En el enfoque utilizando tripsina (T) se identificaron seis subunidades del FSI (PsaL, PsaD, PsaF, A2, A1 y PsaC) y cuatro del FSII con una cobertura menor que para el caso de Q (PsbO, D2, PsbC y PsbE), sin embargo, cinco proteínas del ficobilisoma (FBS), dos de la ATP Sintasa y una del Citocromo *b6f* (*b6f*), fueron detectadas utilizando T (Tabla 16). Se detectaron, además, péptidos para dos porinas putativas (las mismas detectadas con Q), una ligasa de Valina-tRNA (A0ZF68) y una proteasa putativa (A0ZIQ4).

Tabla 16. Identificación proteómica de banda 1 en CN-PAGE de *Nodularia sp. CCM9* utilizando tripsina.

<b>Banda 1 Tripsina</b>			
Unused	%Cov (95)	UniProt ID	Descripción
2.2	1.3	A0ZF68	Valine--tRNA ligase
3.4	6.3	A0ZIQ4	Putative stomatin/prohibitin-family membrane protease
11.8	11.1	A0ZKC9	Putative porin
7.5	12.1	W6FXQ8	Putative porin
6.0	25.8	W6FS94	Phycocyanin alpha chain
2.7	3.8	A0ZN82	Phycobilisome rod linker, phycocyanin-associated
2.0	3.2	A0ZKM3	Phycobilisome linker polypeptide
14.6	4.8	A0ZF10	Phycobilisome core-membrane linker polypeptide
12.1	40.0	W6FL66	Photosystem II manganese-stabilizing protein (PsbO)
8.1	12.2	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
16.4	31.2	A0ZBQ1	Photosystem I reaction center subunit XI (PsaL)
20.8	64.7	A0ZLE1	Photosystem I reaction center subunit II (PsaD)
10.0	28.7	A0ZBQ3	Photosystem I reaction center subunit III (PsaF)
12.8	9.3	A0ZAN9	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2
21.8	11.8	A0ZAP0	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1
5.2	40.7	W6FPY2	Photosystem I iron-sulfur center subunit VII (PsaC)
6.0	9.5	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
4.2	2.7	A0ZME6	Outer membrane protein
2.0	11.0	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha (PsbE)
3.3	3.5	A0ZEZ4	ATP synthase gamma chain
4.3	17.2	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
8.0	17.4	A0ZJ62	Apocytochrome f
4.0	9.9	A0ZF13	Allophycocyanin beta chain

a, b, c, d Como en tabla 15.

Para la banda 2 utilizando Q se detectaron ocho subunidades del FSI (PsaM, PsaL, PsaE, PsaD, PsaF, A2, A1 y PsaC), cuatro del FSII (D2, CP47, PsbC y PsbE), una de la ATP Sintasa (b'), dos del *b6f* (PetC) y solo una del FBS (linker A0ZF10, **Tabla 17**). Se detectaron nuevamente las proteínas no fotosintéticas de la banda 1, además, una fosfatasa alcalina (A0Z9Z8), una metaloproteasa (A0ZDV4) y un transportador de *multidrogas* (A0ZE67).

Tabla 17. Identificación proteómica de banda 2 en CN-PAGE de *Nodularia* sp. CCM9 utilizando quimotripsina.

<b>Banda 2</b>		<b>Quimotripsina</b>		a,b,c,d
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción	Como en tabla 15.
55.0	35.9	A0ZKC9	Putative porin	
7.9	17.4	W6FXQ8	Putative porin	
6.2	1.8	A0ZF10	Phycobilisome core-membrane linker polypeptide	
6.2	6.8	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein	
9.8	9.9	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)	
2.1	16.0	W6FLG3	Photosystem I reaction center XII (PsaM)	
22.1	31.8	A0ZBQ1	Photosystem I reaction center XI (PsaL)	
18.1	77.1	A0ZB92	Photosystem I reaction center IV (PsaE)	
40.0	79.1	A0ZLE1	Photosystem I reaction center II (PsaD)	
15.7	40.9	A0ZBQ3	Photosystem I reaction center III (PsaF)	
88.8	40.6	A0ZAN9	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2	
47.2	30.9	A0ZAP0	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1	
5.1	46.3	W6FPY2	Photosystem I iron-sulfur subunit VII (PsaC)	
5.4	5.4	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC	
2.0	4.4	A0ZHL1	Pentapeptide repeat family protein	
2.0	2.3	A0ZKK4	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	
4.1	1.8	A0ZE67	Multidrug efflux transporter MexF	
6.0	23.5	A0ZJ61	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur (PetC)	
6.0	34.1	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha (PsbE)	
2.5	2.3	A0ZDV4	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	
2.1	7.4	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain	
4.1	13.5	A0ZJ62	Apocytochrome f	
2.3	0.6	A0Z9Z8	Alkaline phosphatase	

Para la banda 2 usando T, se detectaron seis subunidades del FSI (PsaL, PsaD, PsaF, A2, A1 y PsaC), siete del FSII (PsbH, D1, PsbO, D2, CP47, CP43 y PsbE), cuatro de la ATP Sintasa (b,  $\alpha$ ,  $\gamma$  y b'), siete del FBS (ficocianina  $\alpha$  y  $\beta$ , cuatro linkers y aloficocianina  $\beta$ ) y dos del *b6f* (PetC y PetA), una de las cuales es la subunidad IV, una subunidad muy hidrofóbica (**Tabla 18**). Además, la cadena larga de la RuBisCo (A0Z9K8), proteínas de la membrana externa (A0ZG92, A0ZME6), una deshidrogenasa de lactato (A0ZAM6), una chaperona (W6FV44), una proteína con motivos PKD (A0ZFU6), una proteína con una hélice transmembranal conservada (A0ZCT1) y las dos porinas putativas anteriores (A0ZKC9 y W6FXQ8).

En esta banda de se detectan números parecidos de subunidades de los fotosistemas, pero de igual manera que en la banda uno, la cobertura es mayor para las subunidades más grandes e hidrofóbicas como A1 y A2 del core del FSI, sin embargo, al utilizar T se detectan hasta siete subunidades del FBS, un complejo hidrofílico.

Tabla 18. Identificación proteómica de la banda 2 en CN-PAGE de *Nodularia* sp. CCM9 utilizando tripsina.

<b>Banda 2 Tripsina</b>			
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
3.4	2.7	A0Z9K8	Ribulose biphosphate carboxylase large chain
2.3	5.2	A0ZCI5	Ribosomal subunit interface protein
2.1	0.0	A0ZFE9	Putative type I restriction-modification system (HsdR)
30.4	29.8	A0ZKC9	Putative porin
10.4	20.4	W6FXQ8	Putative porin
2.0	1.6	A0ZFU6	PKD repeat protein
2.0	9.8	W6G1Z1	Phycocyanin beta chain
7.7	30.1	W6FS94	Phycocyanin alpha chain
2.3	5.9	A0ZKM1	Phycobilisome rod-core linker, phycocyanin-associated
10.4	20.3	A0ZN82	Phycobilisome rod linker polypeptide, phycocyanin-associated
20.6	6.2	A0ZF10	Phycobilisome core-membrane linker polypeptide
6.1	41.2	A0ZF14	Phycobilisome 7.8 kDa linker, allophycocyanin-associated, core
2.0	20.9	A0Z9N8	Photosystem II reaction center protein H
14.0	23.1	A0ZF30	Photosystem II protein D1
10.2	30.2	W6FL66	Photosystem II manganese-stabilizing protein (PsbO)
10.0	15.3	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
13.6	14.2	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
12.9	31.2	A0ZBQ1	Photosystem I reaction center subunit XI (PsaL)
25.9	65.5	A0ZLE1	Photosystem I reaction center subunit II (PsaD)
10.0	28.7	A0ZBQ3	Photosystem I reaction center subunit III (PsaF)
19.6	12.2	A0ZAN9	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2
30.2	18.6	A0ZAP0	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1
6.0	42.6	W6FPY2	Photosystem I iron-sulfur center subunit VII (PsaC)
12.0	15.2	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
3.2	1.7	A0ZG92	Outer membrane protein/protective antigen OMA87
6.1	6.4	A0ZME6	Outer membrane protein
2.1	5.6	A0ZMQ2	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit I
3.1	5.3	A0ZEJ7	Hypothetical glycine rich membrane protein DUF1517
2.0	5.3	A0ZAM6	D-lactate dehydrogenase
3.2	6.3	A0ZKG9	Cytochrome b6-f complex subunit 4
2.1	9.5	A0ZJ61	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit (PetC)
5.0	22.0	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha (PsaE)
4.0	4.0	A0ZCT1	Conserved TM helix

2.0	2.4	W6FV44	Chaperone protein DnaK
6.5	18.9	W6FQB1	ATP synthase subunit b
2.0	2.6	A0ZEZ5	ATP synthase subunit alpha
6.6	11.1	A0ZEZ4	ATP synthase gamma chain
4.0	17.8	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
6.0	12.6	A0ZJ62	Apocytochrome f (PetA)
4.2	9.9	A0ZF13	Allophycocyanin beta chain
2.0	2.1	A0ZE63	2-octaprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase

<sup>a,b,c,d</sup> Como en tabla 15.

Para la banda 3 utilizando Q se detectaron siete subunidades del FSI (PsaL, PsaE, PsaD, PsaF, A2, A1 y PsaC); A1 y A2 con una cobertura mayor al 34%. Se detectaron además cuatro subunidades del FSII (D1, D2, CP47 y PsaE), una de la ATP Sintasa (b'), un *linker* del FBS (A0ZF10) y una del *b6f* (PetA, **Tabla 19**). Además, se identificó una subunidad del complejo I de la cadena respiratoria (W6FTC7), dos ligasas Coa-ácido graso (W6FPV4 y A0ZLL9), una proteína de adenilación de aminoácidos (A0ZF81), una proteína que une fosfato (W6FIN6), una trans-acilasa (A0ZEC2), una fosfatasa alcalina (A0Z9Z8) y las dos porinas putativas antes detectadas (A0ZKC9 y W6FXQ8).

Tabla 19. Identificación proteómica de banda 3 en CN-PAGE de *Nodularia sp. CCM9* utilizando quimotripsina.

Banda 3		Quimotripsina	
Unused	%Cov(95)	Uniprot ID	Descripción
46.1	32.5	A0ZKC9	Putative porin
14.6	29.4	W6FXQ8	Putative porin
9.7	1.8	A0ZF10	Phycobilisome core-membrane linker polypeptide
6.5	13.6	A0ZF30	Photosystem II protein D1
16.8	19.6	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
12.6	13.8	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
40.3	44.5	A0ZBQ1	Photosystem I reaction center subunit XI (PsaL)
18.1	77.1	A0ZB92	Photosystem I reaction center subunit IV (PsaE)
56.6	86.3	A0ZLE1	Photosystem I reaction center subunit II (PsaD)
23.6	57.9	A0ZBQ3	Photosystem I reaction center subunit III (PsaF)
113.8	42.0	A0ZAN9	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2
67.1	34.4	A0ZAP0	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1
2.1	24.1	W6FPY2	Photosystem I iron-sulfur center subunit VII (PsaC)
2.0	5.8	W6FIN6	Phosphate-binding protein
2.0	8.8	W6FTC7	NAD(P)H-quinone oxidoreductase chain J
5.0	0.3	A0ZEC2	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase

2.7	1.9	W6FPV4	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase
2.3	0.3	A0ZLL9	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase
3.8	39.0	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha
2.3	13.5	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
8.7	20.4	A0ZJ62	Apocytochrome f (PetA)
2.7	0.8	A0ZF81	Amino acid adenylation protein
3.2	1.0	A0Z9Z8	Alkaline phosphatase

a,b,c,d Como en tabla 15

Utilizando la técnica con tripsina, se detectaron siete subunidades del FSI (PsaL, PsaJ, PsaD, PsaF, A2, A1 y PsaC), 3 del FSII (D1, D2 y PsbE), dos de la ATP Sintasa ( $\alpha$  y  $\beta'$ ), dos *linkers* del FBS (A0ZKM3 y A0ZF10) y una del *b<sub>6f</sub>* (PetA, **Tabla 20**). Además, una aril-esterasa (W6G7X4), dos proteínas ribosomales (W6FL55 y W6FLI0), una peptidasa (A0ZE52), la reductasa e hidrogenasa de geranilgeranil (A0ZFY8 y A0ZKH0), dos proteínas no caracterizadas (A0ZA96 y W6FKW4), la cadena larga de la RuBisCo (A0Z9K8), una proteína de la biosíntesis de la ubiquinona (A0ZBV9) y las dos porinas putativas que fueron detectadas en todas las bandas anteriores (W6FXQ8 y A0ZKC9). Como en las bandas anteriores, usando tripsina se identificó un mayor número de proteínas; sin embargo, su cobertura fue menor que cuando se utilizó quimotripsina.

Tabla 20. Identificación proteómica de banda 3 en CN-PAGE de *Nodularia* sp. CCM9 utilizando tripsina.

Banda 3		Tripsina	
Unused	%Cov(95)	Uniprot ID	Descripción
2.1	4.1	A0ZA96	Uncharacterized protein
2.0	7.5	W6FKW4	Uncharacterized protein
4.2	4.2	A0Z9K8	Ribulose biphosphate carboxylase large chain
21.2	24.9	W6FXQ8	Putative porin
10.1	17.9	A0ZKC9	Putative porin
2.2	3.2	A0ZKM3	Phycobilisome linker polypeptide
14.3	7.3	A0ZF10	Phycobilisome core-membrane linker polypeptide
6.0	8.9	A0ZF30	Photosystem II protein D1
10.0	12.2	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
24.0	41.6	A0ZBQ1	Photosystem I reaction center subunit XI (PsaL)
2.0	22.0	A0ZBQ2	Photosystem I reaction center subunit IX (PsaJ)
42.7	71.2	A0ZLE1	Photosystem I reaction center subunit II (PsaD)
16.8	23.2	A0ZBQ3	Photosystem I reaction center subunit III (PsaF)
32.0	20.5	A0ZAN9	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2
24.6	15.0	A0ZAP0	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1

6.0	42.6	W6FPY2	Photosystem I iron-sulfur subunit VII (PsaC)
2.0	5.5	A0ZE52	Peptidase S49, SppA
2.0	2.5	A0ZFY8	Geranylgeranyl hydrogenase BchP Geranylgeranyl reductase
2.0	6.0	A0ZKH0	Cytochrome b6
2.0	11.0	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha (PsbE)
3.8	5.7	A0ZEZ5	ATP synthase subunit alpha
8.4	27.6	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
2.0	6.8	W6G7X4	Arylesterase
10.0	24.0	A0ZJ62	Apocytochrome f (PetA)
3.8	3.6	A0ZBV9	Ubiquinone biosynthesis monooxygenase UbiB
2.5	10.8	W6FL55	50S ribosomal protein L19
2.1	8.3	W6FLI0	30S ribosomal protein S7

<sup>a,b,c,d</sup> Como en tabla 15

Para las bandas 4 y 5 el patrón de subunidades identificadas es muy parecido, aparecen coberturas más altas para quimotripsina y el FSI es el complejo dominante (**Tablas supp. 1-4**). Para la banda 6 y 7 aparece un cambio de patrones. Las subunidades del FSII son más abundantes y aparecen otras subunidades de la ATP Sintasa, y el *b<sub>6f</sub>*. En estas bandas aparecen proteínas relacionadas con la síntesis de clorofilas y carotenos (**Tablas supp. 5-8**).

Para las bandas 8-10 las subunidades dominantes pertenecen al FSII, ATP Sintasa, y el *b<sub>6f</sub>*. Se detectaron proteínas no identificadas y proteínas de la membrana externa, como transportadores de sodio y porinas (**Tablas supp. 9-15**).

Para las bandas 11-13 se detectan más proteínas hidrosolubles como las subunidades del dominio F1 de la ATP Sintasa, proteínas del FBS y algunas subunidades del FSII. Se encontraron, además, subunidades de la NADH deshidrogenasa, proteínas de la síntesis de lípidos, y relacionadas con la síntesis de carotenos y clorofilas (**Tablas supp. 16-22**).

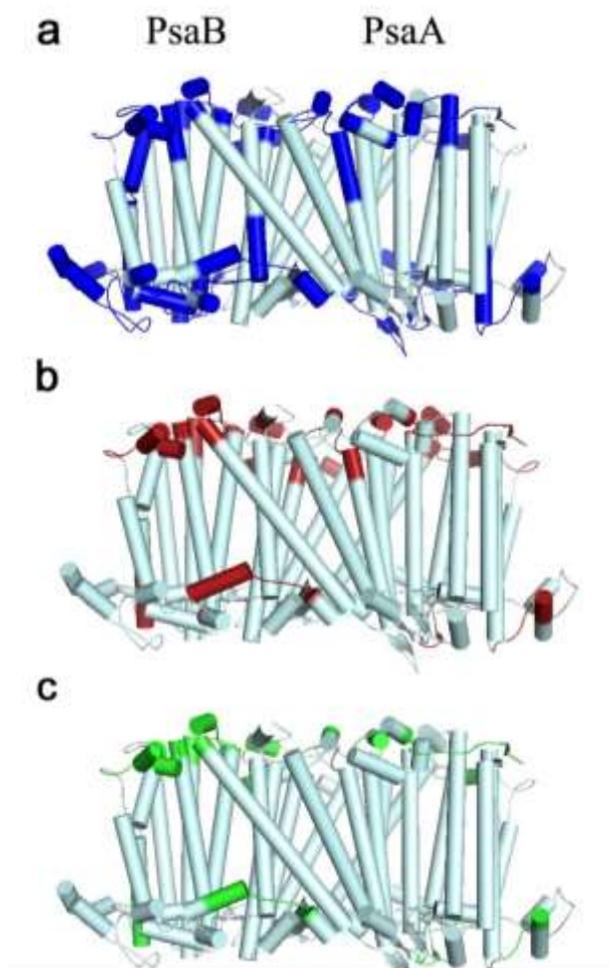
Al analizar los datos de la identificación proteómica utilizando los dos enfoques de digestión (Q y T), notamos que para el caso de la tripsina se detectaron mayormente proteínas hidrosolubles como el FBS y el dominio F1 de la ATP Sintasa, además de subunidades de los FS que se encuentran en la superficie de la membrana o asociada a

ella. En general, los valores de cobertura para las proteínas hidrofóbicas resultaron más altos utilizando quimotripsina y para las proteínas hidrofílicas, sus coberturas fueron más altas utilizando tripsina.

### **Comparación del uso de tripsina y quimotripsina en espectrometría de masas para la identificación de proteínas de membrana**

El *core* del FSI está compuesto de dos subunidades de 11 pases transmembranales cada una, PsaA y PsaB. Estas dos subunidades coordinan los cofactores del centro de reacción (clorofilas y núcleos Fe-S) y de la antena proximal (clorofilas y carotenoides). Como se ha visto, estas proteínas por su carácter hidrofóbico pueden ser detectadas con bajos *scores* utilizando el tratamiento clásico para espectrometría de masas (digestión con tripsina). Cuando se analizaron los péptidos obtenidos con los tratamientos de T y Q para estas subunidades, se notó mayor cobertura utilizando Q. Debido a que la base de datos utilizada para analizar los resultados de espectrometría de masas correspondió a CY9414 y con el fin de tener una idea más clara de los péptidos cortados en las condiciones T y Q, procedimos a amplificar y secuenciar los genes *psaA* y *psaB* de CCM9, los cuales corresponden a las subunidades que forman el *core* del FSI y cuya extensión e hidrofobicidad podrían darnos una buena perspectiva. Los *primers* fueron diseñados alineando las secuencias de los genes *psaA* y *psaB* de CY9414 (*nsp\_41520* para *psaA*; *nsp\_415230* para *psaB*) y otras cianobacterias cercanas filogenéticamente para utilizar las zonas más conservadas (ver materiales y métodos). Al comparar la secuencia de los genes *psaA* y *psaB* de CCM9 con sus ortólogos en CY9414, se encontró una identidad del 99% y 98%, respectivamente. La **figura 48** muestra una caricatura de las subunidades PsaA y PsaB del FSI del cristal de *Thermosynechococcus elongatus* (PDB 1JB0). Se representaron las 11 hélices transmembranales de las dos subunidades en color cian.

Los péptidos detectados para la banda 3 utilizando quimotripsina se encuentran sobre la superficie del complejo proteico (**Fig. 48a**), al igual que los péptidos detectados con tripsina (**Fig. 48a**). En algunos casos los péptidos fueron detectados en ambas condiciones, sin la misma cobertura y confiabilidad. Los péptidos compartidos se muestran en color verde (**Fig. 48c**). Se puede notar que los péptidos detectados con quimotripsina se encuentran en partes más hidrofóbicas, dentro de la membrana, donde los residuos de aminoácidos difícilmente son lisina o arginina, justo los residuos donde la tripsina puede actuar.



*Fig. 48 Representación gráfica de los péptidos detectados por espectrometría en la banda 3 del CN-PAGE de *Nodularia* sp. CY9414. Se utilizo el cristal de *Thermosynechococcus elongatus* (PDB 1JB0) para iluminar los péptidos detectados usando a) tripsina (rojo) y b) quimotripsina (azul), en la subunidad PsaA (verde). El color verde indica superposición de péptidos detectados con ambas enzimas (c). Los péptidos detectados para CY9414 se alinearon con la secuencia de *T. elongatus* para identificar las zonas de corte.*

## **Análisis *in silico* de las antenas fotosintéticas de *Nodularia spumigena* CY9414.**

Cuando la cianobacteria CCM9 fue aislada, el primer paso para su identificación fue amplificar los genes de los rRNA 16S y 23S, además de su zona intergénica (ITS, realizado por la M. en C. Lourdes Leyva Castillo). Cuando se obtuvieron las secuencias de dichos genes, se compararon con las bases de datos de cianobacterias (NCBI). Se encontró que *Nodularia spumigena* CY9414 era la especie filogenéticamente más cercana (identidad del 97% en rRNA y 87% en ITS) y, además, su genoma se encuentra secuenciado y anotado (Voß *et al.*, 2013).

El análisis *in silico* nos permite utilizar la información genética disponible de CY9414 para identificar las posibles proteínas que forman parte del aparato fotosintético de CCM9, debido a su cercanía filogenética. Por otra parte, Shih *et al.* en el 2013, reportaron 54 secuencias genómicas nuevas de cianobacterias sumando un total de 126. Con la información recabada se construyeron algunos árboles filogenéticos con las secuencias de las antenas CP43-like (Fig. 20). El denominado grupo CBPIV, V y VI constituye un grupo de genes *putativos* de antenas fotosintéticas (6 pases transmembranales y residuos conservados de coordinación de Chl *a*), es decir, no existe ningún reporte que demuestre que forman parte del aparato fotosintético de en alguna cianobacteria. De manera interesante el grupo CBPV posee una secuencia de nucleótidos que predicen proteínas con dos dominios atípicos (genes *psbC/psaL*). El extremo amino-terminal pertenece a un homólogo de las proteínas antenas parecidas a PsbC (antena proximal CP43 del FSII) y el carboxilo terminal predice un homólogo de la proteína PsaL, una subunidad del FSI cuya función es estabilizar la formación de estructuras trímeras y coordinar tres clorofilas, dos carotenos y un átomo de calcio (Fig. 49).

De manera interesante, Voß *et al.*, (2013), reportaron la presencia de genes de varias de las familias CBP en CY9414. Este grupo de genes están presente en la mayoría de las cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos como CCM9 (Fig. 50; Shih *et al.*, 2013).

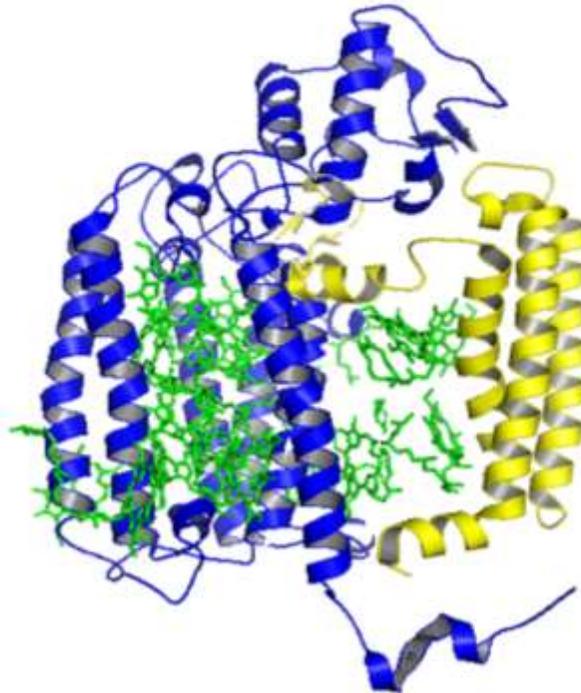


Fig. 49 Modelo tridimensional de la proteína predicha para el grupo de genes CBPV. Arriba, predicción de dominio usando UniProt. Abajo, Predicción del producto génico del gen *psbC/psaL*, usando los PDBs 1JB0 (Fromme et. al. 2001) para el homólogo a PsaL (amarillo) y 3ACR (Umena et. al. 2011) para el homólogo de PsbC (azul). En verde se muestran las clorofilas.

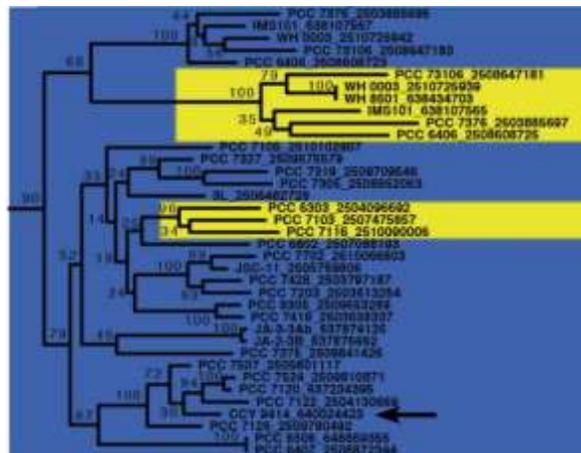
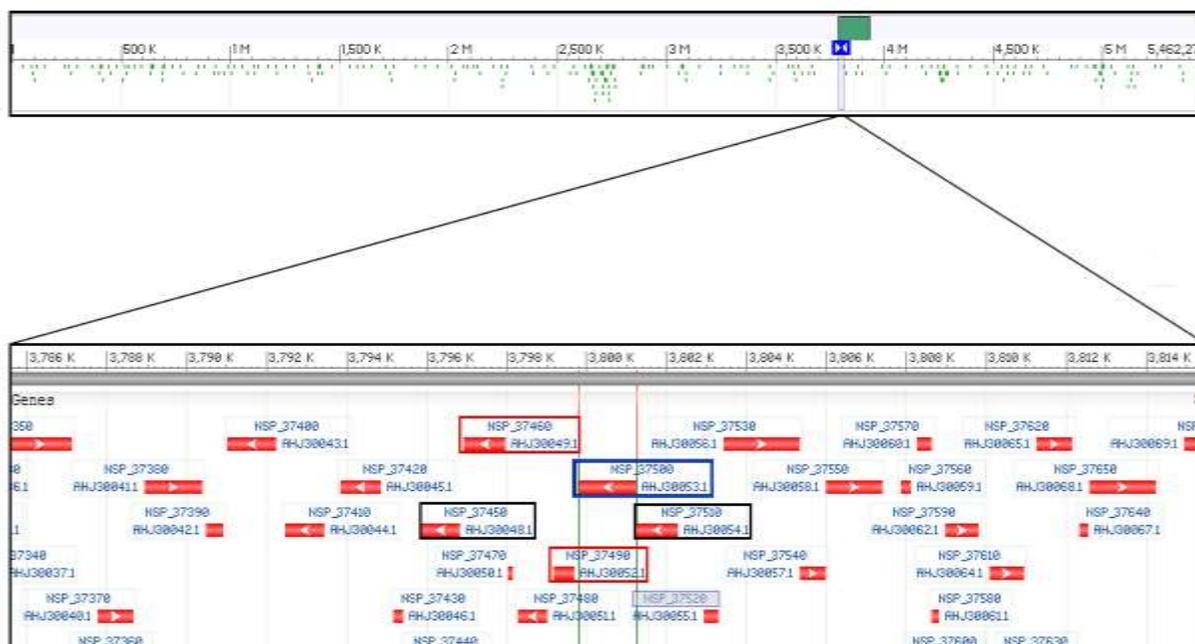


Fig. 50 Árbol filogenético formado por los genes que predicen la proteína PsbC/PsaL (grupo CBPV) en el grupo de cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos. La flecha indica la predicción hecha para *Nodularia spumigena* CY9414. El color amarillo indica las cianobacterias que no cuentan con el C-terminal homólogo a PsaL. Modificado de Shih et al., 2013.

Los genes de las familias CBP fueron localizados en el genoma de CY9414 (ID GenBank CP007203.1) en un clúster cerca de las  $3,7 \times 10^6$  pares de bases (**Fig. 51**). Se identificaron los genes inducibles por escasez de hierro *isiA* (antena distal) e *isiB* (flavodoxina) (**Fig. 50**, cuadros rojos) y, flanqueándolos los genes de las antenas putativas: *nsp37450*, *nsp37500* y *nsp37510* (**Fig. 50**, cuadros negros). Para efectos de distinguir los productos génicos usaremos la nomenclatura de **Voß et al.**, (2013). Para *nsp37450*, PscC-lk1 (35.07 kDa); *nsp37500*, PscC/psaL ó PscC-lk2 (51.6 kDa); *nsp37510*, PscC-lk3 (37.5 kDa); y para *nsp37460*, IsiA (37.66 kDa).

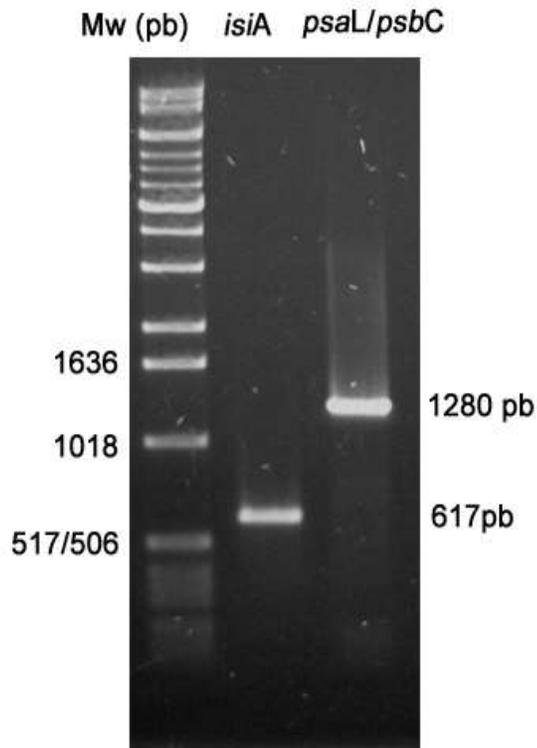


*Fig. 51* Clúster de genes *isiA*, *isiB* y proteínas homologas a CP43 (CBP). En rojo gen *isi*, en negro genes homólogos a CP43 y en azul homólogo a CP43 con C-terminal homólogo a *psaL*. Se usó el genoma con el número de identificación en el NCBI: CP007203.1, correspondiente a la cianobacteria *Nodularia spumigena* CY9414.

## Confirmación de la presencia de los genes *isiA* y *psbC/psaL* en *Nodularia sp. CCM9*.

Los genes de las proteínas *IsiA* y de las antenas putativas *PsbC/PsaL* (*PsbC-lk2*) se alinearon, y se usaron las zonas más conservadas para diseñar los *primers* (ver materiales y métodos). Para el gen *psbC/psaL* se buscó amplificar la zona donde las secuencias de los dominios *psaL* y *psbC* se unen.

Para el gen *isiA* se esperó la amplificación de 617 bases, pero al secuenciar se obtuvieron 558 bases. Al realizar un alineamiento de la secuencia obtenida (Blastn) se obtuvo un 95% de identidad con respecto a *IsiA* de CY9414. Para el gen *psbC/psaL* se esperó la amplificación de 1,228 bases y al secuenciar se obtuvieron 1,065 bases. Al realizar el alineamiento (Blastn) se obtuvo un 89% de identidad. Los productos de PCR se muestran en la **figura 52**.



*Fig. 52 Productos de PCR de los genes *isiA* y *psbC/psaL* de *Nodularia sp. CCM9*. Los productos esperados son 617 pb para *isiA* y 1280 pb para *psbC/psaL*. Las bandas fueron purificadas con QIAquick, Gel Extraction Kit de Qiagen (USA.).*

## Inducción de la expresión de genes CBP con baja concentración de hierro para *Nodularia sp. CCM9*

Una vez confirmada la presencia de al menos dos genes de la familia CBP (*isiA* y *psbC/psaL*) en el genoma de *Nodularia sp. CCM9*, procedimos a inducir su expresión. El procedimiento empleado para inducir la proteína IsiA de *Synechococcus* PCC 7002 fue aplicado de la misma manera para CCM9 (dilución de hierro final 1:210). Se realizaron cultivos con medios completos BG11 (30 mL). Se inocularon frascos de 1.8 L con células crecidas durante cuatro días. Las temporalidades de crecimiento fueron de 6 y 8 días para los cultivos consecutivos hasta alcanzar una concentración final de 101.8 nM de citrato férrico amoniacal. Se tomaron alícuotas de las células, se homogenizaron y se midieron los espectros de absorción para saber si existía una modificación detectable del aparato fotosintético (**Fig. 53**). Las modificaciones del espectro de absorción consistieron en la reducción de la absorción en la zona del color verde, debida al ficobilisoma, lo que sugirió que hubo una reducción en la expresión y el ensamble de dicha antena distal. El pico de absorción  $Q_y$  se modificó en siete nanómetros hacia el azul (679-672 nm, **Fig. 53**), dos nanómetros más que en PCC 7002 en condiciones -Fe (**Fig. 40**).

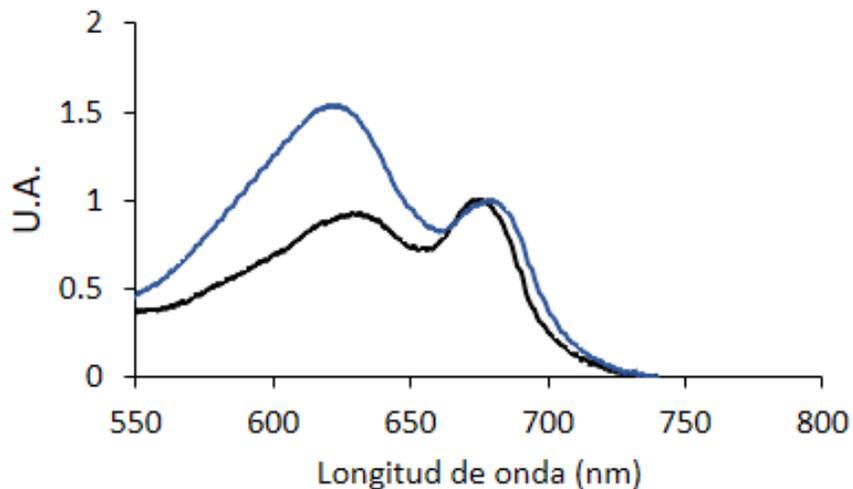


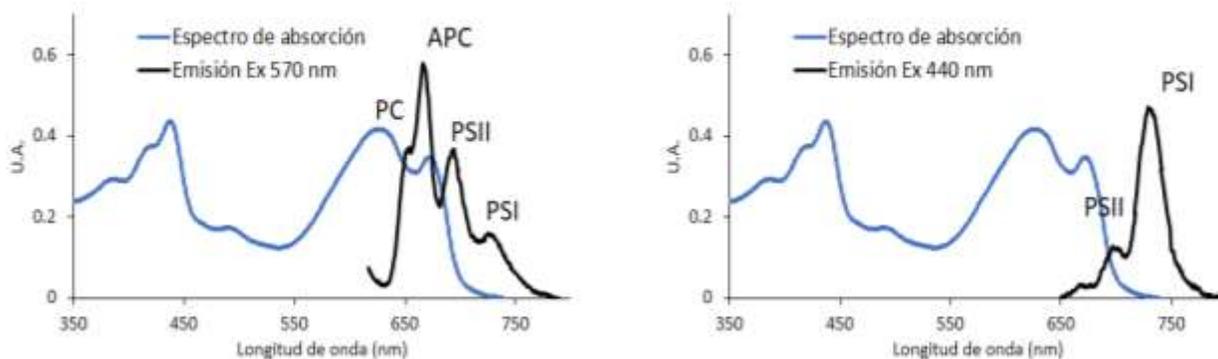
Fig. 53 Espectro de absorción de células de *Nodularia sp. CCM9* en condiciones normales de crecimiento (azul) y con escasez de hierro (1:210) en el medio de crecimiento (negro). Se encontró un pico máximo para la condición de crecimiento normal a 679 nm y para la escasez de hierro a 672 nm.

El crecimiento de las células fue lento en condiciones de bajo hierro (-Fe). Después de ocho días de crecimiento y después de que se detectó la modificación en el espectro de absorción, las células fueron cosechadas y lavadas. Los tilacoides se obtuvieron mezclando las células con arena de mar y molidas en mortero, centrifugados, rápidamente congelado con nitrógeno líquido y guardados a -70 °C hasta su utilización.

### **Análisis espectroscópico del aparato fotosintético de *Nodularia* sp. CCM9**

Las células crecidas en condiciones +Fe y -Fe fueron cosechadas, homogenizadas y resuspendidas en su respectivo medio de crecimiento con una densidad óptica de 1 y 0.5, respectivamente. Las células se mezclaron con glicerol para una concentración final del 50%. Tres mililitros de esta mezcla fueron congelados en nitrógeno líquido durante 5 min. Se utilizaron la longitud de onda de excitación 570 nm para el ficobilisoma y 440 nm para las clorofilas de los fotosistemas.

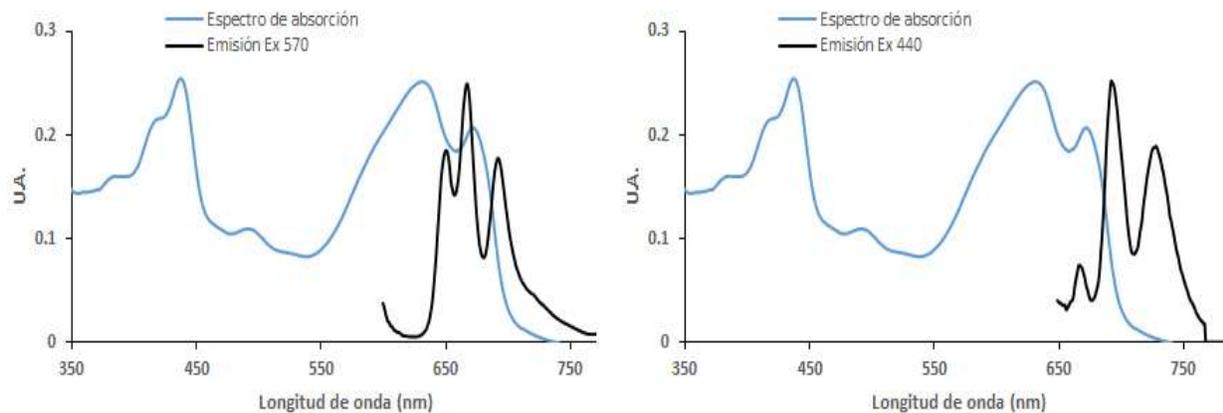
Cuando se excitó el ficobilisoma de células en condiciones de +Fe, específicamente la ficocianina a 570 nm, se obtuvieron picos de fluorescencia para cada uno de los componentes del aparato fotosintético, considerando que esta condición es la *constitutiva* (**Fig. 54**). Se obtuvo un *hombro* a los 654 nm correspondiente a la ficocianina (PC). El pico más alto de fluorescencia a los 664 nm corresponde a la aloficocianina (APC). Para los fotosistemas los picos de fluorescencia corresponden a los 694 nm para FSII (PSII) y 729 nm para FSI (PSI). Al utilizar 570 nm como energía de excitación no aseguramos que el primer componente en absorber la energía sea el ficobilisoma y no la clorofila. La fluorescencia detectada de los fotosistemas es debida a que el aparato fotosintético se encuentra aún acoplado, aunque las células se encontraban a ~ 77 K (**Fig. 54**, izquierda). Cuando se excitaron las clorofilas en los fotosistemas utilizando luz de 440 nm se detectaron dos picos correspondientes a 697 nm para el FSII y 729 nm para el FSI. De manera interesante es posible distinguir un *hombro* a 669 nm (**Fig. 54**, derecha).



*Fig. 54 Análisis espectrofotométrico de células de Nodularia sp. CCM9 en condiciones de crecimiento normal. Las curvas azules muestran el espectro de absorción y las curvas negras muestran la fluorescencia a temperatura de 77 K, excitando el ficobilisoma a 570 nm (izquierda) y los fotosistemas a 440 nm (derecha). Las abreviaturas significan: PC, ficocianina; APC, aloficocianina; PSII, fotosistema II; PSI, fotosistema I. Las unidades de fluorescencia son relativas (no mostradas).*

Se analizaron de la misma manera las células en condiciones de -Fe. Se congelaron células con glicerol al 50% durante 5 min a 77 K utilizando nitrógeno líquido y se midieron los espectros de emisión utilizando la excitación a 570 nm y 440 nm. Cuando se excitó el ficobilisoma con luz a 570 nm encontramos una intensidad de los picos diferentes a la condición +Fe. Se pudo detectar el primer pico correspondiente a la ficocianina a los 651 nm. De la misma manera que la condición +Fe el pico más intenso corresponde a la aloficocianina a los 668 nm. El siguiente pico corresponde a los 693 nm corresponde al FSII. De manera interesante no fue posible detectar ninguna señal para el FSI (**Fig. 55**, izquierda).

Cuando se utilizó una luz de excitación de 440 nm para las clorofilas en los fotosistemas encontramos una distribución e intensidad de picos diferentes también. El pico a 701 nm, correspondiente al FSII, mostró un corrimiento de 4 nm hacia el azul (698 nm en la condición +Fe) y fue relativamente más intenso que el del FSI a 729 nm. Igual que en la condición +Fe, se pudo detectar un teCRer pico, solo que este tuvo un máximo a los 668 nm y fue relativamente más intenso (**Fig. 55**, derecha).



*Fig. 55 Análisis espectrofotométrico de células de Nodularia sp. CCM9 en condiciones de bajo hierro. Las curvas azules muestran el espectro de absorción y las curvas negras muestran la fluorescencia a temperatura de 77 K, excitando el ficobilisoma a 570 nm (izquierda) y los fotosistemas a 440 nm (derecha). Las unidades de fluorescencia son relativas (no mostradas).*

## Complejos y supercomplejos en *Nodularia* sp. CCM9 en condiciones de escasez de hierro.

Una vez que se detectó la modificación del aparato fotosintético por medio de técnicas espectroscópicas (**Fig. 53-55**) se procedió a solubilizar el aparato fotosintético membranal de CCM9 y separarlo utilizando geles CN-PAGE. Se utilizaron gradientes del 4 al 13% de acrilamida y los complejos se separaron utilizando una *corrida electroforética* a baja corriente. Se colocaron complejos del aparato fotosintético en condiciones -Fe y +Fe para poder compararlos (**Fig. 56**)

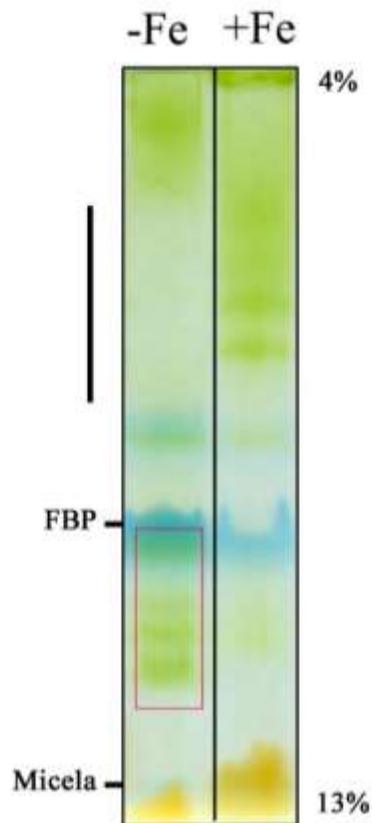
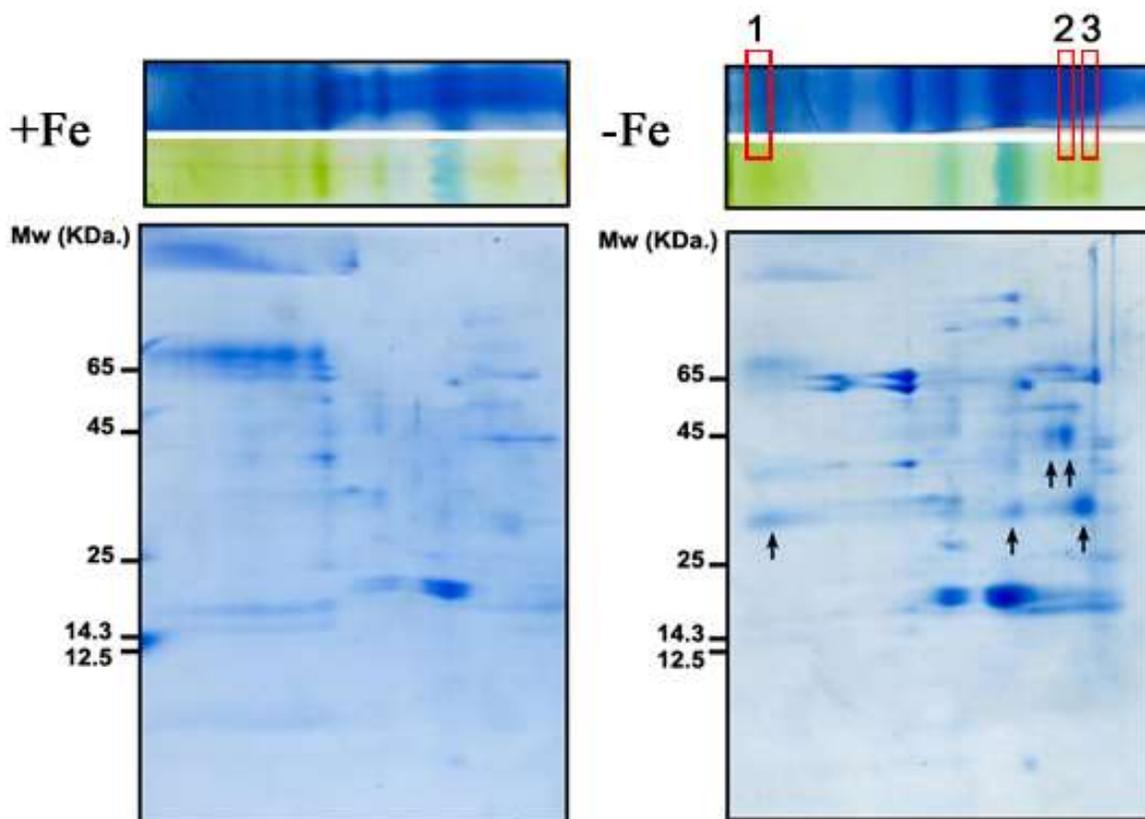


Fig. 56 Complejos del aparato fotosintético de *Nodularia* sp. CCM9 en dos condiciones de crecimiento separadas por CN-PAGE. En el carril izquierdo se muestran un gel representativo sin tinción para complejos obtenido de células crecidas en medio deficiente de hierro 1:210 (-Fe). En el carril derecho se muestran un gel representativo para complejos obtenidos de células crecidas en medio completo (+Fe). Se indica la posición de la micela de detergente-cromóforo y las ficobiliproteínas (FBP). La línea negra indica la zona donde se redujo la intensidad del color verde. El rectángulo rojo indica el lugar donde fueron detectadas nuevas bandas verdes. En ambos geles se cargó la misma concentración de clorofila.

Como anteriormente sucedió, los geles sin tinción nos permitieron identificar los complejos proteicos que unen Chl *a*. Las bandas correspondientes a los supercomplejos del FSI en la condición +Fe, fueron detectados en la zona de alto peso molecular del gel (**Fig. 56**, línea negra). Sin embargo, para la condición -Fe, no se detectó una intensidad verde significativa en esa misma zona. Por debajo de la zona donde aparecen las subestructuras de los fotosistemas (~350 kDa) se detectaron *nuevas* bandas verdes para la condición -Fe (**Fig. 56**, rectángulo rojo). Los geles del CN-PAGE fueron sometidos al proceso usual de desnaturalización de los complejos proteicos para su posterior separación en una segunda dimensión desnaturalizante en geles SDS-PAGE (**Fig. 57**).



*Fig. 57 CN-PAGE y 2-D SDS-PAGE del aparato fotosintético de membranas de Nodularia sp. CCM9 solubilizadas con 1% dodecil maltósido en dos condiciones de crecimiento. Del lado izquierdo se muestra un experimento con células crecidas en condiciones normales de crecimiento (+Fe). Del lado derecho se muestra un experimento con células crecidas en un medio bajo en hierro 1:210 (-Fe). Se colocó el gel de primera dimensión sin tinción para denotar las estructuras con clorofila. Los recuadros rojos muestran las áreas del gel que fueron cortadas para su análisis por espectrometría de masas. Las flechas negras indican las posibles proteínas que se inducen por escasez de hierro.*

La segunda dimensión desnaturante de la condición +Fe mostro un patrón electroforético (**Fig. 57**, izquierda) consistente con lo encontrado anteriormente (**Fig. 46, 47b**). Para la condición de -Fe el patrón electroforético cambió. Los supercomplejos del FSI fueron visibles solo al inicio del gel CN-PAGE (4%) y no en toda la primera mitad del gel (**Fig. 56**, línea negra; **Fig. 57**, -Fe). De manera interesante, en la primera mitad del gel, alrededor de los 65 kDa, se pueden distinguir claramente las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la ATP Sintasa en dos posiciones del gel. En la tinción con azul de Coomassie, las subunidades de alrededor de 45 y 30 kDa fueron visibles, las cuales posiblemente correspondan a las proteínas de la familia CBP (**Fig. 57**, flechas).

Dado que la movilidad electroforética de proteínas hidrofóbicas como IsiA ha mostrado ser *anómala* (**Fig. 42**, -Fe), usando como guía el peso molecular aparente y nuestro resultado para PCC 7002, se infiere que la proteína más pesada (~45 kDa) corresponde a la proteína inducible más pesada, PsbL/PsaC (51.6 kDa) y la más ligera (~25 kDa) podría tratarse de una o varias de las otras tres antenas putativas, PsbC-lk1, PsbC-lk3 e IsiA (35.07, 37.5 y 37.66 kDa, respectivamente).

Para corroborar la identidad de dichas proteínas, las bandas 1 a 3 (**Fig. 57**, rectángulos rojos) fueron cortadas de los geles teñidos con azul de Coomassie y digeridas con T y Q para su análisis usando espectrometría de masas.

Para la banda 1 en la condición Q se identificaron 19 proteínas (**Tabla 21**). Se identificaron 4 subunidades del FSII (A2, A1, PsaD, PsaF y PsaE) y 4 del FSI. Se identificaron péptidos para proteínas solubles del FBS y del dominio  $F_1$  de la ATP Sintasa. De manera interesante se detectaron péptidos para la proteína IsiA (A0ZCF9) y, además, para las otras 3 proteínas hipotéticas de la familia CBP: PsbC-lk3 (W6FVU6), PsbC/PsaL (A0ZCF6), PsbC-lk1 (A0ZCG0).

Para la banda 1 en la condición T se identificaron 27 proteínas con el valor de corte mayor a 2 (unused), sin embargo, en la **Tabla 22** se muestran 3 proteínas más, dos de ellas corresponden a las antenas hipotéticas de la familia CBP, PsbC-lk3 (W6FVU6) y PsbC/PsaL (A0ZCF6), además de una proteína unidora de hierro (A0ZH52), todas ellas esperadas en la condición de estrés a la que se sometió CCM9, pero que no entran dentro de nuestro corte de confiabilidad de detección.

Tabla 21. Identificación proteómica de la banda 1 en CN-PAGE de *Nodularia* sp. CCM9 -Fe (Fig. 57) utilizando quimotripsina.

Unused <sup>a</sup>	%Cov(95)	UniProt ID <sup>b</sup>	Función <sup>c</sup>
37.5	36.8	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
<b>34.3</b>	<b>52.0</b>	<b>A0ZCF9<sup>d</sup></b>	<b>Chlorophyll a(B) binding protein, photosystem II CP43 protein (PsbC)-like protein</b>
32.3	15.9	A0ZAN9	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2
<b>16.0</b>	<b>24.2</b>	<b>W6FVU6<sup>d</sup></b>	<b>Chlorophyll a(B) binding protein, photosystem II CP43 protein (PsbC)-like protein</b>
12.4	9.9	A0ZKC9	Putative porin
<b>11.3</b>	<b>16.1</b>	<b>A0ZCF6<sup>d</sup></b>	<b>Chlorophyll a(B) binding protein, photosystem II CP43 protein (PsbC)-like protein</b>
10.1	11.6	A0ZCG7	ATP synthase subunit beta
10.0	9.2	A0ZAP0	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1
10.0	13.0	A0ZEZ5	ATP synthase subunit Alpha
<b>8.2</b>	<b>19.4</b>	<b>A0ZCG0<sup>d</sup></b>	<b>Chlorophyll a(B) binding protein, photosystem II CP43 protein (PsbC)-like protein</b>
5.4	32.5	A0ZBS1	Microcompartments protein
4.1	9.4	A0ZLE1	Photosystem I reaction center subunit II (PsaD)
4.1	16.2	A0ZF12	Allophycocyanin alpha chain
4.0	5.4	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
4.0	14.6	A0ZBQ3	Photosystem I reaction center subunit III (PsaE)
2.8	6.8	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
2.3	1.1	A0ZF10	Phycobilisome core-membrane linker polypeptide
2.1	11.0	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha (PsbE)
2.0	6.4	W6FXQ8	Putative porin

<sup>a</sup> Valor que relaciona la confiabilidad de la proteína identificada basado en un score asignado para el porcentaje de cobertura de cada uno de los péptidos. Un péptido con una cobertura del 99% le corresponde un valor de unused score de 2, dado por la fórmula Unused score =  $-\log(1 - (\% \text{confidencialidad}/100))$ . El valor es la suma de todas las aportaciones de los péptidos detectados.

<sup>b</sup> ID de proteínas en la base de datos UniProt.

<sup>c</sup> Datos obtenidos del genoma de *Nodularia spumigena* CY9414. Gen Bank ID: CP007203.1. La función de las proteínas fue correlacionada por los ortólogos del cristal con PDB 1JB0 para el FSI, PDB 1VFS para Cyt b6f, ATP Sintasa 5DN6 y 3WU2 para el FSII.

<sup>d</sup> Proteínas de la familia CBP. Los ID de UniProt corresponden a la nomenclatura utilizada por **Vofß et al.**, (2013) de la siguiente forma: A0ZCF9, IsiA; W6FVU6, PsbC-lk3; A0ZCF6, PsbC-lk2 (PsbC/PsaL); A0ZCG0, PsbC-lk1.

Para la banda 2 con el tratamiento de Q se identificaron 8 proteínas de las cuales IsiA (A0ZCF9) es una de las proteínas esperadas en esta zona que corresponde a las subestructuras y antenas libre, es decir, no asociadas a los fotosistemas (**Tabla 23**). Para la banda 2 con el tratamiento con T se identificaron 25 proteínas, la mayoría hidrosolubles (**Tabla 24**). En esta banda se pudieron identificar la antena IsiA y la proteína unidora de fierro, A0ZH52, esta última con buenos valores de *unused*. De manera interesante se identificó un transportador del tipo ABC (A0ZA59) relacionado al transporte de fierro.

Tabla 22. Identificación proteómica de la banda 1 en CN-PAGE de *Nodularia* sp. CCM9 -Fe (Fig. 57) utilizando tripsina.

Unused <sup>a</sup>	%Cov(95)	UniProt ID <sup>b</sup>	Función <sup>c</sup>
16.08	5.194	A0ZF10	Phycobilisome core-membrane linker polypeptide
14.47	11.04	A0ZAP0	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1
10.98	58.99	A0ZLE1	Photosystem I reaction center subunit II
9.97	10.2	A0ZKC9	Putative porin
9.11	15.15	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
<b>8.24</b>	<b>11.92</b>	<b>A0ZCF9<sup>d</sup></b>	<b>Chlorophyll a(B) binding protein, photosystem II CP43 protein (PsbC)-like protein</b>
6.98	5.787	A0ZAN9	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2
6.79	11.41	A0ZCG7	ATP synthase subunit beta
6.6	26.09	A0ZF13	Allophycocyanin beta chain
5	7.674	W6FIN6	Phosphate-binding protein
4.12	6.993	A0ZN82	Phycobilisome rod linker polypeptide, phycocyanin-associated
4	17.79	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
3.93	26.47	A0ZF14	Phycobilisome 7.8 kDa linker polypeptide, allophycocyanin-associated, core
3.76	25.77	W6FS94	Phycocyanin alpha chain
3.64	10.87	A0ZEZ5	ATP synthase subunit alpha
3.28	3.125	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
3.01	15.53	A0ZF12	Allophycocyanin alpha chain
2.79	9.444	A0ZF30	Photosystem II protein D1
2.46	12.24	W6FQB1	ATP synthase subunit b
2.45	3.971	A0ZCT1	Conserved TM helix
2.4	8.302	W6FXQ8	Putative porin
2.22	5.144	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
2.15	11.76	A0ZBS0	Microcompartments protein
2	17.68	A0ZBQ3	Photosystem I reaction center protein PsaF, subunit III
2	40.74	W6FPY2	Photosystem I iron-sulfur center subunit VII (PsaC)
<b>2</b>	<b>3.448</b>	<b>A0ZCG0<sup>d</sup></b>	<b>Chlorophyll a(B) binding protein, photosystem II CP43 protein (PsbC)-like protein</b>
2	10.98	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha
<b>1.33</b>	<b>8.163</b>	<b>W6FVU6</b>	<b>Chlorophyll a(B) binding protein, photosystem II CP43 protein (PsbC)-like protein</b>
<b>0.45</b>	<b>0</b>	<b>A0ZCF6</b>	<b>Chlorophyll a(B) binding protein, photosystem II CP43 protein (PsbC)-like protein</b>
0.29	3.438	A0ZH52	Ferric iron ABC transporter, iron-binding protein

<sup>a, b, c, d</sup> Como en tabla 21.

Tabla 23. Identificación proteómica de la banda 2 en CN-PAGE de *Nodularia* sp. CCM9 -Fe (Fig. 57) utilizando quimotripsina.

Unused <sup>a</sup>	%Cov(95)	UniProt ID <sup>b</sup>	Función <sup>c</sup>
27.27	36.15	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
13.04	19.5	A0ZCG7	ATP synthase subunit beta
<b>12.15</b>	<b>24.13</b>	<b>A0ZCF9<sup>d</sup></b>	<b>Chlorophyll a(B) binding protein, photosystem II CP43 protein (PsbC)-like protein</b>
10.95	13.64	A0ZEZ5	ATP synthase subunit alpha
9.11	13.58	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
8.4	50.31	A0ZF13	Allophycocyanin beta chain
7.43	26.09	A0ZF12	Allophycocyanin alpha chain
6.52	32.46	A0ZBS1	Microcompartments protein

a, b, c, <sup>d</sup> Como en tabla 21.

Tabla 24. Identificación proteómica de la banda 2 en CN-PAGE de *Nodularia* sp. CCM9 -Fe (Fig. 57) utilizando tripsina.

Unused <sup>a</sup>	%Cov(95)	UniProt ID <sup>b</sup>	Función <sup>c</sup>
18.65	31.12	A0ZCG7	ATP synthase subunit beta
16.54	23.59	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
16.31	74.56	A0ZBS1	Microcompartments protein
16.15	52.8	A0ZF13	Allophycocyanin beta chain
12	46.58	A0ZF12	Allophycocyanin alpha chain
10.25	16.6	A0ZEZ5	ATP synthase subunit alpha
10.12	36.6	W6FL66	Photosystem II manganese-stabilizing protein (PsbO)
10.09	10.08	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
10	45.4	W6FS94	Phycocyanin alpha chain
8	70.59	A0ZBS0	Microcompartments protein
6.02	27.75	W6G1Z1	Phycocyanin beta chain
<b>6</b>	<b>9.012</b>	<b>A0ZCF9<sup>d</sup></b>	<b>Chlorophyll a(B) binding protein, photosystem II CP43 protein (PsbC)-like protein</b>
4	17.79	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
2.39	0.6162	A0ZF10	Phycobilisome core-membrane linker polypeptide
2.1	4.011	A0ZH52	Ferric iron ABC transporter, iron-binding protein
2.08	5.645	A0ZF00	ATP synthase subunit a
2.07	6.993	A0ZA49	Transcriptional regulator AbrB
2.02	3.912	A0ZFC1	Elongation factor Tu
2.01	1.996	A0ZA59	Oligopeptide ABC transporter, periplasmic substrate-binding
2	1.949	W6FTH6	Lycopene cyclase, CruP type
2	4.805	A0ZJ62	Apocytochrome f
2	13.24	A0ZF14	Phycobilisome 7.8 kDa linker, allophycocyanin-associated, core
2	27.18	A0ZB13	10 kDa chaperonin
2	3.125	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
2	17.14	A0ZBH1	Putative regulator

a, b, c, <sup>d</sup> Como en tabla 21.

Para la banda 3 usando el tratamiento con Q se identificaron 11 proteínas: la subunidad A2 del FSI, la antena proximal PsbC del FSII, 3 proteínas del ficobilisoma, una deshidrogenasa de NADH, la subunidad  $\beta$  de la ATP Sintasa y una proteína involucrada en la concentración de CO<sub>2</sub> (**Tabla 25**). Además, en esta banda se detectaron péptidos para la antena inducible IsiA (A0ZCF9) y la antena hipotética PsbC-Ik3 (W6FVU6).

Para la banda 3 con el tratamiento de T se identificaron 19 proteínas con valores de *unused* mayor o igual a 2 (**Tabla 26**). Se identificaron 5 subunidades de la ATP Sintasa y del ficobilisoma, 3 subunidades del FSII. En esta banda, de la misma manera que en la condición de Q, se identificaron péptidos para la antena inducible IsiA (A0ZCF9) y las antenas hipotéticas PsbC-Ik3(W6FVU6) y PsbC-Ik1 (A0ZCG0), aunque los péptidos de las dos últimas no presentaron valores aceptables de *unused*. Además, se identificó la proteína unidora de hierro A0ZH52 con buenos valores de *unused* y un transportador del tipo ABC con valores no aceptables de *unused*.

Tabla 25. Identificación proteómica de la banda 3 en CN-PAGE de *Nodularia* sp. CCM9 -Fe (Fig. 57) utilizando quimotripsina.

Unused <sup>a</sup>	%Cov(95 )	UniProt ID <sup>b</sup>	Función <sup>c</sup>
58.5	49.35	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
<b>30.16</b>	<b>38.08</b>	<b>A0ZCF9<sup>d</sup></b>	<b>Chlorophyll a(B) binding protein, photosystem II CP43 protein (PsbC)-like protein</b>
10.09	11.41	A0ZCG7	ATP synthase subunit beta
8.1	22.98	A0ZF12	Allophycocyanin alpha chain
8.07	29.19	A0ZF13	Allophycocyanin beta chain
6.47	7.312	A0ZEZ5	ATP synthase subunit alpha
6.05	21.05	A0ZBS1	Microcompartments protein
<b>3.92</b>	<b>7.289</b>	<b>W6FVU6<sup>d</sup></b>	<b>Chlorophyll a(B) binding protein, photosystem II CP43 protein (PsbC)-like protein</b>
3.37	3.23	A0ZAN9	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2
2	2.778	A0ZFZ6	NADH dehydrogenase
2	7.514	W6G1Z1	Phycocyanin beta chain

<sup>a, b, c, d</sup> Como en tabla 21.

Tabla 26. Identificación proteómica de la banda 3 en CN-PAGE de *Nodularia* sp. CCM9 -Fe (Fig. 57) utilizando tripsina.

Unused <sup>a</sup>	%Cov(95)	UniProt ID <sup>b</sup>	Función <sup>c</sup>
17.37	28.42	A0ZCG7	ATP synthase subunit beta
13.55	27.71	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
<b>7.17</b>	<b>11.92</b>	<b>A0ZCF9<sup>d</sup></b>	<b>Chlorophyll a(B) binding protein, photosystem II CP43 protein (PsbC)-like protein</b>
6.64	35.09	A0ZBS1	Microcompartments protein
6	9.049	A0ZCY8	Periplasmic sugar-binding protein of ABC transporter
5.74	15.76	A0ZH52	Ferric iron ABC transporter, iron-binding protein
5.28	25.77	W6FS94	Phycocyanin alpha chain
4.73	38.3	W6FL66	Photosystem II manganese-stabilizing protein (PsbO)
4.42	24.22	A0ZF13	Allophycocyanin beta chain
4.03	10.87	A0ZEZ5	ATP synthase subunit alpha
3.92	17.79	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
3.67	3.961	A0ZF10	Phycobilisome core-membrane linker polypeptide
3.13	10.81	A0ZEZ6	ATP synthase subunit delta
2.67	5.645	A0ZF00	ATP synthase subunit a
2.41	21.12	A0ZF12	Allophycocyanin alpha chain
2.02	35.29	A0ZBS0	Microcompartments protein
2.01	19.65	W6G1Z1	Phycocyanin beta chain
2	2.377	A0ZHX5	Beta-Ig-H3/fasciclin
2	3.125	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
<b>1.26</b>	<b>2.041</b>	<b>W6FVU6<sup>d</sup></b>	<b>Chlorophyll a(B) binding protein, photosystem II CP43 protein (PsbC)-like protein</b>
0.56	1.996	A0ZA59	Oligopeptide ABC transporter, periplasmic substrate-binding component
<b>0.13</b>	<b>0</b>	<b>A0ZCG0<sup>d</sup></b>	<b>Chlorophyll a(B) binding protein, photosystem II CP43 protein (PsbC)-like protein</b>

<sup>a, b, c, d</sup> Como en tabla 21.

## Discusión

### Complejos y supercomplejos del aparato fotosintético de *Prochlorococcus marinus* MIT9313.

*Prochlorococcus marinus* MIT9313 (MIT9313) es una cianobacteria difícil de crecer en el laboratorio. Presenta una alta sensibilidad a los cambios de temperatura y la intensidad de luz que se requiere para su crecimiento es baja ( $<1.2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}$ ). El medio mínimo que se utiliza para su crecimiento emula las concentraciones de nutrientes presentes en el límite de la zona eufótica del océano. En estas condiciones esperamos que el aparato fotosintético de MIT9313 se encuentre en condiciones normales de crecimiento, es decir, que las proteínas y cromóforos se encuentren expresándose de manera constitutiva. Para caracterizar bioquímicamente los complejos proteicos de MIT9313 involucrados en el primer evento de la fotosíntesis oxigénica se utilizó un método de ruptura mecánico y se utilizaron dos enfoques de separación, electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizantes (CN-PAGE) y ultracentrifugación en gradientes de sacarosa (SG).

El primer enfoque de separación de los componentes del aparato fotosintético fue la electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizantes (CN-PAGE) y una segunda dimensión desnaturizante (2D-SDS-PAGE). Se ha reportado ampliamente que las técnicas electroforéticas de geles no desnaturizantes pueden ser utilizada para separar complejos y super complejos de membrana (**Schägger & von Jagow, 1992; Dudkina et al., 2006; Meyer et al., 2007; Wittig & Schägger, 2008**). Específicamente la técnica CN-PAGE han mostrado ventajas y desventajas (**Wittig & Schägger, 2005**), sin embargo, para el estudio de proteínas de membrana fotosintéticas resulta lo suficientemente útil debido a que se logra mantener intactos complejos e incluso supercomplejos proteicos. En el presente trabajo, ha resultado bastante útil la versión de alta resolución reportada como hCRN-PAGE por **Ladig et al., 2011**.

Utilizando 1% de DDM para solubilizar los tilacoides de MIT9313, se obtuvo una eficiencia > 50% en todos los experimentos y utilizando un mínimo de 0.01% de DDM en el gel y en el buffer superior se obtuvo reproducibilidad del patrón de bandeo de los complejos proteicos en la técnica CN-PAGE. La separación y definición de las bandas verdes mejora cuando se utilizan *corridos electroforéticos* a baja corriente (5 mA por gel de 14x16 cm). El patrón electroforético de MIT9313 mostró 11 bandas verdes intensas (**Fig. 22a**). La estimación de las masas aparentes de dichas bandas requirió el uso de Marcadores de carácter hidrofóbico e hidrofílico, para tener una comparativa más fiable (comunicación personal con el Dr. Luis E. González de la Vara). Los Marcadores hidrofóbicos (complejos de la cadena respiratoria) fueron fácilmente obtenidos de tejido cardíaco de ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), solubilizando una fracción celular rica en membranas mitocondriales (**Fig. 23 y 44**). Las masas moleculares calculadas para los supercomplejos, complejos y subestructuras de MIT9313 estuvieron en el rango de entre 1045 y 117 kDa. La literatura muestra que en cianobacterias los supercomplejos y complejos más comunes son el trímero del FSI, con una masa molecular teórica 1,090 kDa, y el dímero del FSII con una masa teórica de 800 kDa; además de los complejos monoméricos de ambos fotosistemas (**Fromme et al., 2001, Fromme & Grotjohann, 2008**). De manera particular, **Bibby et al.**, (2003) utilizando microscopia electrónica y análisis de imágenes, mostraron que es posible detectar un supercomplejo formado por el dímero del FSII flanqueado por 8 antenas PcbB en partículas solubilizadas del aparato fotosintético de MIT9313. Si asumimos que la antena PcbB contiene 16 Chl y 4 carotenoides, este supercomplejo tendría una masa molecular de ~1, 270 kDa La banda 1, del gel CN-PAGE (**Fig. 22**), con una masa molecular aparente de 1045 kDa, presenta un patrón electroforético correspondiente a la presencia del FSII, lo cual se confirmó por espectrometría de masas al presentar una dominancia de identificaciones correspondientes a dicho fotosistema (**Tablas 8-9**). Tomando en cuenta que la masa molecular aparente de la banda 1 (1045 kDa), y además que, su segunda dimensión presenta el patrón electroforético del FSII y la antena PcbB se puede concluir que esta formada está formada por un dímero del FSII y de 4 a 5 antenas PcbB (55 kDa, tomando 16 Chl y 4 carotenoides).

Para las bandas 2 y 3 (919-829), se puede observar la superposición del patrón electroforético del FSI y FSII. El supercomplejo cuya masa es la más cercana a estas bandas correspondería al homotrímero del FSI y al dímero del FSII con 1 a 2 antenas PcbB. Encontrar la existencia de este tipo de asociaciones sugiere que se están perdiendo asociaciones de fotosistema-antena y entre fotosistema-subunidades en algún punto de nuestras técnicas. Sin embargo, pone de manifiesto que los fotosistemas están conformando supercomplejos en MIT9313 (**Bibby et al., 2003**).

Es posible identificar al patrón electroforético del FSII nuevamente en las bandas 4 (394 kDa) y 5 (351 kDa), con valores de peso molecular aparente correspondientes a complejos monoméricos (~400 kDa).

Las siguientes bandas verdes muestran un patrón electroforético cuya segunda dimensión muestra una banda continua a los 35 kDa, correspondiente a PcbB. En este caso se trataría de asociaciones de antena libre. En ninguno de nuestros experimentos fue posible identificar el patrón electroforético de la ATP Sintasa de manera significativa. Aunque en la tinción con azul de Coomassie, se pudo notar una banda que no es verde (**Fig. 35b**), no presentó un patrón contundente en la segunda dimensión que nos permitiera asignar a la ATP sintasa.

Las 11 bandas del CN-PAGE fueron procesadas para su análisis por espectrometría de masas. Pudimos confirmar, con valores de *score* altos, que las primeras tres bandas corresponden a supercomplejos del FSII con su antena PcbB y del FSI. Además, las bandas 4 y 5 contienen monómeros del FSI y II. A partir de la banda seis se detectaron proteínas del *cyt b<sub>6</sub>f* y la ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa (FNR), apoyando nuestra hipótesis de que la FNR es una proteína asociada a la membrana tilacoidal en MIT9313.

De manera interesante fueron identificadas todas las proteínas de la ATP sintasa (excepto las subunidades c) en las bandas de la 8 a la 10. Lo anterior muestra que solubilizamos el complejo ATP sintasa, sin que fuese posible mantenerla asociada y resolverla como complejo (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>). Posiblemente, la estructura se pierde en el proceso de la solubilización y/o la electroforesis. Pero sin duda es menos *robusta* que las ATP sintasas de *Arthrospira máxima*, *Synechocystis sp.* PCC6803, *Synechococcus* PCC 7002

y *Nodularia sp.* CCM9, las cuales se han podido detectar en experimentos electroforéticos realizados durante el desarrollo de la presente tesis (dato no mostrado, excepto para CCM9 y PCC 7002, ver más adelante). Es importante mencionar que péptidos de la antena PcbB fueron detectados con altas intensidades a lo largo de las 11 bandas, lo que explicaría el cociente  $b_2/a_2$  que se calculó para las fracciones enriquecidas del SG (ver más adelante).

### **Caracterización espectroscópica del aparato fotosintético de *Prochlorococcus marinus* MIT9313.**

Utilizando gradientes de sacarosa (SG), se pudieron separar bandas verdes de diferentes pesos moleculares (**Fig. 24**). Las intensidades de dichas bandas variaron en intensidad, lo que sugiere que la proporción de complejos fotosintéticos es heterogénea. Los complejos fotosintéticos, en particular los fotosistemas y antenas pudieron ser caracterizados espectrofotométricamente debido a que esta técnica de separación los mantiene en solución. Los gradientes se colectaron y se midieron los espectros de absorción de cada fracción. Se detectaron diferencias en los picos de absorción a lo largo del gradiente, lo cual demuestra que cada fracción corresponde a un complejo proteico cuya proporción de cromóforos es distinta (**Fig. 25**). Las fracciones más densas (F2-F6) presentaron una relación Soret/ $Q_y$  más parecida a la correspondiente a la Chl  $a_2$ , por lo que en estos complejos proteicos se puede suponer que la Chl  $a_2$  es el pigmento dominante. Por el contrario, en las fracciones ligeras los espectros de absorción mostraron relaciones Soret/ $Q_y$  más altas, sugiriendo una preponderancia de Chl  $b_2$ . Los complejos proteicos más pesados teóricamente corresponden a los fotosistemas, por otra parte, la proteína antena PcbB es la estructura con cromóforos más ligera. Esta distribución es la esperada en los SG.

Por otro lado, la teoría de resonancia de Förster, muestra que es necesario que el espectro de fluorescencia del donador se *sobreponga* con el espectro de absorción del aceptor. En el caso de las divinil clorofilas (DV Chl) la transferencia de energía solo se podría realizar de Chl  $b_2$  a Chl  $a_2$ , es decir, la antena fotosintética PcbB tendría que

contener una mayor cantidad de Chl  $b_2$  y los fotosistemas una mayor cantidad de Chl  $a_2$ . Lo anterior explica las diferencias en los espectros de absorción correspondientes a las distintas bandas (fracciones) en el gradiente de sacarosa cuando se graficaron utilizando longitudes de onda correspondientes a la Chl  $a_2$  (681 nm) y Chl  $b_2$  (651 nm), lo cual da una primera aproximación a la distribución de dichas DVChl a lo largo de gradiente (**Fig. 26**).

Por otro lado, y como se concluyó en el trabajo de maestría (Barrera Rojas, 2013), nuestros experimentos siguen mostrando que la enzima FNR se encuentra asociada a la membrana tilacoidal. Al seguir la actividad de esta enzima (diaforasa) en cada fracción del SG se puede notar que tiene un máximo en las fracciones 14-16 (**Fig. 26**). Dado que estas fracciones presentan densidades correspondientes a moléculas de ~200 kDa, se sugiere que la FNR se encuentra formando asociaciones con otros componentes del aparato fotosintético en la membrana de los tilacoides muy probablemente con el complejo de citocromos  $b_6f$ , debido a que es muy recurrente encontrar por espectrometría de masas, péptidos de ambos en las mismas bandas de geles y fracciones de SG. Además, estos primeros experimentos nos mostraron un indicio de la distribución de pigmentos en los diferentes complejos del aparato fotosintético, siendo las bandas más pesadas correspondientes a los fotosistemas las que tienen una relación  $b_2/a_2$  cercana a 1, mientras que en las bandas ligeras correspondientes a la antena PcbB ésta es mayor a 1.

Respecto a la fluorescencia del aparato fotosintético de MIT9313, se realizaron algunos experimentos con dos equipos diferentes. Se utilizó un fluorómetro convencional congelando la muestra por 5 min con nitrógeno líquido y se midieron los espectros inmediatamente. Por otra parte, se utilizó un fluorómetro con sistema de congelamiento que preserva la muestra a 77 K durante toda la medición (Fluoromax). En ambos casos las muestras de tilacoides solubilizados con DDM mostraron un espectro de emisión muy parecido (**Fig. S1**). Al excitar los complejos a 440 y 460 nm no se notó ningún cambio significativo, en ambos casos se obtuvo un pico de fluorescencia de emisión que inicia en 660 nm tiene un máximo en 680 nm y termina en 700 nm, y el cual se puede atribuir al FSII.

Utilizando una muestra de tilacoides no solubilizados de MIT9313 excitados a 440 nm se comparó su fluorescencia de emisión con la de tilacoides no solubilizados de *Synechocystis sp.* PCC 6803 (6803) excitando a 435 nm (**Fig. S2**). Para 6803 se resolvieron los dos picos característicos del FSII a 683 y 693 nm, además del pico a 720 nm del FSI. De manera interesante, para MIT9313 se resolvieron dos picos, uno relativamente pequeño a 633 nm y uno más intenso a 683 nm (**Fig. S2a**).

Utilizado el equipo que mantenía la temperatura a 77 K durante la medición del espectro de emisión (Fluoromax), los complejos solubilizados se separaron en un gradiente de sacarosa (no mostrado). La fracción pesada F3, donde usualmente encontramos el trímero del FSI, se comparó con una muestra del supercomplejo FSI-IsiA purificado, proveniente de células de 6803 crecidas en condiciones de bajo Hierro (muestra proporcionada por Hui-Yuan Chen, Washington University in St. Louis MO, USA). Cuando se excitó la muestra del supercomplejo FSI-IsiA a 435 nm se resolvieron dos picos: el primero a 682 nm y el segundo a 720 nm. Cuando F3 fue excitada a 440 nm se resolvieron dos picos intensos a 653 y 681 nm, además, un pico relativamente pequeño a 720 nm (**Fig. S2b**). A partir de lo obtenido usando como referencia las células de 6803 y el supercomplejo FSI-IsiA (ambos con Chl *a*, únicamente) podemos deducir que la antena PcbB tiene un máximo de emisión a 653 nm, el FSII a 681 nm y el FSI a 720 nm en MIT9313. Es necesario mencionar que estos datos se obtuvieron en la Universidad de Washington en St. Louis MO, USA y fueron realizados con membranas de un solo cultivo, las cuales fueron liofilizadas para poder transportarlas. Con ellas se realizaron 5 experimentos de SG.

### **Zonas en el gradiente de sacarosa enriquecidas con los componentes del aparato fotosintético.**

Para conocer la identidad de las bandas verdes en el gradiente de sacarosa, las proteínas en cada fracción fueron precipitadas, solubilizadas y cargadas en un gel SDS-PAGE (**Fig. 27**). Al analizar el patrón electroforético de dicho gel se detectó al FSI en las primeras fracciones (F2-F8), mostrando mayor abundancia en las fracciones 2 y 6 (**Fig. 27b**). Las subunidades pesadas del FSII (CP47 y CP43), además de D1 y D2 se muestran visibles a partir de las fracciones 9-12, mostrando mayor abundancia en las fracciones

10 y 11 (**Fig. 27b**). Respecto a la antena PcbB se puede identificar una banda intensa por debajo de los 35 kDa en las fracciones 12-16, la cual le puede ser atribuida. Para confirmar dichas suposiciones, las bandas indicadas con asteriscos en la **figura 27b** fueron cortadas y procesadas para su análisis por MS. Los resultados obtenidos por MS para las fracciones 2-6 muestran una mayor identificación de subunidades correspondientes al FSI (**Tabla 10**). Para el FSII las mejores identificaciones corresponden a las fracciones 9 y 10 (**Tabla 11**). De manera interesante en la fracción 14 se identificaron el mayor número de subunidades de la ATP Sintasa, lo cual reafirma que dicho complejo es sensible a la solubilización con DDM y no es posible obtenerla como complejo en las técnicas CN-PAGE ni SG. De la misma manera que en el CN-PAGE, la FNR, fue detectada en la misma fracción (F14) que el citocromo *b<sub>6f</sub>* (**Tabla 12**). Lo anterior nos sugiere que, existen zonas del gradiente enriquecidas en cada uno de los fotosistemas. Para el FSI las fracciones más densas (F2-F6) y para el FSII las fracciones intermedias (F9-F10). Las fracciones ligeras contienen mayor abundancia de la antena PcbB, teniendo un máximo en las fracciones 13 y 14.

### **Cromóforos del aparato fotosintético de *Prochlorococcus marinus* MIT9313.**

El siguiente paso de nuestro diseño experimental requirió determinar cuantitativamente la distribución de las DVChl en cada una de las zonas enriquecidas con los complejos fotosintéticos separados con el SG. Para ello, se comenzó por caracterizar cada una de las DVChl's. Los distintos cromóforos presentes en los tilacoides de MIT9313 (células crecidas a  $1.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) fueron extraídos y separados utilizando HPLC. Sabiendo que las clorofilas son sensibles a los pH ácidos (feofitinización) se alcalinizó el solvente de extracción (metanol 90%) y todas las muestras de los extractos se protegieron de la luz.

Los resultados obtenidos del HPLC mostraron 3 picos correspondientes a moléculas de clorofila y 5 picos correspondientes a carotenoides. Nuestros resultados mostraron congruencia con lo reportado por **Goericke y Repeta (1992)**.

La primera clorofila (la más polar) mostró el espectro de absorción característico de un tipo de clorofila c. La detección de este tipo de clorofila podría sugerir la presencia

de un metabolito de la síntesis de las Chl  $a_2$  y no propiamente un cromóforo que participe en la fotosíntesis, sin embargo, **Moore et al.**, (1995) comprobaron que las concentraciones de esta clorofila tipo *c*, en *Prochlorococcus* varían con respecto a la intensidad de la luz, es decir que participa en la fotosíntesis y su concentración en el aparato fotosintético aumenta cuando dichos cultivos se crecen en intensidades bajas de luz.

El hidroxicaroteno zeaxantina (más polar) y el  $\alpha$ -caroteno (menos polar) son los carotenoides más abundantes en nuestras condiciones de crecimiento y eluyeron al principio (minuto 8.91) y al final del gradiente de solventes (minuto 22); lo anterior corresponde a su grado de hidrofobicidad. Estos carotenos fueron aislados y concentrados para su posterior análisis por espectrometría de masas (MS). Se confirmó su identidad al detectar iones de masas ( $m/z$ ) 568.5 y 536.4 los cuales corresponderían a los iones  $[M]^+$ , de la zeaxantina y el  $\alpha$ -caroteno, respectivamente (**Fig. 32**).

En pequeña cantidad se detectaron otros tres carotenos, para dos de ellos no existe reporte alguno en la literatura; los tres carotenoides fueron concentrados y analizados por MS (**Fig. S3**). El denominado caroteno 3 (Car 3, tiempo de elución 17.83 min, **Fig. 29c**), mostró una masa de 583.5 ( $m/z$ ), lo cual contradice lo reportado por **Stickforth et al.**, (2003), el cual utiliza estándares de carotenoides para inferir su identidad por su tiempo de elución en HPLC (**Fig. S3c**). El caroteno antes mencionado es referido como  $\epsilon$ -caroteno el cual tiene una masa de 536, dato que no es soportado por nuestra identificación de MS. Buscando en la literatura (**Takaichi & Mochimaru, 2007**) la masa podría corresponder al hidroxicaroteno caloxantina (584.871). Por otra parte, es mencionado que en los géneros de *Synechococcus* y *Prochlorococcus* no existen cetocarotenos, pero sí Nostoxantina y el gen que la produce (CrtG-like). De manera interesante el caroteno denominado Car 1 (**Fig. S3a**), mostró una masa de 599.4 ( $m/z$ ), muy cercana a la esperada para la nostoxantina (600.87). Respecto al caroteno denominado como Car 2 (**Fig. S3b**), su masa fue de 567.4, muy cercano a la zeaxantina, pero, su espectro de fragmentación resultó ser diferente (**Fig. S3**).

Las DV Chl identificadas por su espectro de absorción (**Fig. 30**) fueron analizadas por MS para corroborar su identidad y la pureza de la muestra. Los patrones de

fragmentación mostraron el característico ion correspondiente a la molécula tetrapirrólica sin el fitol  $[M-278]^+$ , el cual es característico en la fragmentación de muchas clorofilas (**Fig. 31**). Para la muestra conteniendo Chl  $a_2$  (890.5197) se detectó la masa 890.4 (m/z), la cual correspondería al ion  $[M]^+$  (**Fig. 31a**) y para la Chl  $b_2$  (904.4989) se detectó la masa 905.4 (m/z), la cual correspondería al ion  $[M+1]^+$  (**Fig. 31b; Juin et al., 2015**).

Por otra parte, en la muestra que contenía la Chl  $a_2$  se pudo detectar otra masa de 948.4; al realizar la fragmentación de dicho ion, se pudo identificar un espectro de fragmentación idéntico al de la Chl  $a_2$  (dato no mostrado), lo cual sugirió la formación de un aducto debido a la técnica de ionización en el equipo de espectrometría de masas, muy probablemente proveniente del acetato de amonio utilizado como *ion pairing* en la técnica de HPLC (**Kruve & Kaupmees, 2017**).

### **Distribución de cromóforos en fracciones enriquecidas de los complejos y antena del aparato fotosintético de *Prochlorococcus marinus* MIT9313**

Teniendo las DV Chl separadas por HPLC e identificadas por MS, se procedió a concentrarlas y evaporar el solvente de elución. Las divinil clorofilas se resuspendieron en acetona al 80% y los espectros de absorción se midieron de 340 a 740 nm. Se utilizaron los valores reportados por **Shedbalkar & Rebeiz** (1992) para calcular la concentración de Chl  $a_2$  y Chl  $b_2$  debida a su absorción a 664 nm y se utilizó esta medición para calcular los coeficientes de extinción molar ( $\epsilon$ ) a lo largo del espectro (**Fig. 28**). Al comparar el cociente Soret/ $Q_y$  de los  $\epsilon$ , con lo reportado, se notó que para la Chl  $b_2$  el valor no era el mismo. La revisión bibliografía mostro que **Goericke & Repeta** (1993), habían notado esta discrepancia y explican que es debida a contaminación por lípidos en el procesamiento de la muestra de **Shedbalkar & Rebeiz** (1992).

Los valores del coeficiente de extinción molar fueron utilizados para calcular la distribución de las DV Chl a lo largo del SG (**Fig. 33**). Los cromóforos en las fracciones fueron extraídos utilizando acetona al 80% y los espectros de absorción fueron leídos de 340 a 740 nm. Las concentraciones de Chl  $a_2$  y Chl  $b_2$  fueron calculadas a 681 y 651 nm, respectivamente. Se calculó el cociente de las concentraciones de Chl  $b_2$  y Chl  $a_2$  ( $b_2/a_2$ ),

el cual resulto ser mayor a 1 en todas las fracciones. Es decir, que todas las fracciones presentan mayor concentración de Chl  $b_2$  que Chl  $a_2$  (**Fig. 34**). Para valorar el enriquecimiento de los fotosistemas en las fracciones del gradiente de sacarosa, los complejos proteicos en las fracciones 4, 5, 8 y 10 se dializaron y se cargaron en un gel CN-PAGE (**Fig. 37a**). Se puede observar que para las fracciones pesadas se resuelven bandas muy nítidas que corresponde al trímero y al monómero del FSI, y aunque se puede distinguir una banda correspondiente al FSII esta representa relativamente menos abundancia de dicho fotosistema. Utilizando el enfoque del SG, la fracción pesada (**Fig. 35, P1**), se dializó y se cargó en un segundo gradiente (**Fig. 35, 2nd**). En esta ocasión el tratamiento de diálisis y ultracentrifugación disoció los posibles supercomplejos presentes en el P1, donde esperamos encontrar trímeros del FSI y supercomplejos del FSII y su antena PcbB. El patrón de bandas verdes obtenidas en el segundo gradiente, confirmo la presencia de más de un tipo de complejo presente en el P1 (**Fig. 35, 2nd**). Al realizar la caracterización del gradiente encontramos las bandas verdes por encima de la fracción 3 (F3) contribuyen, relativamente poco, a la absorción de dicha fracción. F3 modificó su relación  $b_2/a_2$  siendo menor que 1 (**Fig. 36**).

Basándonos en las estructuras de alta resolución de plantas del FSI y su antena (**Qin et al., 2015**), y del FSII (**Wei et al., 2016**), podemos observar que la Chl  $b$  se encuentra exclusivamente en las antenas distales (LCH), y que los fotosistemas coordinan exclusivamente Chl  $a$ . Considerando que la transferencia de energía se debe realizar de Chl  $b_2$  hacia Chl  $a_2$ , esperaríamos tener una mayor concentración de Chl  $b_2$  en las antenas PcbB, tal y como lo indica la relación  $b_2/a_2 = 2.52 \pm 0.17$  para las fracciones enriquecidas (13-17). Para el FSII, esperamos tener un contenido mayoritario de Chl  $a_2$  en las fracciones enriquecidas (7-12), sin embargo, la relación  $b_2/a_2$  es de  $1.55 \pm 0.14$ .

Probablemente, la antena PcbB se encuentra en esta fracción y contribuye a modificar la relación  $b_2/a_2$ . Para el caso de las fracciones enriquecidas del FSI, no es tan claro por qué la relación  $b_2/a_2$  es tan alta, siendo que, en plantas el FSI no posee Chl  $b$  en su antena proximal. Una hipótesis podría ser que existe contaminación de la antena PcbB, como explica el segundo gradiente, sin embargo, la relación  $b_2/a_2$ , no se ve modificada drásticamente al retirar ese componente (**Fig. 36**).

Otra hipótesis sería que el FSI de MIT9313 coordina Chl  $b_2$  en su antena proximal o que usa, también, a PcbB como antena distal. Lo anterior tiene apoyo en los experimentos de fluorescencia realizados a 77 K para la fracción pesada (F3) del gradiente de sacarosa (**Fig. S4**). Cuando se usó luz a 440 nm para excitar de manera particular a la Chl  $a_2$  se observó la fluorescencia del FSII cerca de los 680 nm y un pequeño pico en 720. Cuando se usó luz a 480 nm para excitar de manera particular a la Chl  $b_2$  se observó fluorescencia de la antena PcbB a 653 nm y del FSII a 683 nm, mostrando la presencia y la transferencia de energía en el supercomplejo FSII-PcbB en esta fracción. De manera interesante, un pico a 720 nm característico del FSI fue detectado, lo cual implica transferencia de la Chl  $b_2$  (según nuestra hipótesis puede estar en la antena proximal del FSI ó PcbB es también antena distal del FSI) a la Chl  $a_2$  del FSI. Por otra parte, es importante mencionar que péptidos de la antena PcbB fueron detectados con altos *scores* a lo largo de las 11 bandas del gel CN-PAGE, lo cual resulta por la disociación de dicha antena. Este evento es denotado por la línea que cruza todo el gel 2D SDS-PAGE aproximadamente a los 35 kDa Todo lo anterior nos indica que la antena PcbB está presente a lo largo de los geles CN- PAGE, así como, en los SG, sin embargo, el alto contenido de Chl  $b_2$  en la fracción enriquecida del FSI no puede ser explicada solo por este hecho (**Fig. 35-37**).

## **El aparato fotosintético constitutivo e inducible de *Synechococcus* PCC.7002**

*Synechococcus* PCC 7002 es una cianobacteria de fácil crecimiento en el laboratorio. Es un modelo ampliamente utilizado para biología molecular y para nuestros experimentos, existen reportes de que en condiciones de estrés por escasez de fierro en el medio, el nivel de mRNA del gen *isiA* aumenta (**Leonhard and Straus, 1992**). Si el mRNA de este gen es traducido a proteína (IsiA) podríamos identificar si dicha antena se asocia con el FSI, tal y como se ha demostrado para algunas cianobacterias (**Bibby et al, 2001; Kouřil et al., 2005**).

Como primer acercamiento, se aislaron y solubilizaron con 1% de DDM membranas tilacoidales de PCC 7002 crecida en condiciones normales de crecimiento. Los complejos solubilizados fueron separados en un gel CN-PAGE y comparados con el patrón electroforético de los complejos de MIT9313 (**Fig. 38**). Habiendo ya caracterizado e identificado las bandas de MIT9313, por peso molecular aparente asignamos que el aparato fotosintético de PCC 7002 se compone de trímeros del FSI y monómeros del FSI y II. Para corroborarlo lo anterior, realizamos una segunda dimensión desnaturalizante la cual presentó los patrones electroforéticos esperados (**Fig. 39**). Se constató que el trímero y el monómero del FSI estaban presentes. El FSII solo se encontraba como monómero. Para esta cianobacteria el tratamiento para obtener los geles CN-PAGE no comprometió la integridad de la ATP sintasa.

De manera interesante, se logró identificar una banda, por debajo de los monómeros del FSI y FSII que ha sido reportada como una subestructura del FSII, la cual solo consta del centro de reacción (CR), la antena proximal CP47 y 10 subunidades más (PsbE, PsbF, PsbI, PsbH, PsbL, PsbM y Psb28), y es denominada CR47. Se ha demostrado que esta subestructura es un estadio del FSII cuando se reemplaza la subunidad D1 por daño (**Herranen et al., 2004; Weisz et al., 2016**).

Para descartar la presencia de la proteína IsiA en nuestras condiciones de crecimiento +Fe, esto debido a la identificación de posibles supercomplejos del FSI en la zona de alto peso molecular del gel CN-PAGE, se cortó una banda en la zona de alto peso molecular del gel y se analizó por MS (**Fig. 42**, rectángulo rojo +Fe). Cuando los supercomplejos se resolvieron en un gel 2D-SDS-PAGE se pueden ver *manchas* entre los 45 y 25 kDa que podrían atribuirse a la antena IsiA (**Fig. 42**, +Fe). Sin embargo, los resultados de MS no detectaron ningún péptido de la antena IsiA (**Tabla 13**). De manera interesante se detectaron 5 péptidos con *scores* altos para la proteína B1XLZ8, la cual esta anotada como una proteína de la superfamilia de estomatinas. Por otro lado, **Herranen et al., 2004** reportaron la presencia de un ortólogo de la proteína B1XLZ8 de PCC7002 (en la misma zona del gel) para la cianobacteria *Synechocystis sp.* PCC6803. La interacción de dicha proteína con el FSI no está documentada.

En condiciones normales de crecimiento, el aparato fotosintético de PCC 7002 contiene los complejos y supercomplejos característicos de la mayoría de las cianobacterias: el FSI formando trímeros y monómeros, y el FSII como monómero, además, de la ausencia de antenas distales de membrana. Por su fácil manipulación es útil para usarse como referencia en el análisis del aparato fotosintético de otras cianobacterias.

Dado que los espectros de absorción pueden dar cuenta de los componentes del aparato fotosintético, cuando una cianobacteria se somete a algún tipo de estrés que modifique la composición de dicho aparato, una forma fácil de constatarlo es medir el espectro de absorción a lo largo del tiempo en el que se mantiene la condición de estrés. Cuando crecimos PCC 7002 en una dilución 1:210 de fierro, su espectro tuvo un corrimiento de cinco nanómetros (de 683 a 678 nm), lo cual es indicativo de que existe una modificación en el aparato fotosintético (**Fig. 40**). Esta fue *la señal* de que el aparato fotosintético de PCC 7002 estaba en proceso de modificación y se aislaron los tilacoides para caracterizarlos. Para identificar dicha modificación, en un mismo gel CN-PAGE se cargó la misma concentración de Chl a de complejos solubilizados con 1% de DDM de las condiciones +Fe y -Fe (**Fig. 41**). Las primeras diferencias que se notaron en el gel CN-PAGE sin teñir para la condición -Fe, fue la aparición de nuevas bandas verdes y la atenuación de algunas otras con respecto a la condición +Fe.

Se pudo notar una disminución de trímero del FSI y un aumento de la intensidad de las bandas verdes por encima de este. Para identificar tentativamente dichas proteínas se realizó una segunda dimensión desnaturalizante. En el gel 2-D SDS-PAGE de la condición de -Fe se pudieron identificar *manchas* por encima de los 25 kDa que se encuentran en la línea que corresponde a las subunidades del FSI, lo cual podría implicar la asociación del FSI con esta proteína y más aún, por el peso molecular aparente (~28 kDa) podría tratarse de la antena IsiA (**Fig. 42**, flechas -Fe).

Para corroborar la identidad de esta proteína se cortó una banda del CN-PAGE por encima del trímero del FSI donde el *spot* de la putativa proteína IsiA es más intenso (**Fig. 42**, - Fe, rectángulo rojo) y se procesó para su análisis por MS. Fue posible detectar péptidos de la proteína IsiA, lo cual corrobora la hipótesis de que IsiA se expresa y se

asocia con el FSI en *Synechococcus* PCC 7002 cuando es crecida en condiciones de bajo hierro (**Tabla 14**). Fue posible observar que existen diferentes supercomplejos con distintas cantidades de antenas IsiA, en la literatura es posible encontrar 18 antenas IsiA por trímero del FSI (**Bibby et al., 2001**) e incluso un segundo anillo con hasta 25 antenas IsiA (**Yeremenko et al., 2004**). Por otra parte, es posible encontrar supercomplejos FSI-IsiA que se encuentran formados por monómeros del FSI (**Kouřil et al., 2005**), lo anterior podría explicar la presencia del patrón electroforético del FSI-IsiA que aparece inmediatamente por debajo del trímero del FSI (**Fig. 41, - Fe**). De manera interesante, en la zona de bajo peso molecular del gel CN-PAGE es posible identificar la presencia de IsiA, muy posiblemente formando agregados, lo cual es parecido a lo encontrado para la antena PcbB en MIT9313 (**Fig. 22a**). Se ha demostrado que los agregados de IsiA en los tilacoides están relacionados con la foto-protección del aparato fotosintético al disipar el exceso de energía (**Ihalainen et al., 2005**).

### **El aparato fotosintético constitutivo e inducible de *Nodularia* sp. CCM9**

*Nodularia* sp. CCM9 es una cianobacteria aislada de un *tapete microbiano* de Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. En el laboratorio, crece rápidamente en medio BG11 suplementado con 0.2 M de NaCl. Vista al microscopio es una cianobacteria filamentosa que presenta diferenciación celular (heterocistos) cuando se somete a una disminución de nitrógeno en el medio de crecimiento (comunicación personal con Lourdes E. Leyva Castillo).

Al coexistir en un *tapete microbiano* con al menos 10 cianobacterias, que también fueron aisladas, y cuya morfología es marcadamente distinta (**Gómez-Lojero et al., 2018**), CCM9 como todas ellas, es un buen candidato de estudio para conocer las adaptaciones que posee para competir en su medio ambiente.

Cuando se solubilizaron los complejos del aparato fotosintético de CCM9 utilizando diferentes concentraciones de DDM y se separaron usando (CN-PAGE), fue notorio que el patrón electroforético (**Fig. 43**) era distinto a los ya descritos para MIT9313 (**Fig. 35b**) y PCC 7002 (**Fig. 41, +Fe**). Al calcular los pesos moleculares aparentes, utilizando como Marcadores los complejos de la cadena respiratoria de mitocondria de corazón de rata

(Fig. 44), se identificaron bandas de complejos de alto peso molecular (Fig. 45). Para proponer una identidad a estos complejos se resolvieron sus subunidades en una segunda dimensión. El patrón electroforético sugirió que estos complejos eran asociaciones del FSI de mayor masa que el de los trímeros de FSI (1,090 kDa). En la mayoría de las cianobacterias se ha reportado que el FSI forma asociaciones trimérica la cual es facilitada por la subunidad PsaL, una subunidad de tres hélices transmembranales que coordina 3 Chl, 2 carotenos y un átomo de calcio (Fig. S5a). Se ha sugerido que el supercomplejo homotrímérico transfiere energía entre monómeros, vía PsaL, para aumentar la eficiencia de transducción de la energía (Grotjohann & Fromme, 2005).

Por otro lado, Watanabe *et al.*, en 2011, reportaron la presencia de una estructura tetramérica del FSI en la cianobacteria filamentosa (formadora de heterocistos) *Anabaena sp.* PCC 7120 y en el 2014, Li *et al.*, reportaron la misma estructura del FSI, pero en la cianobacteria termófila *Chroococcidiopsis sp.* TS-821 (TS-821). De manera interesante, TS-821, ha sido asignada al grupo II (baeocitos) por su fisiología (división celular por fisión múltiple, Waterbury & Stenier, 1978). Estudios más recientes utilizando el 16S rRNA, sitúan a TS-821 muy cerca de las cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos (Fewer *et al.*, 2002). Li *et al.*, atribuyen la formación de dímeros y tetrámeros a la inserción de aminoácidos en el *loop* entre la  $\alpha$ -hélice 2 y 3 de la subunidad PsaL. Sugieren que esta inserción provee un impedimento estérico para la formación del trímero. De manera interesante, la subunidad PsaL de CY9414 (cianobacteria filogenéticamente más cercana a CCM9) posee esta inserción con un amino ácido extra.

Lo anterior reforzó la idea de que en el aparato fotosintético de CCM9 (una cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos) el FSI formaba supercomplejos de mayores masas que el trímero y además estructuras diméricas y monoméricas, las cuales se pudieron observar utilizando CN-PAGE (Fig. 43, 46 y 47).

Utilizando el mismo criterio para asegurar la identificación de los complejos y supercomplejos en MIT9313 y PCC 7002, el gel CN-PAGE fue cortado en 12 bandas y analizado usando espectrometría de masas (**Fig. 47a**). Para estos experimentos, además, se dividieron las bandas en dos. Una parte fue digerida con tripsina (método usual) y la otra parte fue digerida usando la enzima quimotripsina (sugerencia de Emmanuel Ríos Castro). Al usar tripsina y quimotripsina pudimos comparar la efectividad de corte e identificación, utilizando el *unused score* como indicador (valor de confiabilidad de la identificación). Dado que el FSI contienen subunidades muy hidrofóbicas (*core*), fue posible hacer un seguimiento específico de las subunidades PsaA, PsaB para el FSI y PsaA, PsaB para el FSII a lo largo del gel y, en pesos moleculares pertinentes.

Usando el tratamiento con quimotripsina para los supercomplejos del FSI (banda 1-3) se obtuvieron valores de *unused* más altos que para el tratamiento con tripsina. De la banda 1 a la 7 se pudieron identificar proteínas del FSI, sin embargo, a partir de esta banda no fue posible detectar subestructuras. En la banda 7 se obtuvieron los valores de *unused* más altos para subunidades del FSII y la mayor cantidad de subunidades de la ATP Sintasa, se identificaron en la banda 8. Sin embargo, fue posible identificar algunas subunidades desde la banda uno, igual que para el cit *b6f*.

Debido a las identificaciones obtenidas con MS para las bandas de CN-PAGE, además de los pesos moleculares aparentes, podemos concluir que la banda 1 y 3 (**Fig. 47a**) corresponden al tetrámero y dímero del FSI, respectivamente y, la banda 7 al monómero del FSII. De manera interesante, se pudieron identificar más subunidades de la ATP Sintasa en las bandas de alto peso molecular usando tripsina más que con quimotripsina. A lo largo del gel usando el tratamiento con tripsina se identificaron 144 proteínas con un *unused* máximo de 42.67 (PsaD, 16 kDa, banda 3) y para el tratamiento con quimotripsina se identificaron 79 proteínas con *unused* máximo de 113.77 (A2, 83 kDa, banda 3).

En el conjunto de proteínas identificadas bajo ambos tratamientos se detectó en total 147 proteínas distintas. Para el tratamiento con tripsina la proteína más veces detectada fue la subunidad b' de la ATP Sintasa (A0ZEZ8) y para el tratamiento con quimotripsina la antena proximal CP47 de FSII (W6FKG6) fue la proteína más detectada.

Por lo anterior, el tratamiento de tripsina ofrece ventajas en el número de proteínas identificadas y la quimotripsina ofrece ventajas aumentando la cobertura de proteínas hidrofóbicas.

Habiendo identificado las estructuras presentes en el aparato fotosintético constitutivo de CCM9, el siguiente paso fue determinar la presencia de los genes *isiA* y *psb-1k2*. Antes de iniciar el crecimiento en condiciones de estrés por escasez de hierro, se diseñaron *primers* utilizando la secuencia de otras cianobacterias para identificar zonas altamente conservadas en los genes *isiA* y *psb-1k2-like*.

Para el gen de la *quimera* putativa PsaC/PsaL, se utilizaron regiones internas conservadas donde se encuentra la unión entre PsaL y PsaC (**Fig. 52**). Por otra parte, la secuenciación de los productos de PCR mostró una identidad del 100% con los genes *isiA* y *psb-1k2* de *Nodularia spumigena* CY9414, con lo cual confirmamos la presencia de ambos genes en CCM9.

Se procedió a crecer CCM9 en condiciones de bajo hierro para caracterizar los cambios por sustitución de proteínas antena. Al igual que para PCC 7002, se realizaron resiembras con diluciones consecutivas para lograr una aclimatación progresiva. Las células crecidas a una dilución 1:210 fueron cosechadas y homogenizadas para poder medir su espectro de absorción.

Comparando el espectro de absorción de las condiciones normales de crecimiento (+Fe) con las condiciones de bajo hierro (-Fe), se detectó un corrimiento del espectro en 7 nm hacia el azul (**Fig. 53**), esto implicó 2 nm más que para células de PCC 7002 crecidas a la misma dilución de hierro (**Fig. 43**). Igual que para células de PCC 7002, se detectó una disminución en la absorción debida al ficobilisoma. Al obtener los espectros de fluorescencia de emisión excitando al ficobilisoma y a las clorofilas de los fotosistemas detectamos cambios importantes. En estos experimentos se probó mantener la muestra a una temperatura aproximada de 77 K para medir la fluorescencia.

En condiciones normales de crecimiento, al excitar la ficocianina a 570 nm se observó transferencia de energía y picos de fluorescencia debidos a la aloficocianina (664 nm), al FSII (694 nm) y al FSI (729 nm) (**Fig. 54**). Al excitar las clorofilas de los fotosistemas utilizando 440 nm, se detectaron dos picos de fluorescencia para el FSII

(697 nm) y FSI (729 nm), como en otras cianobacterias la fluorescencia es mayor para el FSI que para el FSII (Li *et al.*, 2014; Shen, *et al.*, 2016). Lo anterior implica que existe transferencia de energía entre la antena distal (FBS) y los fotosistemas (Liu *et al.*, 2013).

Los picos de fluorescencia en condiciones de bajo fierro mostraron una modificación importante, utilizando 570 nm para excitar el ficobilisoma y observar la transferencia de energía observamos fluorescencia de la aloficocianina y el FSII, sin embargo, no fue posible detectar ningún pico atribuible al FSI. Lo anterior podría explicarse por la reducción en el contenido de ficobilisoma y FSI en las condiciones de bajo fierro. Además, cuando se utilizó 440 nm, el componente con mayor fluorescencia relativa fue el FSII y no el FSI como en la condición normal de crecimiento (Fig. 55), un indicio más de que la disminución de la fluorescencia del FSI se debe a la disminución en el contenido de este complejo. De manera interesante, se detectó un pico a 668 nm que podría deberse a las antenas inducibles por las condiciones de crecimiento. Es notable que la fluorescencia del FSI a 729 nm es inusual incluso tratándose de tetrámeros y monómeros (Li *et al.*, 2014), esta discrepancia podría deberse a una *descalibración* del equipo de fluorescencia y/o nuestro método para mantener la muestra cercana a 77 K, sin embargo, este estudio requiere un análisis más detallado utilizando controles como MIT9313 y PCC6803 (Fig. S1 y S2).

La modificación en la probabilidad de absorción y la fluorescencia de emisión nos permitió identificar que existía una modificación del aparato fotosintético, por lo tanto, se procedió a separar los componentes del aparato fotosintético de CCM9 utilizando CN-PAGE en condiciones de bajo fierro.

Al solubilizar los tilacoides de células en ambas condiciones de crecimiento (+Fe, -Fe) y separarlas usando CN-PAGE pudimos notar que la resolución de bandas verdes fue pobre, lo cual fue atribuido al biopolímero que CCM9 produce en su medio ambiente natural como respuesta adaptativa y que puede estar interfiriendo en la electroforesis. Es muy probable que al continuar realizando resiembras de esta cianobacteria podría alcanzarse un estado de *domesticación* y por ende una producción mínima de biopolímero.

A primera vista, los geles CN-PAGE mostraron un patrón diferente de complejos del aparato fotosintético (**Fig. 56**). Las estructuras del dímero del FSI no fueron intensas en la condición de bajo hierro, pero se pudieron observar nuevas bandas en el fondo del gel, por debajo de las ficobiliproteínas, muy probablemente debidas a proteínas antenas que unen clorofila. La segunda dimensión desnaturalizante mostro *manchas* en el peso molecular aparente esperado para algunas de las proteínas antena de CCM9 (**Fig. 57**, flechas negras).

Basándonos en los resultados de MIT9313, para los supercomplejos y antenas en el gel CN-PAGE (**Fig. 22**), podemos inferir que las bandas verdes, en la parte baja del gel CN-PAGE de CCM9 (**Fig. 56**, rectángulo rojo), se deben a proteínas antena inducibles libres, mientras que las antenas en la parte superior del gel se encuentran formando supercomplejos con los fotosistemas.

Para identificar los posibles supercomplejos entre las antenas inducibles y los fotosistemas, se cortó una banda en la parte superior del gel (**Fig. 57**, rectángulo rojo) y para identificar las antenas libres se cortaron dos bandas en la parte baja del gel (**Fig. 57** rectángulos rojos), y fueron procesadas para su análisis por MS. De la misma manera que para las bandas del gel CN-PAGE en condiciones de -Fe (**Fig. 47a**) se analizaron las tres bandas digiriendo con tripsina (T) y quimotripsina (Q).

Para la banda 1 (**Fig. 57**) con el tratamiento con Q, se detectaron las tres antenas putativas PsbC-Ik1, PsbC/PsaL y PsbC-Ik3 y además la antena inducible por estrés de hierro IsiA. Lo anterior indica que en nuestras condiciones de bajo hierro se pueden inducir la expresión de IsiA, la cual se asocia con el FSI (**Bibby et. al. 2001, Bibby et al., 2003**), pero, además se identificaron las proteínas cuyos genes se consideraban antenas putativas. Dado que se encuentran en la zona de alto peso molecular del gel CN-PAGE, deben estar formando supercomplejos.

En esa banda se detectaron 4 subunidades del FSI y FSII. Para el FSI se detectó el *core* (PsaA y PsaB) y dos subunidades, una involucrada en la transferencia de electrones a la ferredoxina (PsaD) y la otra involucrada en el *docking* de la plastocianina (PsaE). Para el FSII se identificaron una subunidad del *core* (D2), las dos antenas proximales (CP43 y CP47) y una de las subunidades del cit *b<sub>559</sub>* (PsbE).

Para la banda 1 con el tratamiento con T, de igual manera se identificaron subunidades de ambos fotosistemas. Para el FSI se identificaron las mismas subunidades que en el tratamiento con Q, además de la subunidad PsaC, encargada de dar soporte a los núcleos Fe-S ( $F_A$  y  $F_B$ ). Para el FSII se identificaron las mismas subunidades que en el tratamiento con Q, además, de la otra subunidad que conforma el *core*, D1.

Para las antenas fue diferente, solo IsiA (A0ZCF9) y PsbC-Ik1 (A0ZCG0), tuvieron valores aceptables de *unused*. Por lo anterior se deduce que las proteínas antena inducibles se encuentran formando supercomplejos con ambos fotosistemas y que el tratamiento con Q nos dio mejor información en la identificación de dichas antenas.

De manera interesante y a diferencia de PCC 7002 y MIT9313, se detectaron subunidades de la ATP Sintasa, en esta banda de alto peso molecular, además en el gel 2-D SDS-PAGE se pueden identificar patrones electroforéticos de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  en varias zonas (**Fig. 57**). Lo anterior sugiere que la ATP Sintasa en CCM9 podría estar formando supercomplejos.

Para la banda 2 en la zona de bajo peso molecular (**Fig. 57**) solo se identificó la antena inducible por estrés de hierro IsiA (A0ZCF9) en ambos tratamientos. De manera interesante, solo se identificaron subunidades del FSII y ninguna del FSI. Por lo anterior se infiere que, en esta zona, la presencia de la antena IsiA no es debida a subestructuras del supercomplejo FSI-IsiA (dado que no se identificaron subunidades del FSI). Se ha reportado que en *Synechocystis* PCC 6803 que agregados de IsiA disipan energía (**Havaux et al., 2005; Ihalainen et al., 2005**). En esta banda se identificaron más proteínas con el tratamiento con T, pero el valor de *unused* para IsiA fue mayor para el tratamiento con Q (6 y 12.15, respectivamente).

Para la banda 3 en la zona de bajo peso molecular (**Fig. 57**) se identificaron las antenas IsiA (A0ZCF9) y PsbC-Ik3 (W6FVU6) en el tratamiento con Q, pero para el tratamiento con T solo IsiA fue identificada con valores aceptables de *unused*. En esta banda se detectaron subunidades de ambos fotosistemas.

Utilizando la inferencia realizada para la banda 2, IsiA se encuentra como agregados y podría funcionar como disipador de energía. Pero para PsbC-Ik3, resulta

posiblemente asumir que se asocia con el FSI dado que se identificó la subunidad A2 (caso diferente para la banda 2), y ambas estarían formando una subestructura que provendría de un posible supercomplejo. Esta zona contiene, además, las subestructuras del FSII, ATP Sintasa e incluso el ficobilisoma.

De manera interesante se detectaron proteínas involucradas con la deficiencia de hierro, una proteína de unión a hierro (A0ZH52) y un oligopéptido para el transporte transmembranal del tipo ABC.

Dado que los geles CN-PAGE no tuvieron la suficiente resolución para definir los supercomplejos de la misma manera que para MIT9313 y PCC 7002, debido muy probablemente a su peso molecular muy cercano, se realizó una revisión bibliográfica para obtener más información.

Salvo los análisis *in silico* realizados por **Shih et al.**, (2013) y **Voß et al.**, (2013), existe solo un reporte de **Shen et al.**, (2016) que refiere una caracterización de este tipo de proteínas. El estudio fue realizado en la cianobacteria siderófila *Leptolyngbya* JSC-1 (JSC-1), la cual posee dos *grupos* para estas proteínas. En el primero se encuentran los genes para las proteínas extensamente descritas por su inducción bajo estrés por escasez de hierro IsiA (llamada IsiA1) y flavodoxina, y en el segundo *cluster*, se encuentran 4 genes que codifican putativamente proteínas (hipótesis al principio del estudio) del tipo CP43-like (o CBP) y los cuales fueron nombrados como, IsiA2, IsiA3, IsiA4, IsiA5.

Al analizar filogenéticamente los productos génicos en JSC-1 y en CY9414 (y que ya se ha probado están presentes en CCM9), encontramos homología entre ellos (**Fig. S5**). Los ortólogos son los siguientes: IsiA (A0ZCF9), IsiA1; PsbC-Ik1 (A0ZCG0), IsiA5; PsbC-Ik2 (PsbC/PsaL, A0ZCF6), IsiA4; y PsbC-Ik3 (W6FVU6), IsiA3. Para la proteína IsiA2 de JSC-1 no se encontró un ortólogo en CCM9, sin embargo, el alineamiento de su secuencia mostró que tiene alta homología con IsiA4 y algo menos con PsbC/PsaL.

Lo anterior parece indicar un evento de duplicación de genes que involucraría a ancestros de *isiA2* e *isiA4*, (debido a su alta homología para el dominio *psbC* el cual contribuye con más al *score* para asignar homología; dato no mostrado), con la posterior adición del dominio *psaL*-like en el ancestro de IsiA4. Un posterior evento de especiación

(remoción) y/o transferencia horizontal de genes (de un *cluster* sin el ancestro de *isiA2*) dejaría fuera al ancestro de *isiA2* en CY9414 y CCM9.

Por otro lado y con el fin de ampliar la información filogenética de las proteínas que estudiaron en el presente trabajo se compararon las secuencias de las proteínas antena de membrana de PCC 7002 (con solo *IsiA*), MIT9313 (antena constitutiva *PcbB* e inducible *PcbA*, y que unen divinil clorofila *a* y *b*), CCM9 (4 antenas inducibles cuya secuencia está basada en CY9414) y JSC-1 (5 antenas inducibles), incluyendo además, las secuencias de *Prochlorococcus marinus* SS120 (con 8 genes para proteínas que unen divinil clorofila *a* y *b*, tipo *pcb*) y *Prochlorothrix hollandica* (3 genes para las proteínas *PcbA*, *PcbB* y *PcbC* que unen clorofila *a* y *b*). Dicha comparación mostró que las antenas inducibles de CCM9 y JSC-1 comparten un antepasado común con la proteína *PcbC* de *Prochlorothrix hollandica* (**Fig. S7**, línea negra) y estas a su vez comparten un antepasado común con las proteínas inducibles *IsiA* de PCC 7002, JSC-1 y CCM9 (**Fig. S7**, línea roja). Este conjunto de proteínas está relacionado con las proteínas que unen clorofila *a/b* de *Prochlorothrix hollandica* (**Fig. S7**, línea rosa), las cuales parecen haber divergido mucho antes, respecto a las proteínas *Pcb* del género *Prochlorococcus* (SS120 y MIT9313; **Fig. S7**, línea verde). En general este limitado análisis muestra que estas proteínas tienen una relación distante y posiblemente un origen evolutivo distinto.

Para la cianobacteria JSC-1, se caracterizaron supercomplejos de los fotosistemas con las antenas de la familia *IsiA* (**Shen et al., 2016**). Las proteínas antena *IsiA1*, *IsiA2*, *IsiA3* y *IsiA4* se identificaron formando supercomplejos con monómeros del FSI. La proteína antena *IsiA5* fue detectada en fracciones donde coexistían subunidades del FSI y FSII, sin embargo, los autores sugieren que al ser una proteína muy cercana a *PcbC*, esta podría estar relacionada con la formación de supercomplejos con el FSII (**Fig. S5**).

Sabiendo lo anterior y por homología de secuencias, podríamos inferir que las antenas *IsiA* (A0ZCF9), *PsbC/PsaL* (A0ZCF6) y *PsbC-lk3* (W6FVU6) forman supercomplejos con el FSI (**Fig. S5**, recuadro azul y tipo *IsiA*). La proteína *PsbC-lk1* (A0ZCG0) forma supercomplejos con el FSII (**Fig. S5**, tipo *Pcb*).

## Conclusiones

### Sobre el aparato fotosintético de *Prochlorococcus marinus* MIT9313.

A partir de células crecidas a una intensidad de luz de  $1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  y una temperatura constante de  $19 \text{ }^\circ\text{C}$ , fue posible determinar que:

- a) La fluorescencia de emisión de células completas y membranas tilacoidales muestran una marcada contribución del fotosistema II a  $680 \text{ nm}$  y ninguna perceptible debida al fotosistema I cuando se existen las divinil clorofilas a  $440 \text{ nm}$  y  $460 \text{ nm}$ .
- b) Utilizando arena de mar y mortero es posible obtener membranas tilacoidales al moler las células y cuya integridad se conserva a diferencia del método de ruptura por presión usando la prensa de French (comparación realizada con los datos de maestría).
- c) Utilizando el detergente neutro n-dodecil  $\beta$ -D maltosido (DDM, 98% de isómero  $\beta$ ) es posible solubilizar las membranas tilacoidales y obtener complejos y supercomplejos del aparato fotosintético de MIT9313.
- d) Utilizando gradientes de sacarosa continuos ( $2 \text{ M}$  a  $0.5 \text{ M}$  de sacarosa +  $0.01\%$  DDM), es posible obtener fracciones enriquecidas del trímero del fotosistema I (con un máximo en la fracción 3), monómeros del fotosistema I (con un máximo en la fracción 6), monómeros del fotosistema II (con un máximo en la fracción 10) y la antena distal PcbB (con un máximo en la fracción 14). Lo anterior fue corroborado mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas.
- e) Utilizando metanol al  $90\%$  +  $0.1 \text{ N}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  es posible extraer los cromóforos de las membranas tilacoidales de MIT9313 y prevenir la feofitinización de las divinil clorofilas.
- f) Utilizando HPLC con un gradiente de solventes (polar a apolar) es posible separar los cromóforos de un extracto metanólico de membranas tilacoidales de MIT9313 utilizando acetato de amonio como *ion pairing*. Basados en los espectros de

- absorción medidos por el arreglo de diodos se separaron 5 moléculas de carotenoides y 2 divinil clorofilas.
- g) Utilizando ESI MS-MS para metabolitos, fue posible identificar el ion  $[M^*]^+$  de la divinil clorofila *a* (890.4 m/z) y el ion  $[M+1]$  de la divinil clorofila *b* (905.4 m/z). El patrón de fragmentación de cada divinil clorofila mostraron la pérdida de masa de 278 u.m.a., correspondiente a la fragmentación del fitol y que es característica de las clorofilas.
  - h) La separación de las divinil clorofilas por medio de HPLC y su análisis por espectrometría de masas nos permitió dar cuenta de la pureza de las muestras para la determinación de sus coeficientes de extinción molar, los cuales fueron obtenidos en acetona al 80%.
  - i) Sabiendo los valores del coeficiente de extinción molar en acetona al 80% y la composición de las fracciones en el gradiente de sacarosa fue posible determinar la relación de divinil clorofila *a*/ divinil clorofila *b* en cada una de ellas. Para las fracciones enriquecida del fotosistema I (fracciones 3 a 8),  $1.98 \pm 0.16$ ; para las fracciones enriquecidas del fotosistema II (fracciones 9-12),  $1.55 \pm 0.14$ ; y para la antena distal PcbB (fracciones 13 a la 17),  $2.52 \pm 0.17$ .
  - j) Por lo anterior y por experimentos preliminares de fluorescencia a 77 K se sugiere que el fotosistema I podría utilizar la antena PcbB como antena distal y/o contener divinil clorofila *b* en su antena proximal (A1 y A2).
  - k) Utilizando la técnica electroforética no desnaturizante (CN-PAGE) fue posible separar los complejos y supercomplejos del aparato fotosintético de MIT9313, calculando los pesos moleculares aparentes utilizando como Marcadores de peso molecular los complejos de la cadena respiratoria de mitocondrias de corazón de rata (**Fig. 58**).
  - l) Por medio del patrón electroforético de las subunidades de los fotosistemas I y fotosistemas II, además de su identificación utilizando espectrometría de masas, se encontró que hasta seis antenas PcbB se asocian con el dímero del fotosistema II y el fotosistema I se encuentra formando un homotrímero. Se identificaron además monómeros de ambos fotosistemas y subunidades del complejo de citocromos *b<sub>6</sub>f*. No fue posible encontrar de manera contundente a la ATP Sintasa en el peso molecular que le corresponde, sin embargo, todas sus subunidades,

excepto la subunidad c, fueron identificadas en la parte de bajo peso molecular del gel, mostrando que este complejo es muy sensible a la solubilización con DDM y/o a la electroforesis en geles CN-PAGE.

- m) Utilizando geles CN-PAGE es posible separar complejos proteicos proveniente de membranas tilacoidales de MIT9313 previamente solubilizados con DDM y separados con gradientes de sacarosa.
- n) Se confirmó, utilizando actividad de diaforasa, western blot y espectrometría de masas en geles SDS-PAGE y CN-PAGE que la enzima ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa es una proteína asociada a las membranas tilacoidales en MIT9313 (Fig. 58).

### **Sobre el aparato fotosintético de *Synechococcus* PCC 7002.**

A partir de células crecidas a una intensidad de luz de  $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . En medios mínimo A<sup>+</sup> suplementados con 14.4  $\mu\text{M}$  de cloruro férrico (condición normal de crecimiento), fue posible determinar que:

- a) Utilizando geles CN-PAGE fue posible identificar que el fotosistema I de PCC 7002 se encuentra formando mayoritariamente estructuras homotriméricas y en menor medida estructuras monoméricas.
- b) Utilizando geles CN-PAGE fue posible identificar que el fotosistema II de PCC 7002 se encuentra formando estructuras monoméricas. Fue posible detectar la subestructura del fotosistema II, CR47, la cual es un estadio previo del ensamblaje de los monómeros del fotosistema II.
- c) Fue posible detectar a la ATP Sintasa en el peso molecular aparente correspondiente a su masa molecular.

A partir de células crecidas a una intensidad de luz de  $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . En medios mínimo A<sup>+</sup> suplementados con 68 nM de cloruro férrico (condición de escasez de hierro), fue posible determinar que:

- a) Utilizando una dilución 1:210 de Fe<sup>2+</sup> en el medio de crecimiento, fue posible modificar el aparato fotosintético de PCC 7002 y detectarlo utilizando su

espectro de absorción, el cual modificó el pico máximo de absorción de la banda Q<sub>y</sub> en 5 nanómetros hacia el Soret y en la disminución de la absorción del ficobilisoma.

- b) Fue posible identificar una disminución de la cantidad relativa del fotosistema I en condiciones de bajo hierro en el medio.
- c) Fue posible identificar estructuras de alto peso molecular cuyo patrón electroforético corresponderían a supercomplejos del fotosistema I con la antena distal inducible IsiA, muy probablemente homotrímeros rodeados de la antena IsiA (**Fig. 58**).
- d) Fue posible identificar supercomplejos de peso molecular aparente por debajo del homotrímeros del fotosistema I, formados muy probablemente de monómeros del Fotosistema I rodeados de la antena inducible IsiA (**Fig. 58**).
- e) Fue posible identificar agregados de la antena distal inducible IsiA en zonas de bajo peso molecular cuya función estaría involucrada en la foto protección como disipadoras de energía luminosa.
- f) Utilizando espectrometría de masas se confirmó la identidad de la antena IsiA en condiciones de escasez de hierro en el medio de crecimiento de PCC 7002.

### **Sobre el aparato fotosintético de *Nodularia sp. CCM9*.**

A partir de células crecidas a una intensidad de luz de  $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . En medios mínimo BG11 + 0.2 M NaCl y suplementados con 22  $\mu\text{M}$  de citrato férrico amoniacal (condición normal de crecimiento), fue posible determinar que:

- a) Utilizando geles CN-PAGE y Marcadores hidrofóbicos (complejos de la cadena respiratoria en mitocondrias de corazón de rata) fue posible determinar supercomplejos de alto peso molecular cuyo patrón electroforético correspondería a tetrámeros y dímeros del fotosistema I.
- b) Utilizando espectrometría de masas para los geles CN-PAGE y dos diferentes enzimas digestoras, la tripsina y la quimotripsina encontramos que: la tripsina identifica un mayor número de proteínas y que la gran mayoría son hidrosolubles, por otra parte, la quimotripsina identifica mayoritariamente

proteínas hidrofóbicas con valores de *unused score* y coberturas más altas que utilizando la tripsina.

- c) Utilizando espectrometría de masas en geles CN-PAGE se confirmó la identidad de los supercomplejos del fotosistema I correspondiente a homotetrámeros y homodímeros (**Fig. 58**).
- d) Utilizando espectrometría de masas en geles CN-PAGE se identificaron proteínas de los 4 complejos del aparato fotosintético del CCM9. Además, de proteínas de transporte, biosíntesis de clorofila *a* y carotenoides, ficobiliproteínas y *linkers* del ficobilisoma, entre otros.
- e) Utilizando PCR se amplificaron e identificaron los genes *isiA* y *psbC-lk2* (*psbC/psaL*) en la cianobacteria CCM9.
- f) La fluorescencia de emisión de células completas y membranas tilacoidales mostraron una contribución del fotosistema II a 694 nm y para el fotosistema I a 729 nm, cuando se excitó la clorofila *a*, a 440 nm. La relación entre ambos picos de fluorescencia (FSI/FSII) mostró un valor más alto que para otras cianobacterias.
- g) Se constató la transferencia de energía del ficobilisoma a ambos fotosistemas excitando la ficocianina a 570 nm.

A partir de células crecidas a una intensidad de luz de  $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . En medios mínimo BG11 + 0.2 M NaCl y suplementados con 104 nM de citrato férrico amoniacal (condición de escasez de hierro), fue posibles determinar que:

- a) Utilizando una dilución 1:210 de  $\text{Fe}^{2+}$  en el medio de crecimiento, fue posible modificar el aparato fotosintético de CCM9 y detectarlo utilizando su espectro de absorción, el cual se modificó en el pico máximo de absorción de la banda  $Q_y$  en 7 nanómetros hacia el Soret y en la disminución de la absorción del ficobilisoma.
- b) Se constató la transferencia de energía del ficobilisoma solo al fotosistema II cuando se excitó la ficocianina a 570 nm.
- c) La fluorescencia de emisión de células completas y membranas tilacoidales mostraron una modificación de la contribución del fotosistema II a 694 nm y

para el fotosistema I a 729 nm, cuando se excitó la clorofila *a*, a 440 nm. La relación entre ambos picos de fluorescencia (FSI/FSII) mostró un valor más bajo que para la condición normal de crecimiento.

- d) Utilizando geles CN-PAGE se identificó un patrón electroforético diferente a las condiciones normales de crecimiento. Se detectaron nuevas *manchas* en los geles 2-D SDS-PAGE, en pesos moleculares aparentes que corresponderían a las *nuevas* antenas distales inducibles de CCM9.
- e) En bandas de alto peso molecular de los geles CN-PAGE se identificaron las antenas IsiA (A0ZCF9), PsbC-Ik3 (W6FVU6), PsbC/PsaL (A0ZCF6), PsbC-Ik1 (A0ZCG0) utilizando quimotripsina; mostrando que son proteínas inducibles por estrés de bajo hierro en el medio de crecimiento, en CCM9.
- f) No se obtuvo la suficiente resolución para proponer que tipo de relaciones fotosistema-antena se forman. Sin embargo, podemos concluir que ambos fotosistemas están involucrados en la formación de supercomplejos debido a que fueron identificadas algunas de sus subunidades.
- g) En la zona de bajo peso molecular del gel CN-PAGE se pudo identificar la antena IsiA con ambas enzimas digestoras. De la misma manera que para PCC 7002 estos agregados podrían estar funcionando como disipadoras de energía.

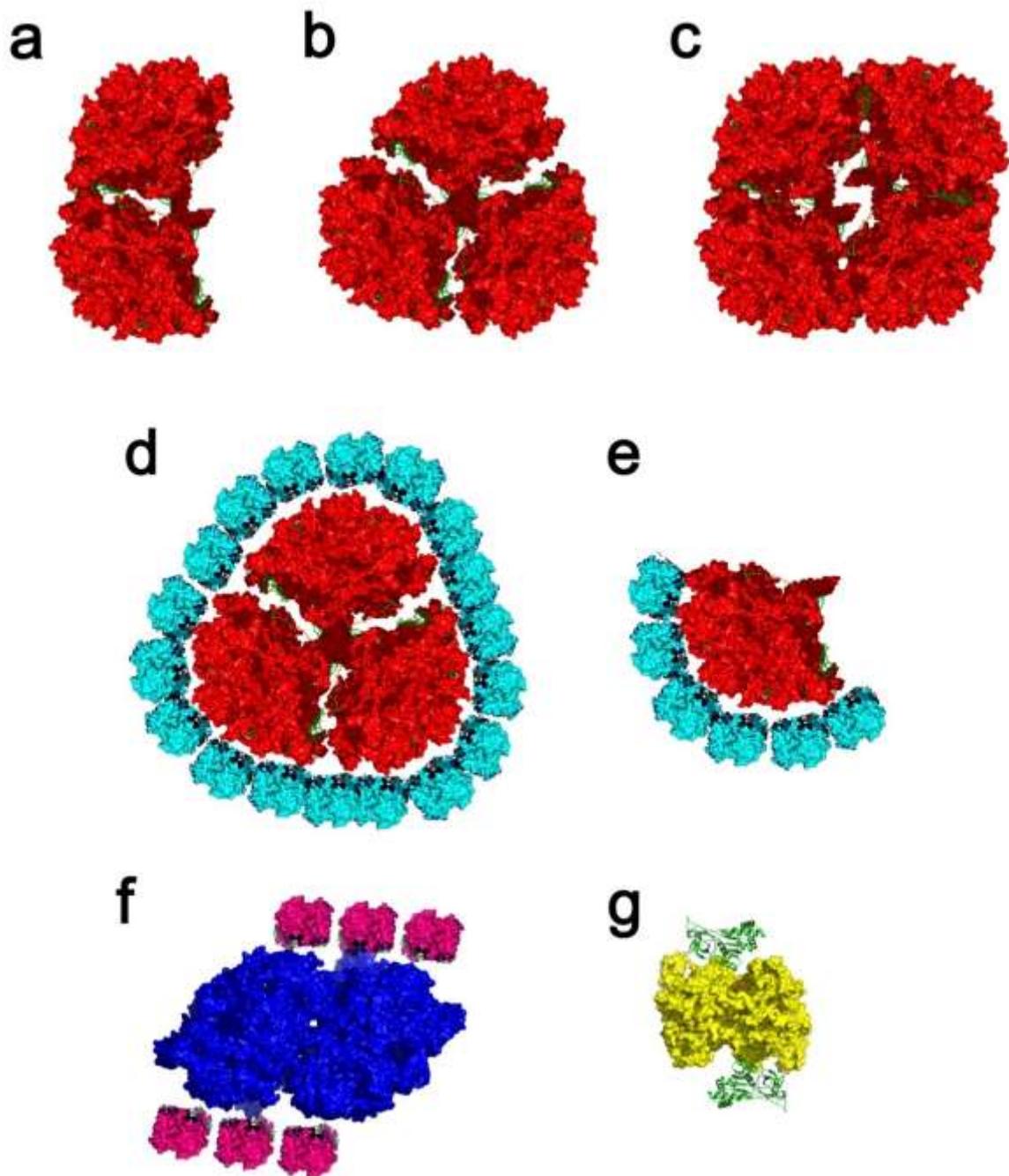


Fig. 58 Modelos de los supercomplejos del aparato fotosintético de tres diferentes cianobacterias  
*a.* Dímero del fotosistema I. *b.* Trímero de fotosistema I. *c.* Tetrámero del fotosistema I. *d.* Trímero del fotosistema I rodeado de 18 proteínas IsiA. *e.* Monómero del fotosistema con 6 antenas IsiA. *f.* Dímero del fotosistema II con 6 antenas PcbB. *g.* Complejos de citocromo *b<sub>6</sub>f* y la enzima ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa. Los modelos se realizaron utilizando los PDB 1JB0 para FSI, 5B66 para el FSII y las antenas IsiA y PcbB (usando solo la cadena correspondiente a CP43), 1VF5 para *b<sub>6</sub>f* y 2B50 para la FNR.

## Bibliografía

- Amunts, A., Drory, O., & Nelson, N. (2007). The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. *Nature* 447: 58-63.
- Arnon, D. I. (1949). Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1–15.
- Bibby, T. S., Mary, I., Nield, J., Partensky, F., & Barber, J. (2003). Low-light-adapted *Prochlorococcus* species possess specific antennae for each photosystem. *Nature*, 424(6952), 1051–1054.
- Barrera-Rojas J, Herrera-Salgado P, Gomez-Lojero C (2016). La fotosíntesis. Subsistiendo bajo la luz del sol. *Avance y perspectiva* 2 (1), <http://bit.ly/29ZvNA6>.
- Barrera-Rojas J. (2013) Supercomplejos y complejos de la fotosíntesis oxigénica en la cianobacteria *Prochlorococcus marinus* MIT9313. Tesis de maestría. Cinvestav- Zacatenco, Depto. Bioquímica, México.
- Bibby, T. S., Nield, J., & Barber, J. (2001). Iron deficiency induces the formation of an antenna ring around trimeric photosystem I in cyanobacteria. *Nature*, 412(1999), 743–745.
- Biller, S. J., Berube, P. M., Lindell, D., & Chisholm, S. W. (2014). *Prochlorococcus*: the structure and function of collective diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 13–27.
- Blankenship, R. E. (1992). Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 33, 91–111.
- Blankenship, R. E. (2010). Early Evolution of Photosynthesis. *Plant Physiology*, 154(2), 434–438.
- Bouman, H. A. (2006). Oceanographic Basis of the Global Surface Distribution of *Prochlorococcus* Ecotypes. *Science*, 312(5775), 918–921.
- Braslavsky, S. E., Fron, E., Rodríguez, H. B., Román, E. S., Scholes, G. D., Schweitzer, G., ... Wirz, J. (2008). Pitfalls and limitations in the practical use of Förster's theory of resonance energy transfer. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7(12), 1444.
- Burger-Wiersma, T., Veenhuis, M., Korthals, H. J., Van De Wiel, C. C. M., & Mur, L. R. (1986). A new prokaryote containing chlorophylls a and b. *Nature*, 320(6059), 262–264.
- Chen, M. (2014). Chlorophyll Modifications and Their Spectral Extension in Oxygenic Photosynthesis, 26(1).
- Chen, M., & Bibby, T. S. (2005). Photosynthetic apparatus of antenna-reaction centres supercomplexes in cyanobacteria: Insight through significance of Pcb/IsiA proteins. In *Photosynthesis Research* 86: pp. 165–173.
- Chisholm, S. W., Olson, R. J., Zettler, E. R., Goericke, R., Waterbury, J. B., & Welschmeyer, N. A. (1988). A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*, 334(6180), 340–343.

- Coleman, M. L., & Chisholm, S. W. (2007). Code and context: *Prochlorococcus* as a model for cross-scale biology. *Trends in Microbiology*.
- Dudkina, N. V., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., Boekema, E. J., & Braun, H. P. (2006). Respiratory chain supeCRomplexes in the plant mitochondrial membrane. *Trends in Plant Science*, 11(5), 232–240.
- Fewer, D., Friedl, T., & Büdel, B. (2002). *Chroococcidiopsis* and heterocyst-differentiating cyanobacteria are each other's closest living relatives. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23(1), 82–90.
- Fromme, P., & Grotjohann, I. (2008). Structure of photosystems I and II. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 45, 33–72.
- Fromme, P., Jordan, P., & Krauß, N. (2001). Structure of photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 1507, 5-31
- Gan, F., Zhang, S., Rockwell, N. C., Martin, S. S., Lagarias, J. C., & Bryant, D. A. (2014). Extensive remodeling of a cyanobacterial photosynthetic apparatus in far-red light. *Science*, 345(6202), 1312–1317.
- Geiß, U., Vinnemeier, J., Kunert, A., Lindner, I., Gemmer, B., Lorenz, M., ... Schoor, A. (2001). Detection of the *isiA* Gene across Cyanobacterial Cepas: Potential for Probing Iron Deficiency. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3–12), 5247–5253.
- Goericke, R., & Repeta, D. (1993). Chlorophylls a and b and divinyl chlorophylls a and b in the open subtropical North Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 101, 307–313.
- Goericke, R., & Welschmeyer, N. A. (1993). The marine prochlorophyte *Prochlorococcus* contributes significantly to phytoplankton biomass and primary production in the Sargasso Sea. *Deep-Sea ReseaCRh*, 40(11), 2283–2294.
- Gómez-Lojero, C., Leyva-Castillo, L. E., Herrera-Salgado, P., Barrera-Rojas, J., Ríos-Castro, E., & Gutiérrez-Cirlos, E. B. (2018). *Leptolyngbya* CCM 4, a cyanobacterium with far-red photoacclimation from Cuatro Ciénegas Basin, México. *Photosynthetica*, 56(1), 1–12.
- Gómez-Lojero, C., Pérez-Gómez, B., Shen, G., Schluchter, W. M., & Bryant, D. A. (2003). Interaction of Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> Oxidoreductase with Phycobilisomes and Phycobilisome Substructures of the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Ceba PCC 7002. *Biochemistry*, 42(47), 13800–13811.
- Green, B. R., Anderson, J. M., & Parson, W. W. (2003). Photosynthetic Membranes and Their Light-Harvesting Antennas. In *Advances in Photosynthesis and Respiration* (pp. 1–28).
- Grotjohann, I., & Fromme, P. (2005). Structure of cyanobacterial Photosystem I. *Photosynthesis ReseaCRh*, 85(1), 51–72.
- Havaux, M., Guedeney, G., Hagemann, M., Yermenko, N., Matthijs, H. C. P., & Jeanjean, R. (2005). The chlorophyll-binding protein *IsiA* is inducible by high light and protects the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 from photooxidative estrés. *FEBS Letters*, 579(11), 2289–2293.
- Herranen, M. (2004). Towards Functional Proteomics of Membrane Protein Complexes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant physiology*, 134(1), 470–481.

Hess, W. R., Rocap, G., Ting, C. S., Larimer, F., Stilwagen, S., Lamerdin, J., & Chisholm, S. W. (2001). The photosynthetic apparatus of *Prochlorococcus*: Insights through comparative genomics. *Photosynthesis ReseaCRh*, 70(1), 53–71.

Ho, M.-Y., Shen, G., Canniffe, D. P., Zhao, C., & Bryant, D. A. (n.d.). Light-dependent chlorophyll f synthase is a highly divergent paralog of PsbA of photosystem II.

Hohmann Martin F and Blankenship Robert E. (2011). Evolution of Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol*, 62, 515–548.

Hooper, J. K. (2012). The Characteristic of Specific Chlorophylls and Their Roles in Biogenesis of the Photosynthetic Apparatus. (T. D. Eaton-rye, Julian J. Tripathy, B.C. Sharkey, Ed.) (Vol. 34). *Advances in Photosynthesis and Respiration*.

Hooper, J. K., Eggink, L. L., & Chen, M. (2007). Chlorophylls, ligands and assembly of light-harvesting complexes in chloroplasts. *Photosynthesis ReseaCRh*.

Johnson, Z. I. (2006). Niche Partitioning Among *Prochlorococcus* Ecotypes Along Ocean-Scale Environmental Gradients. *Science*, 311(5768), 1737–1740.

Johnson, Z., Landry, M. L., Bidigare, R. R., Brown, S. L., Campbell, L., Gunderson, J., ... Trees, C. (1999). Energetics and growth kinetics of a deep *Prochlorococcus* spp. population in the Arabian Sea. *Deep-Sea ReseaCRh Part II: Topical Studies in Oceanography*, 46(8–9), 1719–1743.

Juin, C., Bonnet, A., Nicolau, E., Bérard, J. B., Devillers, R., Thiéry, V., ... Picot, L. (2015). UPLC-MSE profiling of phytoplankton metabolites: Application to the identification of pigments and structural analysis of metabolites in *Porphyridium purpureum*. *Marine Drugs*, 13(4), 2541–2558.

Kouřil, R., Arteni, A. A., Lax, J., Yeremenko, N., D'Haene, S., Rögner, M., ... Boekema, E. J. (2005). Structure and functional role of supeCRomplexes of IsiA and Photosystem I in cyanobacterial photosynthesis. *FEBS Letters*, 579(15), 3253–3257.

Kruve, A., & Kaupmees, K. (2017). Adduct Formation in ESI/MS by Mobile Phase Additives. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*.

Ladig, R., Sommer, M. S., Hahn, A., Leisegang, M. S., Papatotiriou, D. G., Ibrahim, M., ... Schleiff, E. (2011). A high-definition native polyacrylamide gel electrophoresis system for the analysis of membrane complexes. *Plant Journal*, 67(1), 181–194.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., ... Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948.

Laudenbach, D. E., & Straus, N. A. (1988). Characterization of a cyanobacterial iron estrés-induced gene similar to psbC. *Journal of Bacteriology*, 170(11), 5018–5026.

Leonhardt, K., & Straus, N. A. (1992). An iron estrés operon involved in photosynthetic electron transport in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Journal of General Microbiology*.

- Lerma, C., & Gómez-Lojero, C. (1987). Preparation of a highly active ATPase of the mesophilic cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Photosynthesis ReseaCRh*, 11(3), 265–277.
- Lewin R. A. and Withers N. W. (1975). Extraordinary pigment composition of a prokaryotic alga. *Nature*, 256, 735–737.
- Li, M., Semchonok, D. A., Boekema, E. J., & Bruce, B. D. (2014). Characterization and Evolution of Tetrameric Photosystem I from the Thermophilic Cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp TS-821. *The Plant Cell*, 26(3), 1230–1245.
- Liu, H., Zhang, H., Niedzwiedzki, D. M., Prado, M., He, G., Gross, M. L., & Blankenship, R. E. (2013). Phycobilisomes supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria. *Science*, 342(6162), 1104–1107.
- Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., & Biesiadka, J. (2005). Towards complete cofactor arrangement in the 3.0. Resolution structure of photosystem II. *Nature*, 438(7070), 1040–1044.
- Zapata M., Garrido J. L., & Jeffrey S. W. (2006). Chlorophyll *c* Pigments: Current Status. *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. Advances in Photosynthesis and Respiration*, 25, 39-53.
- Martin, J. H., Coale, K. H., Johnson, K. S., Fitzwater, S. E., Gordon, R. M., Tanner, S. J., ... Tindale, N. W. (1994). Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean. *Nature*, 371(6493), 123–129.
- Meyer, B., Wittig, I., Trifilieff, E., Karas, M., & Schägger, H. (2007). Identification of Two Proteins Associated with Mammalian ATP Synthase. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(10), 1690–1699.
- Moore, L. R., Goericke, R., & Chisholm, S. W. (1995). Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*: Influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. *Marine Ecology Progress Series*, 116(1–3), 259–276.
- Morales-Rios, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (2015). Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(43), 13231–13236.
- Olaizola, M., & Duerr, E. O. (1990). Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 2(2), 97–104.
- Pakrasi, H. B., Williams, J. G., & Arntzen, C. J. (1988). Targeted mutagenesis of the *psbE* and *psbF* genes blocks photosynthetic electron transport: evidence for a functional role of cytochrome b559 in photosystem II. *The EMBO Journal*, 7(2), 325.
- Partensky, F., & GaCRzarek, L. (2010). *Prochlorococcus*: Advantages and Limits of Minimalism. *Annual Review of Marine Science*, 2(1), 305–331.
- Partensky, F., Hess, W. R., & Vaultot, D. (1999). *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol.Mol Biol.Rev.*, 63(1), 106–127.

- Reifschneider, N. H., Goto, S., Nakamoto, H., Takahashi, R., Sugawa, M., Dencher, N. A., & Krause, F. (2006). Defining the mitochondrial proteomes from five rat organs in a physiologically significant context using 2D blue-native/SDS-PAGE. *Journal of Proteome Research*, 5(5), 1117–1132.
- Rippka, R., Herdman, M., & Waterbury, J. B. (1979). Generic Assignments, Cepa Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology*, 111(1), 1–61.
- Rocap, G., Larimer, F. W., Lamerdin, J., Malfatti, S., Chain, P., Ahlgren, N. A., ... Chisholm, S. W. (2003). Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature*, 424(6952), 1042–1047.
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368–379.
- Shedibalkar, V. P., & Rebeiz, C. A. (1992). Chloroplast biogenesis: Determination of the molar extinction coefficients of divinyl chlorophyll a and b and their pheophytins. *Analytical Biochemistry*, 207(2), 261–266.
- Shen, G., Gan, F., & Bryant, D. A. (2016). The siderophilic cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. cepa JSC-1 acclimates to iron starvation by expressing multiple isiA-family genes. *Photosynthesis Research*, 128(3), 325–340.
- Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., ... Mann, M. (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14440–14445.
- Shih, P. M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S. D., Fewer, D. P., Talla, E., ... Kerfeld, C. A. (2013). Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(3), 1053–1058.
- Stickforth, P., Steiger, S., Hess, W. R., & Sandmann, G. (2003). A novel type of lycopene  $\epsilon$ -cyclase in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* MED4. *Archives of Microbiology*, 179(6), 409–415.
- Sullivan, M. B., Coleman, M. L., Weigele, P., Rohwer, F., & Chisholm, S. W. (2005). Three *Prochlorococcus* cyanophage genomes: Signature features and ecological interpretations. *PLoS Biology*, 3(5), 0790–0806.
- Takaichi, S., & Mochimaru, M. (2007). Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: Unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Takaichi, S., Mochimaru, M., Maoka, T., & Katoh, H. (2005). Myxol and 4-ketomyxol 2'-fucosides, not rhamnosides, from *Anabaena* sp. PCC 7120 and *Nostoc punctiforme* PCC 73102, and proposal for the biosynthetic pathway of carotenoids. *Plant and Cell Physiology*, 46(3), 497–504.
- Tanaka, A., Fukushima, Y., & Kamiya, N. (2017). Two different structures of the oxygen-evolving complex in the same polypeptide frameworks of photosystem II. *Journal of the American Chemical Society*, 139(5), 1718–1721.

- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J. R., & Kamiya, N. (2011). Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9Å. *Nature*, 473(7345), 55–60.
- Voß, B., Bolhuis, H., Fewer, D. P., Kopf, M., Möke, F., Haas, F., ... Hess, W. R. (2013). Insights into the Physiology and Ecology of the Brackish-Water-Adapted Cyanobacterium *Nodularia spumigena* CCY9414 Based on a Genome-Transcriptome Analysis. *PLoS ONE*, 8(3).
- Watanabe, M., Kubota, H., Wada, H., Narikawa, R., & Ikeuchi, M. (2011). Novel supeCRomplex organization of photosystem I in anabaena and *Cyanophora paradoxa*. *Plant and Cell Physiology*, 52(1), 162–168.
- Watanabe, M., Semchonok, D. A., Webber-Birungi, M. T., Ehira, S., Kondo, K., Narikawa, R., ... Ikeuchi, M. (2014). Attachment of phycobilisomes in an antenna-photosystem I supeCRomplex of cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(7), 2512–2517.
- Waterbury, J. B., & Stanier, R. Y. (1978). Patterns of growth and development in pleurocapsalean cyanobacteria. *Microbiological Reviews*, 42(1), 2–44.
- Wei, X., Su, X., Cao, P., Liu, X., Chang, W., Li, M., ... Liu, Z. (2016). Structure of spinach photosystem II–LHCII supeCRomplex at 3.2 Å resolution.
- Weisz, D. A., Gross, M. L., & Pakrasi, H. B. (2016). The Use of Advanced Mass Spectrometry to Dissect the Life-Cycle of Photosystem II. *Frontiers in Plant Science*, 7(May).
- Westberry, T. K., & Siegel, D. A. (2006). Spatial and temporal distribution of *Trichodesmium* blooms in the world's oceans. *Global Biogeochemical Cycles*, 20(4), 1–13.
- Wittig, I., Beckhaus, T., Wumaier, Z., Karas, M., & Schägger, H. (2010). Mass Estimation of Native Proteins by Blue Native Electrophoresis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(10), 2149–2161.
- Wittig, I., Karas, M., & Schägger, H. (2007). High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(7), 1215–1225.
- Wittig, I., & Schägger, H. (2005). Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics*, 5(17), 4338–4346.
- Wittig, I., & Schägger, H. (2008). Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics*.
- Yang, D., Qing, Y., & Min, C. (2010). Incorporation of the chlorophyll d-binding light-harvesting protein from *Acaryochloris marina* and its localization within the photosynthetic apparatus of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*.
- Yeremenko, N., Kouřil, R., Ihalainen, J. A., D'Haene, S., Van Oosterwijk, N., Andrizhiyevskaya, E. G., ... Dekker, J. P. (2004). Supramolecular organization and dual function of the IsiA chlorophyll-binding protein in cyanobacteria. *Biochemistry*, 43(32), 10308–10313.

Yousef, N., Pistorius, E. K., & Michel, K. P. (2003). Comparative analysis of *idiA* and *isiA* transcription under iron starvation and oxidative stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 wild-type and selected mutants. *Archives of Microbiology*, 180(6), 471–483.

Zigmantas, D., Hiller, R. G., Sundstrom, V., & Polivka, T. (2002). Carotenoid to chlorophyll energy transfer in the peridinin-chlorophyll-a-protein complex involves an intramolecular charge transfer state. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 16760–16765.

## Material suplementario

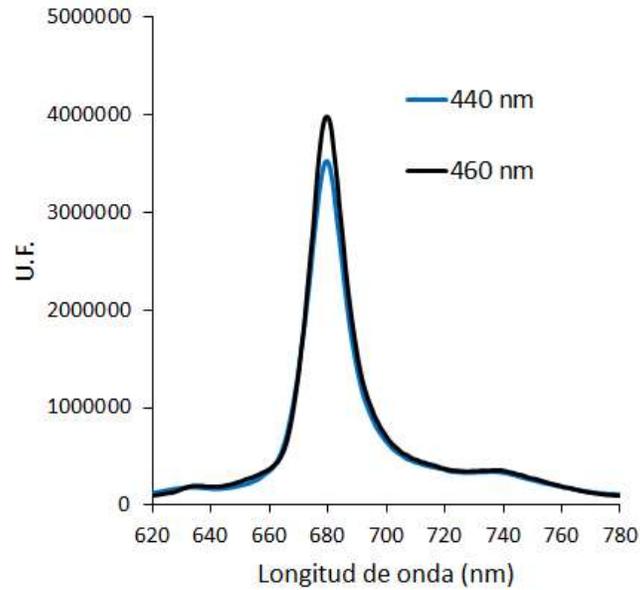


Fig. S1 Espectros de fluorescencia de emisión a 77 K de membranas solubilizadas de *Prochlorococcus marinus* MIT9313.

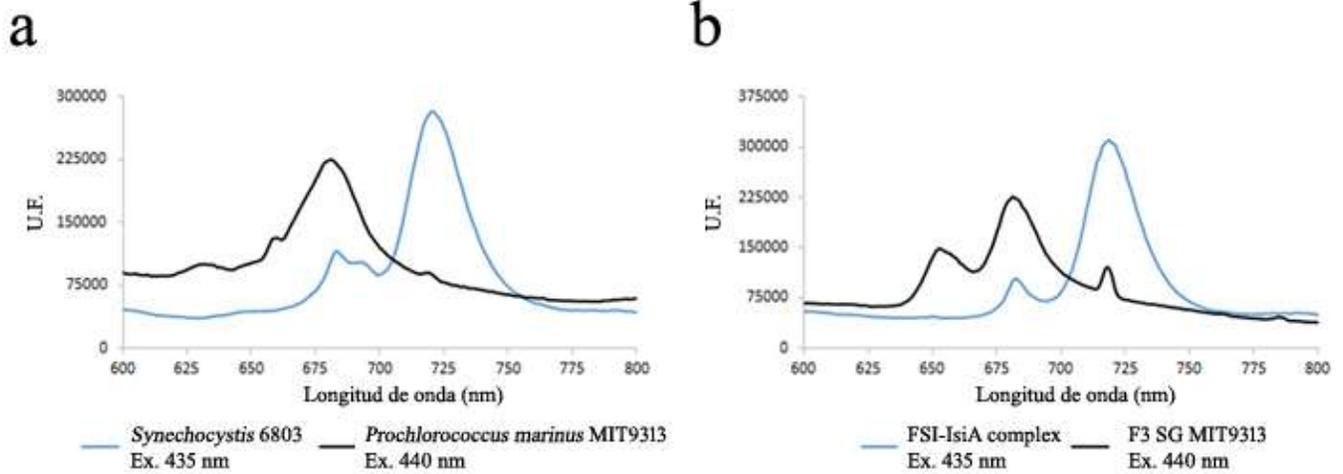


Fig. S2 Espectros de fluorescencia de emisión a 77 K de *Prochlorococcus marinus* MIT9313 y *Synechocystis* sp. PCC 6803.

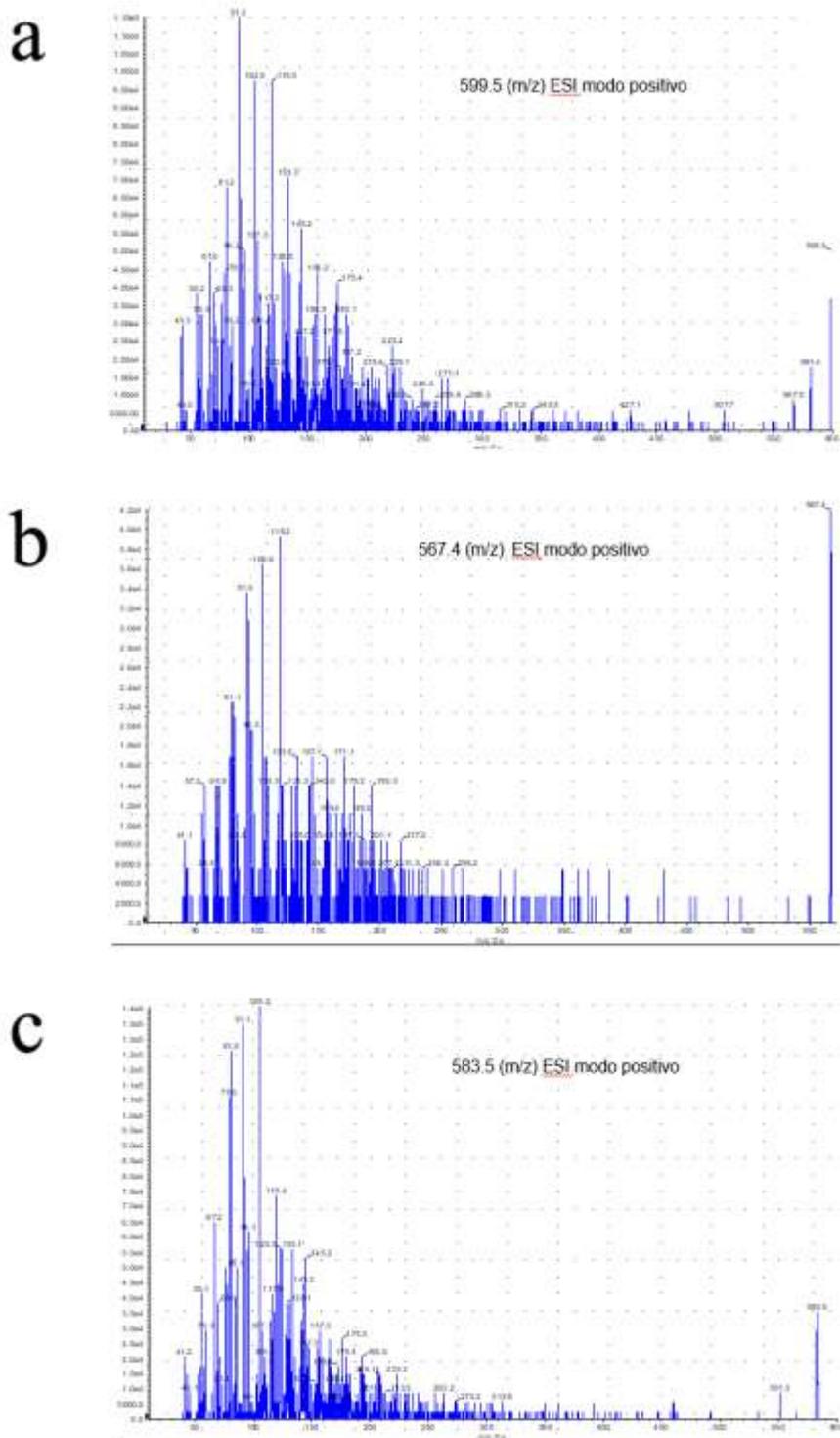
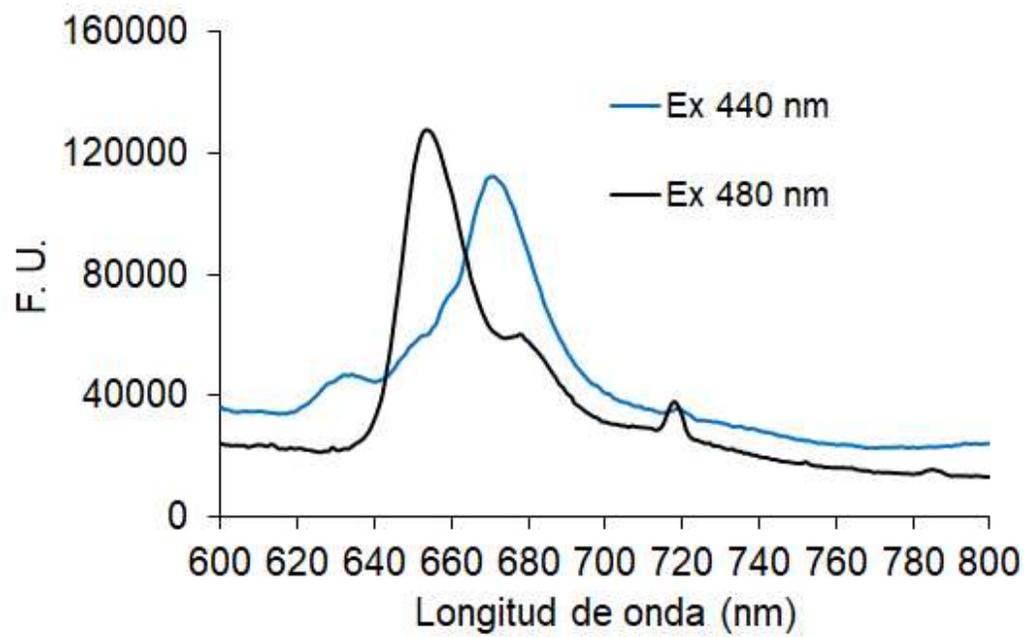


Fig. S3. Espectros de fragmentación de carotenoides no identificados, extraídos de tilacoides de *Prochlorococcus marinus* MIT9313.



*Fig. S4 Espectros de fluorescencia a 77 K de la fracción 3 de gradiente de sacarosa de membranas solubilizadas de Prochlorococcus marinus MIT9313.*

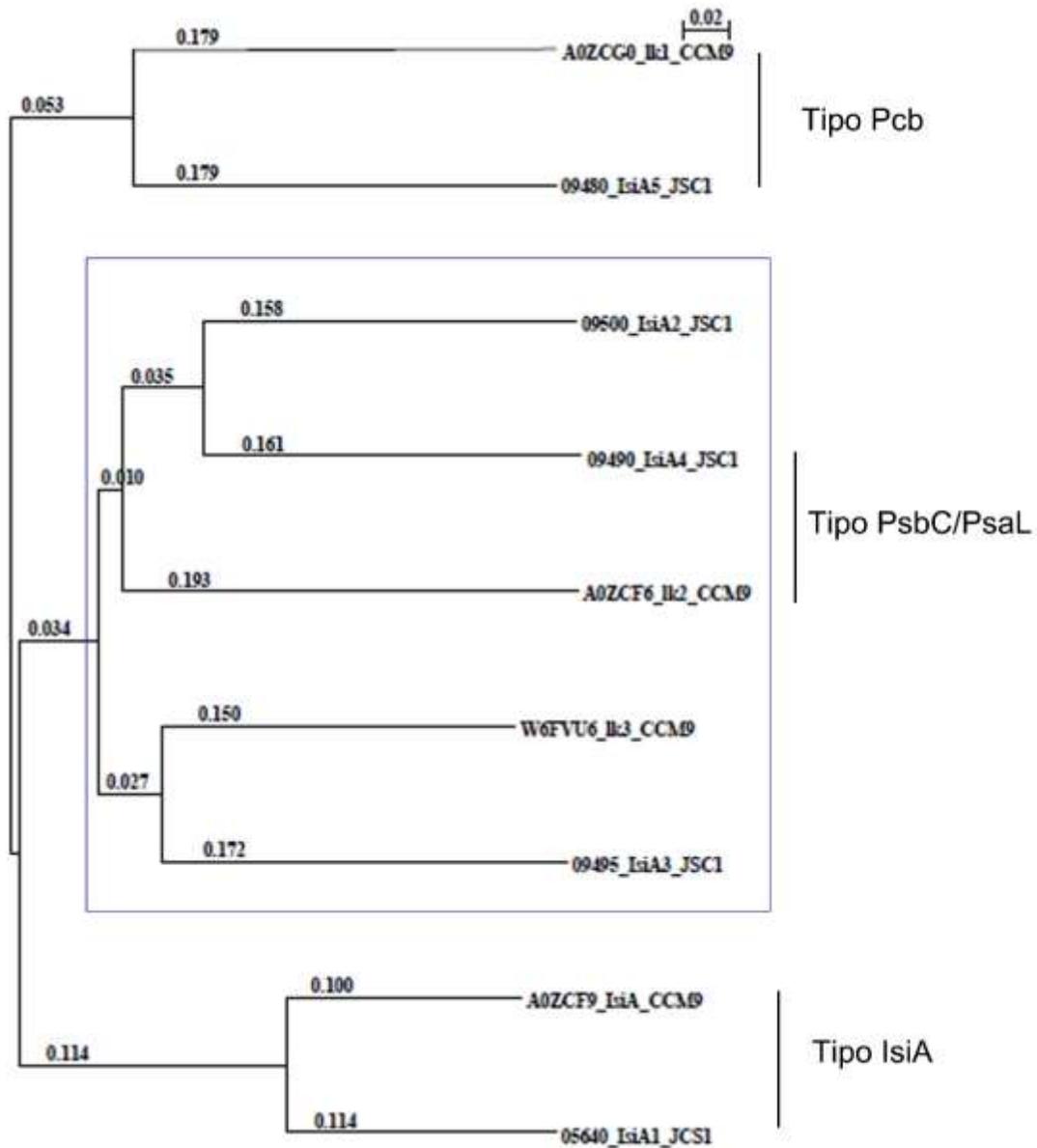


Fig. S5. Árbol filogenético de las proteínas CBP (CP43-like) de las cianobacterias *Leptolyngbya sp. cepa JSC-1* y *Nodularia spumigena CY9414*. Se realizó este árbol utilizando las secuencias de *CY9414* por la cercanía filogenética de *CY9414* y *CCM9*. Se utilizó el software *Clustal X* para alinear las secuencias, utilizando un método de distancia por matriz (clustering o métodos algorítmicos). Los números indican la distancia entre secuencias calculada en cambios por sitio (Larkin et al., 2007). Las secuencias están etiquetadas para la cianobacteria a la que pertenecen. Se detectaron tres subfamilias: tipo Pcb (*Prochlorofitas*), tipo PsaC/PsaL (homología en la parte de la secuencia correspondiente a CP43-like) y tipo IsiA (inducibles por escasez de hierro).

Tabla S1. Identificación proteómica de banda 4 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando quimotripsina.

**Banda 4 Quimotripsina**

Unused	%Cov(95)	Uniprot ID	Descripción
6.8	9.2	W6FXQ8	Putative porin
2.2	2.0	A0ZKC9	Putative porin
11.3	9.9	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
8.9	7.8	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
2.2	6.4	A0ZBQ1	Photosystem I reaction center subunit XI
4.5	40.0	A0ZB92	Photosystem I reaction center subunit IV
17.8	10.5	A0ZAN9	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2
8.4	3.7	A0ZAP0	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1
4.0	22.0	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha

<sup>a</sup> Números correspondientes a la banda del gel CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 (Fig. 47a).

<sup>b</sup> Valor que relaciona la confiabilidad de la proteína identificada basado en un score asignado para el porcentaje de cobertura de cada uno de los péptidos. Un péptido con una cobertura del 99% le corresponde un valor de unused score de 2, dado por la fórmula  $\text{Unused score} = -\log(1 - (\% \text{confidencialidad}/100))$ . El valor es la suma de todas las aportaciones de los péptidos detectados.

<sup>c</sup> ID de proteínas de la base de datos UniProt.

<sup>d</sup> Datos obtenidos del genoma de *Nodularia spumigena* CY9414. Gen Bank ID: NZ\_CP007203.1. La función de las proteínas fue correlacionada por los ortólogos del cristal con PDB 1JB0 para el FSI, PDB 1VFS para Cyt b6f, ATP Sintasa 5DN6 y 3WU2 para el FSII.

Tabla S2. Identificación proteómica de banda 4 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando tripsina.

**Banda 4 Tripsina**

Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
6.1	4.1	A0ZF68	Valine--tRNA ligase
2.1	1.4	A0ZBW7	UvrABC system protein A
2.0	5.4	A0ZC16	Uncharacterized protein
2.0	3.7	W6G081	RNA polymerase sigma factor
6.0	7.1	A0Z9K8	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain
18.6	19.6	W6FXQ8	Putative porin
7.9	13.6	A0ZKC9	Putative porin
2.0	9.8	W6G1Z1	Phycocyanin beta chain
8.0	36.2	W6FS94	Phycocyanin alpha chain
10.1	19.6	A0ZN82	Phycobilisome rod linker polypeptide, phycocyanin-associated
21.3	9.3	A0ZF10	Phycobilisome core-membrane linker polypeptide
4.0	26.5	A0ZF14	Phycobilisome 7.8 kDa linker polypeptide, allophycocyanin-associated, core
2.0	20.9	A0Z9N8	Photosystem II reaction center protein H
12.0	20.0	A0ZF30	Photosystem II protein D1
12.5	15.3	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
14.3	16.3	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
12.2	31.2	A0ZBQ1	Photosystem I reaction center subunit XI
21.7	69.1	A0ZLE1	Photosystem I reaction center subunit II
6.0	23.2	A0ZBQ3	Photosystem I reaction center protein Psaf, subunit III
16.2	9.6	A0ZAN9	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2
19.8	13.8	A0ZAP0	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1

4.4	40.7	W6FPY2	Photosystem I iron-sulfur center subunit VII (PsaC)
12.0	15.2	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
2.0	2.4	W6FIN6	Phosphate-binding protein
5.7	6.4	A0ZME6	Outer membrane protein
2.4	4.5	A0ZDY8	Magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester [oxidative] cyclase
2.2	5.0	W6FX86	Light-dependent protochlorophyllide reductase
2.1	2.5	A0ZFY8	Geranylgeranyl hydrogenase BchP Geranylgeranyl reductase
2.0	6.3	A0ZKG9	Cytochrome b6-f complex subunit 4
2.0	7.3	A0ZJ61	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit
2.3	11.0	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha
4.2	4.7	W6FV44	Chaperone protein DnaK
2.0	4.1	W6FXR8	cAMP-binding proteins-catabolite gene activator and regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase
3.1	2.0	A0ZK05	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH
6.0	22.4	W6FQB1	ATP synthase subunit b
6.0	8.3	A0ZEZ5	ATP synthase subunit alpha
9.2	17.8	A0ZEZ4	ATP synthase gamma chain
8.0	27.6	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
10.1	20.7	A0ZJ62	Apocytochrome f
4.0	9.9	A0ZF13	Allophycocyanin beta chain
3.1	1.5	A0ZBV9	ABC-1
4.7	5.1	A0ZB11	60 kDa chaperonin
4.1	13.6	W6FLI0	30S ribosomal protein S7
2.0	5.4	A0ZL44	30S ribosomal protein S4

a,b,c,d Como en tabla S1.

Tabla S3. Identificación proteómica de banda 5 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando quimotripsina.

#### **Banda 5 Quimotripsina**

Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
5.0	6.4	A0ZF30	Photosystem II protein D1
12.0	13.4	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
13.2	16.5	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
7.0	14.5	A0ZBQ1	Photosystem I reaction center subunit XI
2.0	16.0	A0ZBQ2	Photosystem I reaction center subunit IX
8.0	72.9	A0ZB92	Photosystem I reaction center subunit IV
18.4	43.2	A0ZLE1	Photosystem I reaction center subunit II
16.9	40.2	A0ZBQ3	Photosystem I reaction center PsaF, subunit III
48.4	21.1	A0ZAN9	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2
26.3	17.7	A0ZAP0	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1
3.7	20.9	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain

a,b,c,d Como en tabla S1.

Tabla S4. Identificación proteómica de banda 5 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando tripsina.

<b>Banda 5</b>		<b>Tripsina</b>	
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
2.1	2.5	A0ZG15	Uncharacterized protein
2.0	20.9	A0Z9N8	Photosystem II reaction center protein H
10.0	14.2	A0ZF30	Photosystem II protein D1
3.9	6.0	W6FL66	Photosystem II manganese-stabilizing prot (PsbO)
2.0	15.9	A0ZJX1	Photosystem II lipoprotein Psb27
10.0	12.2	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
12.0	12.3	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
15.7	41.6	A0ZBQ1	Photosystem I reaction center subunit XI
2.0	22.0	A0ZBQ2	Photosystem I reaction center subunit IX
7.7	48.6	A0ZB92	Photosystem I reaction center subunit IV
24.0	65.5	A0ZLE1	Photosystem I reaction center subunit II
7.0	19.5	A0ZBQ3	Photosystem I reaction center PsaF, subunit III
18.1	11.3	A0ZAN9	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2
18.1	12.4	A0ZAP0	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1
4.0	40.7	W6FPY2	Photosystem I iron-sulfur center subunit VII (PsaC)
11.7	16.9	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
4.8	4.1	A0ZME6	Outer membrane protein
2.2	3.2	W6FW28	Outer membrane protein
3.3	9.3	A0ZEJ7	Hypothetical glycine rich membrane prot DUF1517
2.0	9.5	A0ZJ61	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit
2.0	11.0	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha
7.7	34.7	W6FQB1	ATP synthase subunit b
4.3	17.8	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
10.4	20.7	A0ZJ62	Apocytochrome f

<sup>a,b,c,d</sup> Como en tabla S1.

Tabla S5. Identificación proteómica de banda 6 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando quimotripsina.

<b>Banda 6</b>		<b>Quimotripsina</b>	
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
2.2	1.8	W6FUH4	Response regulator receiver domain prot (CheY-like)
7.4	12.2	A0ZF30	Photosystem II protein D1
8.7	6.8	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
21.2	18.1	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
2.8	4.2	A0ZJS4	Periplasmic phosphate-binding prot of ABC transporter
2.5	2.4	A0ZME6	Outer membrane protein
2.8	1.1	A0Z9Q3	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase
3.4	7.5	A0ZKG9	Cytochrome b6-f complex subunit 4
6.2	13.0	A0ZKH0	Cytochrome b6
8.1	35.4	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha
28.5	59.5	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
39.4	50.2	A0ZJ62	Apocytochrome f
3.1	3.1	A0ZI91	Aldehyde dehydrogenase

<sup>a,b,c,d</sup> Como en tabla S1.

Tabla S6. Identificación proteómica de banda 6 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando tripsina

<b>Banda 6</b>		<b>Tripsina</b>	
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
6.1	3.6	A0ZF68	Valine--tRNA ligase
2.4	5.4	A0ZC16	Uncharacterized protein
2.4	7.0	A0ZA49	Transcriptional regulator AbrB
4.1	4.2	W6FXQ8	Putative porin
3.4	6.3	A0ZA67	Putative dioxygenase
4.3	7.3	A0ZN82	Phycobilisome rod linker polypeptide, phycocyanin-associated
3.0	13.2	A0ZF14	Phycobilisome 7.8 kDa linker polypeptide, allophycocyanin-associated, core
2.0	20.9	A0Z9N8	Photosystem II reaction center protein H
14.0	23.1	A0ZF30	Photosystem II protein D1
12.1	15.3	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
12.6	11.5	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
2.3	5.8	A0ZBQ1	Photosystem I reaction center subunit XI
4.0	3.4	A0ZAN9	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2
4.1	3.5	A0ZAP0	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1
8.4	8.9	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
2.2	0.0	A0ZG92	Outer membrane protein/protective antigen OMA87
3.0	4.0	A0ZEJ7	Hypothetical glycine rich membrane protein DUF1517

4.9	5.7	A0ZFY8	Geranylgeranyl hydrogenase BchP Geranylgeranyl reductase
3.7	3.5	A0ZKK0	FAD dependent oxidoreductase
3.4	8.1	A0ZKG9	Cytochrome b6-f complex subunit 4
17.7	52.0	A0ZJ61	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit
2.0	11.0	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha
2.0	5.9	A0ZEZ6	ATP synthase subunit delta
14.5	43.4	W6FQB1	ATP synthase subunit b
4.0	9.7	A0ZF00	ATP synthase subunit a
2.1	3.5	A0ZEZ4	ATP synthase gamma chain
16.0	43.6	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
21.9	31.5	A0ZJ62	Apocytochrome f
2.4	4.3	A0ZF13	Allophycocyanin beta chain
4.0	13.6	W6FLI0	30S ribosomal protein S7

a,b,c,d Como en tabla S1.

Tabla S7. Identificación proteómica de banda 7 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando quimotripsina.

<b>Banda 7</b>		<b>Quimotripsina</b>	
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
4.1	1.5	W6FS56	Two-component hybrid sensor and regulator
2.0	2.1	A0ZL55	Small GTP-binding protein domain
2.1	9.0	A0ZBE3	Sensory subunit of low CO <sub>2</sub> -induced prot complex, putative
2.4	0.0	W6FU08	Potassium efflux system KefA protein / Small-conductance mechanosensitive channel
25.2	30.8	A0ZF30	Photosystem II protein D1
27.2	24.7	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
48.9	35.4	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
2.0	4.4	A0ZHL1	Pentapeptide repeat family protein
17.5	54.9	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha
4.1	20.9	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain

a,b,c,d Como en tabla S1.

Tabla S8. Identificación proteómica de banda 7 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando tripsina

<b>Banda 7</b>		<b>Tripsina</b>	
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
6.1	4.1	A0ZF68	Valine--tRNA ligase
2.0	3.9	A0ZG03	Uncharacterized protein
2.0	6.2	A0ZA87	Uncharacterized protein
2.0	16.7	A0Z9P0	Sec-independent protein translocase protein TatA
4.1	7.3	A0ZN82	Phycobilisome rod linker polypeptide, phycocyanin-associated
6.0	47.1	A0ZF14	Phycobilisome 7.8 kDa linker, allophycocyanin-associated, core
4.0	23.9	A0Z9N8	Photosystem II reaction center protein H

16.0	25.3	A0ZF30	Photosystem II protein D1
18.0	20.7	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
25.8	25.3	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
2.0	9.4	W6FV47	Photosystem II 12 kDa extrinsic protein
11.7	15.2	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
4.2	2.8	A0ZG92	Outer membrane protein/protective antigen OMA87
2.0	2.6	A0ZDB9	Inner membrane protein translocase component YidC, short form OxaI-like protein
2.4	4.0	A0ZEJ7	Hypothetical glycine rich membrane protein DUF1517
2.1	2.5	A0ZFY8	Geranylgeranyl hydrogenase BchP Geranylgeranyl reductase
3.5	1.7	A0ZET8	DNA helicase
4.0	15.9	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha
2.1	4.1	W6FXR8	cAMP-binding proteins-catabolite gene activator and regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase
9.1	28.1	W6FQB1	ATP synthase subunit b
7.8	16.8	A0ZEZ4	ATP synthase gamma chain
10.4	29.4	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
4.0	9.6	A0ZJ62	Apocytochrome f
3.6	2.8	A0ZB11	60 kDa chaperonin
2.0	5.3	W6FLI0	30S ribosomal protein S7

<sup>a,b,c,d</sup> Como en tabla S1.

Tabla S9. Identificación proteómica de banda 8 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando quimotripsina.

<b>Banda 8</b>	<b>Quimotripsina</b>		
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
2.0	5.7	A0ZE06	Uncharacterized protein
2.0	2.7	A0ZE68	Putative RND efflux membrane fusion protein
2.5	1.1	A0ZF10	Phycobilisome core-membrane linker polypeptide
6.0	8.3	A0ZF30	Photosystem II protein D1
4.4	9.4	W6FL66	Photosystem II manganese-stabilizing protein (PsbO)
8.7	6.8	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
8.1	8.2	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
25.1	30.7	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
4.3	5.6	A0ZEF4	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase
2.0	4.4	A0ZHL1	Pentapeptide repeat family protein
0.0	1.6	A0ZBN8	Na exchanging protein
2.0	1.7	A0ZHK8	Na antiporter
6.0	0.9	A0ZE67	Multidrug efflux transporter MexF
4.2	7.6	W6FTH6	Lycopene cyclase, CruP type
5.2	3.5	A0ZE40	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase
2.0	0.0	A0ZLL9	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase
2.0	3.3	A0ZLL3	HlyD family secretion protein
2.0	7.3	A0ZJ61	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit

5.7	34.1	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha
2.2	2.0	A0ZK05	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH
7.0	13.3	A0ZEZ4	ATP synthase gamma chain
6.0	27.6	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
8.3	9.9	A0ZJU7	Ammonium transporter
8.8	16.5	A0ZAG8	ABC transporter ATP-binding protein

a,b,c,d Como en tabla S1.

Tabla S10. Identificación proteómica de banda 8 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando tripsina.

<b>Banda 8</b>		<b>Tripsina</b>	
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
2.2	3.2	A0ZI40	Ycf48-like protein
20.9	13.2	A0ZF68	Valine--tRNA ligase
10.2	13.1	W6FV48	Uncharacterized protein
10.2	15.6	A0Z9V9	Uncharacterized protein
4.3	1.2	A0ZDV0	Uncharacterized protein
4.1	19.3	A0ZA87	Uncharacterized protein
4.0	2.3	A0ZMS6	Uncharacterized protein
2.7	2.7	A0ZI64	Uncharacterized protein
2.6	4.5	A0ZA96	Uncharacterized protein
2.4	3.8	A0ZBI8	Uncharacterized protein
2.0	5.9	A0ZMJ1	Uncharacterized protein
2.0	0.0	W6FXA9	Uncharacterized protein
2.0	5.4	A0ZC16	Uncharacterized protein
2.0	8.2	W6FM68	Uncharacterized protein
2.7	2.7	A0ZAG7	Transport permease protein
2.1	7.4	A0ZIH4	Serine/threonine protein kinase
6.1	8.6	A0Z9K8	Ribulose biphosphate carboxylase large chain
4.1	5.5	A0ZG57	Protein translocase subunit SecY
6.9	9.3	A0ZBR5	Protein translocase subunit SecD
4.6	2.8	A0ZGE7	Protein translocase subunit SecA
2.0	3.9	A0ZIN0	PilT protein-like protein
8.1	36.2	W6FS94	Phycocyanin alpha chain
14.6	29.7	A0ZN82	Phycobilisome rod linker polypeptide, phycocyanin-associated
12.9	3.1	A0ZF10	Phycobilisome core-membrane linker polypeptide
4.1	26.5	A0ZF14	Phycobilisome 7.8 kDa linker, allophycocyanin-associated, core
11.4	20.0	A0ZF30	Photosystem II protein D1
18.1	57.9	W6FL66	Photosystem II manganese-stabilizing protein (PsbO)
2.1	15.9	A0ZJX1	Photosystem II lipoprotein Psb27
10.1	12.2	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
14.5	16.3	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
14.1	17.7	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
18.7	11.6	A0ZG92	Outer membrane protein/protective antigen OMA87
4.0	3.7	A0ZME6	Outer membrane protein

2.0	10.5	A0ZG77	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit N
4.0	11.7	A0ZMQ2	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit I
2.0	5.9	W6FTC7	NAD(P)H-quinone oxidoreductase chain J
2.6	2.6	A0ZE40	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase
6.1	13.3	W6FX86	Light-dependent protochlorophyllide reductase
2.3	1.3	W6FQ05	Isoleucine--tRNA ligase
4.3	7.9	A0ZDB9	Inner membrane protein translocase component YidC, short form OxaI-like protein
10.1	23.5	A0ZEJ7	Hypothetical glycine rich membrane protein DUF1517
4.2	2.5	A0ZK45	HlyD family secretion protein
4.7	5.7	A0ZFY8	Geranylgeranyl hydrogenase BchP Geranylgeranyl reductase
6.7	13.8	W6FHY4	Gamma-glutamyltransferase
4.4	7.5	A0ZET4	DNA segregation ATPase FtsK/SpoIIIE
2.0	2.1	A0ZCH4	DNA helicase (Rad25-like)
5.4	3.2	A0ZET8	DNA helicase
2.3	5.4	W6FI76	Cytochrome c oxidase subunit 2
2.0	6.3	A0ZKG9	Cytochrome b6-f complex subunit 4
4.0	19.0	A0ZJ61	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit
2.0	11.0	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha
7.8	6.7	W6FV44	Chaperone protein DnaK
4.8	8.7	W6FXR8	cAMP-binding proteins-catabolite gene activator and regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase
7.3	8.1	W6FR50	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH
6.7	6.7	A0ZK05	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH
3.9	1.7	A0ZL21	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpC / Negative regulator of genetic competence clcC/mecB
2.8	1.0	A0ZB73	ATPase, E1-E2 type
2.0	5.9	A0ZEZ6	ATP synthase subunit delta
10.0	35.7	W6FQB1	ATP synthase subunit b
4.2	5.7	A0ZEZ5	ATP synthase subunit alpha
4.0	9.7	A0ZF00	ATP synthase subunit a
18.5	30.5	A0ZEZ4	ATP synthase gamma chain
2.0	8.8	A0ZCG6	ATP synthase epsilon chain
12.1	35.0	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
13.7	26.7	A0ZJ62	Apocytochrome f
4.1	9.9	A0ZF13	Allophycocyanin beta chain
18.5	32.2	A0ZAG8	ABC transporter ATP-binding protein
10.5	13.9	A0ZB11	60 kDa chaperonin
2.4	8.5	A0ZG74	50S ribosomal protein L4
2.3	5.3	W6FLI0	30S ribosomal protein S7
3.0	10.5	W6G449	30S ribosomal protein S14

a,b,c,d Como en tabla S1.

Tabla S11. Identificación proteómica de banda 9 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando quimotripsina.

<b>Banda 9</b>	<b>Quimotripsina</b>		
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
0.0	1.6	W6FJE5	VCBS repeat domain protein
2.4	0.8	A0ZCF0	Uncharacterized protein
9.5	18.3	W6FL66	Photosystem II manganese-stabilizing protein (PsbO)
7.2	9.9	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
13.4	13.6	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
54.8	45.9	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
8.2	6.0	A0ZG92	Outer membrane protein/protective antigen OMA87
2.1	8.8	W6FTC7	NAD(P)H-quinone oxidoreductase chain J
5.0	10.0	A0ZDB9	Inner membrane protein translocase component YidC, short form OxaI-like protein
2.0	3.3	A0ZLL3	HlyD family secretion protein
2.3	8.4	A0ZKH0	Cytochrome b6
5.2	22.0	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha
4.4	7.6	A0ZEZ4	ATP synthase gamma chain
6.0	27.6	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
9.8	19.2	A0ZJ62	Apocytochrome f

<sup>a,b,c,d</sup> Como en tabla S1.

Tabla S12. Identificación proteómica de banda 9 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando tripsina.

<b>Banda 9</b>	<b>Tripsina</b>		
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
6.2	9.6	W6FV48	Uncharacterized protein
2.7	2.7	A0Z9V9	Uncharacterized protein
3.4	4.9	A0ZER7	Trigger factor
2.0	4.0	A0Z9K8	Ribulose biphosphate carboxylase large chain
3.1	2.3	A0ZBR5	Protein translocase subunit SecD
4.0	18.4	W6FS94	Phycocyanin alpha chain
2.9	3.8	A0ZN82	Phycobilisome rod linker polypeptide, phycocyanin-associated
6.0	9.7	A0ZF30	Photosystem II protein D1
10.0	38.3	W6FL66	Photosystem II manganese-stabilizing protein (PsbO)
8.0	12.2	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
6.8	5.1	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
8.0	11.5	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
14.8	10.6	A0ZG92	Outer membrane protein/protective antigen OMA87
4.5	7.9	A0ZDB9	Inner membrane protein translocase component YidC, short form OxaI-like protein
2.3	4.0	A0ZEJ7	Hypothetical glycine rich membrane protein DUF1517
4.1	5.7	A0ZFY8	Geranylgeranyl hydrogenase BchP Geranylgeranyl reductase

2.3	6.3	A0ZKG9	Cytochrome b6-f complex subunit 4
2.0	11.0	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha
2.0	3.0	A0ZBM4	Cell division protein FtsI/penicillin-binding protein 2
4.1	14.8	W6FQB1	ATP synthase subunit b
2.0	5.6	A0ZF00	ATP synthase subunit a
6.4	7.3	A0ZEZ4	ATP synthase gamma chain
7.2	27.0	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
10.8	16.8	A0ZJ62	Apocytochrome f
2.1	4.6	A0ZFM8	Alpha/beta hydrolase fold protein
2.1	2.4	A0ZB11	60 kDa chaperonin

a,b,c,d Como en tabla S1.

Tabla S13. Identificación proteómica de banda 10 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando quimotripsina.

<b>Banda 10</b>		<b>Quimotripsina</b>	
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
22.0	42.8	W6G1Z1	Phycocyanin beta chain
30.8	64.4	W6FS94	Phycocyanin alpha chain
4.0	4.9	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
4.0	4.1	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
9.3	36.0	A0ZBS1	Microcompartments protein
16.8	46.0	A0ZF12	Allophycocyanin alpha chain

a,b,c,d Como en tabla S1.

Tabla S14. Identificación proteómica de banda 10 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando tripsina.

<b>Banda 10</b>		<b>Tripsina</b>	
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
2.2	2.7	A0Z9V9	Uncharacterized protein
2.0	17.1	A0ZBH1	Putative regulator
6.1	5.1	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
10.1	11.9	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
4.3	2.5	A0ZG92	Outer membrane protein/protective antigen OMA87
4.2	11.7	W6FQB1	ATP synthase subunit b
3.3	3.5	A0ZEZ4	ATP synthase gamma chain
4.0	17.2	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
8.2	15.6	A0ZJ62	Apocytochrome f

a,b,c,d Como en tabla S1.

Tabla S15. Identificación proteómica de banda 11 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando quimotripsina.

<b>Banda 11 Quimotripsina</b>			
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
2.7	1.5	W6G7D7	Uncharacterized protein
2.0	4.7	W6FW56	Superfamily II DNA and RNA helicase
58.5	49.1	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
2.2	8.8	W6FTC7	NAD(P)H-quinone oxidoreductase chain J
4.9	0.9	A0Z9S3	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase
4.1	10.0	A0ZDB9	Inner membrane protein translocase component YidC, short form OxaI-like protein
4.2	5.3	A0ZHX5	Beta-Ig-H3/fasciclin
8.5	11.1	A0ZEZ5	ATP synthase subunit alpha
2.7	3.8	A0ZEZ4	ATP synthase gamma chain
4.2	20.9	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
2.0	8.7	A0ZF12	Allophycocyanin alpha chain

a,b,c,d Como en tabla S1.

Tabla S16. Identificación proteómica de banda 11 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando tripsina.

<b>Banda 11 Tripsina</b>			
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
4.0	5.4	W6FQJ4	Zinc metalloprotease
6.4	11.2	A0Z9V9	Uncharacterized protein
6.3	22.3	A0ZC16	Uncharacterized protein
2.8	13.1	A0ZA87	Uncharacterized protein
2.2	2.3	W6FLH7	Uncharacterized protein
2.0	4.9	A0ZBQ8	Uncharacterized protein
2.0	6.9	A0ZDC0	Uncharacterized protein
2.0	7.4	A0ZCM3	Transcriptional regulator
2.0	3.8	A0ZFH8	Superoxide dismutase
2.1	1.9	A0Z9K8	Ribulose biphosphate carboxylase large chain
2.0	5.2	A0ZCI5	Ribosomal subunit interface protein
8.3	31.8	W6G1Z1	Phycocyanin beta chain
8.7	36.2	W6FS94	Phycocyanin alpha chain
17.4	48.5	W6FL66	Photosystem II manganese-stabilizing protein (PsbO)
5.8	6.8	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
2.1	2.7	W6FKG6	Photosystem II CP47 protein (PsbB)
4.0	18.8	W6FV47	Photosystem II 12 kDa extrinsic protein
12.4	18.0	A0ZKS0	Photosynthetic II protein PsbC
3.2	2.5	A0ZfZ6	NADH dehydrogenase
3.9	5.6	W6FU17	NAD(P) transhydrogenase subunit beta
2.9	0.6	A0Z9S4	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase
3.7	7.3	W6FX86	Light-dependent protochlorophyllide reductase
6.1	12.1	A0ZDB9	Inner membrane protein translocase component YidC, short form OxaI-like protein

4.5	9.0	A0ZEJ7	Hypothetical glycine rich membrane protein DUF1517
2.0	2.5	A0ZFY8	Geranylgeranyl hydrogenase BchP Geranylgeranyl reductase
2.1	3.7	A0ZA81	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
2.0	11.0	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha
6.0	8.2	A0ZHX5	Beta-Ig-H3/fasciclin
2.8	1.8	A0ZK05	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH
2.0	5.9	A0ZEZ6	ATP synthase subunit delta
7.2	20.4	W6FQB1	ATP synthase subunit b
10.1	12.6	A0ZEZ5	ATP synthase subunit alpha
2.0	5.6	A0ZF00	ATP synthase subunit a
11.4	18.4	A0ZEZ4	ATP synthase gamma chain
6.9	27.0	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
4.5	7.0	A0ZGZ8	Alpha/beta hydrolase fold protein
2.0	4.6	A0ZFM8	Alpha/beta hydrolase fold protein
3.3	4.3	A0ZF13	Allophycocyanin beta chain
4.8	5.3	A0ZB11	60 kDa chaperonin

a,b,c,d Como en tabla S1.

Tabla S17. Identificación proteómica de banda 12 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando quimotripsina.

<b>Banda 12</b>		<b>Quimotripsina</b>	
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
4.1	12.9	A0ZC16	Uncharacterized protein
2.0	15.9	A0ZA87	Uncharacterized protein
2.0	4.7	W6FW56	Superfamily II DNA and RNA helicase
2.0	7.5	W6G1Z1	Phycocyanin beta chain
13.6	31.5	W6FL66	Photosystem II manganese-stabilizing protein (PsbO)
3.7	9.4	W6FV47	Photosystem II 12 kDa extrinsic protein
5.9	8.2	A0ZA59	Oligopeptide ABC transporter, periplasmic substrate-binding component
3.3	8.7	A0ZF59	Membrane protein, putative
2.1	0.0	A0Z9Q3	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase
3.8	7.9	A0ZDB9	Inner membrane protein translocase component YidC, short form OxaI-like protein
2.0	7.3	A0ZJ61	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit
5.4	34.1	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha
2.3	4.5	W6FLQ5	C-1'-hydroxylase CruF
17.9	24.7	A0ZCG7	ATP synthase subunit beta
6.1	8.1	A0ZEZ5	ATP synthase subunit alpha
2.3	7.4	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
6.0	26.1	A0ZF12	Allophycocyanin alpha chain

a,b,c,d Como en tabla S1.

Tabla S18. Identificación proteómica de banda 12 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando tripsina.

<b>Banda 12</b>		<b>Tripsina</b>	
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
2.0	5.4	A0ZC16	Uncharacterized protein
2.8	8.0	W6FS94	Phycocyanin alpha chain
10.2	36.2	W6FL66	Photosystem II manganese-stabilizing protein (PsbO)
2.0	11.0	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha
8.8	11.0	A0ZCG7	ATP synthase subunit beta
2.1	2.6	A0ZEZ5	ATP synthase subunit alpha
2.0	8.0	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain

<sup>a,b,c,d</sup> Como en tabla S1.

Tabla S19. Identificación proteómica de banda 13 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando quimotripsina.

<b>Banda 13</b>		<b>Quimotripsina</b>	
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
2.0	6.5	A0ZM86	Uncharacterized protein
2.0	5.1	A0ZC84	Thioredoxin-like protein
37.2	76.6	W6FL66	Photosystem II manganese-stabilizing protein (PsbO)
5.8	11.8	W6FYC7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase

<sup>a,b,c,d</sup> Como en tabla S1.

Tabla S20. Identificación proteómica de banda 13 en CN-PAGE de *Nodularia sp.* CCM9 utilizando tripsina.

<b>Banda 13</b>		<b>Tripsina</b>	
Unused	%Cov(95)	UniProt ID	Descripción
4.0	6.5	A0ZI40	Ycf48-like protein
6.0	17.3	A0ZC16	Uncharacterized protein
6.0	26.2	A0ZA87	Uncharacterized protein
2.0	5.0	A0Z9Y4	Uncharacterized protein
4.0	10.7	W6FJJ7	Translation initiation factor 2 (IF-2 GTPase)
8.3	39.3	W6G1Z1	Phycocyanin beta chain
6.0	25.8	W6FS94	Phycocyanin alpha chain
30.4	76.2	W6FL66	Photosystem II manganese-stabilizing protein (PsbO)
2.0	3.1	A0ZKS1	Photosystem II D2 protein
4.6	9.1	W6FYC7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
2.0	3.1	W6FYQ5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
2.0	5.6	A0ZMQ2	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit I
4.1	7.3	W6FX86	Light-dependent protochlorophyllide reductase
2.0	4.0	A0ZEJ7	Hypothetical glycine rich membrane protein DUF1517
5.5	11.7	A0ZH52	Ferric iron ABC transporter, iron-binding protein

2.0	11.0	A0ZI39	Cytochrome b559 subunit alpha
2.0	18.6	A0ZG33	CAB/ELIP/HLIP superfamily of proteins
11.5	22.0	A0ZEX5	Branched-chain amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein
4.7	18.9	A0ZEZ6	ATP synthase subunit delta
4.0	14.8	W6FQB1	ATP synthase subunit b
2.0	5.6	A0ZF00	ATP synthase subunit a
5.0	17.8	A0ZEZ8	ATP synthase B' chain
2.1	4.8	A0ZJ62	Apocytochrome f
4.6	9.9	A0ZF13	Allophycocyanin beta chain
2.1	9.9	A0ZF12	Allophycocyanin alpha chain
2.0	3.4	A0ZKL4	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase

<sup>a,b,c,d</sup> Como en tabla S1.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la obtención del grado de Doctor en Ciencias con la especialidad en Bioquímica No. 261984 (CVU 420840).

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, cuyas instalaciones y servicios fueron fundamentales para el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Marco Antonio Meraz Ríos por el apoyo brindado a todos en el Laboratorio 12.

A mis profesores y asesores, Dra. Angelica Rueda y Sánchez de la Vega, Dr. Luis E. González de la Vara, Dr. Heliodoro Celis Sandoval, Dr. J. Víctor Calderón Salinas, por sus consejos y apoyo académico durante todo mi posgrado.

A mi tutor, Dr. Carlos Gómez Lojero, por su excelente guía y generosidad al compartir su profundo conocimiento de bioquímica.

Al cuerpo técnico del Laboratorio 12, Lourdes E. Leyva Castillo y Jorge Zarco Mendoza por su apoyo en la implementación de los métodos y diseños experimentales del presente trabajo.

Al M. en C. Emmanuel Ríos Castro por su apoyo técnico en la implementación de los métodos de HPLC y espectrometría de masas.

Al cuerpo técnico del departamento de Bioquímica de Cinvestav-Zacatenco por su apoyo para el desarrollo del presente trabajo.

A todos mis familiares cuyo apoyo y amor ha hecho la diferencia en cada etapa de mi vida.

A mi esposa Fátima F. Mancilla Mejía por compartir su vida conmigo y apoyarme en cada momento.

A mi hija Vania Barrera Mancilla por ser tan linda y ayudarme, sin querer, a ser mejor cada día.

A todos mis compañeros y amigos por su amistad y apoyo.

GRACIAS.