



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**“Estudio comparativo de la remodelación del aparato  
fotosintético en *Synechococcus* PCC 7335 y *Nodularia* sp. CCM 9”**

**T E S I S**

Que presenta

**M. en C. Priscila Herrera Salgado**

Para la obtención de grado de

**Doctor en Ciencias Bioquímicas**

Director de la Tesis: **Dr. Carlos Gómez Lojero**

México, Distrito Federal

Enero, 2018



We care about our future, which is a continuation of our past. One good reason for trying to reconstruct ancient life is to manage better the biology of our planet today, so we need to set up some kind of reasonable logic for interpreting life of the past.

*History of Life*, Richard Cowen

## Resumen

---

Las cianobacterias son uno de los productores primarios de varios ecosistemas. Ellas utilizan 3 supercomplejos de la fotosíntesis: el ficobilisoma como antena extrínseca de membrana como captadora de luz y los fotosistemas I y II como antenas intrínsecas de membrana, próximas a los centros de reacción; estos complejos llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica que convierte el CO<sub>2</sub> y agua en carbohidratos y oxígeno. Por un largo tiempo se pensó que este tipo de fotosíntesis sólo se llevaba a cabo aprovechando la radiación de luz visible ( $\lambda = 400 - 700\text{nm}$ ) pero descubrimientos recientes mostraron dos nuevos tipos de clorofila presentes en las cianobacterias, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica: clorofila *f* y *d* (1). A diferencia de la clorofila *a* estas dos tienen la capacidad de absorber luz de longitudes de onda de 700-750nm, que se considera luz infrarroja cercana.

La aclimatación a la luz infrarroja cercana fue recientemente descubierta en 7 cianobacterias entre las cuales esta *Synechococcus* PCC 7335, *Leptolyngbya* JSC-1, *Calotrix* PCC 7507, *Fisherella thermalis* PCC 7521, *Chroococcidopsis thermalis* PCC 7203, *Chlorogloeopsis* PCC 9212 y *Halomicromena hongdechloris*. La fotoaclimatación al infrarrojo cercano incluye una remodelación de los fotosistemas I y II, así como del ficobilisoma. La fotoaclimatación al infrarrojo cercano se realiza mediante un conjunto de 21 genes que codifican subunidades del núcleo del ficobilisoma y los fotosistemas I y II. También cuenta con genes que codifican para enzimas de la síntesis de clorofila *f* y *d* (2-5).

El ficobilisoma está estructurado en un núcleo de aloficocianinas (AF) rodeado de brazos de ficocianina (FC) y en algunas especies de cianobacteria, también de ficoeritrina (FE), como en *Synechococcus* PCC 7335. Estos componentes están unidos mediante proteínas *linker* que ensamblan el núcleo de AF con la membrana tilacoide (L<sub>CM</sub>), otros agrupan a las FC con la AF (L<sub>RC</sub>) unos más colocan cara a cara a las FC (L<sub>R</sub><sup>FC</sup>) y unen ficoeritinas (L<sub>R</sub><sup>FE</sup>) (6,7). En las cianobacterias se diversificaron los sistemas captadores de luz, logrando una gran variedad de tipos de FBS: hemidiscoidales con núcleos bicilíndricos, tricilíndricos y pentacilíndricos; de brazos paralelos (solo visto en *Gloebacter violaceus*), y recientemente se han propuestos otros formados únicamente por cilindros de ficobiliproteínas que no tienen un núcleo como en los casos anteriores.

Las cianobacterias tienen muchas estrategias para adaptarse, muchas producen metabolitos secundarios de interés biológico, algunas se aclimatan a cambios de la intensidad luminosa por medio de la adaptación cromática complementaria (el FBS cambia los *rods* de FC a unos de FE) y algunas otras fijan nitrógeno. La enzima central para la fijación de nitrógeno, la nitrogenasa, es sensible al O<sub>2</sub>. Con el fin de evitar el daño oxidativo de esta enzima, las cianobacterias diazotróficas han desarrollado estrategias tales como separación temporal (*Synechococcus* PCC 7335 fija nitrógeno durante la noche y realiza fotosíntesis durante el día) o la separación espacial de la fijación de N<sub>2</sub> (heterocistos) de la fotosíntesis (células vegetativas) como en CCM 9.

En México, existen áreas con una gran variedad de cianobacterias como es Cuatro Ciénegas, Coahuila; Guerrero Negro, Baja California Sur; Puerto Peñasco, Sonora; Alchichica, Puebla y Bacalar, Quintana Roo. Cuatro Ciénegas, Coahuila, es un lugar único en la Tierra. Sus pozas multicolores conservan los mismos microorganismos de un mar primitivo que hubo hace miles de millones de años y son clave para comprender el origen y evolución de la vida en el planeta. En Cuatro Ciénegas se aisló la cianobacteria filamentosa CCM9 (Cultivo de Cuatro Ciénegas). En un estudio de CCM9 usado el análisis de la secuenciación del gen 16S rRNA y 16S-23S ITS (*Internal Transcribed Spacer*) se encontró un 98% y 88% de identidad, respectivamente, con los genes de *Nodularia spumigena* CCY9414. La conclusión obtenida de este análisis es que CCM9 es una especie cercana a *N. spumigena*, pero no es idéntica. El genoma de *N. spumigena* está completamente secuenciado, pero no ha sido anotado, por lo cual nos

permite realizar análisis *in silico* sobre su genoma y encontrar los genes del ficobilisoma, la fijación de nitrógeno y compararlos con experimentos en CCM 9.

Este trabajo se centra en la comparación de los tipos de ficobilisomas y las diferentes capacidades adaptativas a la luz en *Synechococcus* PCC 7335 y *Nodularia* sp. CCM9. *Synechococcus* PCC 7335 es una cianobacteria unicelular que mide alrededor de 2  $\mu\text{m}$  que presenta un FBS con núcleo tricilíndrico y con capacidad de aclimatación cromática complementaria (ACC), además de que es capaz de crecer en infrarrojo cercano. Fue aislada en Puerto Peñasco, Sonora por J. B. Waterbury de la concha de un caracol en 1971, en la zona intermareal de la costa donde existe una pleamar de 5m y una bajamar de hasta 1.5m. La otra cianobacteria con la que se trabajo fue *Nodularia* sp. CCM9 que es filamentosa con capacidad de diferenciar sus células a heterocistos para fijar nitrógeno ambiental y cuyo nicho ha sobrevivido al paso del tiempo sin ser prácticamente alterado siendo rico en azufre y pobre en nutrientes. Estas cianobacterias mostraron diferentes estrategias de aclimatación a la luz.

## Abstract

---

Cyanobacteria are one of the main groups of several ecosystems. They use 3 supercomplexes of photosynthesis: the phycobilisome as extrinsic membrane antenna as light capture and photosystems I and II as intrinsic membrane antennas, close to the reaction centers. These complexes carry out the oxygenic photosynthesis that converts CO<sub>2</sub> and water into carbohydrates and oxygen. For a long time, it was thought that this type of photosynthesis was only carried out taking advantage of visible light radiation ( $\lambda = 400 - 700\text{nm}$ ) but recent discoveries showed two new types of chlorophyll present in cyanobacteria, capable of performing oxygenic photosynthesis: chlorophyll f and d (1). Unlike chlorophyll these two can absorb light of wavelengths of 700-750nm, which is considered near infrared light.

Acclimation to far-red light was recently discovered in 7 cyanobacteria among which is *Synechococcus* PCC 7335, *Leptolyngbya* JSC-1, *Calotrix* PCC 7507, *Fisherella thermalis* PCC 7521, *Chroococcidopsis thermalis* PCC 7203, *Chlorogloeopsis* PCC 9212 and *Halomicromena hongdechloris*. Photoacclimation to far-red light includes a remodeling of photosystems I and II as well as phycobilisome. Photoacclimation to the far-red light is carried out by means of a set of 21 genes that encode core phycobilisome subunits and photosystems I and II. It also has genes that encode enzymes for the synthesis of chlorophyll f and d (2-5).

Phycobilisome is structured in a core of allophycocyanins (AF) surrounded by phycocyanin (FC) rods and in some species of cyanobacteria, also phycoerythrin (FE), as in *Synechococcus* PCC 7335. These components are linked by linker proteins that assemble the core of AF with the thylakoid membrane (L<sub>CM</sub>), others group to the FC with the AP (L<sub>RC</sub>) some more place face to face to the FC (L<sub>R</sub><sup>FC</sup>) and join phycoerythrins (L<sub>R</sub><sup>PE</sup>) (6,7). In the cyanobacteria, light capture systems were diversified, achieving a wide variety of types of FBS: hemidiscoidal with bicylindrical, tricylindrical and pentacylindrical core; of parallel rods (only seen in *Gloeobacter violaceus*), and recently, others have been proposed formed only by cylinders of phycobiliproteins that do not have a core as in the previous cases.

Cyanobacteria have many strategies to adapt, many produce secondary metabolites of biological interest, some are acclimatized to changes in light intensity by means of complementary chromatic adaptation (the FBS changes the rods of FC to ones of FE) and some others fix nitrogen. The central enzyme for nitrogen fixation, nitrogenase, is sensitive to O<sub>2</sub>. In order to avoid oxidative damage of this enzyme, diazotrophic cyanobacteria have developed strategies such as temporary separation (*Synechococcus* PCC 7335 fixes nitrogen at night and performs photosynthesis during the day) or spatial separation of N<sub>2</sub> fixation (heterocysts) of photosynthesis (vegetative cells) as in CCM 9.

In Mexico, there are areas with a immense variety of cyanobacteria such as Cuatro Ciénegas, Coahuila; Guerrero Negro, Baja California Sur; Puerto Peñasco, Sonora; Alchichica, Puebla and Bacalar, Quintana Roo. Cuatro Ciénegas, Coahuila, is a unique place on Earth. Its multi-colored pools preserve the same microorganisms of a primitive sea that existed billions of years ago and are key to understanding the origin and evolution of life on the planet. In Cuatro Ciénegas the filamentous cyanobacterium CCM9 (Cultivation of Cuatro Ciénegas, México) was isolated. In a study of CCM9 used the analysis of the sequencing of the gene 16S rRNA and 16S-23S ITS (Internal Transcribed Spacer) was found 98% and 88% identity, respectively, with the genes of *Nodularia spumigena* CCY9414. The conclusion obtained from this analysis is that CCM9 is a species close to *N. spumigena* but it is not identical. The genome of *N. spumigena* is completely sequenced, but it has not been annotated, which allows us to perform *in silico* analyzes on its genome and find the phycobilisome genes, nitrogen fixation and compare them with experiments in CCM 9.

This work focuses on the comparison of the types of phycobilisomes and the different adaptive capacities to light in *Synechococcus* PCC 7335 and *Nodularia* sp. CCM9. *Synechococcus* PCC 7335 is a unicellular cyanobacterium that measures around 2  $\mu\text{m}$  and has an FBS with a tricylindrical core and complementary chromatic acclimation capacity (ACC), as well as being able to grow in far-red light. It was isolated in Puerto Peñasco, Sonora by J. B. Waterbury from the shell of a snail in 1971, in the intertidal zone of the coast where there is a high tide of 5m and a low tide of up to 1.5m. The other cyanobacteria with which we worked was *Nodularia* sp. CCM9 which is filamentous with the ability to differentiate its cells to heterocists to fix environmental nitrogen and whose niche has survived the passage of time without being practically altered being rich in sulfur and poor in nutrients. These cyanobacteria showed different acclimation strategies to light.

## Abreviaturas

---

AF	Aloficocianina	L <sub>R</sub>	<i>Linker rod</i>
Apc-	Subunidad de aloficocianina	LR	Luz Roja
<i>apc-</i>	Genes de aloficocianina	L <sub>RC</sub>	<i>Linker rod core</i>
ACC	Aclimatación Cromática Complementaria	P680	Centro de reacción con epímeros de clorofila que absorben a 680nm
Chl	Clorofila	P700	Centro de reacción con epímeros de clorofila que absorben a 700nm
Cpc-	Subunidades de ficocianina	PCB	Ficocianobilina
<i>cpc-</i>	Genes de ficocianina	PEB	Ficoeritrobilina
Cpe-	Subunidades de ficoeritrina	PEC	Ficoeritrina tipo II
<i>cpe-</i>	Genes de ficoeritrina	Psa-	Subunidad del fotosistema I
CN-PAGE	<i>Clear-Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>	psa-	Gene de una subunidad del fotosistema I
FaRLiP	<i>Far-red light Photoacclimation</i>	Psb-	Subunidad del fotosistema II
FBP	Ficobiliproteínas	psb-	Gene de una subunidad del fotosistema II
FBS	Ficobilisoma	PUB	Ficourobilina
FC	Ficocianina	PXB	Ficobiliviolina
FC-FBS	Ficobilisoma rico en ficocianina	Q <sub>A</sub>	Plastoquinona estrechamente unida
FE	Ficoeritrina	Q <sub>B</sub>	Plastoquinona móvil
FE-FBS	Ficobilisomas rico en ficoeritrina	REP	Secuencia repetida de aminoácidos
FSI	Fotosistema I	RuBisCo	Ribulosa-1,5 -Bisfosfato Carboxilasa
FSII	Fotosistema II	SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
IR	Luz Infrarroja cercana	Yz	Tirosina (Tyr)
Isi-	<i>Iron stress induced</i>	ZZZ <sub>asa</sub>	Posición de los carbonos coplanar (C5-Z, C10-Z, C15-Z, C5-anti, C10-sin, C15-anti)
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>	ZZZ <sub>ssa</sub>	Posición de los carbonos semicircular (C5-Z, C10-Z, C15-Z, C5-sin, C10-sin, C15-anti)
LB	Luz Blanca		
L <sub>C</sub>	<i>Linker core</i>		
L <sub>CM</sub>	<i>Linker core membrane</i>		



Resumen.....	i
Abstract.....	iii
Abreviaturas .....	v
Indice .....	vii
<b>Índice de Figuras</b> .....	x
<b>Índice de Tablas</b> .....	xv
Introducción .....	1
<b>Fotosíntesis</b> .....	1
<b>Las Cianobacterias</b> .....	1
<b>Captura y Flujo de Energía, El Ficobilisoma</b> .....	2
<b>Fotosistema II</b> .....	5
<b>Fotosistema I</b> .....	8
<b>Clorofilas</b> .....	11
<b>Tipos de Aclimatación</b> .....	12
<b>Procedimiento Moderno para Identificar y Clasificar Cianobacterias</b> .....	16
<b>Justificación</b> .....	17
<i>Nodularia spumigena</i> CCM 9 .....	17
<i>Synechococcus</i> PCC 7335 .....	17
<b>Hipótesis</b> .....	17
<b>Objetivos</b> .....	18
<i>Nodularia spumigena</i> CCM 9 .....	18
<i>Synechococcus</i> PCC 7335 .....	18
<b>Objetivos Específicos</b> .....	18
<i>Nodularia spumigena</i> CCM 9.....	18
<i>Synechococcus</i> PCC 7335 .....	18
Materiales y Métodos .....	19
<b>Crecimiento de la cepa <i>Nodularia spumigena</i> CCM 9</b> .....	19
<b>Crecimiento de la cepa <i>Synechococcus</i> PCC 7335</b> .....	19
<b>Aislamiento de los FBS</b> .....	19

<b>Extracción de Membranas</b> .....	20
<b>Cuantificación de clorofila</b> .....	20
<b>Espectros de absorción</b> .....	20
<b>Electroforesis en geles claros nativos o no desnaturalizantes (CN-PAGE)</b> .....	21
<b>Electroforesis en geles von Jagow o desnaturalizantes (SDS-PAGE)</b> .....	21
<i>Tinción de Geles</i> .....	22
<i>Precipitación de Proteínas</i> .....	22
<i>Geles desnaturalizantes de von Jagow</i> .....	22
<i>Tinción de Geles</i> .....	23
<b>Digestión de proteínas</b> .....	23
<b>Extracción de Pigmentos y Purificación por RT-HPLC (ZipTip C4, millipore®)</b> .....	25
<b>Espectrometría de masas y análisis de datos</b> .....	25
<b>Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)</b> .....	25
<b>Extracción de DNA</b> .....	26
<b>PCR</b> .....	27
<b>Resultados</b> .....	28
<i>Nodularia spumigena CCM 9</i> .....	28
<i>Experimentos Previos Realizados</i> .....	28
<i>Análisis in silico</i> .....	29
<i>Identificación de los componentes del FBS de CCM 9</i> .....	30
<i>Synechococcus PCC 7335</i> .....	34
<i>Análisis in silico</i> .....	34
<i>Análisis de la secuencia de aminoácidos de las ficobiliproteínas</i> .....	38
<i>Condiciones experimentales para la aclimatación al cercano infrarrojo</i> .....	42
<i>Componentes del FBS aclimatado a luz infrarroja cercana</i> .....	43
<i>Identificación de los pigmentos en células en diferentes condiciones de crecimiento lumínico</i> .....	47
<i>Identificación de las subunidades expresadas de los fotosistemas I y II en diferentes condiciones de crecimiento lumínico</i> .....	50
<i>Transferencia de Energía</i> .....	58
<i>Modelo propuesto del ficobilisoma de core bicilíndrico</i> .....	59
<i>Modelo propuesto de los fotosistemas</i> .....	61
<b>Discusión</b> .....	62
<i>Nodularia spumigena CCM 9</i> .....	62
<i>Synechococcus PCC 7335</i> .....	63
<b>Conclusiones</b> .....	67

Perspectivas.....	67
<b>Referencias.....</b>	<b>68</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>74</b>
<b>Anexo A.....</b>	<b>74</b>
<b>Anexo B.....</b>	<b>76</b>
<b>Anexo C.....</b>	<b>79</b>
<b>Anexo D.....</b>	<b>81</b>
<b>Anexo E.....</b>	<b>86</b>

## Índice de Figuras

- Fig. 1 Esquema del ficobilisoma. LR – Linker rod, LRC – Linker rod-core, LC – Linker core, FSII – Dímero del Fotosistema II, AP - Aloficocianina, FC – Ficocianina, FE – Ficoeritrina, FSI – Fotosistema I .....2
- Fig. 2 Algunos tipos de ficobilisomas. A. Ficobilisoma bicilíndrico con rods de ficocianina. B. Ficobilisoma tricilíndrico con rods de ficocianina. C. Ficobilisoma pentacilíndrico con rods de ficocianina. ....3
- Fig. 3 Estructura química general de las ficobilinas y sus espectros de absorción y fluorescencia. A. estructura de las ficobilinas, la numeración de los carbonos es de acuerdo con la IUPAQ. En la tabla se muestran los sustituyentes de los sitios marcados como R y el tipo de enlace entre los carbonos. B. Ficocianobilina de ApcD en geometría ZZZasa o plana (Tang 2005). C. Ficocianobilina de ApcE en geometría ZZZssa o semicircular PDB:4XXI (Peng et al 2014). D. Espectro de absorción del ficobilisoma de la cianobacteria *Gloeobacter violaceus* (línea negra). 1. Ficoerobilina, 2. Ficoeritrobilina, 4. Ficocianina 6. Aloficocianina. La emisión (fluorescencia se éxito a 500 nm) de las tres ficobiliproteínas que lo conforman 3. Ficoeritrina 5. Ficocianina y 7. Aloficocianina. E. Espectros de absorción y fluorescencia de la ficocianina de *Synechococcus sp* PCC 7002. Exc. a 580 nm. F. Espectros de absorción y fluorescencia de la aloficocianina de *Arthrospira maxima*. Exc. a 600 nm. Todos los espectros fueron normalizados.....4
- Fig. 4 A. Dos fotosistemas conectados en serie a través del complejo de citocromos  $b_6f$ , conforman el llamado esquema “Z” en cianobacterias y cloroplastos de algas y plantas superiores. El FSII cuenta con un CR tipo II y tiene asociado un sistema productor de oxígeno (SPO). Cuatro átomos de manganeso (Mn) y un átomo de calcio (Ca) forman parte de SPO. El par especializado del CR, ( $P_{680}$ ) del FSII contiene clorofila *a*. La Feofitina (Feo) es el aceptor inicial del electrón;  $Q_A$ ,  $Q_B$  y  $Q_P$  son plastoquinonas.  $Q_P$  lleva los electrones al complejo de citocromos  $b_6f$  que es análogo a  $bc_1$ , antes descrito. Los electrones provenientes de cit  $b_6f$  son acarreados por la plastocianina (PC) o el cit *c* al PS1. El FSI cuenta con un centro de reacción tipo I ( $P_{700}$ ), cuyos componentes son el par especializado, formado por dímero de isómero de clorofila *a*.  $A_0$ , es clorofila *a*, aceptor inicial del electrón; FQ, filoquinona; (Fe-S)<sub>X</sub>, (Fe-S)<sub>A</sub>, (Fe-S)<sub>B</sub>, centros hierro azufre; Fd, ferredoxina; FNR, ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa. Flechas punteadas señalan vías alternativas para el flujo cíclico fotosintético. B. Centro de reacción (tipo I) del fotosistema I de *Thermosynechococcus elongatus* (PDB: 1JB0), el par especializado (donador primario del electrón) del "isómero de clorofila a" está representado en barras roja y azul (vista lateral). La primera clorofila, la filoquinona y los centros hierro azufre están representados por átomos en el modelo CPK (Corey, Pauling & Koltun). La segunda clorofila a representada en barras verdes es el aceptor primario del electrón. C. CR del fotosistema II de *Thermosynechococcus vulcanus* (PDB: 3WU2) y complejo manganeso-calcio. El sistema productor de oxígeno está representado en CPK.....6
- Fig. 5 Modelos estructural del dímero del PS II. La dirección de la vista es desde el lado del estroma hasta el plano de la membrana. Las hélices transmembrana de las subunidades de núcleo se muestran como columnas, mientras que las hélices de las subunidades pequeñas se muestran en una representación de cinta. Las subunidades D1 (azul) y D2 (rojo) forman el centro del complejo. Están flanqueadas en ambos lados por las proteínas de antena CP47 (amarillo) y CP43 (naranja). El dominio de trimerización contiene subunidades PsbM (cian) PsbL (Brown y Schoch) y PsbT (verde). Las hélices transmembrana expuestas a la membrana se asignan a las subunidades siguientes (partiendo de la hélice entre CP43 y la interfaz de dímero (PsbI), en dirección horaria alrededor del monómero): psbI (verde), PsbZ (azul), PsbK (luz roja), PsbN (Negro), PsbJ (gris), PsbE (oro), PsbF (bronce), Hélice no identificada (gris), PsbX (azul metálico), PsbH (gris). Parcialmente visibles son las proteínas lumenales PsbO (rosa oscuro), PsbU (rosa) y PsbV (Brown y Schoch) (para una mejor visión de estas subunidades ver Fig. 3A). Los cofactores están codificados por colores como en la figura 1. El modelo estructural basado en la estructura de PS II a una resolución de 3,5 °A (código de adhesión pdb 1S5L), más la hélice adicional de las estructuras 3,8 y 3,0 Å (2AXT).....7
- Fig. 6 La estructura trimérica de PS I de las cianobacterias. La dirección de la vista es desde el lado del estroma hasta el plano de la membrana. Las proteínas se muestran en una representación de la columna vertebral, con las hélices de las subunidades PsA (azul) y PsB (rojo), así como las subunidades PsA (cian), PsA (rosa oscuro) y PsA (verde) Mostrados como columnas. Las pequeñas hélices transmembrana se muestran en representación de la cinta y se asignan a las subunidades siguientes (comenzando con PsA en la interfase monómero / monómero y en sentido horario

alrededor del monómero más alto en el trímero): PsaM (marrón), PsaI (rosa), PsaL Naranja), PsaK (gris), PsaJ (oro), PsaF (amarillo) y PsaX, gris metálico). Las clorofilas (representadas en verde) están representadas por sus grupos de cabeza de cloro, se han omitido sus colas de fitol para mayor claridad; Los carotenoides se representan en naranja y los lípidos en cian. ....	9
Fig. 7 La numeración de los carbonos está de acuerdo con la IUPAQ. X y son los ejes moleculares para todas las clorofilas. En la tabla se muestran los sustituyentes de los sitios marcados como R y el tipo de enlace entre los carbonos 7 y 8. Qy es el eje del dipolo que denota el máximo de absorción en la zona del espectro rojo y Qx es el eje del dipolo del máximo de absorción en la zona del espectro azul (Soret) .....	11
Fig. 8 Sistema Rca y Cgi. En luz roja, el sistema Rca parece estar fosforilado debido a la actividad quinasa de RcaE, lo que conduce a una unión de RcaC altamente fosforilada. Esto conduce a la regulación positiva de los genes <i>cpcB2A2HID</i> y a la regulación negativa de la expresión de <i>cpeCDESTR</i> . En luz verde, RcaE aparentemente actúa como fosfatasa, lo que desvía el sistema de Rca hacia un estado defosforilado y disminuye la actividad de unión de RcaC. Los genes inducidos por la luz roja no se activan, mientras que el operón <i>cpeCDESTR</i> se expresa en un nivel alto que, mediante la producción de CpeR, conduce a la regulación positiva de otros genes inducidos por luz verde ( <i>cpeBA</i> ). Aunque no se muestra, también se sabe que los genes chl están bajo el control de los sistemas Rca y Cgi. RcaF, y quizás RcaC, pueden ser fosforilados en cierta medida por otras fuentes celulares independientemente de CCA. El sistema Cgi contribuye a la regulación de CA3 reprimiendo aún más la expresión de <i>cpeCDESTR</i> en luz roja. En luz verde, el sistema Cgi también puede mejorar ligeramente la expresión de este operón (indicado por la línea punteada). ....	12
Fig. 9 Ficobilisomas dependiendo el tipo de aclimatación. A. Aclimatación Cromática Complementaria, FE-FBS en luz blanca o verde, FC-FBS en luz roja. B. Rod-FBS, <i>Acaryochloris marina</i> y su adaptación a la luz infrarroja. C. Fotoaclimatación al infrarrojo cercano en <i>Halomicronema hongdechloris</i> . FC-FBS de <i>core</i> pentacilíndrico en luz blanca, Core-FBS en luz infrarroja. ....	13
Fig. 10 Grupos de genes similares al grupo de 21 genes en <i>Leptolyngbya</i> sp. JSC-1 se producen en otras 12 cianobacterias. Código de colores para los genes: genes <i>psa</i> para las subunidades centrales del fotosistema I (rojo); los genes <i>psb</i> para las subunidades centrales del fotosistema II (verde); genes <i>apc</i> para las subunidades centrales del FBS (azul); los genes <i>rfp</i> para el fitocromo (RfpA) y los reguladores de respuesta RfpB y RfpC (marrón); proteína hipotética conservada (Hyp, negro); todos los otros genes se muestran en gris. Tomada de Gan et al (2014). ....	14
Fig. 11 Mediciones de penetración de luz en suelo arenoso, mostrando el fuerte enriquecimiento para la luz roja lejana a medida que la profundidad aumenta de 0 (línea negra), 3 (línea roja) y 6 mm (línea marrón). Las barras horizontales a color denotan el rango de absorción de diferentes tipos de pigmentos. Las barras negras representan el rango de absorción de los centros de reacción cuyo máximo está indicado por el número. ....	15
Fig. 12 Árbol filogenético de cianobacterias endémicas de Cuatro Ciénegas (CCM) junto con una variedad de otras cianobacterias .....	28
Fig. 13 Fotografía de CCM 9 con una amplificación 100x. Se observan una cianobacteria filamentosas que contienen cada 12 o 13 células vegetativas un heterocistos. ....	28
Fig. 14 BLAST del 16S rRNA de CCM9 (Query) con <i>N. spumigena</i> CCY9414 mostrando una identidad del 98% y un gap del 0%. ....	29
Fig. 15 Operones de los genes del ficobilisoma y la nitrogenasa de <i>N. spumigena</i> CCY9414.....	30
Fig. 16 Secuencia de aminoácidos del <i>linker</i> ApcE de <i>n. spumigena</i> CCY9414. En amarillo se encuentra el dominio de FBP y en azul los REPs. ....	30
Fig. 17 A. Patrón de las fracciones (colectadas de arriba abajo) del gradiente de sacarosa. La absorción de cada fracción a 620nm se indica en círculos negros. La absorción a 650nm de cada fracción se muestra en triángulos azules. La actividad de FNR expresada en nmols de DCPIP•min <sup>-1</sup> •ml <sup>-1</sup> se indica en cuadrados rojos. B. Espectros de absorción de 340 a 740nm de las fracciones 5 (FBSs) y 10 (FBPs). Las células fueron crecidas en luz blanca continua	

(las 24 horas) con una intensidad (I) de  $10.9 \mu\text{mol}$  de fotones  $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  durante 7 días. Se cosecharon 3gr de células provenientes de 1.8L de medio BG110 .....31

Fig. 18 Análisis SDS-PAGE de las fracciones del gradiente de sacarosa mostrado en la Fig. 17. A. Geles del 10% de acrilamida teñido con azul de Coomassie de las fracciones del gradiente de sacarosa 3-10 de CCM9 crecida sin nitratos durante 7 días en luz blanca. La electroforesis fue parada cuando el azul de bromofenol llego a la parte final del gel. B. Primera dimensión: Gel de isoelectroenfoque de la fracción 3 corrida en una tira de pH 3-11. Segunda dimensión: SDS-PAGE de acrilamida al 14%. El barrido densitométrico se hizo para obtener los pesos moleculares y las cantidades relativas de las proteínas por medio del programa ImageJ. Los marcadores de peso molecular usados fueron: albumina sérica bovina (65kDa), ovoalbúmina (45kDa), quimiotripsinogeno (25kDa), lisozima (14.3kDa) y citocromo c de caballo (12.5kDa). .....32

Fig. 19 Mapa de los genes y modelos estructurales de la FBS de *Synechococcus* PCC 7335. Grupos de genes de ficobilisoma. E. Productos génicos asociados a proteínas de antena de función desconocida. Los números, por encima de los genes o grupos de genes, dan la posición de nucleótidos en el cromosoma. Los nombres de los genes se muestran en cursiva. La secuencia del *Synechococcus* sp. El genoma de PCC 7335 (ATCC 29403) era de NCBI, número de acceso NZ\_DS989904.1. Los programas en línea para BLAST análisis se obtuvieron utilizando NCBI y UniProt sitios web. ....36

Fig. 20 El árbol filogenético para ApcA, ApcB, ApcD y ApcF secuencias de varias cepas similares incluyen con FaRLiP o CCA similar a la de *Synechococcus* ATCC 29403. Secuencias se alinearon utilizando el Clustal X2 y un vecino de unión árbol se construyó a partir .....39

Fig. 21 La alineación de secuencias para las secuencias de ApcA, ApcB, ApcD y ApcF de diversas cepas incluye FaRLiP, CCA o similar a la de *Synechococcus* PCC 7335. Las secuencias se alinearon usando el Clustal X2. AP se cimentaron para sus clados: ApcB ( $\beta^{\text{AP}}$ ), ApcF ( $\beta^{\text{AP-18.9}}$ ), ApcA ( $\alpha^{\text{AP}}$ ), ApcD ( $\alpha^{\text{AP-C}}$ ) y nuevo ApcG (líneas de la izquierda). La línea negra derecha fue indicada ApcD y ApcG clusters. En la línea inferior se mostró una secuencia específica en la que se observa una notable diferencia en el grupo ApcG (residuos 58 a 88 aa). .....40

Fig. 22 Aislamiento y caracterización de FBS de células *Synechococcus* PCC 7335 cultivadas en luz blanca (WL) y luz roja (RL). A. Se representó gráficamente la absorbancia a 650 nm de cada fracción del gradiente de sacarosa de las células crecidas en WL (círculos) y RL (triángulos). B. Espectros de absorbancia de FBS; Fracción 5 para WL (línea continua) y fracción 6 para RL (línea discontinua). C. Un análisis de SDS-PAGE al 10% de las fracciones de FBS de los gradientes de sacarosa mostrados en A. Las fracciones 5 y 6 de WL y RL, respectivamente. Las bandas con números se sometieron a análisis MS / MS. ....41

Fig. 23 Espectros de emisión de la fuente de tungsteno (OSRAM 72 W, línea negra). La luz infrarroja cercana (línea discontinua roja) fue suministrada por una fuente de tungsteno y una combinación de filtros de plástico: azul claro y rojo Marius, 165 y 787 respectivamente (catálogo en <http://www.leefilters.com/>). Estos filtros transmiten principalmente longitudes de onda superiores a 650 nm. (Punteado). Los espectros se normalizaron. La intensidad medida fue  $12 \mu\text{mol}$  fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Los LEDs rojos (línea punteada azul) tienen una intensidad de  $4 \mu\text{mol}$  fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Todos los espectros fueron normalizados. ....42

Fig. 24 Aislamiento y caracterización de FBS de células *Synechococcus* PCC 7335 cultivadas en FRL. A. Centrifugación en gradiente de sacarosa de WCE a partir de células cultivadas en WL durante una semana y luego 3 semanas en luz FRL. B. Patrón de fracciones obtenidas del gradiente. Se indica la absorbancia de cada fracción a 650 nm (círculos) y 710 nm (triángulos). C. Espectro de absorción de las fracciones 4 y 12 del patrón. El espectro de la fracción 4 (línea continua) tiene un máximo de absorbancia a 576 nm y un segundo pico a 625 nm con un hombro a 650 nm. El espectro de la fracción 11 (línea discontinua) tiene picos de absorbancia a 711 nm, 650 nm y 567 nm. D. Un 10% de SDS-PAGE Coomassie teñido con Mw (marcadores de peso molecular, números anotados en la izquierda), fracciones 5 y 12 del patrón en BE A 10% SDS-PAGE con hhc (corazón del caballo citocromo) y fracciones 12. Los colores de las bandas indican las FBP. F. La centrifugación en gradiente de sacarosa de WCE a partir de células cultivadas en RL de una semana y durante tres semanas en FRL. G. Patrón de fracciones obtenidas del gradiente, se

indica la absorbancia de cada fracción a 650 nm (línea continua) y 711 nm (línea discontinua). H. Los espectros de absorción de las fracciones 5 (línea continua) y 11 (línea discontinua) son del patrón. ....	43
Fig. 25 Se midió el espectro de absorción de la fracción 11 (puntos) a temperatura ambiente. Los espectros de excitación de la fracción 11 registrados usando la longitud de onda de emisión a 725 nm (línea) se midieron a baja temperatura. Se midió el espectro de emisión de la fracción 11 registrada usando una longitud de onda de excitación de 620 nm (discontinua) a baja temperatura. Todos los espectros se normalizaron a 710 nm para facilitar la comparación. ....	44
Fig. 26 Primera dimensión: Gel de isoelectroenfoque de la fracción 3 corrida en una tira de pH 3-11. Segunda dimensión: SDS-PAGE de acrilamida al 14%. El barrido densitométrico se hizo para obtener los pesos moleculares y las cantidades relativas de las proteínas por medio del programa ImageJ. Los marcadores de peso molecular usados fueron: albumina sérica bovina (65kDa), ovoalbúmina (45kDa), quimiotripsinogeno (25kDa), lisozima (14.3kDa) y citocromo c de caballo (12.5kDa).....	46
Fig. 27 A. Ficobilisomas y ficobiliproteínas aisladas de células crecidas en luz blanca. Espectro de absorción de las fracciones 5 (línea negra) y 11 (líneas punteadas azul) desnaturalizadas en 8M urea a pH de 2. B. Ficobilisomas y ficobiliproteínas aisladas de células crecidas en luz blanca por 7 días y después pasadas a infrarrojo por 21 días. Espectro de absorción de las fracciones 5 (línea negra) y 11 (líneas punteadas azul) desnaturalizadas en 8M urea a pH de 2. C. Ficobilisomas y ficobiliproteínas aisladas de células crecidas en luz roja. Espectro de absorción de las fracciones 5 (línea negra) y 11 (líneas punteadas roja) desnaturalizadas en 8M urea a pH de 2. D. Ficobilisomas y ficobiliproteínas aisladas de células crecidas en luz roja por 7 días y después pasadas a infrarrojo por 21 días. Espectro de absorción de las fracciones 5 (línea negra) y 11 (líneas punteadas roja) desnaturalizadas en 8M urea a pH de 2.....	47
Fig. 28 Cromatogramas de los pigmentos liposolubles de células de <i>Synechococcus</i> PCC 7335 crecidas bajo distintas condiciones de luz. HPLC monitoreado a 440 nm, los pigmentos se extrajeron de las células crecidas en luz roja (A), blanca (B), luz roja a infrarroja (C) y luz blanca a infrarroja (D). También se monitorearon a 750 nm las clorofilas de las células crecidas en luz roja (E), blanca (F), luz roja a infrarroja (G) y luz blanca a infrarroja (H).....	48
Fig. 29 Las células de <i>Synechococcus</i> PCC 7335 crecidas luz roja/roja a infrarroja sintetizan clorofila <i>a</i> (A), <i>f</i> (B) y <i>f</i> (C).....	49
Fig. 30 Las células de <i>Synechococcus</i> PCC 7335 crecidas luz blanca (A) y luz blanca a infrarroja (B) sintetizan carotenos-- (línea negra) (línea roja). ....	49
Fig. 31 Membranas tilacoideas solubilizadas en 0.5% de DDM de <i>Synechococcus</i> PCC 7335 crecidas en luz blanca (A), luz roja (B). Las membranas tilacoideas contienen 32.54 µg/µL de clorofila <i>a</i> y fueron cargadas a un gel del 4 al 13% CN-PAGE como primera dimensión. La segunda dimensión de la banda de gel fue con un gel al 10% SDS-PAGE. Los marcadores de peso molecular usados son albumina (65kDa), ovoalbumina (45kDa), quimiotripsinogeno (25kDa), lisozima (14.3 kDa) y citocromo de caballo (12.5kDa).....	50
Fig. 32 Gen <i>psbB1</i> , Los números a la derecha pertenecen a la posición en el genoma. En letras azules están los aminoácidos que se pueden obtener de la secuencia del genoma de <i>Synechococcus</i> PCC 7335, en rojo los aminoácidos que encontramos al secuenciar la parte faltante del gen. Los nucleótidos en negritas y subrayado pertenecen a la posición de los primers. Los nucleótidos diferentes a la secuencia original se resaltan en magenta. Los nucleótidos de inicio de las proteínas <i>psbB1</i> y <i>psbT</i> (ATG-metionina) están en amarillo. ....	52
Fig. 33. Membranas tilacoideas solubilizadas en 0.5% de DDM de <i>Synechococcus</i> PCC 7335 crecidas 11 días en LR y 21 en FRL. Las membranas tilacoideas contienen 32.54 µg/µL de clorofila <i>a</i> y fueron cargadas a un gel del 4 al 13% CN-PAGE como primera dimensión. La segunda dimensión de la banda de gel fue con un gel al 10% SDS-PAGE. Los marcadores de peso molecular usados son albumina (65kDa), ovoalbumina (45kDa), quimiotripsinogeno (25kDa), lisozima (14.3 kDa) y citocromo de caballo (12.5kDa).....	53
Fig. 34 Espectro de las bandas de los geles claros nativos de membranas de células crecidas en luz roja (A) e infrarroja cercana (B).....	55

Fig. 35 Aislamiento y caracterización de los complejos membranales de células <i>Synechococcus</i> PCC 7335 cultivadas en FRL. A. Gradiente de sacarosa de membranas solubilizadas con 0,5% de DDM a partir de células cultivadas en LR durante una semana y luego 3 semanas en luz FRL. B. Patrón de fracciones obtenidas del gradiente. Se indica la absorbancia de cada fracción a 679 nm (círculos rojos) y 722 nm (cuadrados negros). La concentración de sacarosa se muestra en puntos azules. C. Espectro de absorción de las fracciones 3, 7 y 11. ....	55
Fig. 36 Aislamiento y caracterización de los complejos membranales de células <i>Synechococcus</i> PCC 7335 cultivadas en FRL. A. Gradiente de sacarosa de membranas solubilizadas con 2 % de DDM a partir de células cultivadas en LR durante una semana y luego 3 semanas en luz FRL. B. Patrón de fracciones obtenidas del gradiente. Se indica la absorbancia de cada fracción a 679 nm (círculos rojos) y 722 nm (cuadrados negros). La concentración de sacarosa se muestra en puntos azules. C. Espectro de absorción de las fracciones 3, 7 y 11. ....	56
Fig. 37 Bandas de las fracciones 8 y 13 de los SDS-PAGE al 10% de las membranas solubilizadas con 0.5% de DDM. ....	56
Fig. 38. Graficas de columnas apiladas sobre los resultados de masas obtenidos de las bandas analizadas de la fracción 8. El valor en el eje y es el porcentaje compartido del espectro total. El eje x muestra la proteína analizada. A. Subunidades del fotosistema II. B. Subunidades del fotosistema I. C. Subunidades del <i>core</i> del ficobilisoma .....	57
Fig. 39 Graficas de columnas apiladas sobre los resultados de masas obtenidos de las bandas analizadas de la fracción 14. El valor en el eje y es el porcentaje compartido del espectro total. El eje x muestra la proteína analizada. A. Subunidades del fotosistema I. B. Subunidades del fotosistema II. C. Subunidades del <i>core</i> del ficobilisoma .....	57
Fig. 40 . Espectros de Absorción y Fluorescencia. Se midió el espectro de absorción en células a temperatura ambiente (línea verde). A. Los espectros de emisión en células crecidas en luz blanca fueron registrados usando la longitud de onda de excitación a 550 nm (línea rosa) y 440 nm (línea azul), se midieron a baja temperatura. B. Los espectros de emisión en células crecidas en luz roja fueron registrados usando la longitud de onda de excitación a 590 nm (línea rosa) y 440 nm (línea azul), se midieron a baja temperatura. C. Los espectros de emisión en células crecidas en luz infrarroja cercana fueron registrados usando la longitud de onda de excitación a 520 nm (línea rosa) y 440 nm (línea azul), se midieron a baja temperatura .....	58
Fig. 41 Representación esquemática del <i>core</i> bicilíndrico de <i>Synechococcus</i> PCC 7335. $L_c^{7,8}$ se encuentra al final de los cuatro trímeros de AP (1 y 4). Los puntos representan la posición del dímero aceptor final $\alpha^{AP-E} \beta^{AP-2}$ . Las líneas diagonales representan la posición del dímero aceptor final $\alpha^{Lcm} \beta^{18.5}$ . ....	60
Fig. 42. Modelo del Centro de Reacción del Fotosistema II.....	61
Fig. 43 Modelo de los Fotosistemas de la Fotoaclimatación al Infrarrojo Cercano.....	61
Fig. 45 Comparación de las secuencias de ITS con tRNAs y ITS cortos de CCM 9 y <i>N. spumigena</i> CCY9414. Las flechas azules son el inicio y final del tRNA de isoleucina. Las flechas rojas son el inicio y final del tRNA de alanina. La línea rosa representa el inicio del 23S rRNA.....	74
Fig. 46 Alienamiento del gen <i>nifH</i> de CCM9 después de ser traducido a proteína y la proteína NifH de <i>N. spumigena</i> CCY9414. Oligonucleótidos utilizados Forward:TTCCAATTCGTCCATTGAGATGGGGGTGGG, Reverse:AGACAAATCGCTTTCTACGGTAAAGGTGGT.....	75
Fig. 47 Secuenciación del gen <i>apcE</i> de <i>Nodularia spumigena</i> CCM 9. A la izquierda se muestra el gel de agarosa al 1% de donde se cortaron las secuencias analizadas. A la derecha se muestran las zonas de la proteína que son idénticas al ApcE de <i>Nodularia spumigena</i> CCY 9414.....	75
Fig. 48 A. Estructuras de aminoácidos (de 57 a 87) a ApcA (1B33), ApcD (4PO5) y estructura predicha por modelado de Swiss-Model ExPASy a ApcG3 (B4WKI4), ApcG2 (B4WKI7) y ApcG1 (B4WKI9) con alineación de plantilla PDB = 4PO5. B. Estructuras de ficocianobilina dentro de ApcE por PDB = 4XXI y ApcD por PDB = 4PO5 (Tang 2005, Peng et al 2014). ....	81
Fig. 49 Análisis <i>in silico</i> de la proteína PsbA (Subunidad D1 del FSII) que muestra los sitios de unión a los componentes del centro de reacción. Los aminoácidos mostrados van desde el aa 61 hasta el 196. ....	81

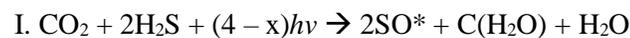
Fig. 50 Análisis in silico de la proteína PsbD2 (Subunidad D2 del FSII) que muestra los sitios de unión a los componentes del centro de reacción. Los aminoácidos mostrados van desde el aa 181 hasta el 205. ....	82
Fig. 51 Análisis in silico de la proteína PsaA2 (subunidad que ancla el centro de reacción del FSI). ....	83
Fig. 52 Análisis in silico de la proteína PsbB2 (Cp47). Las flechas negras muestran los sitios de unión con las clorofilas así como su configuración. Las flechas rojas muestran los cambios en los aminoácidos únicamente en las cepas con fotoaclimatación al infrarrojo cercano. ....	84
Fig. 53 Análisis in silico de la proteína PsbC2 (Cp43). Las flechas negras muestran los sitios de unión de las clorofilas y la configuración que posee el ligando. ....	85
Fig. 54 Espectro obtenido del análisis de masas de las clorofilas <i>f</i> (A) y <i>d</i> (B). ....	86

## Índice de Tablas

Tabla 1 Subunidades del fotosistema II, su función y coordinación de pigmentos. ....	8
Tabla 2 Subunidades del fotosistema I, su función y coordinación de pigmentos. ....	10
Tabla 3 La identificación proteómica en las bandas de SDS-PAGE de los componentes enlazadores del FBS hemidiscoidal (fracción 5) aislados de las células cultivadas durante una semana en LB. ....	33
Tabla 4 Genes relacionados a la fijación de nitrógeno. En rojo se muestran algunos genes responsables de la diferenciación a heterocistos. ....	37
Tabla 5 Identificación proteómica en SDS-PAGE de bandas con y sin tinción con azul Coomassie de las FBP que absorben a 711 nm (fracción 12) de células cultivadas durante una semana en luz blanca y tres semanas en FRL. ....	45
Tabla 6 La identificación proteómica en las bandas de SDS-PAGE de los componentes enlazadores del FBS hemidiscoidal (fracción 5) aislados de las células cultivadas durante una semana en LB y tres semanas en IR. ....	45
Tabla 7 Identificación proteómica de los spots del gel de segunda dimensión SDS-PAGE de las ficobiliproteínas de la fracción 11 de células crecidas una semana en luz roja y tres semanas en FLR. ....	46
Tabla 8 La identificación proteómica en las bandas de CN-PAGE de los componentes de los fotosistemas aislados de las células cultivadas durante 11 días en LB. ....	51
Tabla 9. La identificación proteómica en las bandas de CN-PAGE de los componentes de los fotosistemas aislados de las células cultivadas durante 11 días en LR. ....	51
Tabla 10. La identificación proteómica en las bandas de CN-PAGE de los componentes de los fotosistemas aislados de las células cultivadas durante 11 días en LR y 21 en FRL. ....	54

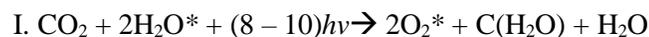
### Fotosíntesis

La fotosíntesis es el proceso de captura de la energía electromagnética por los organismos fotosintéticos y su conversión a energía química en forma de compuestos orgánicos reducidos. Existen dos tipos de procesos fotosintéticos óxido-reductores, que son la fotosíntesis oxigénica y la fotosíntesis anoxigénica. La primera es propia de las plantas superiores, las algas y las cianobacterias, donde el donador de electrones es el agua y como consecuencia, se desprende oxígeno. La fotosíntesis anoxigénica la realizan proteobacterias entre las que se encuentran las bacterias purpúreas y verdes del azufre, es decir *Chlorobiaceae* en las que el donador de electrones es el sulfuro de hidrógeno, y consecuentemente el elemento químico liberado no será oxígeno sino azufre que puede ser acumulado en el interior de la bacteria para continuar oxidándolo, o en su defecto, expulsarlo. La reacción de la fotosíntesis anoxigénica es:



La fotosíntesis oxigénica se produce en cianobacterias y en eucariotas unicelulares y multicelulares (algas), así como en las plantas. Aunque el proceso en estos organismos difiere en detalle, los mecanismos subyacentes son muy similares, y gran parte de nuestra comprensión actual de la fotosíntesis en las plantas se deriva de los estudios de los organismos más simples.

La ecuación general para la fotosíntesis describe una reacción de oxidación-reducción en el que el donador de electrones es el agua para la reducción  $CO_2$  a hidratos de carbono y liberación de oxígeno (Nelson, 2013). La ecuación general de la fotosíntesis oxigénica:



### Las Cianobacterias

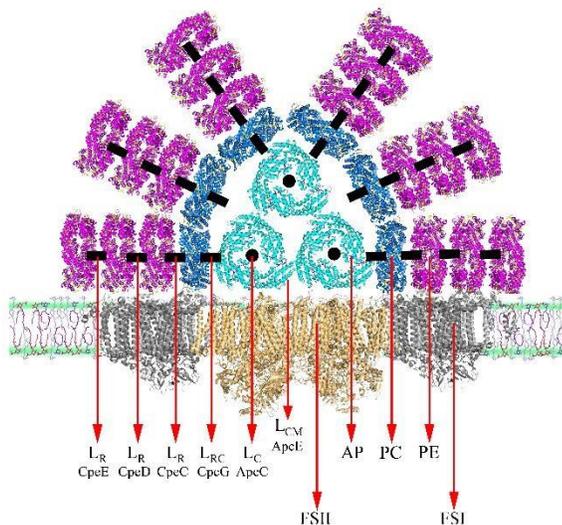
Las cianobacterias antes conocidas como algas verdeazuladas son un grupo de procariotas Gram-negativas. Aparecieron hace aproximadamente 2.4-2.2 millones de años en la Eón Proterozoico y se volvieron el organismo más exitoso de su entorno ya que fueron las primeras que usaron la fotosíntesis oxigénica, siendo las responsables de la atmósfera oxidante de la Tierra.

En la actualidad siguen jugando un papel importante como productores primarios y además en el ciclo del nitrógeno. Se pueden encontrar en hábitats que no son marinos; como son lagos hipersalinos, zonas de agua dulce, medios alcalinos, biosferas terrestres y ecosistemas extremófilos tales como Yellowstone, pero no en medios ácidos. En México existen zonas con una gran diversidad de cianobacterias, como en Cuatro Ciénegas, Coahuila, sitio con estromatolitos vivos (del griego *stroma* = cama/alfombra y *litho* = piedra) formados por parte de cianobacterias. Estas estructuras son consideradas fósiles; los más viejos encontrados están en Warrawoona, Australia. Bacalar, Quintana Roo es la zona más extensa con estromatolitos cubriendo un área de 13 km, el agua de esta región es dulce, pero con elevadas concentraciones de carbonatos donde se han encontrado a las cianobacterias del filo de *Homeothrix* y *Leptolyngbya* (Gischler E., 2008). Por otro lado, tenemos a Guerrero Negro, donde el agua se

caracteriza por ser “dura” o hipersalina y donde el filo más dominante es *Chloroflexi* (Ley et al. 2006). En la laguna alcalina de Alchichica, Puebla la variedad de cianobacterias varía dependiendo de la profundidad, las oscilatorias son predominantes en la superficie, mientras que las pleurocapsales se encontraron en los microbiolitos intermedios y profundos (Kazmierczak et al. 2012). Es interesante señalar que, en Puerto Peñasco, Sonora fue aislada de la concha de un caracol en la zona intermareal de la costa, *Synechococcus* PCC 7335 (Pasteur Culture Colection), por J.B. Waterbury en 1971, siendo una cianobacteria unicelular que presenta adaptación cromática complementaria y es capaz de fijar nitrógeno (Rippka et al. 1979).

Entre las múltiples capacidades de adaptación de las cianobacterias, algunas son capaces de regular su flotabilidad mediante vacuolas gaseosas intracelulares, producir polímeros extracelulares y metabolitos secundarios que resultan de interés biológico.

Las cianobacterias cuentan con un citoplasma que suele presentar estructuras reconocibles como los tilacoides (vesículas aplanadas) donde reside el aparato fotosintético luminoso, carboxisomas (donde se encuentra la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa -RuBisCO-, que realiza la fijación el CO<sub>2</sub>), gránulos de glucógeno, gránulos de cianoficina, gránulos de polifosfato y vesículas gasíferas (llenas de gas).



**Fig. 1** Esquema del ficobilisoma. LR – Linker rod, LRC – Linker rod-core, LC – Linker core, FSII – Dímero del Fotosistema II, AP – Aloficocianina, FC – Ficocianina, FE – Ficoeritrina, FSI – Fotosistema I

Los *linkers* se pueden clasificar por su peso molecular y función (Watanabe and Ikeuchi 2013) en *linkers* grandes *linker core membrane*, (>75 kDa, L<sub>CM</sub>) que ensamblan el *core* de AF y unen al FBS con el fotosistema II (FSII), *linkers* medianos (28-35 kDa) capaces de unir al *core* con los *rods* (*linker rod-core*, L<sub>RC</sub>) y los *linkers* que unen a las FBPs de los *rods* (*linkers rods*, L<sub>R</sub>) y finalmente los *linkers* pequeños unidos en los extremos de los cilindros (*Linker core*, L<sub>C</sub>; *linker rod capping*, L<sub>R</sub>) con pesos moleculares de 7-11 kDa. (Fig. 1).

El *linker core membrane* denominado L<sub>CM</sub> o ApeE se presenta en dos copias por cada FBS y es el único *linker* que cuenta con una ficocianobilina, siendo este uno de los aceptores finales del FBS. En su amino-terminal se encuentra el dominio de ‘ficobiliproteína’ y es donde se une la PCB, este dominio contiene una pequeña intersección conocida como dominio *loop*, el cual se ha sugerido es el responsable directo del anclaje del FBS con el FSII. Los siguientes dominios son conocidos como *Arms* (brazos) y REPs (secuencias repetidas de aminoácidos) encontrándose están alternados. Los dominios REPs se encuentran uniendo o acercando dos AF, mientras que los *Arms* son los ‘lazos’ hacia los cilindros de AF. El número de secuencias REPs dará como resultado el tamaño del

core del FBS, dos REPs ensamblara un core bicilíndrico, tres REPs darán un tricilíndrico y cuatro REPs un pentacilíndrico (Fig. 2). Un el caso especial es *Calothrix* sp. 7601, esta cuenta con un ApcE de cuatro REPs, pero solo se codifican tres de ellos, formando un FBS tricilíndrico (Sidler 1994,).

Además del dominio *loop* de ApcE, no se conocía algún otro *linker* capaz de unir el FBS con los fotosistemas. Recientemente, mediante un análisis de hidrofobicidad de los *linker* se observó que CpcG3 o CpcL cuenta con una secuencia hidrofóbica de ~20aa en el C-terminal que ningún otro *linker* tiene (Watanabe M. et al. 2014). Típicamente, los *linker* CpcG ensamblan el core con los *rods* como en caso de CpcG1, CpcG2 y CpcG4 en *Anabaena variabilis* (Chang et al. 2015). En *Synechocystis* sp. PCC 6803 al deletar CpcG, se encontró que CpcL está anclado al FSI (Kondo et al. 2007). En el caso de *Acaryochloris marina*, esta cianobacteria no cuenta con el *linker* ApcE, pero si con CpcL. Mediante micrografías y aislamiento de complejos membranales se encontró que CpcL une un FBS tipo *rods* al fotosistema II (Chen et al. 2009). Aún se encuentra en discusión a que fotosistema se uniría CpcL, lo que se sabe es que ensambla un nuevo tipo de ficobilisomas denominado *rod-FBS* y que tendría una función equivalente al *linker* ApcE, pero éste no cuenta con sitios de unión a un cromóforo.

Las proteínas que absorben y transfieren la energía son las ficobiliproteínas (FBPs) y sus características espectroscópicas estan dadas por varios factores: **I.** el tipo de cromóforo (Fig. 3A), las ficobilinas son tetrapirroles lineales de cadena abierta; estas pueden ser ficocianobilina (PCB,  $A_{max} = 600 - 670$  nm) en FC and AF, ficoeritrobilina (PEB,  $A_{max} = 540 - 575$  nm) en FE-I, ficourobilina (PUB,  $A_{max} = 490 - 500$  nm) en FE-II y ficobiliviolina (PXB,  $A_{max} = 575$  nm) en PEC (Glazer 1989, Scheer and Zhao, 2008). **II.** La cantidad de ficobilinas, las subunidades  $\alpha^{AF}$ ,  $\beta^{AF}$  y  $\alpha^{FC}$  tienen una

ficocianobilina, en cambio,  $\beta^{FC}$  contiene dos. Para las ficoeritrinas,  $\alpha^{FE}$  posee dos ficoeritrobilinas y  $\beta^{FE}$  solo una (Glaser M., 1992). **III.** El ambiente de la ficobilina, existen subunidades  $\alpha^{AF-B}$  (ApcD) y  $\beta^{18.5}$  (ApcF) que cuentan con una ficocianobilina y tienen una longitud de onda más larga de absorción y de fluorescencia (Peng et al. 2014). La PCB está localizada en ApcD (aa. 84) en la periferia del trímero y en ApcF (a.a.84) cerca de la cavidad interna. **IV.** El tipo de enlace ficobilina-proteína, el enlace de la ficobilina es mediante enlace(s) tioeter entre una cisteína covalentemente y la FBP (Grossman et al, 2003). En el caso de la ficoeritrobilina y la ficourobilina, éstas son capaces de realizar dos enlaces tioeter, mientras que la ficocianobilina y la ficobiliviolina solo uno. Recientemente se observó que puede existir "la ausencia de enlace" y el cromóforo aun así encuentra presente (Miao et al. 2016, Gindt et al. 1992). **V.** Las interacciones cromóforo-cromóforo (excitón), interacciones y cambios espectroscópicos

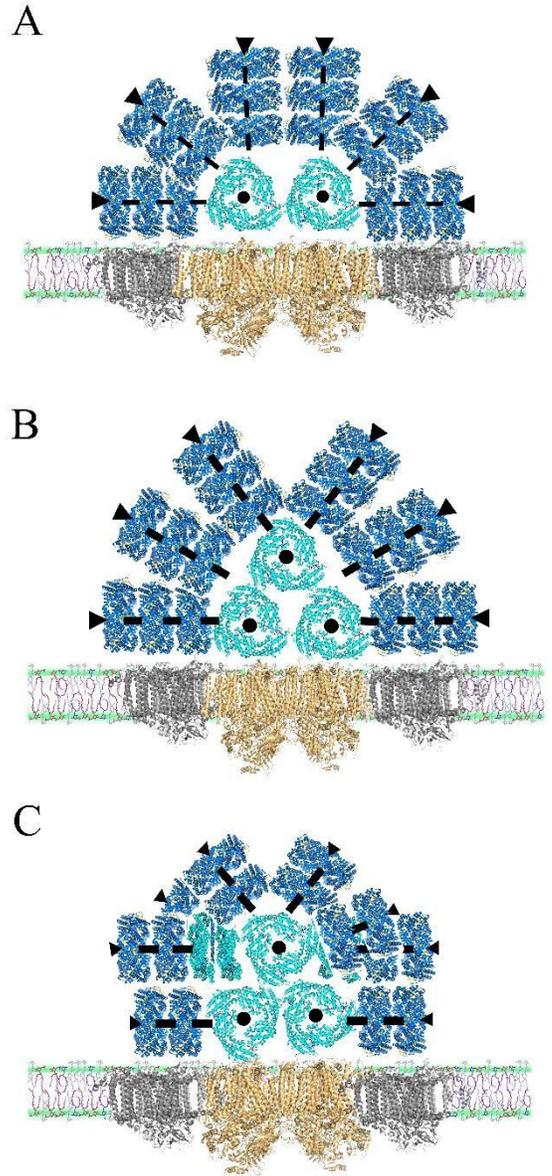
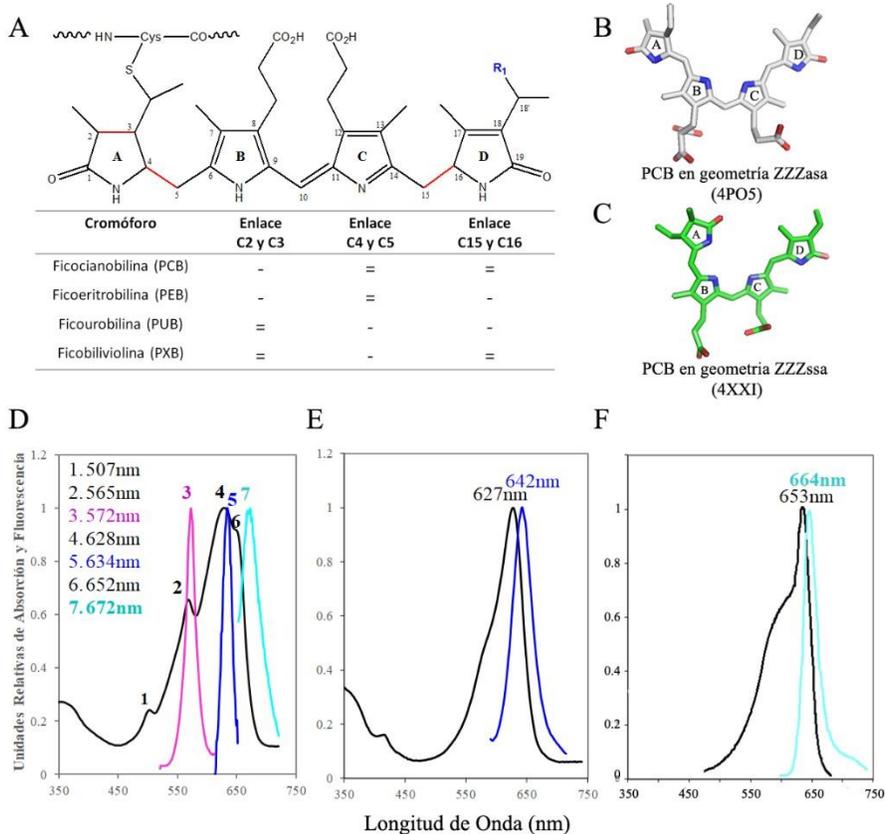


Fig. 2 Algunos tipos de ficobilisomas. A. Ficobilisoma bicilíndrico con rods de ficocianina. B. Ficobilisoma tricilíndrico con rods de ficocianina. C. Ficobilisoma pentacilíndrico con rods de ficocianina.



**Fig. 3** Estructura química general de las ficobilinas y sus espectros de absorción y fluorescencia. **A.** estructura de las ficobilinas, la numeración de los carbonos es de acuerdo con la IUPAC. En la tabla se muestran los sustituyentes de los sitios marcados como R y el tipo de enlace entre los carbonos. **B.** Ficocianobilina de ApcD en geometría ZZZasa o plana (Tang 2005). **C.** Ficocianobilina de ApcE en geometría ZZZssa o semicircular PDB:4XXI (Peng et al 2014). **D.** Espectro de absorción del ficobilisoma de la cianobacteria *Gloeobacter violaceus* (línea negra). 1. Ficourobilina, 2. Ficoeritrobilina, 4. Ficocianina 6. Aloficocianina. La emisión (fluorescencia se excita a 500 nm) de las tres ficobiliproteínas que lo conforman 3. Ficoeritrina 5. Ficocianina y 7. Aloficocianina. **E.** Espectros de absorción y fluorescencia de la ficocianina de *Synechococcus sp* PCC 7002. Exc. a 580 nm. **F.** Espectros de absorción y fluorescencia de la aloficocianina de *Arthrospira maxima*. Exc. a 600 nm. Todos los espectros fueron normalizados.

de  $L_{CM}$  (Tang et al. 2015).

Las ficobiliproteínas pueden clasificarse por la energía que absorben; de alta energía, absorben alrededor de 565nm: ficoeritrinas (PE, Fig. 3D); de energía intermedia, absorben alrededor de 620 nm: ficocianinas (PC, Fig. 3E); y de baja energía, absorben alrededor de 650 nm: las aloficocianinas (AF, Fig. 3F). La energía fluye desde los pigmentos de más alta energía, pasando por la FE hasta llegar a los pigmentos de menor energía AF y finalmente a los fotosistemas (Bryant et al. 1979). La estructura principal de las ficobiliproteínas es un heterodímero que tienen una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ . Las FBPs aisladas son trímeros  $(\alpha\beta)_3$  o hexámeros  $(\alpha\beta)_6$ . Estos heterómeros forman trímeros en el caso de AF ( $\alpha^{AF}, \beta^{AF}$ ) y hexámeros en los casos de FC ( $\alpha^{PC}, \beta^{PC}$ ) y FE ( $\alpha^{PE}, \beta^{PE}$ ); estos hexámeros son en realidad dos trímeros viéndose cara a cara.

Este conjunto de factores: ficobiliproteínas, su posición en el ficobilisoma y los *linkers* que las ensamblan, provoca que la “sintonización” de cada una pueda facilitar la transferencia eficiente de energía. De este modo, la transferencia de energía va de ficoeritrina (565nm)  $\rightarrow$  ficocianina (620nm)  $\rightarrow$  aloficocianina (650nm)  $\rightarrow$  el dominio

provocado por las perturbaciones en el ambiente en los trímeros y hexámeros, específicamente los *linker*, como en el caso del Lc (ApcC) que interacciona con una subunidad  $\alpha^{AF-B}$  (ApcD), que se considera el receptor final del fotosistema I. **VI.** La geometría general de los cromóforos, en el caso de PCB en todas las ficobiliproteínas su geometría es ZZZasa (C5-Z, C10-Z, C15-Z, C5-anti, C10-sin, C15-anti, Fig. 3B) o coplanar. Sin embargo, PCB en ApcE tiene un cambio de geometría a ZZZssa (C5-Z, C10-Z, C15-Z, C5-sin, C10-sin, C15-anti, Fig. 3C) o semicircular. Este cambio de geometría provoca que el máximo de absorción de PCB en ZZZssa tenga una absorción y fluorescencia desplazadas al infrarrojo. Uno de los factores del corrimiento es que la geometría ZZZssa es menos coplanar que ZZZasa. La geometría ZZZssa de la PCB y el apilado  $\pi$ - $\pi$  con una cuenta un Trp vecino son los responsables del desplazamiento espectral funcionalmente relevante

de FBP de ApcE (670nm) → fotosistema II (680nm) o bien ficoeritrina (565nm) → ficocianina (620nm) → aloficocianina (650nm) → ApcD (670nm) → fotosistema I (700nm).

## Fotosistema II

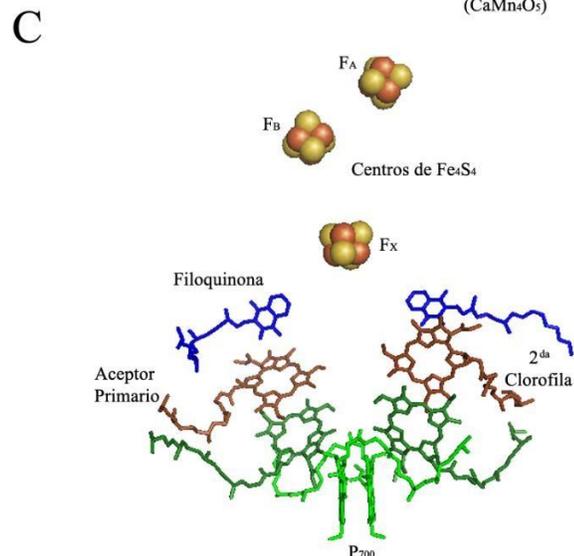
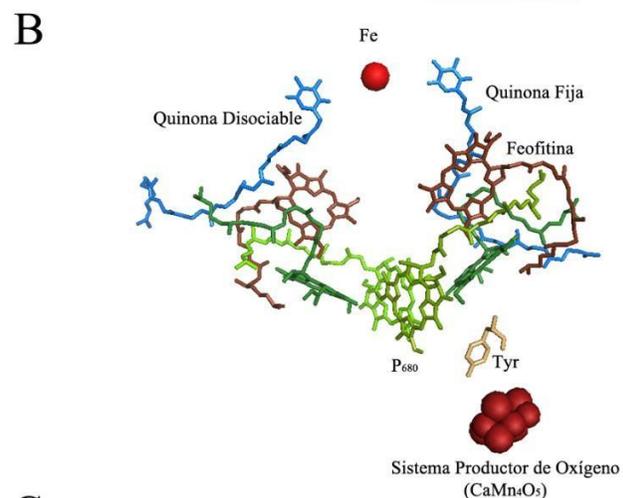
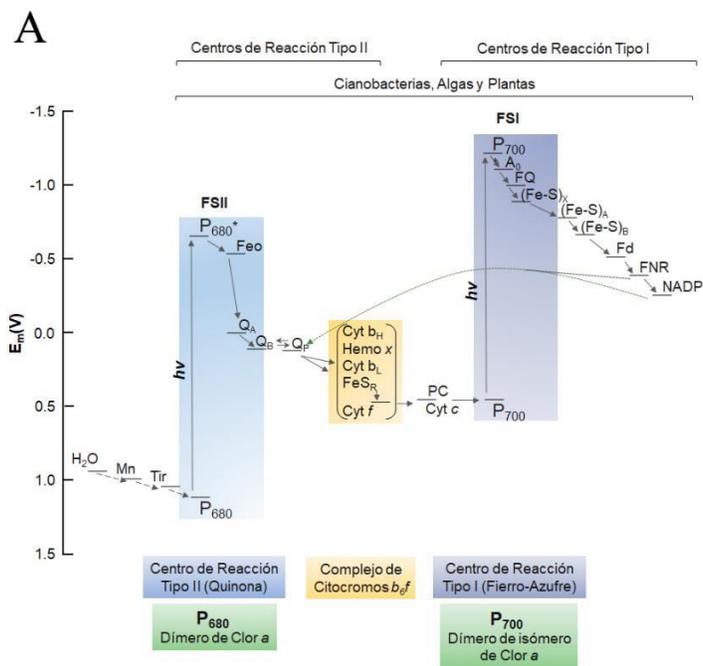
FSI y FSII son sistemas de antenas intrínsecas de membrana que contienen clorofilas y carotenoides, que capturan la energía luminosa del sol y utilizan esta energía para realizar una separación de carga a través de la membrana tilacoide. Además, ambos fotosistemas están funcionalmente conectados a complejos de antena periféricos, aumentando de ese modo la sección transversal de la captura de luz. Los ficobilisomas asociados a los fotosistemas sirven como complejos de antena extrínsecas de membrana en cianobacterias. Algunas cianobacterias marinas contienen complejos de antena intrínseca de membrana que pertenecen a la familia de proteínas PsaB. Bajo la deficiencia de hierro, un anillo de 18 pases transmembranales (IsiA) rodea el FSI y sirve como una antena periférica.

El fotosistema II proporciona los electrones para toda la cadena de transporte de electrones fotosintéticos. Captura la luz con un sistema de antena interna que consta de 35-36 clorofilas y 10-12 carotenoides. La energía de excitación se transfiere al centro del complejo donde tiene lugar la separación de carga. Cuatro electrones se extraen en cuatro sucesos de separación de carga posteriores de 2 moléculas de agua unidas al complejo que forma oxígeno. De este modo se liberan 4 protones en el lumen del tilacoide y el oxígeno se desarrolla como subproducto de la fotosíntesis. Los cofactores del FSII son (del lumen al estroma): el grupo  $Mn_4Ca$ , dos tirosinas activas redox (TyrZ y TyrD), el donante primario de electrones P680, dos clorofilas accesorias, dos feofitinas, una plastoquinona estrechamente unida ( $Q_A$ ) y una plastoquinona móvil ( $Q_B$ ). Después de dos etapas de transferencia de electrones subsiguientes, la  $Q_B$  doblemente reducida une dos protones y deja la bolsa de unión como  $PQH_2$ . El “hueco” vacío se vuelve a rellenar con una molécula de plastoquinona del *pool* de PQ (Fig. 4A y 4B). Por lo tanto, la ruta de transferencia de electrones en FSII se acepta generalmente como sigue:



Veintidós subunidades proteicas se han asignado a la estructura de FSII de *Thermosynechococcus elongatus*, al menos 19 proteínas de estas subunidades están presentes en cristales del FSII mediante un análisis espectroscópico de masas detallado (Kern et al. 2005). Dieciséis de estas subunidades son intrínsecas a la membrana, mientras que PsbO, PsbU y PsbV no contienen  $\alpha$  hélices transmembranales y se localizan en el lado luminal.

El núcleo de una unidad monomérica de FSII contiene el centro de reacción (RC) y radica en las subunidades D1 (PsbA) y D2 (PsbD), flanqueadas en ambos lados por las proteínas de antena de núcleo CP47 (PsbB) y CP43 (PsbD). La mayor parte de la masa extrínseca de FSII se localiza en el sitio luminal, formada por CP43, CP47 y las tres proteínas lumenales PsbO, PsbU y PsbV, que estabilizan el complejo generador de oxígeno en FSII. La proteína D1 contiene todos los cofactores de la cadena de transporte de electrones: el grupo Mn, la tirosina activa TyrZ, la clorofila del donante primario, P680, la clorofila accesorias, una feofitina y la plastoquinona móvil  $Q_B$ . La proteína D2 contiene TyrD, una tirosina que no está directamente involucrada en el transporte de electrones, pero puede ser importante para el fotoensamblado del grupo activo de Mn (Rutherford et al., 2004). Además, D2 coordina las clorofilas de P680, otra clorofila accesorias, otra feofitina y la plastoquinona  $Q_A$  estrechamente unida. Las dos subunidades más grandes de PS II son las proteínas de antena CP47 y CP43.



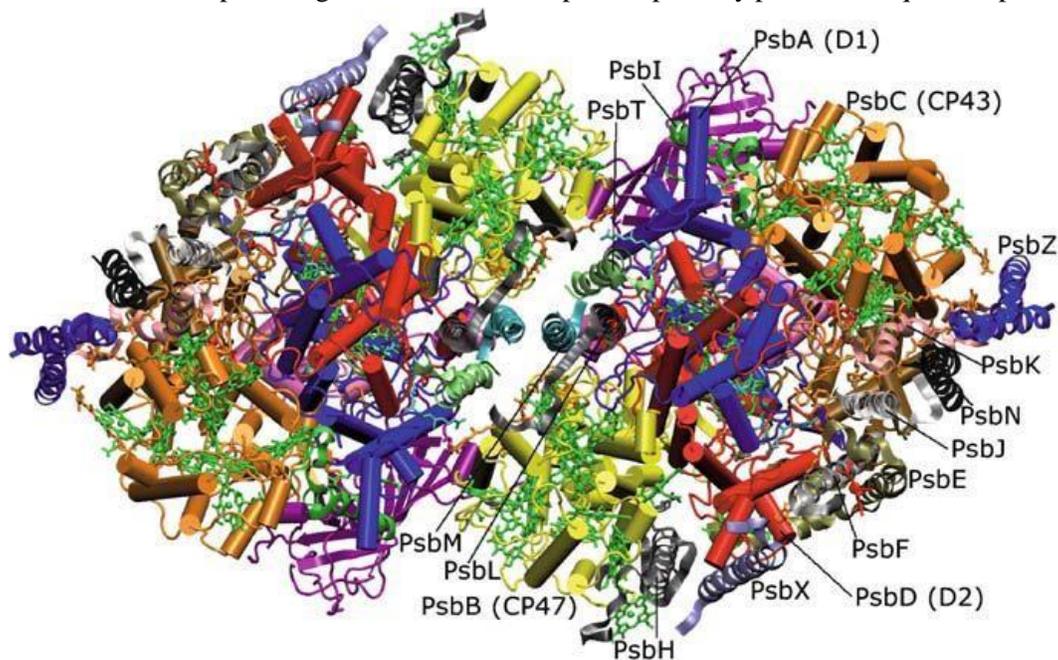
**Fig. 4 A.** Dos fotosistemas conectados en serie a través del complejo de citocromos  $b_6f$ , conforman el llamado esquema "Z" en cianobacterias y cloroplastos de algas y plantas superiores. El FSII cuenta con un CR tipo II y tiene asociado un sistema productor de oxígeno (SPO). Cuatro átomos de manganeso (Mn) y un átomo de calcio (Ca) forman parte de SPO. El par especializado del CR, ( $P_{680}$ ) del FSII contiene clorofila  $a$ . La Feofitina (Feo) es el aceptor inicial del electrón;  $Q_A$ ,  $Q_B$  y  $Q_P$  son plastoquinonas.  $Q_P$  lleva los electrones al complejo de citocromos  $b_6f$  que es análogo a  $bc_1$ , antes descrito. Los electrones provenientes de cit  $b_6f$  son acarreados por la plastocianina (PC) o el cit  $c$  al PS1. El FSI cuenta con un centro de reacción tipo I ( $P_{700}$ ), cuyos componentes son el par especializado, formado por dímero de isómero de clorofila  $a$ .  $A_0$ , es clorofila  $a$ , aceptor inicial del electrón; FQ, filoquinona;  $(Fe-S)_X$ ,  $(Fe-S)_A$ ,  $(Fe-S)_B$ , centros hierro azufre; Fd, ferredoxina; FNR, ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa. Flechas punteadas señalan vías alternativas para el flujo cíclico fotosintético. **B.** Centro de reacción (tipo I) del fotosistema I de *Thermosynechococcus elongatus* (PDB: 1J80), el par especializado (donador primario del electrón) del "isómero de clorofila  $a$ " está representado en barras roja y azul (vista lateral). La primera clorofila, la filoquinona y los centros hierro azufre están representados por átomos en el modelo CPK (Corey, Pauling & Koltun). La segunda clorofila  $a$  representada en barras verdes es el aceptor primario del electrón. **C.** CR del fotosistema II de *Thermosynechococcus vulcanus* (PDB: 3WU2) y complejo manganeso-calcio. El sistema productor de oxígeno está representado en CPK.

CP47 coordina 16 Chls y CP43 13 (o 14) clorofilas. Catorce hélices transmembrana están situadas periféricamente al núcleo central y han sido asignadas a las proteínas intrínsecas de la membrana. Pueden estar estructuralmente divididos en subunidades situadas en el dominio de dimerización y subunidades situadas en la periferia del dímero FSII. Tres hélices están situadas cerca del eje de simetría local entre los dímeros, representando PsbM, PsbT y PsbL. Una hélice está intercalada entre D1 y CP43, que se asigna a PsbI. Diez hélices se localizan en la membrana en la periferia de FSII, que se constituye de PsbE, PsbF, PsbH, PsbJ, PsbK y PsbZ. La densidad de electrones está mucho mejor definida en la interfase de dímeros que en la periferia de FSII, por lo que todavía existe un debate sobre la asignación de subunidad de tres de las hélices periféricas a las subunidades PsbN y PsbX (Ferreira et al., 2004). Sin embargo, PsbY, pero no PsbN, se ha identificado en los cristales PS II. Por lo tanto, no se puede excluir que PsbY también puede ser una de las tres hélices periféricas. Tres hélices se encuentran en el dominio de dimerización, que se asignan a las

subunidades PsbL, PsbM y PsbT. PsbM está más cerca del dominio de dimerización y forma interacciones con la subunidad PsbM del dímero vecino. PsbT también está cerca de la interfaz dímero-dímero y está situado en las proximidades de la primera hélice transmembrana de la proteína D1. La hélice asignada a PsbL se encuentra entre PsbM y PsbT. Las tres subunidades forman contactos con varios lípidos que llenan el espacio entre el dominio de dimerización y la abertura entre la proteína D1 y D2. (Fig. 5, Tabla 1).

La estructura más reciente de PS II reveló que hay dos carotenoides asociados con el centro del centro de reacción en PS II. Forman interacciones hidrofóbicas con la hélice transmembrana más externa del núcleo central de reacción, que corresponde a la primera hélice transmembrana de D1 y D2 (hélice a). Los carotenoides están situados muy cerca de clorofilas de D1 y D2. Se propuso que los carotenoides asociados a D2 podrían desempeñar un papel en el proceso de apagado no fotoquímico en PS II (Telfer 2002, 2005, Telfer et al., 2003).

Uno de los principales problemas que PS II ha tenido que afrontar desde la invención de la fotólisis del agua hace 2.500 millones de años es el proceso severo de fotodaño. Este fotodaño es causado por  $P680^+$ , que tiene el potencial redox alto de +1.1 V y puede formar fácilmente un estado triplete. Los detalles moleculares y mecanicistas del proceso de fotodaño en PS II es un tema de investigación actual. Podría ocurrir por oxidación directa de la proteína por  $P680^+$  o por la formación del triplete de P680 y posteriormente el singulete del oxígeno altamente reactivo. Durante el proceso de fotoinhibición, se produce un daño irreversible de una de las proteínas del núcleo de PS II, D1. D1 enlaza la mayoría de los cofactores de la cadena de transferencia de electrones, incluyendo el grupo de Mn, y tiene que ser reemplazado cada 30min en plantas de color brillante. El genoma de cianobacterias contiene tres copias del gen D1, denominado psbA1, psbA2 y psbA3. Aunque la expresión de psbA1



**Fig. 5** Modelos estructural del dímero del PS II. La dirección de la vista es desde el lado del estroma hasta el plano de la membrana. Las hélices transmembrana de las subunidades de núcleo se muestran como columnas, mientras que las hélices de las subunidades pequeñas se muestran en una representación de cinta. Las subunidades D1 (azul) y D2 (rojo) forman el centro del complejo. Están flanqueadas en ambos lados por las proteínas de antena CP47 (amarillo) y CP43 (naranja). El dominio de trimerización contiene subunidades PsbM (cian) PsbL (Brown y Schoch) y PsbT (verde). Las hélices transmembrana expuestas a la membrana se asignan a las subunidades siguientes (partiendo de la hélice entre CP43 y la interfaz de dímero (PsbI), en dirección horaria alrededor del monómero): psbI (verde), PsbZ (azul), PsbK (luz roja), PsbN (Negro), PsbJ (gris), PsbE (oro), PsbF (bronce), Hélice no identificada (gris), PsbX (azul metálico), PsbH (gris). Parcialmente visibles son las proteínas lumenales PsbO (rosa oscuro), PsbU (rosa) y PsbV (Brown y Schoch) (para una mejor visión de estas subunidades ver Fig. 3A). Los cofactores están codificados por colores como en la figura 1. El modelo estructural basado en la estructura de PS II a una resolución de 3,5 Å (código de adhesión pdb 1S5L), más la hélice adicional de las estructuras 3,8 y 3,0 Å (2AXT).

no se ha mostrado hasta ahora, sí se expresan *psbA2* y *psbA3* y su patrón de expresión se adapta en diferentes condiciones ambientales. Las funciones resumidas y el pigmento que coordina cada subunidad esta resumida en la Tabla 1.

**Tabla 1** Subunidades del fotosistema II, su función y coordinación de pigmentos.

Gene	Cofactor y/o función	Coordinación de	
		No. Hélices transmembranales	Pigmento
<i>psbB</i> (CP47)	Antena Proximal, Cercana a ApcE	6	16 Chl y 4 carotenos
<i>psbC</i> (CP43)	Antena proximal, Cercana a ApcE	6	13 Chl y 5 carotenos
<i>psbD</i> (D2)	Tyr, P680, Pheo, Chl accesoria, Q <sub>a</sub> , Cercana a ApcE	5	2 Chl y 2 carotenos
<i>psbA-I</i> (D1)	Cluster de Mn-Ca, tyr, Chl del primer donador, P680, chl accesoria, Pheo, Q <sub>b</sub>	5	2 Chl y 2 carotenos
<i>psbO</i>	Estabiliza el Cluster Mn-Ca	--	
<i>psbQ</i>		--	
<i>psbP</i>	Estabiliza el Cluster Mn-Ca	--	
<i>psbV</i>	Cit c 550	--	
<i>psbU</i>	Estabiliza el Cluster Mn-Ca	--	
<i>psb27</i>		--	
<i>psb28</i>	Estabiliza y recambio del FSII	--	
<i>psbE</i>	Cit b <sub>559</sub>	1	
<i>psbH</i>	Fosfoproteína y fotoprotección	1	
<i>psbZ</i>	Interacción entre la antena proximal y el centro de reacción	2	
<i>psbK</i>	Proteína del centro de reacción	1	
<i>psbF</i>	Cit b <sub>559</sub>	1	
<i>psbN</i>		--	
<i>psbL</i>	Participa en la dimerización del FSII	1	
<i>psbY</i>	Péptido de unión a Mn	1	
<i>psbX</i>	Sitio de unión de Q <sub>b</sub>	--	
<i>psbI</i>	Componente del centro de reacción, Cercana a ApcE	1	
<i>psbJ</i>	Proteína del centro de reacción	1	
<i>psbM</i>	Participa en la dimerización del FSII	1	
<i>psbT</i>		1	

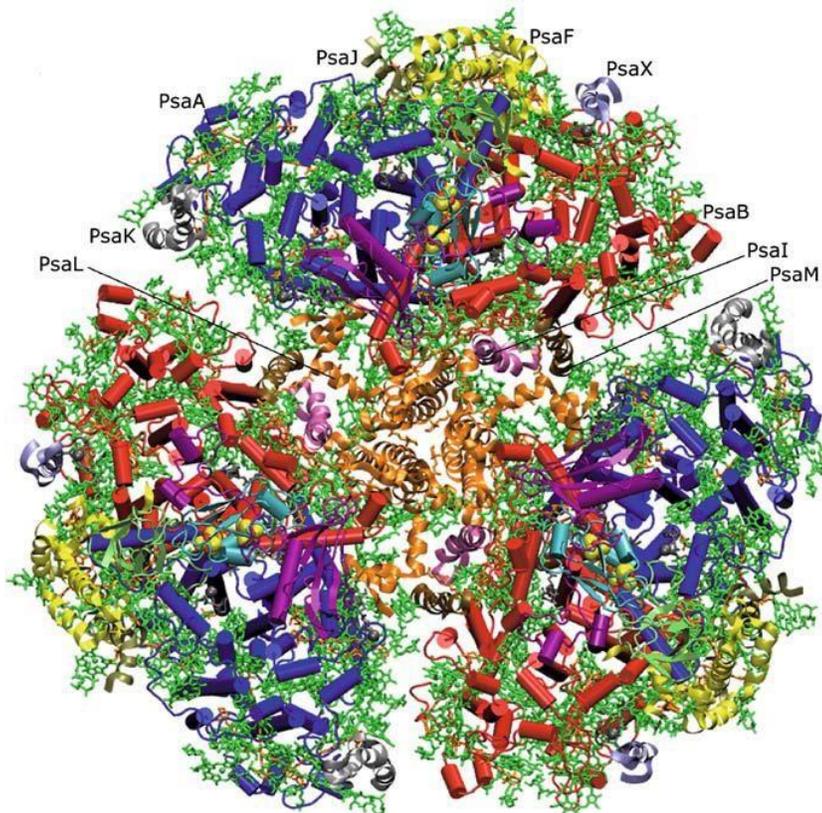
### Fotosistema I

Este núcleo de la FSII muestra fuertes similitudes con la disposición de las dos principales proteínas en FSI (PsaA y PsaB), lo que indica que FSI y FSII han evolucionado a partir de un antepasado común, como sugieren Schubert y colaboradores (Schubert et al. 1998). Una comparación de las partes intrínsecas de la membrana de PS I y II se muestra en la figura 4. Ninguna de las subunidades extrínsecas o pequeñas subunidades intrínsecas de membrana de PS I y II muestran semejanzas, lo que indica que se han añadido a las PS I y II después de la división evolutiva entre los dos fotosistemas. Como es evidente en la Fig. 1, la diferencia más notable entre ambos fotosistemas es la localización de las proteínas extrínsecas de la membrana. Considerando que FSI contiene tres proteínas extrínsecas en el lado estromal, que están involucrados en el acoplamiento de ferredoxina / flavodoxina, FSII no se extiende más de 10°A en el estroma.

Una unidad monomérica de FSI de cianobacterias consiste en 12 proteínas diferentes a las que 127 cofactores están unidos no covalentemente. Las proteínas grandes PsaA y PsaB forman un centro de reacción conjunta y un

complejo de antenas (núcleo) y se localizan en el centro de FSI. El núcleo PsaA / B está rodeado por siete proteínas pequeñas intrínsecas de membrana (PsaF, PsaI, PsaJ, PsaK, PsaL, PsaM Y PsaX). Tres subunidades (PsaC, PsaD y PsaE) forman la parte estromal de PS I que sobresale de la membrana. PsaA y PsaB tienen 11 hélices transmembrana cada una. PsaA y PsaB coordinan la mayoría de los cofactores de la cadena de transporte de electrones (P700, A0, A1 y FX) y 79 de las 90 clorofilas de la antena en PS I. Además, la mayoría de los carotenoides muestran interacciones hidrofóbicas con PsaA o PsaB. Ambas subunidades pueden dividirse estructuralmente en un dominio C-terminal que rodea la cadena de transporte de electrones y un dominio N-terminal que flanquea el centro de reacción en ambos lados y alberga el sistema de antena de núcleo del FSI. El dominio C-terminal no sólo coordina los cofactores de la cadena de transporte de electrones, sino que también coordina más de un tercio de las 90 clorofilas de la antena (25 de las 90 clorofilas de la antena están coordinadas por el dominio C-terminal de PsaA y PsaB). Mientras que las hélices transmembrana muestran una simetría casi perfecta de 2 veces entre PsaA y PsaB, los *loops* muestran sorprendentes diferencias en secuencia, longitud y elementos estructurales secundarios. Los *loops* inducen una asimetría en el sistema, que es funcionalmente importante para el acoplamiento de las tres subunidades del estroma, PsaC, PsaD y PsaE y las interacciones con las pequeñas subunidades intrínsecas de la membrana de FSI.

Siete pequeñas subunidades intrínsecas de membrana están rodeando el núcleo del dominio transmembrana de PS I: PsaF, PsaI, PsaJ, PsaK, PsaL, PsaM y PsaX. Los nombres reflejan su secuencia temporal de descubrimiento, y no están relacionados con su función o proximidad local. Hay dos dominios principales, donde se encuentran algunas de las subunidades pequeñas. Las tres subunidades PsaI, PsaL y PsaM se agrupan y forman el dominio de trimerización en la interfase monómero-monómero, mientras que las subunidades PsaF, PsaJ, PsaK y PsaX que están situadas en la superficie expuesta de la membrana del trímero del FSI.



**Fig. 6** La estructura trimérica de PS I de las cianobacterias. La dirección de la vista es desde el lado del estroma hasta el plano de la membrana. Las proteínas se muestran en una representación de la columna vertebral, con las hélices de las subunidades PsaA (azul) y PsaB (rojo), así como las subunidades PsaC (cian), PsaD (rosa oscuro) y PsaE (verde) mostrados como columnas. Las pequeñas hélices transmembrana se muestran en representación de la cinta y se asignan a las subunidades siguientes (comenzando con PsaM en la interfase monómero / monómero y en sentido horario alrededor del monómero más alto en el trímero): PsaM (marrón), PsaI (rosa), PsaL (naranja), PsaK (gris), PsaJ (oro), PsaF (amarillo) y PsaX, gris metálico). Las clorofilas (representadas en verde) están representadas por sus grupos de cabeza de cloro, se han omitido sus colas de fitol para mayor claridad; Los carotenoides se representan en naranja y los lípidos en cian.

PsaL contiene tres hélices transmembrana. Está situado en el centro del dominio de trimerización de PS I, formando así la mayor parte de los contactos entre los monómeros. Además, PsaL coordina tres antenas con clorofila *a* y forma contactos hidrófobos con carotenoides. Estas clorofilas pueden ser importantes para la transferencia de energía de excitación entre los monómeros (Sener et al., 2005). La mayoría de los sitios de contacto entre los monómeros en el dominio de trimerización son proporcionados por enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas dentro de las regiones de bucle. Tres sitios de unión de  $Ca^{2+}$  están situados en la interfase del trímero con ligandos proporcionados por subunidades PsaL de monómeros vecinos y PsaA, que pueden estabilizar adicionalmente el trímero. PsaI contiene sólo una hélice transmembrana, localizada en la vecindad de PsaL. La delección de PsaI desestabiliza el trímero, pero no obstaculiza completamente la formación de trímeros (Schluchter et al., 1996). PsaI no está involucrado en la coordinación *Clorofila a*, pero forma interacciones hidrófobas con moléculas de carotenoides mientras que forma pocos contactos con el monómero adyacente. PsaI se encuentra entre PsaL y PsaM. PsaM contiene sólo una hélice  $\alpha$  transmembrana y un MW de 3,4 kDa por lo que es la subunidad más pequeña de PS I. PsaM se localiza en la interfase monómero / monómero y forma interacciones con PsaI y PsaB. PsaM puede ser importante para la transferencia de energía de excitación entre los monómeros, ya que coordina una clorofila que pertenece funcionalmente al siguiente monómero (Sener et al., 2004).

La superficie expuesta al detergente de FSI alberga cuatro pequeñas subunidades de proteínas hidrófobas: PsaF, PsaJ, PsaK y PsaX. Estas cuatro proteínas estabilizan el sistema de antena de núcleo de PS I y pueden jugar un papel adicional en la formación de interacciones con el sistema de antena periférica intrínseca de la membrana, el anillo IsiA (Bibby et al., 2001). Mientras que PsaF, PsaJ y PsaK se conservan entre las cianobacterias y las plantas, PsaX es exclusivo de las cianobacterias termófilas. PsaF y PsaJ forman varios contactos con PsaA, PsaB y PsaE y están situados en el lado opuesto del dominio de la trimerización. PsaK se encuentra en la periferia de PsaA. Las funciones de cada subunidad y la cantidad de pigmentos que coordinan se muestran en la Tabla 2.

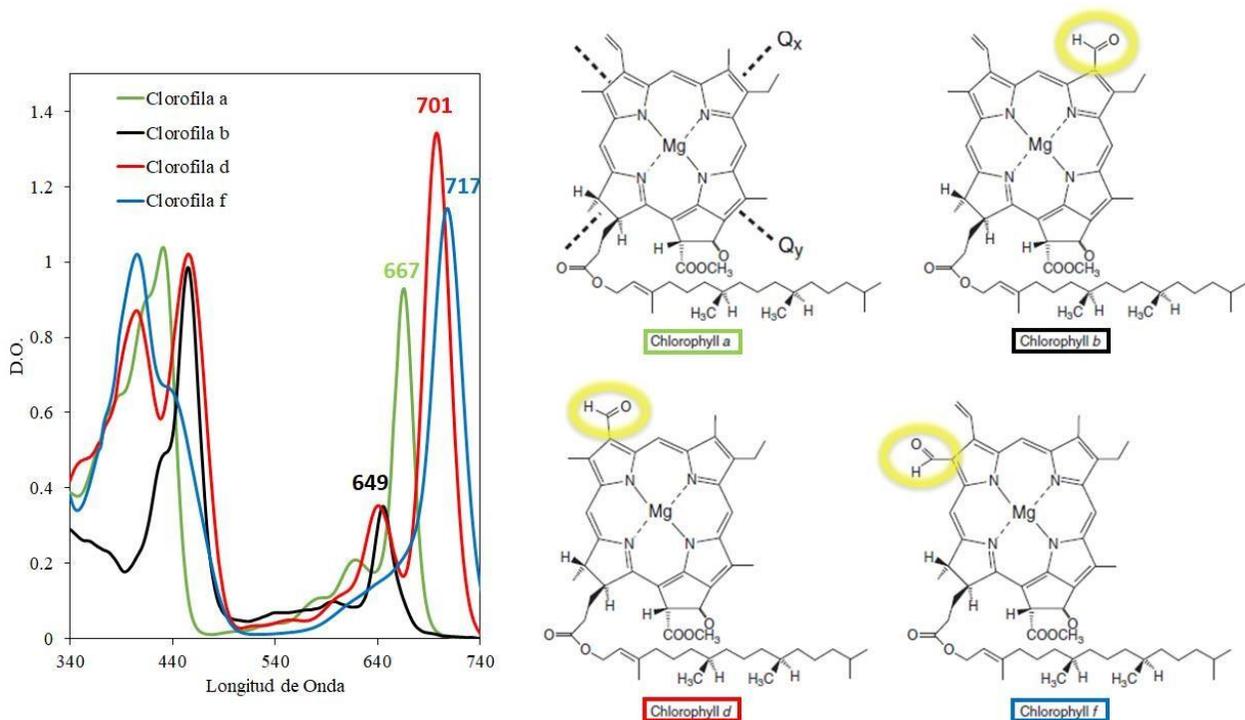
Tabla 2 Subunidades del fotosistema I, su función y coordinación de pigmentos.

Gene	Cofactor y/o función	No. Hélices transmembranales	Coordinación de Pigmento
psaA	P700, A0, A1, F <sub>x</sub> , Cercana con ApcD	11	79 Chl (junto con PsaB)
psaB	P700, A0, A1, F <sub>x</sub>	11	79 Chl (junto con PsaA)
psaL	Permite la formación del trímero	3	Coordina Chl <i>a</i> y carotenos para la transferencia de energía
psaF	Involucrado en el “docking” de la plastocianina, Cit C6	1	
psaD	Transferencia de electrones del FSI a la Ferredoxina, Cercana con ApcB	--	
psaM	Transferencia de energía entre monómeros	1	1 Chl
psaK	Contacto con carotenos, interacción con IsiA	2	2 Chl
psaC	Fa y Fb	--	
psaE	Involucrada en el “docking” con ferredoxina	--	
psaI	Interacción con carotenos. Ayuda a la estabilización del trímero	1	
psaJ	Transferencia de energía entre monómeros e interacción con proteínas IsiA	1	3 Chl

## Clorofilas

Las clorofilas son tetrapirroles con un magnesio central que desempeñan papeles esenciales en la fotosíntesis. Sus funciones incluyen recolectar energía luminosa, transferir energía de excitación a los centros de reacción y conducir reacciones de separación de carga en centros de reacción. Estas moléculas contienen estructuras de anillo de cinco miembros similares, con variaciones en las cadenas laterales. Tales alteraciones en los anillos o cadenas laterales en diversos tipos de clorofilas dan lugar a diferentes propiedades de absorción (Fig. 7). La presencia de varios tipos de clorofilas permite que los organismos fotosintéticos cosechen la luz solar en diferentes longitudes de onda y para mejorar la energía luminosa de entrada. La composición pigmentaria de los organismos fotosintéticos oxigenados refleja las propiedades espectrales en la superficie de la Tierra. (Fig. 7).

La primera molécula de clorofila fue aislada y reportada por los químicos franceses en 1817. Hasta la fecha se han caracterizado cinco clorofilas de organismos fotosintéticos naturales: clorofila *a* (Cl *a*), Cl *b*, Cl *c*, Cl *d*, y Cl *f*. Cl *a*, Cl *b* y Cl *c* fueron identificados en el siglo XIX, y Cl *d* fue reportado en 1943, más de 70 años después (5). La quinta clorofila, Cl *f* la que tiene un mayor corrimiento al infrarrojo y fue aislada de en estromatolitos e identificada en 2010 (6). La clorofila *a* es el más abundante de todos. Está presente en el centro de reacción y en los complejos de recolección de luz (LHCs) de casi todos los organismos fotosintéticos oxigénicos, incluyendo plantas superiores, algas y cianobacterias (8). La clorofila *b* es la segunda clorofila más abundante en organismos fotosintéticos oxigénicos. Funciona sólo como clorofila accesoria en el sistema de recolección de luz, pero no puede actuar como el llamado par especial en el centro de reacción (9). Hasta la fecha, la clorofila *c* no se ha encontrado en las plantas, pero está ampliamente distribuido en algas como las diatomeas (10). El descubrimiento de la clorofila *d* en *Acaryochloris marina* (13) confundió el pensamiento tradicional sobre las funciones esenciales de Cl *a* en los organismos fotosintéticos. La clorofila *d* es la única clorofila encontrada hasta la fecha que puede reemplazar todas las funciones de Cl *a* que implican la recolección de luz (14-17) y la separación de carga en los centros de reacción

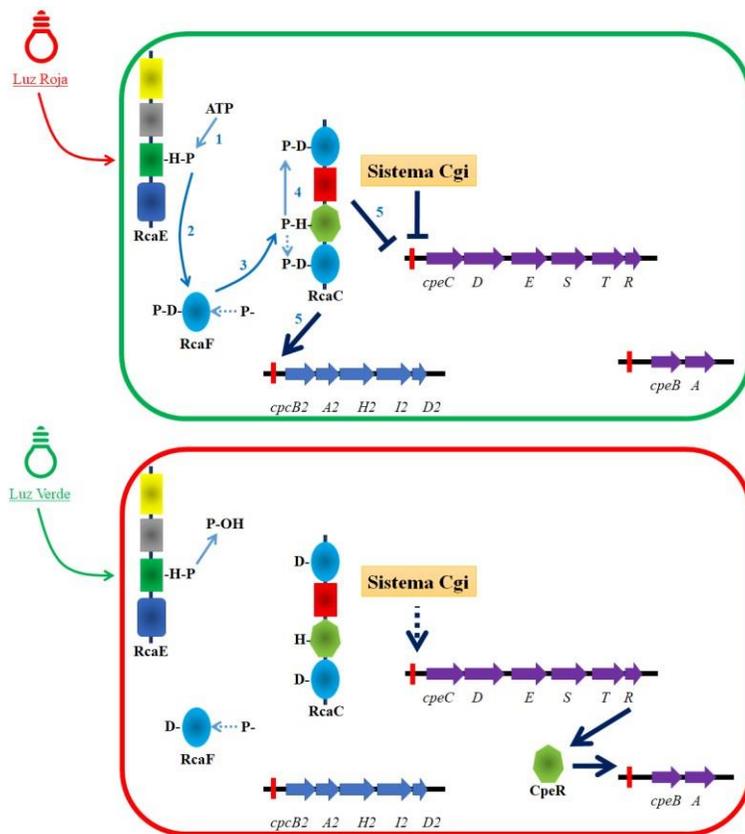


**Fig. 7** La numeración de los carbonos está de acuerdo con la IUPAQ. X y son los ejes moleculares para todas las clorofilas. En la tabla se muestran los sustituyentes de los sitios marcados como R y el tipo de enlace entre los carbonos 7 y 8. Qy es el eje del dipolo que denota el máximo de absorción en la zona del espectro rojo y Qx es el eje del dipolo del máximo de absorción en la zona del espectro azul (Soret)

(18-20). Las cianobacterias con contenido de Cl *d* se distribuyen ampliamente en nichos ecológicos enriquecidos con luz IR.

### Tipos de Aclimatación

La calidad y la intensidad de la luz son señales críticas en el ambiente que permiten a las cianobacterias detectar señales que informan la hora del día, el estado potencial de la energía intracelular y ayudar a la célula a afinar sus actividades metabólicas. Estas señales luminosas se detectan como diferentes intensidades y longitudes de onda. Existen numerosos fotorreceptores que detectan señales luminosas, incluyendo fitocromos, criptocromos, fototropinas, carotenoides, rodopsinas sensoriales, entre otras (Rockwell and Lagarias 2017). Los fotorreceptores son muy abundantes en las cianobacterias y regulan, por ejemplo, el ciclo circadiano mediante un fitocromo que se



**Fig. 8** Sistema Rca y Cgi. En luz roja, el sistema Rca parece estar fosforilado debido a la actividad quinasa de RcaE, lo que conduce a una unión de RcaC altamente fosforilada. Esto conduce a la regulación positiva de los genes *cpcB2A2HID* y a la regulación negativa de la expresión de *cpeCDEST*. En luz verde, RcaE aparentemente actúa como fosfatasa, lo que desvía el sistema de Rca hacia un estado defosforilado y disminuye la actividad de unión de RcaC. Los genes inducidos por la luz roja no se activan, mientras que el operón *cpeCDEST* se expresa en un nivel alto que, mediante la producción de CpeR, conduce a la regulación positiva de otros genes inducidos por luz verde (*cpeBA*). Aunque no se muestra, también se sabe que los genes *chl* están bajo el control de los sistemas Rca y Cgi. RcaF, y quizás RcaC, pueden ser fosforilados en cierta medida por otras fuentes celulares independientemente de CCA. El sistema Cgi contribuye a la regulación de CA3 reprimiendo aún más la expresión de *cpeCDEST* en luz roja. En luz verde, el sistema Cgi también puede mejorar ligeramente la expresión de este operón (indicado por la línea punteada).

denomina *cikA*, *circadian input kinase A* (Mutsuda et al. 2003). Estos fotorreceptores absorben luz roja e infrarroja, que las activa o inactiva, respectivamente.

Otra de las regulaciones por un fotorreceptor es el cambio en la pigmentación en respuesta a la calidad de la luz, este fenómeno se ha denominado aclimatación cromática. La aclimatación cromática en las cianobacterias se clasifica en cinco grupos (Tandeau de Marsac 1977): Grupo I, cianobacterias que no alteran la estructura de FBS (Krogmann et al. 2007); Grupo II, las cianobacterias pueden alterar los niveles de FE con una cantidad constante de FC (Glazer 1989); Grupo III, la aclimatación cromática complementaria (ACC), las cianobacterias que sintetizan FBS de *nov* al cambiar la composición de los *rods*, ricos en FE cuando hay luz blanca o verde y ricos en FC cuando crecen en luz roja (Grossman et al. 1993, Kehoe et al. 2006). El Grupo IV se añadió después del descubrimiento y caracterización de *Synechococcus marinus*. Esta aclimatación consiste en el cambio del cromóforo en algunas FBP periféricas (Everroad et al. 2006). El Grupo V es el descubrimiento más reciente, y consiste en la fotoaclimatación al infrarrojo cercano (*Far-Red Light Photoacclimation*, FaRLiP), donde algunas cianobacterias realizan fotosíntesis oxigenada a longitudes de onda > 700nm

(Gan et al. 2014). Las dos aclimataciones de interés en este trabajo son ACC y FaRLiP, y serán las únicas en las que se profundice.

Las cianobacterias con aclimatación cromática complementaria tienen la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica a distintos rangos de luz visible (400-700nm), mediante la síntesis de *novo* del FBS. Para este proceso son necesarios clusters de genes para el ensamblaje de dos tipos de *rods* del ficobilisoma. Durante luz roja se enciende el clúster *cpcB<sup>i</sup>A<sup>i</sup>HID* para tener un ficobilisoma de *rods* de FC (FC-FBS). Los genes *cpcB<sup>i</sup>A<sup>i</sup>* codifican para subunidades inducibles (PC<sup>i</sup>)  $\alpha$  y  $\beta$  de ficocianina, y *cpcHID* para los *linker* que ensamblan los *rods* de estas PC<sup>i</sup>. En luz verde, para el ficobilisoma con *rods* de FE (FE-FBS) se codifican los clusters *cpeAB* para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de ficoeritrina, y para los *linkers* que ensamblaran los *rods* los genes *cpeCDE*. Ambos ficobilisomas cuentan con una parte

conservada, este es el *core* de AF con sus respectivos *linkers*, una ronda de ficocianinas constitutiva (PC<sup>c</sup>) y el *linker* que une al *core* con los *rods*, CpcG. El receptor responsable del encendido y apagado de estos genes es *rcaCEF* (*Receptor chromatic adaption C, E, F*; Sobczyk et al., 1994), donde la subunidad RcaE contiene un dominio de unión a cromóforo de fitocromo en su mitad amino-terminal y un dominio de histidina cinasa como sensor en su mitad carboxilo terminal (Terauchi et al. 2004). El sistema activa el clúster de genes inducibles de ficocianina y reprime la expresión del clúster de ficoeritrina en luz roja. El segundo responsable del encendido y apagado de genes es el sistema Cgi (*Control of Green light Induction*). Este sistema no tiene efecto detectable en el clúster de FC inducible y solo reprime la expresión de ficoeritrina en luz roja. Hasta la fecha, no se han identificado o aislado componentes del sistema Cgi. Por lo tanto, no está claro si es o no un sistema basado en

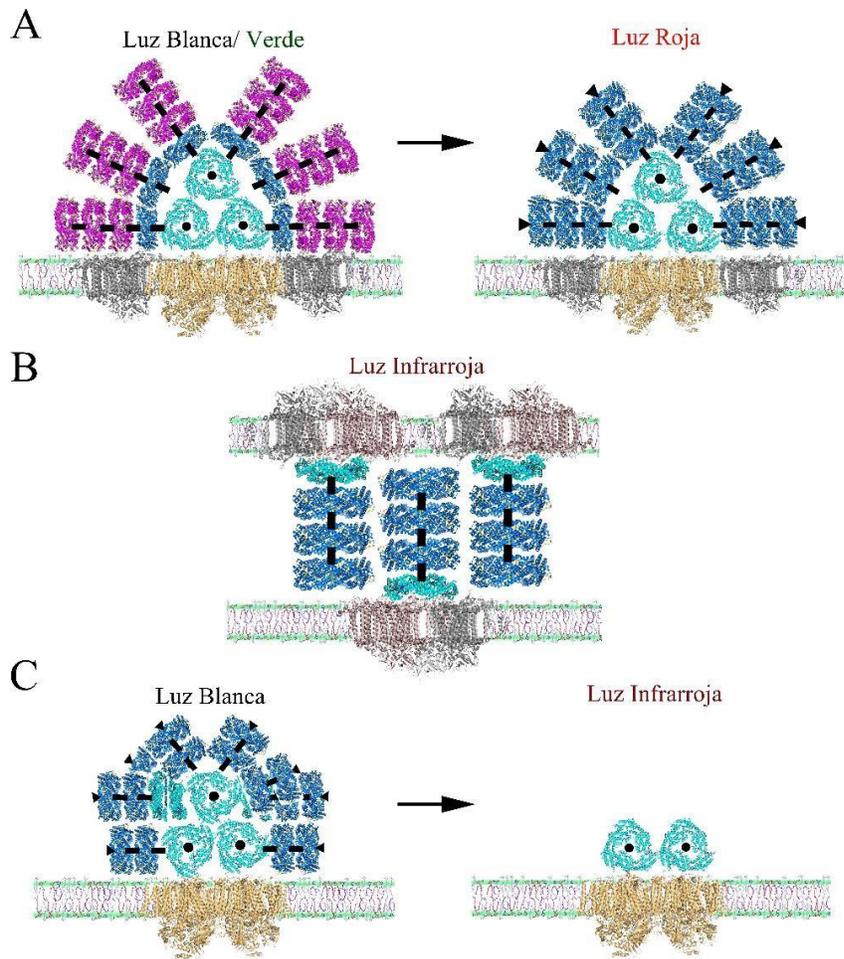


Fig. 9 Ficobilisomas dependiendo el tipo de aclimatación. A. Aclimatación Cromática Complementaria, FE-FBS en luz blanca o verde, FC-FBS en luz roja. B. Rod-FBS, *Acaryochloris marina* y su adaptación a la luz infrarroja. C. Fotoaclimatación al infrarrojo cercano en *Halomicronema hongdechloris*. FC-FBS de *core* pentacilíndrico en luz blanca, Core-FBS en luz infrarroja.

fotorreceptores, aunque esto podría esperarse dado que controla las respuestas de ACC en estado estacionario (Gutu y Kehoe, 2012). La forma en que estos sistemas comparten la regulación de ACC es sorprendente e inesperada porque es asimétrica (Fig. 8).

La luz del sol que llega en mayor intensidad a la superficie de la Tierra es de 400-700 nm llamada luz visible. La luz que penetra en el océano por la columna de agua se va filtrando, a los 8 m ya no llega la luz roja de tal forma

que un *core* de AF y *rods* de PC, resultan incapaces de captar la energía luminosa. La luz verde-azul penetra a mayor profundidad por lo que una cianobacteria con ficoeritrina se adapta perfectamente a la absorción de luz verde-azul que transfiere a través de FC y AF (Grossman, 2003). Por lo tanto, el fenómeno de adaptación cromática complementaria es una función muy ventajosa, al realizar una modificación inducida cromáticamente de la relación de ficoeritrina-ficocianina, que implica la síntesis de *novo* de proteínas (Fig. 9A). Solo algunas cianobacterias son capaces de realizar ACC, por ejemplo, *Tolypothrix*, *Fremyella diplosiphon* (Pérez-Gómez, 2012), *Synechococcus* PCC 7335, entre otras.

La mayor parte de cianobacterias solo pueden realizar fotosíntesis oxigénica en luz visible (400-700nm) y un caso especial son *Acaryochloris* spp. Estas cianobacterias pueden crecer con luz del infrarrojo cercano (>700 nm), y hasta ahora son las únicas cianobacterias que producen y usan clorofila *d*. Se sabe que *Acaryochloris* sp. CCMEE 5410 y *Acaryochloris marina* MBIC 11017 tienen un genoma de 7.9 y 8.4 Mbp, respectivamente, siendo estos mucho más grandes que el genoma de muchas otras cianobacterias. En *Acaryochloris* sp. CCMEE 5410 no se pueden encontrar genes relacionados con el ficobilisoma, mientras que en *Acaryochloris marina* MBIC 11017 se encuentran genes para FC y AF, pero no un  $L_{CM}$  para ensamblar un *core* de AF, en cambio si el *linker* transmembranal (CpcL) que forma un *rod*-FBS uniéndolo a la membrana, como se muestra en la Fig. 9B (Chen et al. 2009, Swingley et al. 2008, Chan et al. 2007). Exceptuando PsaK, todos los genes para las subunidades del fotosistema I se encuentran presentes en una sola copia, en ambas especies. Sin embargo, múltiples copias de los genes para las subunidades del fotosistema II se encuentran presentes, por ejemplo, PsaA, PsaB, PsaD, PsaE, PsaU y PsaV, y esto pasa en ambos genomas. Estas observaciones sugieren que podría haber algún mecanismo de aclimatación que conduzca a la expresión y el ensamblaje de complejos de PS II funcionalmente modificados, lo que podría llevar a cabo la fotosíntesis bajo algunas condiciones específicas de crecimiento (Kiss et al. 2012). Se ha establecido que, además de su papel como pigmento accesorio en los centros de reacción FSI y FSII, la clorofila

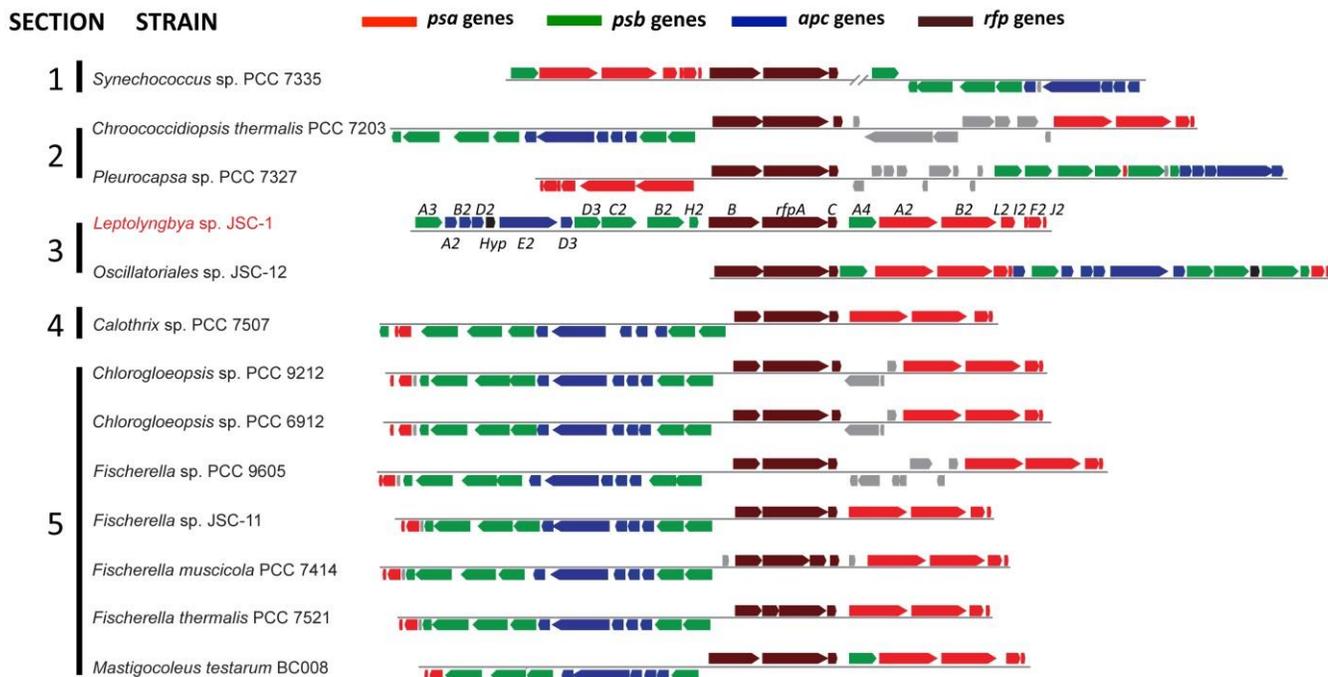


Fig. 10 Grupos de genes similares al grupo de 21 genes en *Leptolyngbya* sp. JSC-1 se producen en otras 12 cianobacterias. Código de colores para los genes: genes *psa* para las subunidades centrales del fotosistema I (rojo); los genes *psb* para las subunidades centrales del fotosistema II (verde); genes *apc* para las subunidades centrales del FBS (azul); los genes *rfp* para el fitocromo (RfpA) y los reguladores de respuesta RfpB y RfpC (marrón); proteína hipotética conservada (Hyp, negro); todos los otros genes se muestran en gris. Tomada de Gan et al (2014).

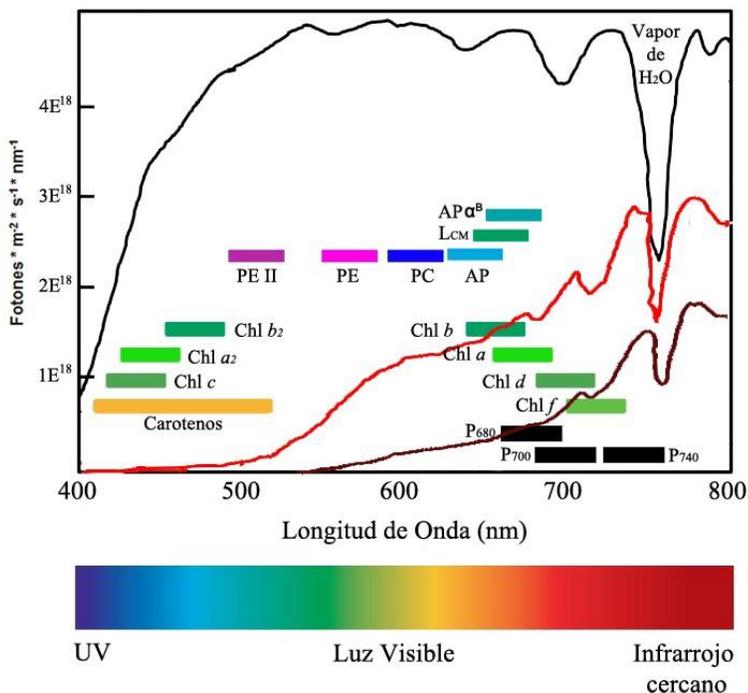


Fig. 11 Mediciones de penetración de luz en suelo arenoso, mostrando el fuerte enriquecimiento para la luz roja lejana a medida que la profundidad aumenta de 0 (línea negra), 3 (línea roja) y 6 mm (línea marrón). Las barras horizontales a color denotan el rango de absorción de diferentes tipos de pigmentos. Las barras negras representan el rango de absorción de los centros de reacción cuyo máximo está indicado por el número.

genes en clúster que codifica cuatro parálogos del núcleo de FSII (*psbD3C2B2H2*) y *psbA3* aislado del clúster. Para FSI en otro clúster de seis parálogos (*psaA2B2L2I2F2J2*) que codifican para las proteínas con clorofila. Para el ficobilisoma se encuentra el mismo clúster *apcE2D1D2D5B2*, pero al poner a la cianobacteria a crecer en infrarrojo cercano expresa un ficobilisoma pentacilíndrico que coexiste con el ficobilisoma bicilíndrico (Gan et al. 2014).

Los fotorreceptores en este tipo de fotoaclimatación son RfpABC (*Receptor far-red light photoaclimation A, B, C*) y se encuentran en un solo clúster de genes y se ha caracterizado recientemente, en *Synechococcus* PCC 7335. Los resultados mostraron que el sistema de regulación Rpf normalmente limita la expresión del FSII y el FBS en luz blanca, y aumenta los complejos inducibles de éstos (Ho et al. 2017). *PsbA3* es la clorofila *f* sintetasa, la cual no puede unir al centro de reacción  $Mn_4CaO_5$  y la energía que recibe se utiliza para la síntesis de clorofila *a* a clorofila *f* (Ho et al. 2016). Hasta ahora se han descrito 16 cianobacterias capaces de realizar este tipo de aclimatación (Fig. 10)

Una de condiciones en las que se pueden dar estos tipos de aclimatación es en los tapetes bacterianos. Los organismos en el fondo de la capa fótica del tapete bacteriano experimentarán irradiaciones mucho más bajas que los organismos en la superficie. Otra condición es la dispersión de luz por arena o tierra donde se ve severamente disminuida la cantidad de luz visible que pasa, siendo longitudes de onda  $>700nm$  las más abundantes (Fig. 11). Solo a 3mm de arena la disminución de luz visible es notorio, si en lugar de arena fuera un tapete bacteriano de 3mm es posible que el paso de luz visible fuera aún más filtrado por los organismos de la capa superior. La combinación de la dispersión de la luz, la absorción y la refracción hace que los organismos en la parte inferior del tapete bacteriano sean severamente limitados por la luz. Para contrarrestar esto, algunos organismos se han adaptado al tener pequeños cambios de aclimatación en sus proteínas y pigmentos para ampliar la absorción de la luz por los

*d* forma el par especial (P740) en FSI, que exhibe una diferencia de luz máxima inducida a 740 nm (Tomo et al. 2008, Sivakumar et al. 2003, Hu et al. 1998).

La fotoaclimatación al infrarrojo cercano fue descrita por primera vez en *Leptolyngbya* JSC-1 y demostró un remodelamiento extenso del aparato fotosintético (Gan et al. 2014). Son 21 genes los responsables de la FaRLiP que codifican para el recambio del ficobilisoma, parte de ambos fotosistemas, la síntesis de clorofila *f* y un fotorreceptor. Los genes que codifican el recambio del ficobilisoma son *apcE2D1D2D5B2*, que involucran la síntesis de *nov* del core de aloficocianinas, como sucede en *Halomicronema hongdechloris*. En el caso de esta cianobacteria, el ficobilisoma pentacilíndrico sintetizado en luz blanca, es recambiado a uno bicilíndrico (Fig. 9C). Por otro lado, en el genoma JS-1, otra cianobacteria capaz de adaptarse al infrarrojo cercano, se encontraron cuatro

complejos antena. En otros casos, la capacidad de realizar una remodelación extensa del aparato fotosintético ha evolucionado, con la síntesis concomitante de nuevos pigmentos y FBP altamente modificados, como es el caso de la ACC y FaRLiP (Gan et al. 2015).

### **Procedimiento Moderno para Identificar y Clasificar Cianobacterias**

Los ácidos nucleicos y las proteínas comunes a los seres vivos cambian con el tiempo. Por ello, pueden considerarse como cronómetros moleculares o “documentos” de la historia evolutiva. Asumiendo que los cambios se producen al azar y que aumentan con el tiempo de manera lineal, las diferencias de las secuencias de los monómeros (nucleótidos o aminoácidos) que integran macromoléculas homologas, refleja la distancia evolutiva que existe entre ellas. Esta idea sugerida por Zuckerkandl y Pauling se ha venido utilizando durante décadas para establecer las relaciones filogenéticas entre los seres vivos, creando un marco apropiado para su clasificación e identificación (Zuckerkandl 1965).

Por otro lado, otra forma de clasificación e identificación bacteriana, como ya se mencionó, es mediante el 16S rRNA. El operón del rRNA consiste en tres genes de rRNA 16S, 23S y 5S separados por ITS (*Internal Transcribed Spacer*). El 16s rRNA es la molécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese a principios de la década de los '70. Woese considero que el 16S rRNA como un cronómetro molecular ya que está presente en todas las bacterias, su estructura y función permanece constante durante tiempos muy prolongados, sus cambios ocurren de manera muy lenta y tienen suficiente variabilidad para diferenciar no solo a los organismos más lejanos, sino también a los más próximos, además de ser una molécula relativamente larga. Desde entonces, el análisis del 16S rRNA se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procarionta, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana (Rodicio 2004).

En la actualidad se realiza la secuenciación de nucleótidos (16S rRNA) y se establecen las comparaciones y será el grado de similitud entre las secuencias 16S rRNA de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva. Por otro lado, el análisis comparativo de secuencias 16S rRNA permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados. En algunos organismos la región entre los genes del 16S y el 23S (ITS) se encuentran las secuencias que codifican los genes para los RNAs de transferencia (tRNA-Ile y tRNA-Ala) y los patrones de plegamiento de las partes restantes de las secuencias ITS (Boyer S.L., 2001). La secuenciación y comparación de los ITS en la taxonomía y filogenia molecular por dos razones: es fácil de amplificar incluso en pequeñas concentraciones de DNA y tiene un alto grado de variación incluso entre especies estrechamente relacionadas. En la actualidad la secuenciación de 16S rRNA e ITS y su comparación en los bancos de datos, es una herramienta para la identificación y diferenciación de cepas bacterianas y subespecies. La longitud del 16s rRNA es aproximadamente de 1550 bases, por lo tanto, una diferencia de un 1% entre dos diferentes 16s rRNA serian 15 bases de diferencia, esto implica que, entre más bajo el porcentaje de identidad, más alejadas están dos especies entre ellas. En cambio, los ITS no son tan conservados entre especies, y suelen dar información confiable para distinguir dos cepas diferentes o iguales.

## Justificación

---

### *Nodularia spumigena* CCM 9

Mediante la comparación de los FBS que se ensamblan en ambas cianobacterias podemos destacar dos estrategias interesantes de captación de luz, *Synechococcus* PCC 7335 puede fotoaclimatarse cambiando la composición de su ficobilisoma tricilíndrico mediante el proceso de adaptación cromática complementaria. En cambio, en el análisis *in silico* de *N. spumigena* CCY9414, el FBS que se ensambla es pentacilíndrico rico en ficocianina que le da un área más amplia para la captación de luz que en el caso del FBS tricilíndrico y no cuenta con adaptación cromática complementaria. Se espera que los FBS que ensambla CCMM 9 sean pentacilíndricos y ricos en ficocianina.

### *Synechococcus* PCC 7335

Hasta antes de los trabajos presentados como antecedentes, no se conocía ningún organismo capaz de hacer fotosíntesis oxigénica con luz infrarroja cercana. Aún se encuentra en discusión la estructura del ficobilisoma bajo estas condiciones y se desconoce el recambio del centro de reacción de los fotosistemas.

*Synechococcus* PCC 7335 cuenta con los genes que se presume son los responsables de esta aclimatación al infrarrojo cercano, por lo tanto, es un buen modelo para descubrir los cambios que se realizan en esta aclimatación.

## Hipótesis

---

*Synechococcus* PCC 7335 fue aislada de Puerto Peñasco, Sonora, donde la pleamar es de 5m y la bajamar de - 1.2m. En *Synechococcus* PCC 7335 se predicen al menos 4 tipos diferentes de ficobilisomas, que se ensamblarían bajo diferentes condiciones de aclimatación a la luz o a escases de nutrientes, pudiendo ser la adaptación de la cepa a los cambios abruptos de luz de su ecosistema. Por el análisis *in silico* del clúster de genes, de sintetizarse las proteínas estas realizarían un ficobilisoma para la fotoaclimatación al infrarrojo cercano, previamente se demostró que, además, existen dos tipos de ficobilisomas que se ensamblan bajo aclimatación cromática complementaria, el último tipo de ficobilisoma se sospecha se expresa mediante una fotoaclimatación a luz baja. La hipótesis a demostrar es que se puede realizar una aclimatación cromática complementaria y subsecuentemente una segunda fotoaclimatación al infrarrojo cercano, esto se pretende lograr creciendo a *Synechococcus* PCC 7335 11 días en luz roja/blanca y pasarla a luz infrarroja cercana por 21 días; de esta manera se inducirán FC-PBS/FE-PBS durante el crecimiento en luz roja/blanca y se pretende observar que la cepa no recambia los ficobilisomas existentes al hacer la transición a luz infrarroja, obteniendo dos tipos de ficobilisomas coexistiendo en luz infrarroja cercana.

Cuatro Ciénegas, Coahuila es un lugar conocido por sus pozas multicolores conservan los mismos microorganismos de un mar primitivo que existió hace miles de millones de años, que sobrevivió a cambios climáticos globales, eras glaciales y cinco extinciones masivas. Cuyo nicho es rico en azufre y limitado por nutrientes se encontró *Nodularia* sp. CCM9. Por otro lado, el genoma de *Nodularia spumigena* CCY9414, pariente cercana de la cepa *Nodularia* sp. CCM9, solo mostró tener los genes para ensamblar un solo tipo de ficobilisoma, se sospecha que *Nodularia* sp. CCM9 también cuenta con esta característica. De ser así, se podrá usar el genoma de *Nodularia spumigena* CCY9414 para buscar genes de interés y subsecuentemente se buscarán las proteínas en *Nodularia* sp. CCM9. Este procedimiento se realiza ya que la secuenciación de un genoma suele ser cara y lleva tiempo su anotación.

Comparar las diferentes estrategias de aclimatación a la luz de estas cepas, nos mostrará parte del camino evolutivo del ficobilisoma.

## Objetivos

---

### *Nodularia spumigena* CCM 9

Identificar los componentes del ficobilisoma de *Nodularia* sp. CCM 9.

### *Synechococcus* PCC 7335

Conocer los componentes y estructura del ficobilisoma y los fotosistemas ensamblados en luz infrarroja cercana y como llevar a cabo la transferencia de energía.

## Objetivos Específicos

### *Nodularia spumigena* CCM 9

- Identificar los componentes del FBS de *Nodularia* sp. CCM 9 por medio de SDS-PAGE y un subsecuente análisis de bandas por espectrometría de masas
- Identificar los componentes del core de los FBS de *Nodularia* sp. CCM 9 por medio de isoelectroenfoque seguido de una segunda dimensión en SDS-PAGE para conocer la estequiometría de los componentes del core.

### *Synechococcus* PCC 7335

- Identificar los componentes del FBS de *Synechococcus* PCC 7335 crecida en infrarrojo cercano por medio de SDS-PAGE y un subsecuente análisis de bandas por espectrometría de masas.
- Identificar los componentes de los fotosistemas *Synechococcus* PCC 7335 crecidas en infrarrojo cercano por medio del aislamiento de membranas y su solubilización con n-dodecil  $\beta$ -D-maltosido, separando los componentes del solubilizado por medio de gradientes de sacarosa.
- Se realizarán espectros de fluorescencia a temperatura de nitrógeno líquido para conocer como es la transferencia de energía en células, membranas, fracciones del gradiente de FBS y fracciones del gradiente de membranas.
- Separar los pigmentos liposolubles de *Synechococcus* PCC 7335 crecida en infrarrojo cercano por HPLC en fase reversa con una columna C18.

### **Crecimiento de la cepa *Nodularia spumigena* CCM 9**

CCM 9 fue aislada de Cuatro Ciénegas, Coahuila y crece en un medio BG11 más 0.2M de NaCl. Esta se creció a 26 °C en un volumen inicial de 100 mL por 7 días, después se pasó a un volumen de 1 L. La luz continua fue provista por LEDs blancos (11  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 11 días. Las células fueron agitadas y burbujeadas con 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> en aire.

### **Crecimiento de la cepa *Synechococcus* PCC 7335**

Las células de *Synechococcus* sp. ATCC® No. 29403™ (PCC 7335) fueron suministradas por el American Type Culture Collection. La cianobacteria fue crecida en un medio ATCC 957 con 20 mcg/L de vitamina B12. Estas se crecieron a 26 °C en un volumen inicial de 100 mL por 7 días, después fueron transferidas a matraces de un volumen de 1 L. La luz continua fue provista por Leds blancos (11  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), LEDs rojos (4  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 11 días. La luz infrarroja (12  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) fue provista por un foco de tungsteno en combinación con dos filtros: 165 day light blue y 787 Marius red (<http://www.leefilters.com/>) por 21 días y 7 días más añadiendo 1L de medio fresco. Las células fueron agitadas y burbujeadas con 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> en aire.

### **Aislamiento de los FBS**

El procedimiento empleado tiene modificaciones mínimas del protocolo de Gómez-Lojero et al. (2003).

Solución para remover las células de polímero extracelular

- Amortiguador para remoción del EPS: EDTA 50 mM y NaCl al 10%.

Soluciones para romper las células en condiciones de estabilidad para los ficobilisomas

- Amortiguador de Fosfatos 0,65M: Fosfato de potasio monobásico (KHPO<sub>2</sub>) 0.65M, PMSF 1mM, EDTA 10 mM, Azida 0.1%, pH 8 con HCl.
- Amortiguador de Fosfatos 0,75M: Fosfato de potasio monobásico (KHPO<sub>2</sub>) 0.75M, PMSF 1mM, EDTA 10 mM, Azida 0.1%, pH 8 con HCl.

#### *Cosecha de las células*

Se centrifugaron las células a 11500rpm por 20min a 22°C en el rotor JA-14. Después se tiró la solución cuidando de no mover la pastilla de células que se formó al fondo del frasco. Se pesaron los frascos y se determinó la cantidad de células obtenidas. Se colocó 3 veces el peso obtenido en volumen EDTA 10mM y NaCl 10% y se homogeneizó con ayuda del taladro. El EDTA y NaCl se utilizó para quitar la solución polimérica extracelular (EPS) que posee el cultivo celular. La nueva solución fue centrifugada en el rotor JA-20 a 17500 rpm por 20min y 22°C. Nuevamente se tiró la solución cuidando de no remover el pastilla formado en el fondo del tubo. Se pesó los tubos y para determinar la cantidad de células obtenidas.

#### *Rompimiento celular*

Se resuspendieron las células en 3 veces el peso de amortiguador de fosfatos 1M con inhibidores de proteasas. Se hizo pasar la solución obtenida por la prensa French en 3 ocasiones, de esta manera y con una presión de los 20000 psi se rompieron las células. Se centrifugó la solución a 5000rpm por 10min a 22°C para bajar las células que no se rompieron.

#### *Obtención del extracto total de la célula*

Se midió el volumen final obtenido y añadir el 1% de este en volumen de Triton x-100. Se mantuvo la solución en agitación suave por 30min. Se centrifugó en el rotor JA-20 a 16000 rpm por 30min a 24°C, esto provocó que se separe la solución en dos fases, la fase inferior son los FBSs, FBPs y demás proteínas del citoplasma, la fase superior (de Triton x100) contiene las proteínas de membrana. En este punto se observa una diferencia de fases. Se

filtró la inferior con nital. El gradiente de sacarosa fue preparado a partir de las siguientes concentraciones de sacarosa: 2 ml de sacarosa 0.5 M, 5 ml de sacarosa 0.75 M, 4 ml de sacarosa 1 M y 3 ml de sacarosa 2 M.

### Extracción de Membranas

Las células de *Synechococcus* sp. PCC 7335 fueron lavadas con 100 mM NaCl y 50 mM Tris base (pH 7.5) y resuspendidas en la misma muestra. Las células son pasadas tres veces por la Prensa de French (Thermo Spectronic, Massachusetts USA) para su ruptura a 15 000 psi. Las células rotas son centrifugadas por 10 min a 6000rpm y 4°C. A la pastilla se le añade metanol: acetona (80:10 v/v) para análisis en HPLC. El sobrenadante fue centrifugado por 20 min a 36000 rpm y 4°C. La pastilla fue tratada con 0.5% v/v de concentración de clorofila con n-dodecil beta-d-maltosido (Sigma-Aldrich), agitando por 30min a 4°C. Es centrifugado una vez más por 20 min a 36000rpm y 4°C. La pastilla es resuspendido en 50 mM Tris base, 0.5 M ácido amino caproico, pH 7. Se toman 25 µL de la muestra y se añaden a metanol al 90%, es agitado y filtrado con filtros Whatman #3, sacando un espectro de absorción de la muestra. Se toma el volumen necesario para tener no más de 1 µg de clorofila. La muestra es colocada hasta arriba del siguiente gradiente de sacarosa: 3, 4, 4, 3 y 3 mL de 1.5, 1, 0.75, 0.5 and 0.25 M de una solución de sacarosa que contiene 100 mM, 50 mM bis-tris y 0.01% n-dodecil beta-d-maltosido, pH 7.5. La otra parte de la muestra es cargada en geles CN-PAGE. El gradiente de sacarosa es ultracentrifugado a 50 000 rpm por 3h a 4°C en el rotor 70Ti. Después de la centrifugación, son colectadas de abajo hacia arriba fracciones de un mililitro del gradiente.

### Cuantificación de clorofila

En filtros Millipore HVLP se filtraron 10mL de células. En frascos con tapa se colocó el papel filtro con las células y añadieron 10mL de metanol al 90%. Se puso en baño María 10min a 70°C. Colocando en hielo para enfriar la solución una vez terminado el baño María. Fue filtrada la solución en papel Whatman #3. Finalmente, se realizaron espectros de absorción de la solución filtrada de 340-740nm.

### Espectros de absorción

En un equipo Hitachi U3310 Spectrophotometer ROM Version 2520-10, se realizaron espectros de absorción de 340-740nm en celdas de 2-5 mm de paso de luz. Independientemente de la celdilla empleada para el espectro la D.O. se expresa por 10 mm de paso de luz. Para calcular la concentración de los componentes del FBS se emplearon las siguientes ecuaciones simultáneas.

Para los FBS que contienen solamente rods de PC:

$$[A_{650}] = (A_{650} - 0.28 A_{620}) / 264$$

$$[P_{620}] = (A_{620} - 0.52 A_{650}) / 333$$

Los coeficientes de extinción para los protómeros de las FBP's usados fueron  $\epsilon_{650}^{AP} = 309$ ,  $\epsilon_{620}^{AP} = 106$ ,

$\epsilon_{650}^{PC} = 390$ ,  $\epsilon_{620}^{PC} = 110$ . En el caso de los FBS que contienen rods de PC y FBP's:

$$[P_{620}] = (A_{620} - 0.52 A_{650}) / 302$$

$$[P_{620}] = (A_{670} - 100[P_{620}] - 100[A_{650}]) / 560$$

Los coeficientes de extinción para los protómeros de las FBPs usados fueron  $\epsilon_{650}^{AP} = 309$ ,  $\epsilon_{620}^{AP} = 160$ ,  $\epsilon_{670}^{AP} = 100$ ,  $\epsilon_{620}^{AF} = 390$ ,  $\epsilon_{650}^{AF} = 170$ ,  $\epsilon_{670}^{AF} = 100$ ,  $\epsilon_{570}^{AF} = 560$ . Las concentraciones se expresan en miliMolar. Ya

que los coeficientes de extinción están expresados en  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . La concentración del FBS fue obtenida dividiendo la concentración de AF entre su número de protómeros, siendo este de 36 porque se asume que el core es tricilíndrico

### Electroforesis en geles claros nativos o no desnaturalizantes (CN-PAGE)

hrCN-PAGE se realizó como se describe en Wittig et al. Alabama. (2007) añadiendo al Amortiguador catódico 0.01% de n-dodecil  $\beta$ -D-maltosido (DDM) y 0.05% de ácido desoxicólico (DOC). Las membranas se solubilizaron con DDM (relación mg de DDM / mg de Chl = --) durante 30 min en hielo, seguido de centrifugación a 126.000 g durante 20 min a 4°C. Los complejos solubilizados se sometieron a hrCN-PAGE en gradiente de 4% a 13% de acrilamida durante 6 h a 5 mA. Algunos carriles se cargaron con dos concentraciones de clorofila, uno para cortar las bandas y realizar espectros de absorción y análisis de las bandas por espectrometría de masas, el otro para una segunda dimensión. El carril para segunda dimensión se incubó con Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, ditiotreitol 20 mM, SDS al 2,5% y glicerol al 10% durante 2 h a 37°C y se sometieron a SDS-PAGE al 10% como segunda dimensión.

### Electroforesis en geles von Jagow o desnaturalizantes (SDS-PAGE)

La acrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Los geles de poli(acrilamida) se forman por la polimerización vinílica del monómero de acrilamida y del monómero entrecruzador N, N'-metileno-bis-acrilamida. La polimerización se inicia por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato. Las aminas terciarias como el N, N, N, N'-tetrametil-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato.

Soluciones:

#### □ Geles de Separación

Concentración	Solución	p/36ml
10%	Acrilamida 30%- bis-acrilamida 0.938%	10ml
	Tris 3M, HCl 1M, SDS 0.3%	10ml
	Glicerol 79.5% (v/v)	4ml
	Agua	6ml
	Persulfato de amonio 10% (w/v)	100 $\mu$ l
	TEMED	10 $\mu$ l

#### □ Geles de Condensación

Concentración	Solución	p/7ml
4%	Acrilamida 30%- bis-acrilamida 0.938%	933 $\mu$ l
	Tris 3M, HCl 1M, SDS 0.3%	1.75ml
	Agua	4.31ml
	Persulfato de amonio 10% (w/v)	46 $\mu$ l
	TEMED	4.6 $\mu$ l

- Amortiguador Superior. - Tris 0.1M, Tricina 0.1M y SDS 0.1%
- Amortiguador Inferior. - Tris-HCl pH 8.9 0.2M

- Marcadores de Peso molecular. - ovoalbúmina, citocromo c de caballo, lisozima,

Cargar las muestras en un gel con 15 pozos. La corrida de la electroforesis se realiza durante 3 hrs. a 35V, 14hrs a 95V y finalmente 2 hrs a 125V.

#### *Tinción de Geles*

Soluciones:

- Solución de Tinción. - Coomassie 0,1% (w/v), metanol 50% (v/v) y ácido
- Solución para Fijar Proteínas. - Metanol 50% (v/v)
- Solución de Etanol 25% (v/v) y ácido acético 7% (v/v)
- Solución para desteñir el gel. - Ácido acético 7% (v/v)

Técnica:

Retirar el gel de las placas y poner en 75ml de solución de tinción, poner en agitación suave por una hora y media. Tirar la solución y añadir 75ml de solución para fijar proteínas, colocar en agitación por 30min. Quitar esta solución y agregar 100ml de solución de etanol al 25% y ácido acético al 7%, agitar durante tres horas. De ser necesario cambiar cada hora la solución. Finalmente, poner suficiente solución para desteñir geles, dejar hasta lograr quitar el fondo azul de este.

#### *Precipitación de Proteínas*

Soluciones:

- Tricloroacético (TCA) al 50%.
- Solución digestora 2x: SDS 10%, Glicerol 30%, Tris 100mM pH 8, DTT 4% y azul de bromofenol 0.02%.

Para calcular la cantidad de proteína a precipitar sabemos que las FBP's tienen una proporcionalidad con la cantidad de proteínas totales siendo la siguiente:

- Ficocianina, medida a 620nm, 80 unidades de absorción equivalen a 16 $\mu$ g/ $\mu$ l de PC, ahora bien, 75 $\mu$ g de FC equivalen a 210 $\mu$ g proteína total.
- Ficoeritrina, medida a 565nm, 1.86 unidades de absorción equivalen a 86 $\mu$ g/ml de PE, ahora bien, 80 $\mu$ g de FE equivalen a 250 $\mu$ g proteína total.

Sabiendo la cantidad de microgramos y haciendo una conversión a microlitros se realiza la siguiente relación para proceder a precipitar, diluir la muestra 10 veces con TCA al 25% (v/v)

Procedimiento:

Se agitó con vortex por 1min la solución y colocar en hielo por 30min. Una vez terminado el tiempo, se centrifugó a 14000rpm por 20min a 4°C en el rotor JA-25.15. Fue retirada la solución, cuidando de no resuspender la pastilla formado al fondo. Se resuspendió la pastilla en 50 $\mu$ L de solución digestora 1x. Colocar en baño María a 60°C por 20min.

#### *Geles desnaturalizantes de von Jagow*

La acrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero de acrilamida y del monómero entrecruzador N, N'-metileno-bis-acrilamida. La polimerización se inicia por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones

persulfato. Las aminas terciarias como el N, N, N, N'-tetrametil-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato.

Soluciones:

☐ Geles de Separación

Concentración	Solución	p/36ml
10%	Acrilamida 30%- bis-acrilamida 0.938%	10ml
	Tris 3M, HCl 1M, SDS 0.3%	10ml
	Glicerol 79.5% (v/v)	4ml
	Agua	6ml
	Persulfato de amonio 10% (w/v)	100µl
	TEMED	10µl

☐ Geles de Condensación

Concentración	Solución	p/7ml
4%	Acrilamida 30%- bis-acrilamida 0.938%	933µl
	Tris 3M, HCl 1M, SDS 0.3%	1.75ml
	Agua	4.31ml
	Persulfato de amonio 10% (w/v)	46µl
	TEMED	4.6µl

☐ Amortiguador Superior. - Tris 0.1M, Tricina 0.1M y SDS 0.1%

☐ Amortiguador Inferior. - Tris-HCl pH 8.9 0.2M

☐ Marcadores de Peso molecular. - ovoalbúmina, citocromo *c* de caballo, lisozima,

Cargar las muestras en un gel con 15 pozos. La corrida de la electroforesis se realiza durante 3 hrs. a 35V, 14hrs a 95V y finalmente 2 hrs a 125V.

*Tinción de Geles*

Soluciones:

☐ Solución de Tinción. - Coomassie 0,1% (w/v), metanol 50% (v/v) y ácido

☐ Solución para Fijar Proteínas. - Metanol 50% (v/v)

☐ Solución de Etanol 25% (v/v) y ácido acético 7% (v/v)

☐ Solución para desteñir el gel. - Ácido acético 7% (v/v)

Técnica:

Retirar el gel de las placas y poner en 75ml de solución de tinción, poner en agitación suave por una hora y media. Tirar la solución y añadir 75ml de solución para fijar proteínas, colocar en agitación por 30min. Quitar esta solución y agregar 100ml de solución de etanol al 25% y ácido acético al 7%, agitar durante tres horas. De ser necesario cambiar cada hora la solución. Finalmente, poner suficiente solución para desteñir geles, dejar hasta lograr quitar el fondo azul de este.

**Digestión de proteínas**

Soluciones:

☐ Solución de lavado (metanol 50% (v/v), ácido acético 5% (v/v)).

- Bicarbonato de amonio 100mM.
- Bicarbonato de amonio 50mM.
- DTT 10mM
- Iodoacetamida 100mM.
- Solución de tripsina (20ng/μl)
- Amortiguador de extracción (acetonitrilo 50% (v/v), ácido fórmico 5% (v/v)).

Procedimiento:

Nota: Todo el procedimiento se realiza a temperatura ambiente excepto cuando se especifica otra condición.

Cortar la banda o mancha del gel evitando cortar acrilamida extra. Cortar en pedacitos de aproximadamente 1mm<sup>3</sup> o 2mm<sup>3</sup>. No pulverizar la muestra para evitar crear partículas finas que pueden tapan la columna de HPLC. Colocar las piezas de gel en tubos de centrifuga de 1.5 ml estériles. Añadir 200μl de solución de lavado y dejar enjuagado por 4hrs. Remover la solución de lavado cuidadosamente con la punta de una pipeta y descartar. Volver a añadir 200μl de solución de lavado y dejar enjuagado por 4hrs. Realizar el paso anterior hasta que las piezas de gel estén transparentes. Remover la solución de lavado cuidadosamente con la punta de una pipeta y descartar. Añadir 200μl de acetonitrilo y dejar deshidratando las piezas de gel por 5min. Las piezas estarán deshidratadas cuando se tornen de un color blanco opaco y su tamaño se haya reducido significativamente. Remover el acetonitrilo cuidadosamente con la punta de una pipeta y descartar. Secar completamente las piezas de gel a temperatura ambiente. Añadir 30μl de DTT 10mM. Dejar reduciendo por 30min a temperatura ambiente. Remover el DTT cuidadosamente con la punta de una pipeta y descartar. Añadir 30μl de iodoacetamida 100mM. Dejar alquilando por 30min a temperatura ambiente. Remover la iodoacetamida cuidadosamente con la punta de una pipeta y descartar. Añadir 200μl de acetonitrilo y dejar deshidratando las piezas de gel por 5min. Remover el acetonitrilo cuidadosamente con la punta de una pipeta y descartar. Rehidratar las piezas de gel por 10min con 200ul de bicarbonato de amonios 100mM. Remover el bicarbonato de amonio cuidadosamente con la punta de una pipeta y descartar. Añadir 200μl de acetonitrilo y dejar deshidratando las piezas de gel por 5min. Remover el acetonitrilo cuidadosamente con la punta de una pipeta y descartar. Secar completamente las piezas de gel a temperatura ambiente. Añadir 30μl de solución de tripsina y dejar que las piezas de gel se rehidraten por 10min, mezclando ocasionalmente con vortex. Bajar las piezas de gel rehidratadas y la solución de tripsina excedente al fondo del tubo por centrifugación. Remover el excedente de solución de tripsina cuidadosamente con la punta de una pipeta y descartar. Añadir 5μl de bicarbonato de amonio 50mM a la muestra. Mezclar con vortex. Bajar la muestra al fondo del tubo centrifugando por 30 segundos y llevar a cabo la reacción de digestión toda la noche a 37°C (16hrs.). Añadir 30μl de bicarbonato de amonio 50mM a la digestión e incubar la muestra por 10min mezclando ocasionalmente con vortex. Bajar la muestra al fondo del tubo centrifugando por 30 segundos. Colectar el sobrenadante cuidadosamente con la punta de una pipeta y transferirlo a un tubo de centrifuga nuevo de 0.5ml. Añadir 30μl de solución de extracción a la digestión e incubar la muestra por 10min mezclando ocasionalmente con vortex. Bajar la muestra al fondo del tubo centrifugando por 30 segundos. Colectar el sobrenadante cuidadosamente con la punta de una pipeta y combinarlo con el extracto anterior. Volver a añadir 30μl de solución de extracción a la digestión e incubar la muestra por 10min mezclando ocasionalmente con vortex. Bajar la muestra al fondo del tubo centrifugando por 30 segundos. Colectar el sobrenadante cuidadosamente con la punta de una pipeta y combinarlo con el extracto anterior. Reducir el volumen de extracto a 20μl evaporando en una centrifuga con vacío a temperatura ambiente. No dejar secar completamente. Ajustar el volumen de la muestra a 20μl con ácido acético al 1%, solo en caso necesario.

## **Extracción de Pigmentos y Purificación por RT-HPLC (ZipTip C4, millipore®)**

Soluciones:

- Solución humectante. - Acetonitrilo (ACN) 100%
- Preparación de la muestra. - Ajustar la muestra con ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% (v/v); para obtener un pH <4.
- Solución de equilibrio. - TFA al 0.1% en agua Milli-Q.
- Solución de lavado. - metanol 5% (v/v), TFA 0.1% (v/v) en agua Milli-Q.
- Solución de Elución. - 0.1% TFA, ACN 70% en agua Milli-Q.

Procedimiento:

Previo a empezar, se lavaron todos los viales a utilizar con ACN 100% y en un tubo para cada muestra se colocaron 40ul de solución de lavado.

Fue ajustada la muestra a 35-40ul con 0.1% TFA, en caso de ser necesario se añadió ácido acético al 1% para llegar al volumen deseado. Se tomó la punta ZipTip con el embolo de la pipeta abajo y con un volumen de 10ul. Se aspiraron 10ul de solución de humectación de manera lenta y constante, después se descartó la solución. Fue repetido el paso anterior tres veces. Después, se aspiraron 10ul de la solución de equilibrio de forma lenta y constante, no permitiendo que le entre aire a la punta y se descartó la solución. Fue repetido el paso anterior tres veces. Luego, se tomaron 10ul de la muestra y descartaron por las paredes del tubo de centrifugación, repitiendo esto por lo menos 10 veces. Se aspiran 10ul de solución de lavado y descartaron, repitiendo esto cuatro veces. En el tubo de PCR que contenía 10ul de solución de elución, fueron aspirados y descartados por lo menos durante 10 ciclos. Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

## **Espectrometría de masas y análisis de datos**

Algunas bandas de los geles de ficobilisomas fueron seleccionadas para ser digeridas con tripsina de acuerdo con los protocolos publicados por Shevchenko et al. (2007) y Mendoza-Hernández et al. (2010). Las muestras se analizaron en el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (LAnSE) en un HPLC Ekspert nanoLC 425 (Eksigent, Redwood City CA) acoplado a un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 Plus (ABSciex, Framingham MA). Los datos fueron procesados en Protein Pilot con la base de datos de UniProt para la cepa *Synechococcus* PCC 7335 que contiene 5475 secuencias de proteínas.

Para el análisis de las muestras de geles CN-PAGE y SDS-PAGE de membranas, las muestras se enviaron a la Unidad de Identificación de Proteínas del Cinvestav-Irapuato. Las bandas fueron cortadas, desteñidas (en el caso de las teñidas con Coomassie), reducidas, alquilas y digeridas con tripsina (Lino et al., 2016). Los péptidos tripsinizados se eluyeron y separaron por LC con a nano Acquity system (Waters Corp. Milford, MA, USA), acoplado a un espectrómetro de masas ESI-linear ion trap LTQ Velos (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). Los datos fueron procesados con X! Tandem, y después fueron validados en PeptideProphet (descartando las asignaciones de péptidos con <0.7) y ProteinProphet. Los datos analizados solo incluyen las proteínas con probabilidad de 1 (> 0.9999). (Alcántara-Sánchez F et al. 2017, Deutsch et al. 2010)

## **Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

Para el análisis de los pigmentos fueron usadas las células que no fueron rotas después de la Prensa de French. Los pigmentos fueron extraídos por la resuspensión de 1g de células con metanol: acetona (80:10 v/v). El sobrenadante fue filtrado con papel filtro Whatman #3 y la solución se centrifugo en un microfuga. El volumen de

muestra empleado fue de 200  $\mu\text{L}$ . La cromatografía por HPLC fue realizada usando un UltiMate™ 3000 Standard Dual System (Thermo Scientific Inc., Massachusetts USA). La columna empleada fue una Supelco C18 previamente equilibrada con solución A (85% metanol y 10 mM acetato de amonio), solución B (metanol) y solución C (acetona). Los pigmentos fueron eluidos en la columna con un flujo de  $1.5 \text{ ml min}^{-1}$  de acuerdo con el siguiente programa: 0-5 min 100% solución A; 5-12 min 6% solución A, 92% solución B, 2% solución C gradiente lineal; 12-15 min 100% solución B gradiente lineal; 15-18 min 90% solución B, 10% solución C gradiente lineal; 18-20 min solución 20% solución B, 80% solución C gradiente lineal; 20-24 min 20% solución B, 80% solución C gradiente lineal, 26-35 min 100% solución B. Los datos fueron adquiridos usando el programa Chromeleon v6.8. Los espectros fueron colectados de 240 a 740 nm en intervalos de 0.2 s.

### **Extracción de DNA**

Se cosecharon 2 g de cultivo (*Synechococcus* PCC 7335 o *Nodularia spumigena* CCM 9). Fueron lavadas las células en 20 mL de solución Tris 50 mM, NaCl 50 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 50 mM pH 8.5. Después, se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min. Se repitió el lavado y centrifugado en 2 ocasiones más. Las células fueron colocadas en un tubo falcón de 50 mL, añadiendo 3 mL/g de solución Tris 50 mM, NaCl 50 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 50 mM pH 8.5 y 4 mg/L de lisozima. Se agitaron suavemente por inversión aproximadamente 20 veces e incubaron por 1 hr a 37°C. Después, se adicionó a la muestra 2% (v/v) de la solución de SDS al 20% e incubaron por 1 hr a 60°C. Fueron agitadas por inversión 20 veces y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se guardaron en el congelador a -20°C por lo menos 3 hrs. Después se descongelaron a baño maría a 60°C. La muestra fue transferida a tubos korex de 30 mL y se adicionó 1:1 (v/v) de Fenol saturado con TE: Tris 10 mM – Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM pH 8, esterilizado (solo se toma la fase inferior del frasco). Se tapó el tubo con parafilm y agitó por inversión 25 veces. La solución se incubó en hielo por 30 min. Al terminar la incubación se centrifugó a 5,500 rpm por 10 a 4°C en el rotor JA-20. Se extrajo la fase superior (fase acuosa) con una pipeta Pasteur y depositó la solución en un tubo limpio. La incubación y centrifugación realizada con fenol saturado, se realiza hasta que la fase acuosa sea color melón. Se añadió ½ (v/v) de acetato de amonio y 3:1 (v/v) de etanol absoluto pre-enfriado y resbalándolo suavemente por la pared. El tubo se tapó con parafilm y agitó por inversión suavemente 25 veces. Fue incubado en hielo por 30 min y después mantenido a temperatura ambiente por 30 min. Subsecuentemente, la muestra se colocó en hielo por media hora. Luego, se centrifugó a 7,500 rpm por 20 min a 4°C en el rotor JA-20. Descartando el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur sin tocar la pastilla. Al precipitado se le añadieron 5 mL de etanol 70% pre-enfriado y suspendiendo suavemente la pastilla. Se volvió a incubar en hielo por 20 min y después a centrifugar a 7,500 por 20 min a 4°C. Cuidadosamente se desechó el sobrenadante. Al precipitado se le añadieron 5 mL de etanol 80% pre-enfriado y se resuspendió suavemente la pastilla. La solución se incubó en hielo por 20 min y después se centrifugó a 7,500 por 20 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y al precipitado se le añadieron 5 mL de etanol 90% pre-enfriado y se resuspendió suavemente la pastilla. Se incubó en hielo por 20 min y enseguida fue centrifugada a 7,500 por 20 min a 4°C. El sobrenadante fue desechado y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Seguido de esto el precipitado es resuspendido con 500  $\mu\text{L}$  de solución TE-Salina: Tris 10 mM - Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM – NaCl 0.1 M pH 8, esterilizado e incubado por 30 min a 37°C para disolver el ADN. Se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de solución stock de RNAasa (100 mg/mL) para 500  $\mu\text{L}$  de muestra e incubaron por 1 hr a 37°C. Finalmente, se adicionaron 20  $\mu\text{g/mL}$  de solución stock de proteinasa K (10 mg/mL) e incubaron toda la noche a 37°C. Para recuperar el ADN, fue transferida la solución a un tubo korex de 15 mL adicionando 250  $\mu\text{L}$  de acetato de amonio 7.5 M y 1.5 mL de etanol puro pre-enfriado a 500  $\mu\text{L}$  de muestra. Con parafilm se tapó el tubo y se agitó suavemente por inversión 20 veces. Se incubaron en hielo por 30 min y se mantuvo a temperatura ambiente por 30 min más. La solución se centrifugó a 7,500 rpm por 20 min a 4°C en el rotor JA-20. Se extrajo el sobrenadante y se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de TE-Salina: Tris 10 mM - Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM – NaCl 0.1 M pH 8, esterilizada. Fue incubado por 15 min a 37°C para disolver el ADN. Se preparó una dilución 1:50 de la muestra con TE-Salina: Tris 10 mM - Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM – NaCl 0.1 M pH

8, esterilizada y medir un espectro de absorción para sacar el D.O.  $_{260\text{nm}}$ /D.O.  $_{280\text{nm}}$ . Se diluyó la muestra para que quedará en 50  $\mu\text{g/mL}$ .

## PCR

Se amplificó parte del gen *psbB* del DNA genómico de *Synechococcus* PCC 7335 en el Termociclador Techno Genius Thermal Cycler FGEN02TP (Applied Biosystems, CA). El par específicos de primers fue verificado usando el programa BLAST de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). En cada mezcla de PCR se usó una mezcla de: 0.5  $\mu\text{L}$  de a DNA genómico (50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  DNA), 2.5  $\mu\text{L}$  de solución de 10x ( $\text{MgCl}_2$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  de mezcla de dNTP, 0.25  $\mu\text{L}$  de Taq polimerasa [20 mM Tris-HCl (pH 8.0)] and 0.5  $\mu\text{L}$  (12.5 pmol) de cada primer (Primer forward: TAGAGTTCCAATAATACAAGCGAAGATCAA, Primer reverse: TTGTTTACCTTACGGTTCGACCACCGCAG) y fue ajustado el volumen final a 25  $\mu\text{L}$  con agua inyectable. La PCR se realizó de la siguiente manera: 94 °C por 2 min; 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min y 72 °C por 1 min; después se mantiene la temperatura a 72 °C por 10 min; y finalmente se deja a 4°C. Todos los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1%, corridos a 20v por 1h y teñidos con bromuro de etidio por 15 min. La toma de imágenes y cortado de la muestra se realiza en el equipo de Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad, USA). Las muestras son mandadas a secuenciar en la Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular UNAM.

## Resultados

### *Nodularia spumigena* CCM 9

#### Experimentos Previos Realizados

En el trabajo de campo desarrollado en el laboratorio se aislaron diversas cianobacterias de Cuatro Ciéneas, Coahuila de los lugares conocidos como Los Hundidos y Pozas Azules. Se lograron obtener parcialmente axénicas 10 cepas morfológicamente diferentes. Una vez crecidas en medio líquido y con suficiente concentración celular se procedieron a realizar la purificación del DNA de cada cepa. Se realizaron ampliaciones de 16S rRNA e ITS de cada cepa que fueron secuenciados. Los resultados obtenidos se alinearon en la base de datos de NCBI para conocer la especie más próxima de cada cianobacteria endémica aislada (Fig. 12).

Una de las cianobacterias encontradas es CCM 9 (Fig. 12, siglas de Cuatro Ciéneas México). El gen 16S rRNA de esta cianobacteria mostró 98% de identidad con el gen 16S rRNA con *Nodularia spumigena* CCY9414 (Fig. 12), sin embargo, la secuencia ITS solo mostró el 87% de identidad con *N. spumigena* CCY9414 (Anexo A, Fig. 28). Concluyendo que CCM9 cercana a *N. spumigena* CCY9414, pero es una cepa distinta.

*Nodularia spumigena* CCY9414 es una cianobacteria diazotrófica que soporta variaciones en la

salinidad del agua, se ha encontrado en el Estuario del Río Neuse, Carolina del Norte (EUA), en el Mar Báltico, al Norte de Europa y en Estuario Peel-Harvey, Australia. *N. spumigena* CCY9414 ha sido ampliamente estudiada con trabajos referidos a su tolerancia a la salinidad, su capacidad de fijar nitrógeno por medio de heterocistos y las cianotoxinas que libera. El genoma de esta cianobacteria ha sido secuenciado y se encuentra en proceso de ser anotado.



Fig. 13 Fotografía de CCM 9 con una ampliación 100x. Se observan una cianobacteria filamentosas que contienen cada 12 o 13 células vegetativas un heterocistos.

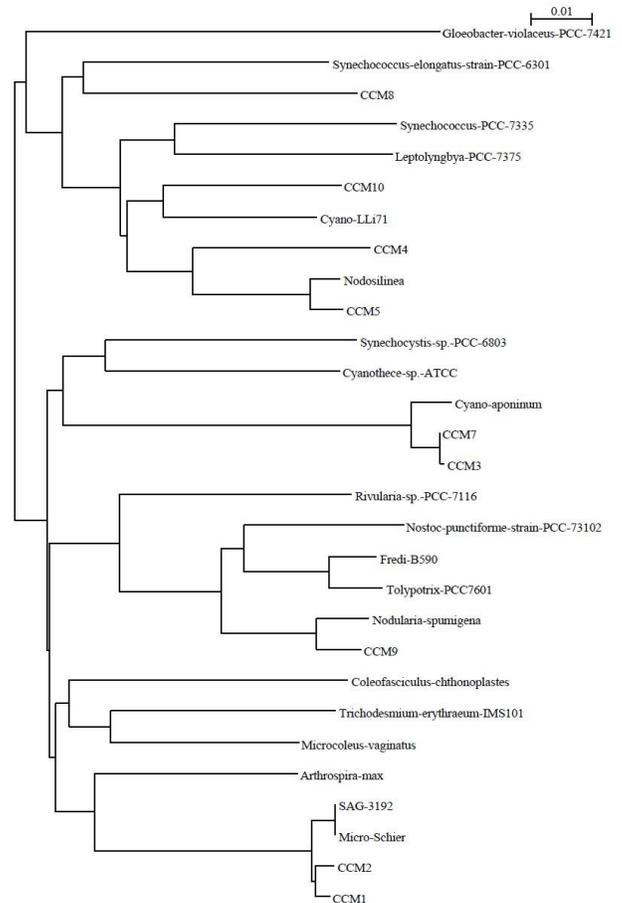


Fig. 12 Árbol filogenético de cianobacterias endémicas de Cuatro Ciéneas (CCM) junto con una variedad de otras cianobacterias

Después de conocer las características de *N. spumigena* CCY9414, se puso a crecer a CCM 9 en ausencia de nitratos y se observó que ésta desarrollaba heterocistos (Fig. 13). Así mismo se amplificó parcialmente el gen *nifH* (el gen que codifica a la proteína nitrogenasa reductasa) y fue secuenciado. Se encontró una identidad del 94% (224/238) y una similitud del 97% (230/238) con el gen *nifH* de *N. spumigena* CCY9414 (Anexo A). Con lo que se predice que CCM9 tiene la capacidad de fijar nitrógeno en células especializadas denominadas heterocistos.

Nodularia spumigena CCY9414 genome

Sequence ID: gb|CP007203.2| Length: 5462271 Number of Matches: 8

Range 1: 1454561 to 1455998 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2519 bits(1364)	0.0	1414/1438(98%)	4/1438(0%)	Plus/Minus

Features: rRNA-16S\_ribosomal\_RNA

Query 1	CATGC-AGTCGAACGGTCTCTTCGGAGATAGTGGCGACGGGTGAGTAAACCGTGGAAAT	59	Query 778	GAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG	837
Sbjct 1455998	CATGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGGACATAGTGGCGACGGGTGAGTAAACCGTGGAAAT	1455998	Sbjct 1455218	GAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG	1455159
Query 60	CTAGCTTCAGTTCGGGACAC-CCACGGGAACTGTGGCTAATACCGGATATGCCGAGAGG	118	Query 838	TATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGACTTGACATGTCCGGAATC	897
Sbjct 1455938	CTAGCTTCAGTTCGGGACACAC-CCACGGGAACTGTGGCTAATACCGGATATGCCGAGAGG	1455879	Sbjct 1455158	TATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGACTTGACATGTCCGGAATC	1455099
Query 119	TGAAAGGCTAGCTGCTCGAAGATGAGCTCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAG	178	Query 898	CCGGTGAAGCTGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCA	957
Sbjct 1455878	TGAAAGGCTAGCTGCTCGAAGATGAGCTCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAG	1455819	Sbjct 1455098	TCTCTGAAAGGAGAGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCA	1455039
Query 179	CGCACCAAGCGACGATCAGTACTGCTGTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAG	238	Query 958	GCTCGTGTGATGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCCACCTCGTTTTTAGTTG	1017
Sbjct 1455818	CGCACCTAGCGACGATCAGTACTGCTGTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAG	1455759	Sbjct 1455038	GCTCGTGTGATGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCCACCTCGTTTTTAGTTG	1454979
Query 239	ACACGGCCAGACTCTACGGGAGCGAGCAGTGGGAAATTTTCGGCAATGGGCGAAGGCC	298	Query 1018	CCAGCATTAGGTTGGGCACTCTAGAGACTGCCCGTGCACAAACCGGAGGAAAGTGGGA	1077
Sbjct 1455758	ACACGGCCAGACTCTACGGGAGCGAGCAGTGGGAAATTTTCGGCAATGGGCGAAGGCC	1455699	Sbjct 1454978	CCAGCATTAGGTTGGGCACTCTAGAGACTGCCCGTGCACAAACCGGAGGAAAGTGGGA	1454919
Query 299	TGACGGAGCAATACCGCGTGGGAGGAAAGGCTCTTGGTTGTAACTCTTTTCTCAGG	358	Query 1078	TGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCTTGGGCTACACAGCTACTACAATGCTACGGA	1137
Sbjct 1455698	TGACGGAGCAATACCGCGTGGGAGGAAAGGCTCTTGGTTGTAACTCTTTTCTCAGG	1455639	Sbjct 1454918	TGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCTTGGGCTACACAGCTACTACAATGCTACGGA	1454859
Query 359	GAAAGAAAAAAGAGCGTACCTGAGGAAATAGCATCGGCTAAGTCCGTCGACGAGCCGC	418	Query 1138	CAAAGGGCAGCTACACAGCAATGTGATGCAAAATCTCAGAAA-CCGTAGCTCAGTTCAGAT	1196
Sbjct 1455638	GAAAGAAAAAAGAGCGTACCTGAGGAAATAGCATCGGCTAAGTCCGTCGACGAGCCGC	1455579	Sbjct 1454858	CAAAGGGCAGCTACACAGCAATGTGATGCAAAATCTCAGAAA-CCGTAGCTCAGTTCAGAT	1454799
Query 419	GGTAATACGGAGATGCAAGCGTTATCCGGAAATGATTGGCGTAAGGGTCCGAGGTGG	478	Query 1197	CCAGGCTGCAACTCGCCTGGGTGAGGAGGAAATCGCTAGTAATTGAGGCTCAGCATACT	1256
Sbjct 1455578	GGTAATACGGAGATGCAAGCGTTATCCGGAAATGATTGGCGTAAGGGTCCGAGGTGG	1455519	Sbjct 1454798	CCAGGCTGCAACTCGCCTGGGTGAGGAGGAAATCGCTAGTAATTGAGGCTCAGCATACT	1454739
Query 539	AGCTAGAGTGGTTCGGGAGTAGAGGAAATCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATC	598	Query 1257	CGAGTGAATTCGTTCCCGGGCTTGTACACCCCGCGTACACCATGGAACTGTGTAC	1316
Sbjct 1455458	AGCTAGAGTGGTTCGGGAGTAGAGGAAATCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATC	1455399	Sbjct 1454738	CGAGTGAATTCGTTCCCGGGCTTGTACACCCCGCGTACACCATGGAACTGTGTAC	1454679
Query 599	AGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGCGCTACTAGGCGCACTGACACTGAGGAGCGAAA	658	Query 1317	CGCCGAGTGGTACCCCACTGTTTCGCAAGGGGAGTGCAGGAGGCGAGACTGGTACT	1376
Sbjct 1455398	AGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGCGCTACTAGGCGCACTGACACTGAGGAGCGAAA	1455339	Sbjct 1454678	CGCCGAGTGGTACCCCACTGTTTCGCAAGGGGAGTGCAGGAGGCGAGACTGGTACT	1454619
Query 659	GCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTTACCGGTAAGCATGGATACTA	718	Query 1377	GGGGTGAAGTGTAAACAGGTACCGTACCGGAAAGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTT	1434
Sbjct 1455338	GCTAGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTTACCGGTAAGCATGGATACTA	1455279	Sbjct 1454618	GGGGTGAAGTGTAAACAGGTACCGTACCGGAAAGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTT	1454561
Query 719	GGCGTGGCTGTATCGACCCGAGCGTCCCGGAGCTA-CGCGTTAAGTATCCCGCTGGG	777			
Sbjct 1455278	GGCGTGGCTGTATCGACCCGAGCGTCCCGGAGCTA-CGCGTTAAGTATCCCGCTGGG	1455219			

Fig. 14 BLAST del 16S rRNA de CCM9 (Query) con *N. spumigena* CCY9414 mostrando una identidad del 98% y un gap del 0%.

### Análisis in silico

Para realizar el análisis *in silico* se usó el genoma de *Nodularia spumigena* CCY9414, que como se mostró anteriormente es la cianobacteria más cercana a *Nodularia* CCM 9. Los genes buscados son los pertenecientes al ficobilisoma y para identificarlos se realiza BLAST y un alineamiento de la secuencia de aminoácidos contra *Anabaena variabilis*. Se buscan 3 tipos de proteínas en los FBS: las ficobiliproteínas, que contienen cisteínas conservadas donde se unen los cromóforos responsables de la absorción y transferencia de energía, las proteínas de unión (*linkers*) que no cuentan con cromóforos y las que se asocian al FBS como la FNR (Fig. 14).

Digestión. En bacterias la nomenclatura para los genes es con letras en cursivas y las primeras tres que definen una serie de proteínas relacionadas con una vía, una función o una estructura están en minúsculas y la última también en cursivas, pero en letra mayúscula. La última refleja el orden en un clúster de genes o el orden de una vía, por ejemplo: *apc*, gene que codifica una proteína de la aloficocianina. El producto génico se expresa con letras sin cursivas y se pone la primera letra con mayúscula igual que la última. Todas las ficobiliproteínas cuentan con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , así que, *ApcA* sería la secuencia de aminoácidos de la subunidad  $\alpha$  de la aloficocianina. Las ficobiliproteínas son heterotrímeros contruidos por homodímeros de una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ . Un trímero de AF o FC estaría contruido por  $(\alpha\beta)_3$  equivalente a tres subunidades *ApcA* y tres *ApcB*.

Para identificar las subunidades de las distintas ficobiliproteínas se procedió a los siguientes pasos: se alinearon las secuencias con las de *Anabaena variabilis* y se buscaron las cisteínas conservadas. Las subunidades  $\alpha^{AF}$  (*ApcA*),  $\beta^{AF}$  (*ApcB*),  $\alpha^{AF-B}$  cuentan con una sola cisteína para unir PCB. Para las subunidades  $\alpha^{FC}$  y  $\beta^{FC}$  de las ficocianinas (*CpcA* y *CpcB*); *CpcA* ensambla solo un cromóforo de PCB, por ende, solo cuenta con una cisteína conservada y *CpcB* que une dos PCB necesita dos cisteínas. Los genes *apcD* que codifica la subunidad  $\alpha$  de

aloficocianina y *apcF* que codifica la subunidad  $\beta$  de AF, se encuentran separadas de algún otro gen perteneciente al ficobilisoma. No se encontraron genes relacionados con la ficoeritrina (Fig. 15).

El segundo grupo de genes cuenta con ambas subunidades de la ficocianina (*cpcA* y *cpcB*), los *linkers* responsables de unir al *core* y los *rods* (*cpcG1*, *cpcG2* y *cpcG3*), el *linker rods* (*cpcC*) y el *rod capping linker* (*cpcD*). Un alineamiento de los tres genes *cpcG* dio como resultado una identidad del

35.052% con lo que se muestra son diferentes entre sí. En el análisis de su secuencia ninguno de los tres genes *cpcG* mostro un cruce transmembranal, por lo que, se descarta que la función de uno de ellos sea la de unirse al fotosistema I o II, así que se predice llevan a cabo la misma función de unir al *core* de aloficocianinas con los *rods* de ficocianinas (Fig. 15).

La presencia en el genoma de los homólogos *apcABCDEF* que definen el *core* del FBS, que implica, cuatro FBP (*apcABFD*) y dos enlazadores (*apcCE*). Cuatro genes están agrupados (*apcEABC*) y los otros dos genes (*apcD* y *apcF*) aislados en el genoma. Para poder predecir el tamaño del ficobilisoma se analiza la secuencia de aminoácidos de ApcE, y según el número de REPs, será el tamaño del *core*. En el caso del ApcE de *N. spumigena* CCM 9 se encontraron cuatro secuencias REPs y la cisteína conservada que une una PCB, por lo tanto, el ficobilisoma es pentacilíndrico (Fig. 16).

También fueron identificadas en el genoma las proteínas para el ensamble de la nitrogenasa, hidrogenasa e hidrogenasa de rescate (Anexo B) que son las proteínas responsables de la fijación de nitrógeno, además, las proteínas responsables de la diferenciación celular a heterocistos (células especializadas en la fijación de nitrógeno).

### Identificación de los componentes del FBS de CCM 9

Se crecieron células de *Nodularia spumigena* CCM 9 en luz blanca durante 7 días, una vez en fase exponencial se aislaron los ficobilisomas en un gradiente de sacarosa (0.5 – 2M) y se colectaron en fracciones de un mililitro.

Correspondiendo a estos pigmentos visualizamos en la Fig. 17A está el patrón de absorción a 620nm (círculos negros) de la Fig.

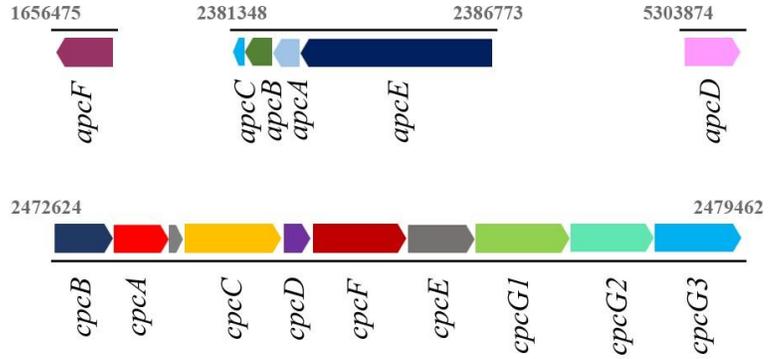
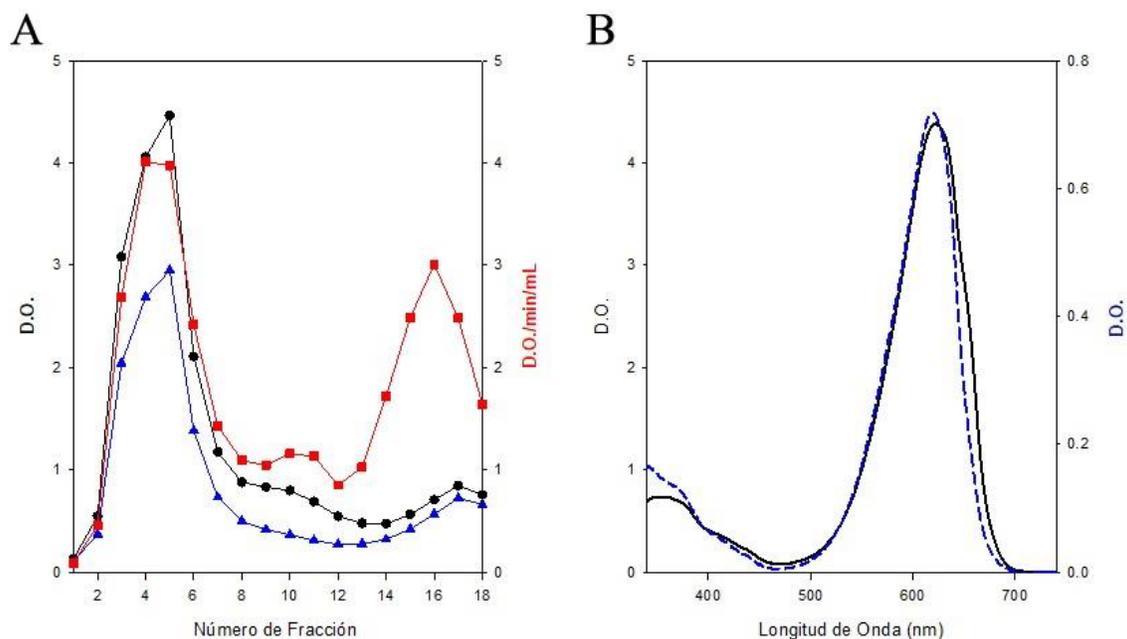


Fig. 15 Operones de los genes del ficobilisoma y la nitrogenasa de *N. spumigena* CCY9414.

1	MSIKASGGSS	VARPOLYQTL	PVATISQAEQ	QDRFLNGEL	SELASYFASG
51	AKRLEIAQML	TDNSEIIVSR	AANRIFVGGG	PMAFLEKPOE	RELAMAGAVG
101	ASEASVAEGM	KLGVTVYVES	RGGFLENLRS	IFNSSPSGPI	PPGFRPINVA
151	RYGFSNMAKS	LRDLSWFLRY	ATYAIVAGDP	NIISVNTRGL	REIENACST
201	EATVVALQEI	KAASLSYFRK	DTVATEIVSQ	YMDVLLNEFK	APTFSNKVQR
251	RPSGDQQGLQ	LPQIYSVAAE	RRPKFAMKPG	LSASEKIEVV	KAAYRQLFER
301	DITRAYSLSI	SDLESKVKNG	DISMKEFVRR	LAKSPLYQKQ	FYQPFINSRV
351	IELAFRHILG	RGPSRSREEVQ	KYFAIISNGG	LPALVDALVD	SDEYGDYFGE
401	ETVPYLRGLG	QEAQECRNWG	PQDLKFKFSA	PFRKVPQFIT	TFAAYDRPLP
451	DQHPYGGND	PLEIQFGAIF	PKETRNPSSS	PAPFGKDTRR	ILIHQGPIN
501	NQLSNPQARG	EFPGLSPKV	FRLDQVPSTL	SRKGGKGVSV	KFSESSTQAV
551	IRAIYLQVFG	RDVYEQRLK	VAEIKLENGE	ITVREFVRIL	AKSDLFRKMY
601	WTSLYVCKAI	EYIHRLLGR	PTYGRQENNK	YFDIASKKGF	YAVVDAILDT
651	PEYSEAFGED	TVPYERYLTP	AGVSLRQLRV	GSIREDVGTG	KVEKVPTRF
701	VELGTVIENR	TEPDIQFRIN	QGVTKQREQT	KVFKLVAANTS	DKVAVHTLIS
751	AAYRQIFERD	VAPYIIKNEF	SALESKLGNG	EISVKEFIAG	LGYSNLYLKE
801	FYTPYPNTKV	IEMGTHFLG	RAPIDQAEIR	KYNQILATQG	IRAFINAMVE
851	SVEYSQAFGE	DTVYPRRFP	LPAANFPNTQ	KLYNQLTKQN	KDLVVPFET
901	VKPRMNSANM	PILAKAIADL	AAQARQMDKT	KPLFIELGRS	FNDGRGQSV
951	VGVGTSRRKP	ARIHRMILGA	NQAEKQLVIN	AAVCQVLDF	SGQVPQDFRR
1001	SNLDSKLRNG	EISVREFVRE	LASSEIYRKR	FYTPYPNTKV	IELFRHILG
1051	RAPATQGEIR	QYNKLLADSG	LRAAVEAIVD	SQYARFFGE	DVVYPRYPS
1101	LPAGNYLGSV	QAAADLVKQS	WSSLSPAULT	GRPSDR	

Fig. 16 Secuencia de aminoácidos del linker ApcE de *n. spumigena* CCY9414. En amarillo se encuentra el dominio de FBP y en azul los REPs.



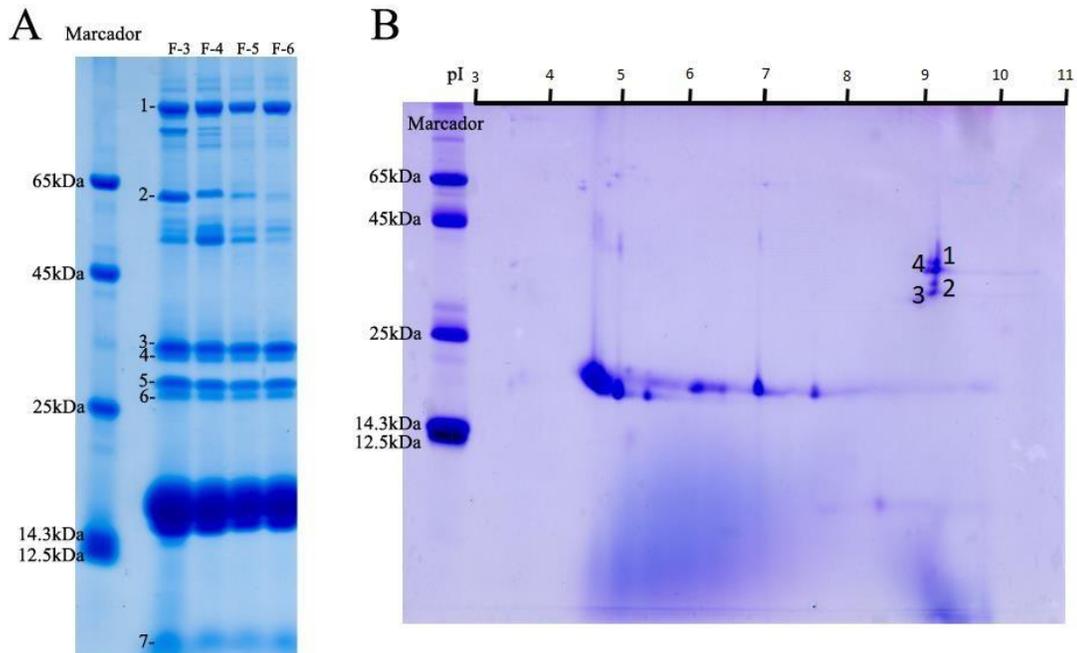
**Fig. 17 A.** Patrón de las fracciones (colectadas de arriba abajo) del gradiente de sacarosa. La absorción de cada fracción a 620nm se indica en círculos negros. La absorción a 650nm de cada fracción se muestra en triángulos azules. La actividad de FNR expresada en nmols de DCPIP·min<sup>-1</sup>·ml<sup>-1</sup> se indica en cuadrados rojos. **B.** Espectros de absorción de 340 a 740nm de las fracciones 5 (FBSs) y 10 (FBPs). Las células fueron crecidas en luz blanca continua (las 24 horas) con una intensidad (I) de 10.9  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  durante 7 días. Se cosecharon 3gr de células provenientes de 1.8L de medio BG110

17A. Dos picos se notan con máximos en las fracciones 5 y 10. El componente de más rápida sedimentación, fracciones 1-6 representa el 24% de las FBPs que están formando el FBS. El componente de sedimentación intermedia (fracciones 7-14) contiene el 48% de las FBPs. El tercer componente corresponde al levitado de Triton X-100 que se emplea para liberar al ficobilisoma de la membrana y contiene proteínas hidrofóbicas de la misma. El patrón en círculos negros corresponde a la distribución de la enzima FNR en el gradiente de sacarosa. El 7% co-migra con el FBS, el 33% de la FNR co-migra con las FBPs y finalmente se encuentra la libre el 60% de la enzima.

En la Fig. 17B están los espectros de las fracciones del FBS y de las FBPs. En la línea azul punteada observamos la fracción 6 cuyo máximo de absorción está a 620nm que pertenece al máximo de absorción de la ficocianina (PC), en 650nm observamos un hombro que corresponde a la aloficocianina (AF). Se calcularon las concentraciones de FC y AF encontrándose una relación de  $[\text{FC}]/[\text{AF}]$  de 1. El trazo rojo, es el espectro de la fracción 11. Su máximo de absorción es igual al de la fracción 6 a 620nm, lo que significa que el componente mayoritario es la PC, sin embargo, no hay un hombro 650nm con lo que no hay aloficocianina libre en esta fracción. Ya que no se encuentra ningún hombro en la fracción 5 y 10 a 650nm, es posible que esta cianobacteria no sea capaz de sintetizar ficoeritrina.

Se analizaron 7 de las fracciones obtenidas del gradiente de sacarosa (F3-F10) en SDS-PAGE al 10% (Fig. 18A), se predice que pertenece a ApcE de CCM 9 con un peso molecular es de 110kDa. Esto indica posiblemente CCM9 tiene un *linker core membrane* parecido al de *Nodularia spumigena* CCY9414 y por su peso molecular se puede predecir puede ser de cuatro REPs, de ser así se ensamblaría un FBS pentacilíndrico. Para corroborar el tamaño del gen se realizó una PCR para ApcE (Anexo A, Fig. 45) donde se encontraron las 34 secuencias REPs.

Por medio de análisis de espectrometría de masas se identificaron las proteínas pertenecientes a los linkers, que pueden ser del grupo I >60 kDa para el *linker* ApcE, grupo II para *linker* entre 40-60 kDa, grupo III entre 27-



**Fig. 18** Análisis SDS-PAGE de las fracciones del gradiente de sacarosa mostrado en la Fig. 17. **A.** Geles del 10% de acrilamida teñido con azul de Coomassie de las fracciones del gradiente de sacarosa 3-10 de CCM9 crecida sin nitratos durante 7 días en luz blanca. La electroforesis fue parada cuando el azul de bromofenol llegó a la parte final del gel. **B.** Primera dimensión: Gel de isoelectroenfoque de la fracción 3 corrida en una tira de pH 3-11. Segunda dimensión: SDS-PAGE de acrilamida al 14%. El barrido densitométrico se hizo para obtener los pesos moleculares y las cantidades relativas de las proteínas por medio del programa ImageJ. Los marcadores de peso molecular usados fueron: albumina sérica bovina (65kDa), ovoalbúmina (45kDa), quimiotripsinogeno (25kDa), lisozima (14.3kDa) y citocromo c de caballo (12.5kDa).

35 kDa y el grupo IV de *linkers* <10 kDa. Del grupo I se encontró ApcE, del grupo III CpcC, CpcG1, CpcG2, CpcG4 y del grupo IV CpcD (Fig. 18A, Tabla 3). Para intentar conocer la estequiometría de los *linkers* CpcG se realizó un gel de isoelectroenfoque (Fig. 18B). Solo se lograron encontrar 2 de las 3 CpcG, así que no logramos dilucidar la estequiometría (Tabla 3, Anexo C muestra los péptidos identificados de cada proteína).

Una proteína encontrada en la banda 2 del SDS-PAGE (Fig. 18A) fue identificada como *Phage tail sheath protein*. Se han secuenciado algunos genomas de cianófagos, lo que ha revelado la presencia de genes cianobacterianos implicados en el metabolismo energético central y la supervivencia de su huésped. Por ejemplo, se han descrito algunos genes relacionados con la fotosíntesis (psbA, hliP y FSII) y genes de respuesta al estrés (codificación de chaperones y genes asociados con motilidad bacteriana y quimiotaxis) en cianofagos, la mayoría de los cuales se transcriben junto con la replicación esencial de cianófagos relacionados (Gao et al. 2012).

La proteína HigB encontrada en la banda 3 del IEF, es una toxina que se asocia a los ribosomas y media la escisión de mRNA dependiente de la traducción de los sitios ricos en adenina. *N. spumigena* CCY9414 dentro de su genoma exhibe genes que codifican 13 cianotoxinas entre las que se encuentra HigB, parece ser que comparte esta singularidad con CCM 9. No se realizó la identificación por espectrometría de masas de las ficobiliproteínas porque es suficiente con identificarlas por medio de los espectros de absorción, FC a 620nm y AF a 650nm en las fracciones de FBS y FBPs.

**Tabla 3** La identificación proteómica en las bandas de SDS-PAGE de los componentes enlazadores del FBS hemidiscoidal (fracción 5) aislados de las células cultivadas durante una semana en LB

<b>Gel SDS-</b>	<b>Total</b>	<b>&gt;95%</b>	<b>Gel IEF</b>	<b>Total</b>	<b>&gt;95%</b>	<b>Gene</b>	<b>Predicted</b>				
<b>PAGE (kDa)</b>	<b>coverage</b>	<b>Coverage</b>	<b>(kDa)</b>	<b>coverage</b>	<b>Coverage</b>	<b>UniProt</b>	<b>Product</b>	<b>mass</b>	<b>pI</b>	<b>Star</b>	<b>Stop</b>
1 (92)	15*					A0ZF10	ApcE	127	9.4	2383363	2386773
2 (62.5)	10.55	5.9				K9WW1	±	62.02			
3 (32.1)	43	22.4	1 (32)	25.87	23.07	A0ZN82	CpcC	32.2	9.25	2473938	2474798
4 (30.7)	34.4	9.7	4 (31.8)	41.22	29.75	A0ZKM3	CpcG1	32.14	9.11	2476692	2477531
5 (27.5)	35.29	30.2	2 (30.5)	42.35	38.43	A0ZKM1	CpcG4	29.48	9.42	2478695	2479462
6 (26.2)	48.98	28.4				A0ZKM2	CpcG2	28.84	8.82	2477812	2478555
7 (8.7)	32.49	31.3				AOZN81	CpcD	8.9	9.67	2474836	2475078
			3 (28.2)	19.4	19.4	A0ZLQ7	HigB	10.84	6.63		

\*Esta proteína está identificada con Mascot y obtuvo un score de 125. ± Proteína de vaina de la cola de un fago.

## ***Synechococcus* PCC 7335**

### **Análisis *in silico***

En la anotación parcial del genoma de *Synechococcus* PCC 7335 se buscaron todas las proteínas pertenecientes al ficobilisoma, fotosistemas y fotoreceptores relacionados a la ACC y FaRLiP. Se realizaron BLAST y análisis *in silico* de cada una de las secuencias encontradas para poder asignarle una función y nombre a los genes. Por secuencia de alineación se encontraron 31 genes cuyos productos tienen similitud con las proteínas implicadas en la estructura del FBS, 30 para el fotosistema II y 21 para el fotosistema I. *Synechococcus* PCC 7335 exhibió la existencia de genes para ACC y FaRLiP (Fig. 19).

Para identificar las subunidades de las distintas ficobiliproteínas se procedió con los siguientes pasos: se alinearon las secuencias con las de *Tolypothrix* PCC 7601 y se buscaron las cisteínas conservadas. Las subunidades  $\alpha^{AF}$  (gen, *apcA*),  $\beta^{AF}$  (*apcB*),  $\alpha^{AF-B}$  (*apcD*) y  $\beta^{AF-18}$  (*apcF*) cuentan con una sola cisteína para unir ficocianobilina. En el caso de ficoeritrina los genes para las subunidades  $\alpha^{FE}$  (*cpeA*),  $\beta^{FE}$  (*cpeB*) donde se distinguen las subunidades por el número y posición de las cisteínas; CpeA cuenta con dos ficoeritrobilinas, por tanto, necesita dos cisteínas; CpeB une tres ficoeritrobilinas y cuenta con tres cisteínas de unión. Finalmente, para las subunidades  $\alpha^{FC}$  y  $\beta^{FC}$  de las ficocianinas (*cpcA* y *cpcB*); CpcA ensambla solo un cromóforo de ficocianobilina, por ende, solo cuenta con una cisteína conservada y CpcB que une dos ficocianobilinas necesita dos cisteínas. Durante ACC la remodelación de FBS se lleva a cabo únicamente en los brazos, cambiando PC<sup>i</sup> por FE o viceversa, mientras que el núcleo de AF y PC<sup>c</sup> con el linker CpcG permanece constante. Los genes para FE (*cpeA*, *cpeB*) están agrupados y en otro grupo de sus linkers (*cpeCDE*), que se expresan principalmente en luz verde/blanca. PC<sup>i</sup> genes se expresan sólo en LR y se cotranscriben con los tres genes de los linkers de FC (*cpcAiBiHiD*). Las subunidades  $\alpha^{FC}$  y  $\beta^{FC}$  inducibles y constitutivas, codificadas por estos dos grupos de genes son 75,93% y 73,25% idénticas, respectivamente. Ahora bien, de expresarse todos los genes en las condiciones mencionadas anteriormente, el peso molecular previsto de un FE-FBS es 7487.5 kDa y FC-FBS es 5958.16 kDa.

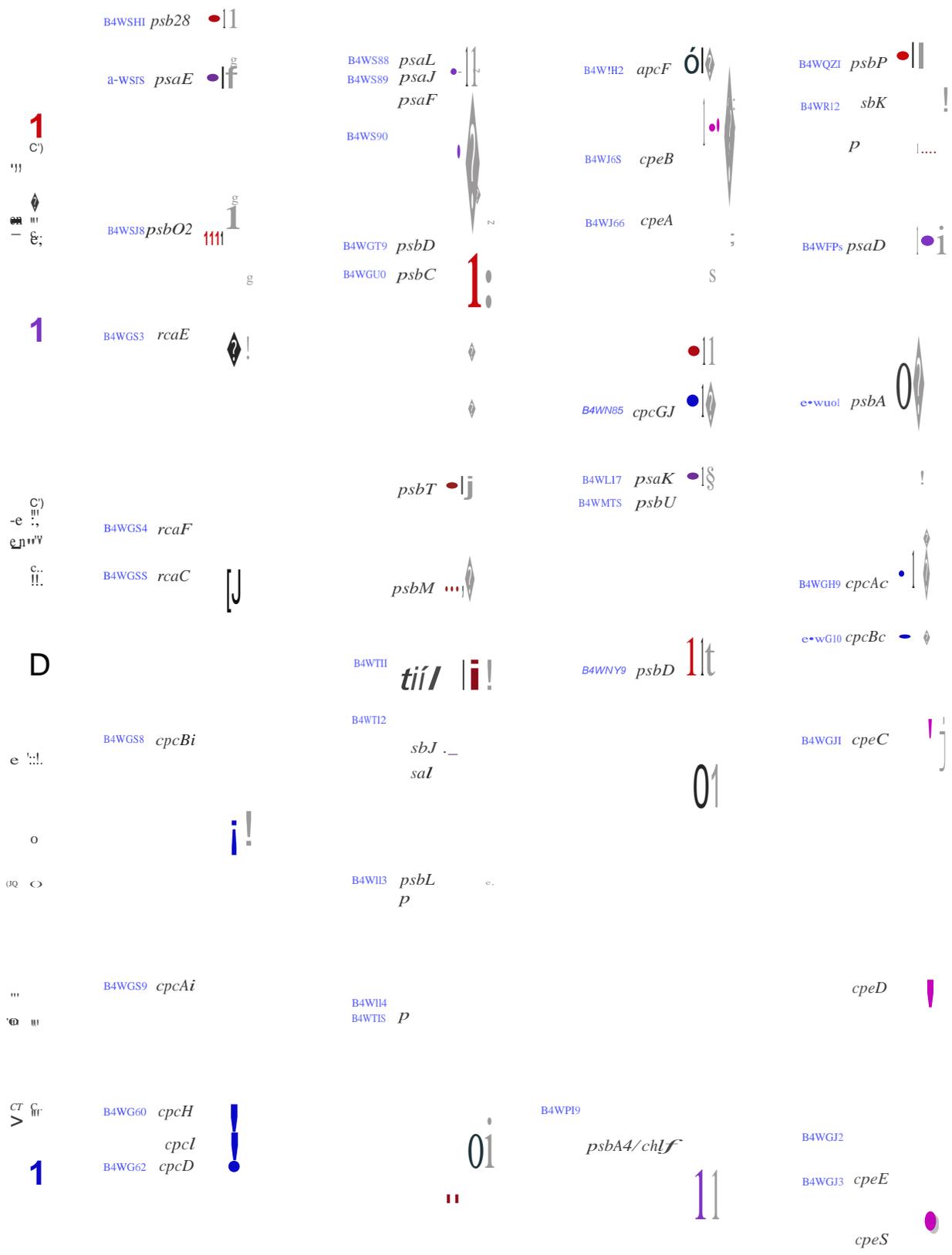
La presencia en el genoma de los homólogos *apcABCDEF* que definen el núcleo del FBS, que implica, cuatro FBP (*apcABFD*) y dos enlazadores (*apcCE*). Cuatro genes están agrupados (*apcEABC*) y los otros dos genes (*apcD* y *apcF*) aislados en el genoma. Por un análisis *in silico* de *apcE* se encontraron tres REPs y la cisteína conservada que une una ficocianobilina. El FC<sup>c</sup> (*cpcAcBc*) y *cpcG* genes establecido es constitutivamente expresado.

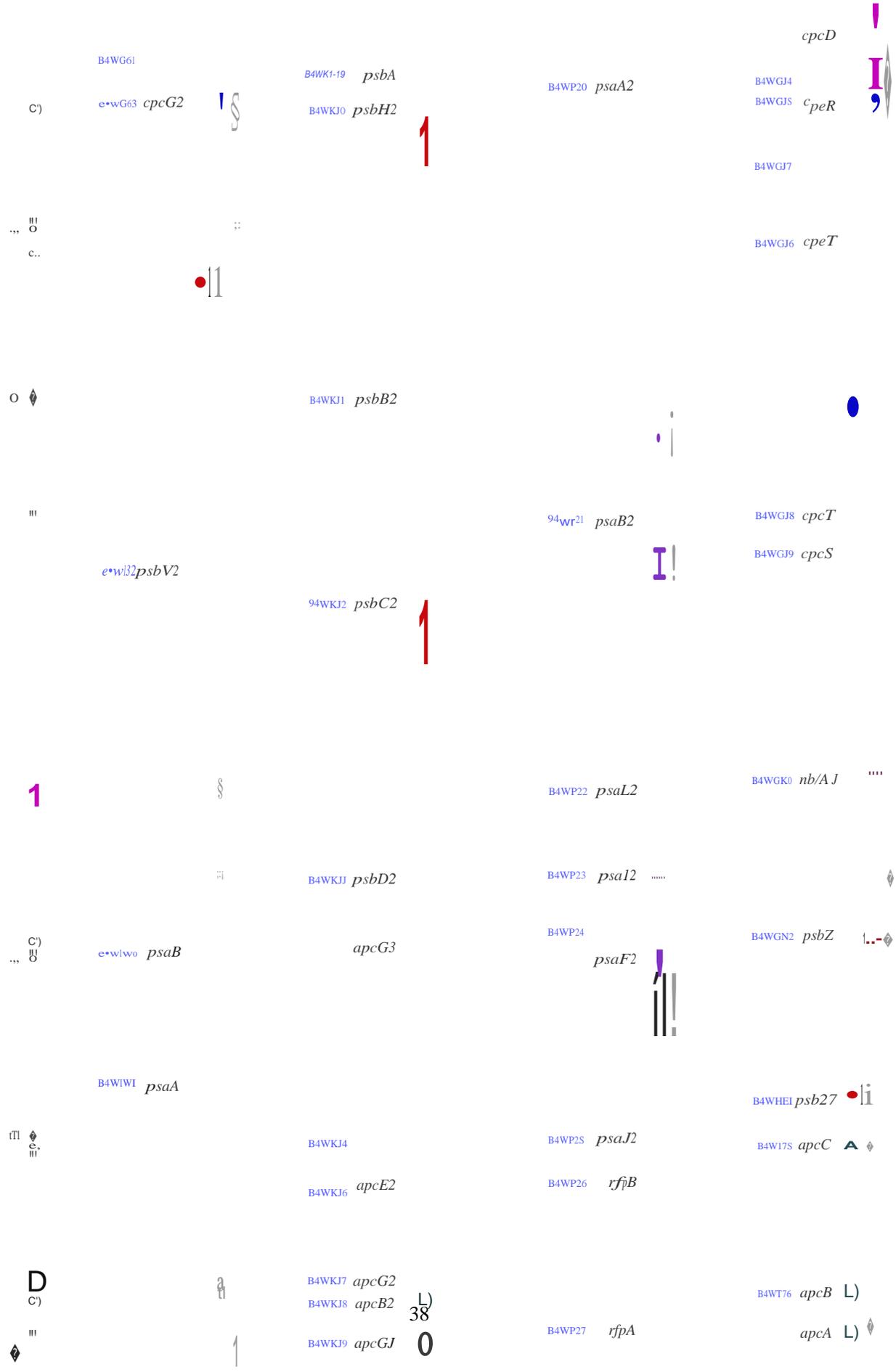
Por otro lado, cerca del clúster PC<sup>i</sup> está *cpcL* y el análisis de su secuencia mostró una secuencia hidrofóbica de 20 aminoácidos que desconocemos en qué condiciones se pueda expresar. El último clúster encontrado contiene un *apcG4* y *apcB3*, y está junto a CP43-like, también desconocemos la forma de expresar estos genes. Además del segundo clúster para otro *core* del ficobilisoma, estas cianobacterias cuentan con un segundo clúster para algunas subunidades de los fotosistemas. En el caso del fotosistema II se han identificado los genes *psbC2* (CP43) y *psbB2* (CP47) y las subunidades *psbA5* (D1) y la subunidad *psbD2* (D2), *psbH2*, así como una *psbA4/chf* que se describió es la sintetasa de la clorofila *f*. Se estima que el dímero del FSII de *Synechococcus* PCC 7335 en condiciones de crecimiento en luz blanca o roja sea de 764 kDa, mientras que en infrarrojo sería de 761 kDa. El análisis *in silico* de *psbA5* que codificaría para la subunidad D1 del fotosistema II mostró junto al sitio de unión del Mg existen 5 residuos conservados (YIPAL) en todas las cepas con fotoaclimatación al infrarrojo cercano, este fue el único cambio considerable encontrado en toda la proteína (Anexo D, Fig. 49). Las subunidades D2 del fotosistema II son muy conservadas entre especies, en especial la zona donde se ancla P680, para el caso de *psbD2* de *Synechococcus* PCC 7335 que mostró el cambio de un aminoácido importante en la interacción con P680, en el resto de las especies se encuentra un W191, pero en *psbD2* de *Synechococcus* PCC 7335 y en el resto de las cepas con fotoaclimatación al infrarrojo cercano cambia por una Y191 (Anexo D, Fig. 50).

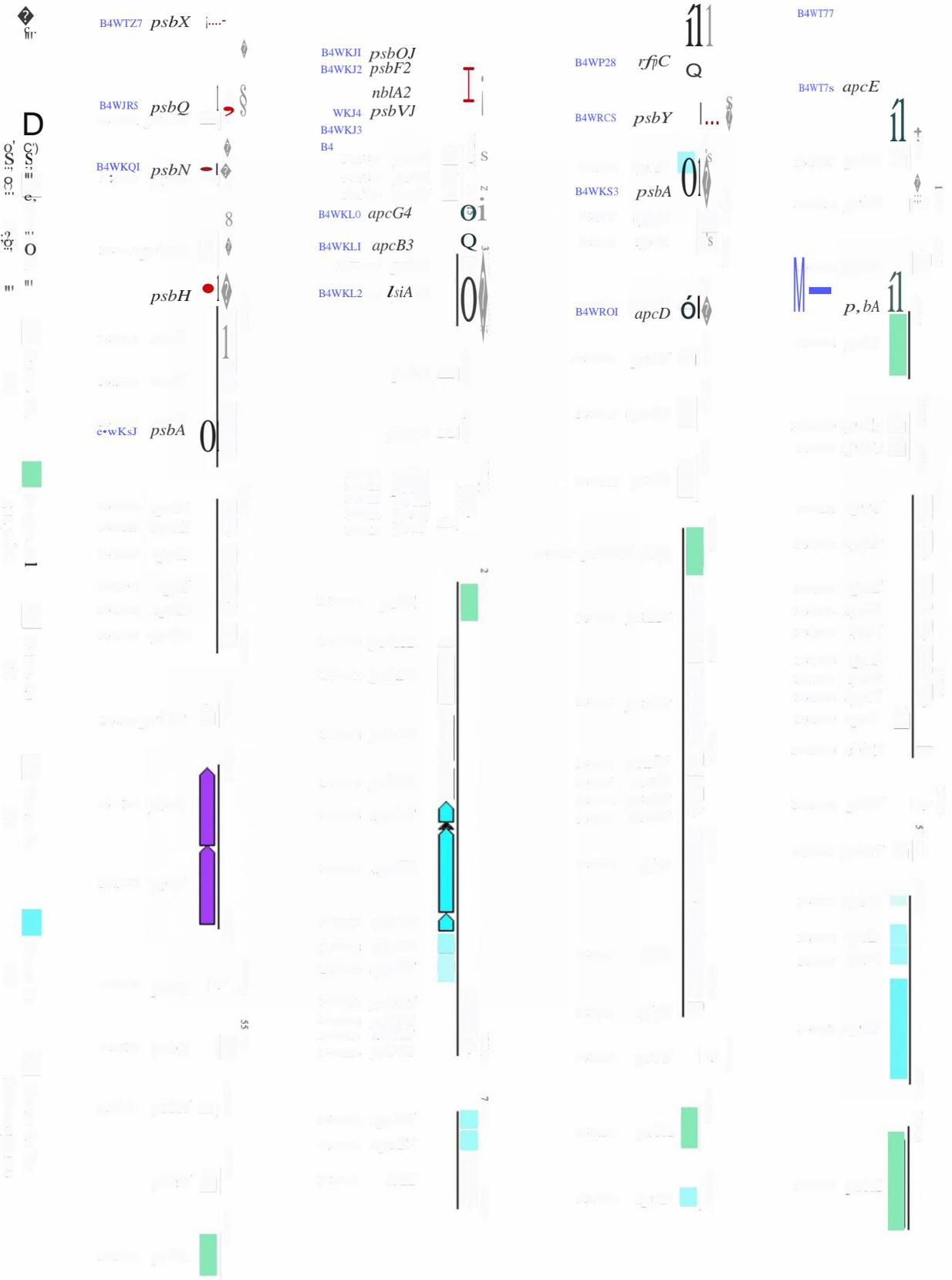
Para el fotosistema I se encontraron los genes *psaA5*, *psaB2* (juntos forman el centro de reacción y la antena proximal), *psaL2* (responsable del ensamblaje del trímero) y subunidades periféricas (*psaI*, *psaJ* y *psaF*). En *Synechococcus* PCC 7335 estos segundos genes para los fotosistemas son los únicos que se encuentran en clúster atribuido a la remodelación del cercano infrarrojo, el resto de los genes para los fotosistemas se encuentra dispersos en el genoma. Por lo tanto, el trímero del FSI de *Synechococcus* PCC 7335 en condiciones de crecimiento en luz blanca o roja se espera sea de un peso aproximado de 811 kDa, mientras que en infrarrojo sería de 816 kDa. Por otro lado, el análisis *in silico* de *PsaA5*, proteína que ancla el centro de reacción, mostro la existencia de dos *loops* solo existentes en las cepas con fotoaclimatación al infrarrojo cercano, estos se encuentran entre los aminoácidos 327-338 y 502-534. En el modelado de la proteína se ubicaron como dentro de la membrana tilacoidal pero no interaccionan con ninguna otra subunidad del PSI ni tampoco mostraron interacción con las clorofilas. El mismo análisis se realizó en *PsaB2*, esta es la otra subunidad que estabiliza al centro de reacción, esta no mostro ningún cambio visible en su secuencia.

Una de las curiosidades encontradas en el genoma de *Synechococcus* PCC 7335 fue la presencia de genes pertenecientes a la regulación y aparición de los heterocistos en cianobacterias filamentosas. Esta cianobacteria es unicelular con capacidad de fijar nitrógeno por lo que expresa una nitrogenasa. El clúster involucrado en la fijación de nitrógeno molecular está constituido por el operón de la nitrogenasa *nifHDK* y 13 genes involucrados en la síntesis y el ensamble de los grupos prostéticos. Los cofactores de la nitrogenasa son incorporados cuando las proteínas estructurales *NifHDK* se encuentran ensambladas. Los tres cofactores parten de [4Fe-4S], los cuales son armados en *NifU*. 4Fe y 4S provenientes de 4 Cys con *NifS* (que es una desulfurasa) son transferidos a *NifU*. Este clúster formado será transferido directamente a *NifH*. Para el ensamblado del clúster-P se requiere la transferencia de 2 unidades de [4Fe-4S] al heterodímero *NifDK*, donde una vez transferidos por *NifU*, *NifH* es acoplada y se unen dos moléculas de ATP, esto promueve la unión de ambos clústeres de [4Fe-4S], provocando un cambio estructural en ellos y la salida de un átomo de azufre (Tabla 4).

La construcción del clúster FeMo es más compleja que las anteriores. El primer paso del ensamblado se da en *NifB* donde se requieren dos unidades [4Fe-4S], 2 moléculas de S-adenosil L-metionina (SAM) y un átomo de azufre. Uno de los clusters de [4Fe-4S] es metilado por SAM y promueve un cambio estructural, provocando la unión entre la molécula de azufre con ambos clústeres de [4Fe-4S]. Una segunda SAM toma un hidrógeno del metilo del clúster [4Fe-4S], estimulando la completa unión de ambos clusters de [4Fe-4S], y un segundo cambio estructural, obteniendo un nuevo clúster [8Fe-9S] denominado L clúster (Hu et al. 2012). El tercer paso se realiza en el heterodímero *NifEN*, donde *NifB* transfiere el clúster L [8Fe-9S], *NifV* aportará el homocitrato y *NifQ* el molibdeno (Hu et al. 2010). Una vez se encuentran estos componentes en *NifEN* esta es “cerrada” por *NifH* y activada con ATP, provocando el ensamblaje del clúster [Mo(7Fe-9S): homocitrato] y la salida de un átomo de Fe, denominado clúster M. El último paso es la transferencia del clúster M a *NifDK* y el acople de *NifH* (Fontecilla- Camps et al. 2009).







**Fig. 19** Mapa de los genes y modelos estructurales de la FBS de *Synechococcus* PCC 7335. Grupos de genes de ficobilisoma. E. Productos génicos asociados a proteínas de antena de función desconocida. Los números, por encima de los genes o grupos de genes, dan la posición de nucleótidos en el cromosoma. Los nombres de los genes se muestran en cursiva. La secuencia del *Synechococcus* sp. El genoma de PCC 7335 (ATCC29403) era de NCBI, número de acceso NZ\_DS989904.1. Los programas en línea para BLAST análisis se obtuvieron utilizando NCBI y UniProt sitios web.

Tabla 4 Genes relacionados a la fijación de nitrógeno. En rojo se muestran algunos genes responsables de la diferenciación a heterocistos.

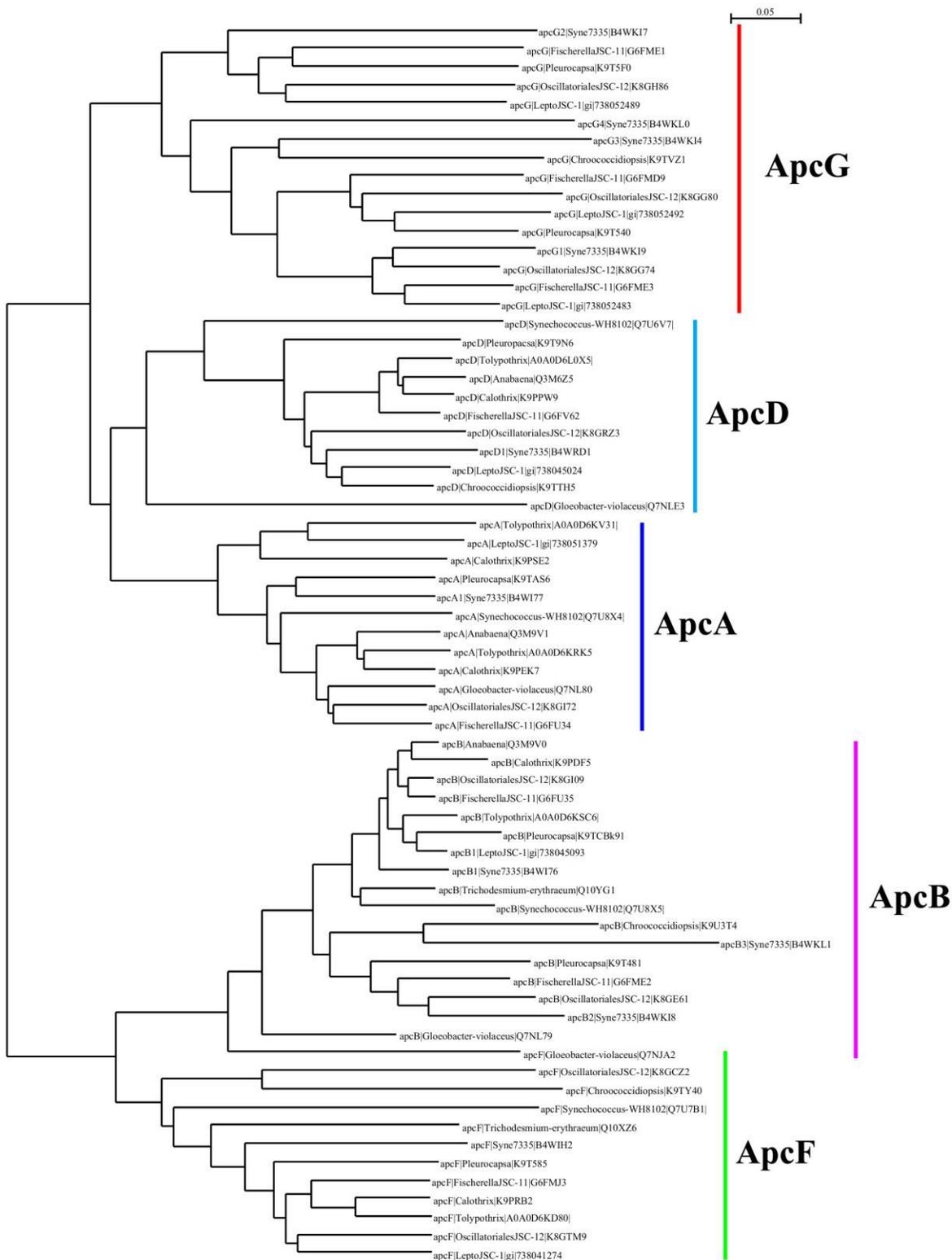
Gene	PM Predicho kDa	Proteína	UniProt Access	NCBI
<i>NtcA</i>	24,657	Global nitrogen regulatory protein, CRP family of transcriptional regulators	<del>B4WN77</del>	<a href="#">WP_006457314.1</a>
<i>HetR</i>	34,962	Main regulator of heterocyst differentiation HetR	<a href="#">B4WJH4</a>	<a href="#">WP_006456315.1</a>
<i>HesB</i>	12,802	Fe-S cluster assembly protein HesB	<a href="#">B4WRU2</a>	<a href="#">WP_006457093.1</a>
<i>HesA</i>		Protein HesA	<a href="#">B4WRU3</a>	<a href="#">WP_006454552.1</a>
<i>DevB</i>	43,458	ABC exporter membrane fusión protein, DevB	<a href="#">B4WSZ1</a>	<a href="#">WP_006458106.1</a>
<i>DevC</i>	45,349	DevC protein	<a href="#">B4WTK6</a>	<a href="#">WP_006457799.1</a>
<i>DevC</i>	43,574	DevC protein	<a href="#">B4WSZ0</a>	<a href="#">WP_006457889.1</a>
<i>HetN</i>	28,109	Ketoacyl reductase HetN/ Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	<a href="#">B4WJC4</a>	<a href="#">WP_006455801.1</a>
<i>HetI</i>	25,565	4'-phosphopantetheinyl transferase, HetI	<a href="#">B4WHW2</a>	<a href="#">WP_006454265.1</a>
<i>PatB</i>	61,452	Transcriptional Regulator	<a href="#">B4WR41</a>	<a href="#">WP_006455610.1</a>
<i>nifE/nifN</i>	101.79	Nitrogenase MoFe cofactor biosynthesis protein NifE, putative	<a href="#">B4WRU8</a>	<a href="#">EDX83984.1</a>
<i>nifK</i>	60.0864	nitrogenase molybdenum iron protein beta-chain	<a href="#">B4WRV1</a>	<a href="#">WP_038016695.1</a> , <a href="#">EDX83720.1</a>
<i>nifD</i>	53,956	Nitrogenase protein alpha chain	<a href="#">B4WRV2</a>	<a href="#">WP_006453870.1</a>
<i>nifB</i>	43.78	Nitrogenase cofactor biosynthesis protein NifB	<a href="#">B4WRV7</a>	<a href="#">WP_038016696.1</a> , <a href="#">EDX84235.1</a>
<i>nifS</i>	42.61	Aminotransferase, class V superfamily	<a href="#">B4WRV5</a>	<a href="#">WP_006454118.1</a>
<i>nifU</i>	31.61	Nitrogen fixation protein nifU	<a href="#">B4WRV4</a>	<a href="#">WP_006453463.1</a>
<i>nifH</i>	31.57	Nitrogenase iron protein (291 AA)	<a href="#">B4WRV3</a>	<a href="#">WP_006457679.1</a>
<i>nifX</i>	16.32	Nitrogen fixation protein NifX	<a href="#">B4WRU7</a>	<a href="#">WP_006456261.1</a>
<i>nifW</i>	12.47	Nitrogen fixation protein NifW	<a href="#">B4WRU4</a>	<a href="#">WP_038016691.1</a> , <a href="#">EDX85983.1</a>
<i>nifZ</i>	10,891	Nifz domain	<a href="#">B4WRV0</a>	<a href="#">WP_006455367.1</a>

### **Análisis de la secuencia de aminoácidos de las ficobiliproteínas**

Para conocer las diferencias, similitudes y grupo al que pertenecen estas nuevas aloficocianinas encontradas en el genoma de *Synechococcus* PCC 7335 es necesario realizar más análisis aparte de un BLAST. Un árbol filogenético de las aloficocianinas encontradas en *Synechococcus* PCC 7335 junto con otras cianobacterias con ACC, FaRLiP o cercanas a esta cianobacteria, mostró 2 grandes grupos de aloficocianinas que se reconocen como subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Fig. 20). El grupo de las subunidades  $\beta$  se subdivide en las ApcB ( $\beta^{AF}$ ) y ApcF ( $\beta^{18.5}$ ), en el grupo de las subunidades  $\alpha$  se encuentran ApcA, ApcD y aparece un nuevo grupo antes no identificado que nosotros denominamos ApcG. En este grupo se encuentran todas las aloficocianinas ‘nuevas’ de las cianobacterias con FaRLiP.

Un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las aloficocianinas nos mostró que ApcG es muy cercana a ApcD (Fig. 21, línea negra lado derecho). A primera vista se observa una secuencia única en estas aloficocianinas, que denominaremos huella peptídica (Fig. 21, subrayado), y que es la región de la proteína que rodea a la ficocianobilina (PDB: 4PO5). La huella peptídica está entre Phe 57 a Trp 84 y la numeración corresponde a las subunidades de tipo  $\alpha$  del FaRLiP. La secuencia es FWXXXPXTPSNS/TGXX---XXXXXC/AXRDXXWY, hay algunos residuos importantes que pueden agruparse en cuatro grupos: el primero incluye dos triptofanos: Trp58 adyacente a Phe57 y Trp84-Tyr85. Esto llama la atención ya que en las secuencias de aminoácidos de las subunidades ApcBs, no se encuentran ningún triptofano, en las subunidades de ApcAs se tienen un Trp (84) y algunas ApcD, ocasionalmente tienen dos Trp (58 y 84). En segundo lugar, dos prolinas (Pro62 y Pro65) que interrumpen una hélice alfa, lo que podría provocar mayor “flexibilidad” de la PCB. En tercer lugar, los residuos de aminoácidos Cys61, Thr64, Ser66, Asn67 y Ser68 como posibles donantes de enlaces de hidrógeno en la interacción con el PCB. Cuarta, una brecha de tres aminoácidos que acorta la distancia entre los aminoácidos aromáticos (Phe57-Trp58 y Trp84-Tyr85) haciendo una fuerte interacción  $\pi$ - $\pi$  o haciendo más compacta el hueco de PCB. Esta propuesta de nomenclatura también se basa en la estructura predicha utilizando el programa Swiss-Model ExPASy con la alineación de plantillas PDB  $\alpha^{AF}$ , 1B33 y  $\alpha^{AF-B}$ , 4PO5 (Anexo D).

Otra observación de este alineamiento es que la cisteína conservada en las aloficocianinas (Cys77) en 4 proteínas no están presente, dos ApcF y dos ApcG; en ambos casos pertenecen a cianobacterias con FaRLiP. Hasta este momento son tres observaciones que nos dan pie a nombrar a estas nuevas aloficocianinas: su agrupación en el árbol filogenético, la huella peptídica en la alineación de la secuencia de aminoácidos y la relevancia de algunos aminoácidos que se encuentran en la huella peptídica que las demás aloficocianinas no tienen, esto se podría decir que es un dominio único en estas aloficocianinas (ApcGs). En consecuencia, al nombrarlas como ApcGs, los nombres de cada subunidad serían: ApcG1 ( $\alpha^{AF-C}$ ), ApcG2 ( $\alpha^{AF-D}$ ), ApcG3 ( $\alpha^{AF-E}$ ) y ApcG4 ( $\alpha^{AF-F}$ ).



**Fig. 20** El árbol filogenético para ApcA, ApcB, ApcD y ApcF secuencias de varias cepas similares incluyen con FaRLiP o CCA similar a la de Synechococcus ATCC 29403. Secuencias se alinearon utilizando el Clustal X2 y un vecino de unión árbol se construyó a partir

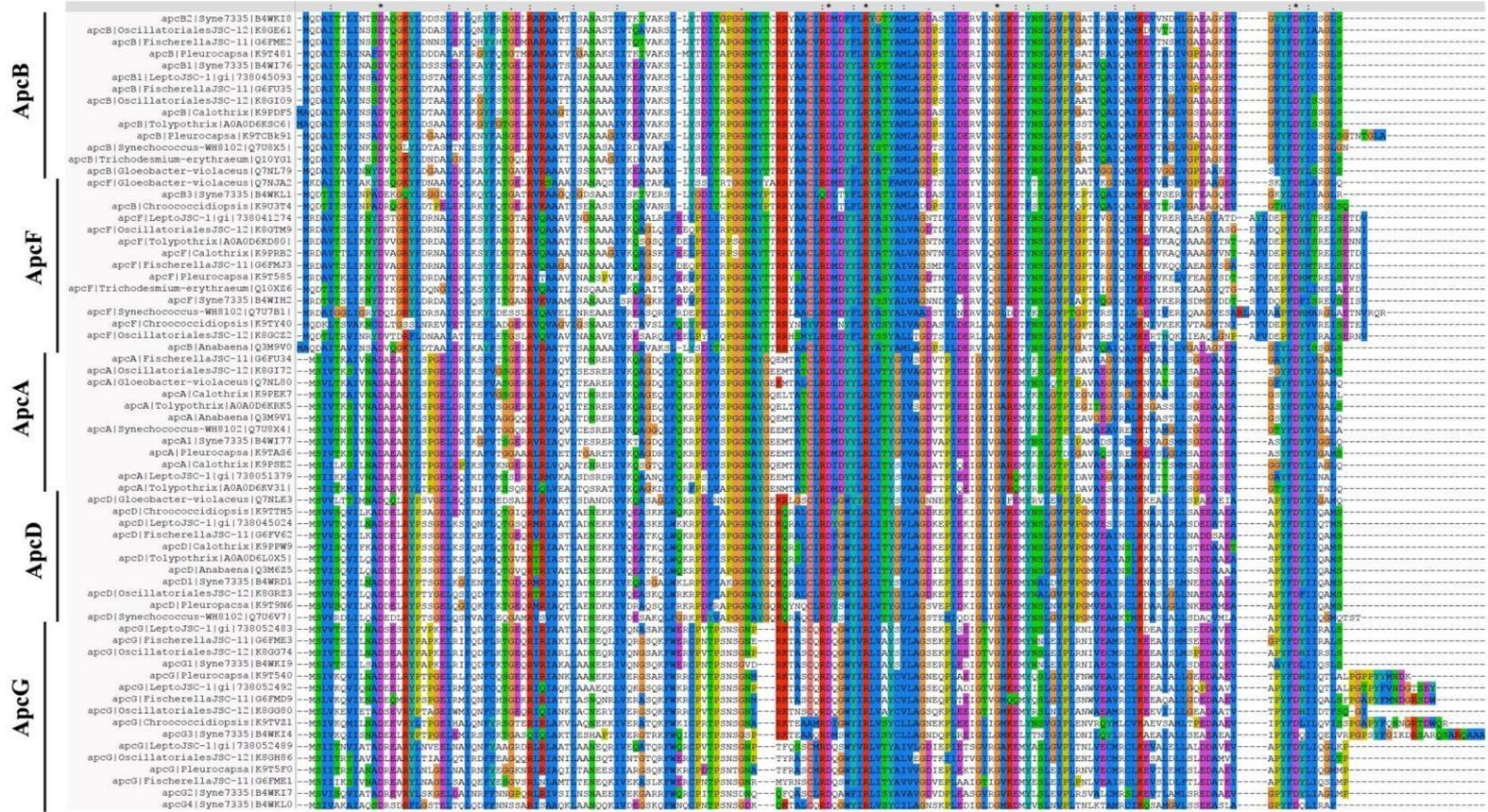
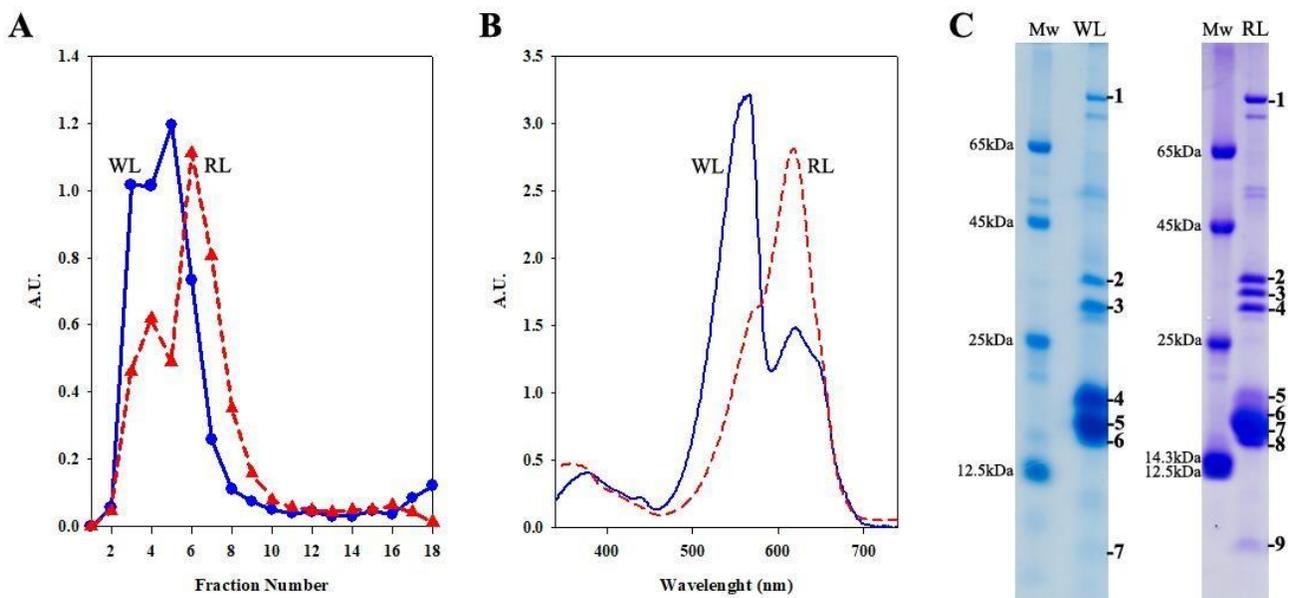


Fig. 21 La alineación de secuencias para las secuencias de ApcA, ApcB, ApcD y ApcF de diversas cepas incluye FaRLiP, CCA o similar a la de *Synechococcus* PCC 7335. Las secuencias se alinearon usando el Clustal X2. AP se cimentaron para sus clados: ApcB ( $\beta^{AP}$ ), ApcF ( $\beta^{AP-18.9}$ ), ApcA ( $\alpha^{AP}$ ), ApcD ( $\alpha^{AP-C}$ ) y nuevo ApcG (líneas de la izquierda). La línea negra derecha fue indicada ApcD y ApcG clusters. En la línea inferior se mostró una secuencia específica en la que se observa una notable diferencia en el grupo ApcG (residuos 58 a 88 aa).

### Experimentos previos realizados

En nuestro laboratorio de fotosíntesis en cianobacterias, se había estudiado previamente la aclimatación cromática complementaria en dos cianobacterias *Tolypothrix* PCC 7601 y *Fremyella diplosiphon* UTEX B590, pero no se contaba con sus genomas.

La elección de *Synechococcus* PCC 7335 se basó en las observaciones realizadas por Rippka et. al (1979). Es una cianobacteria foto-heterótrofa facultativa, que puede usar fructosa, sintetizar la enzima nitrogenasa en anaerobiosis, crecer en un medio marino, además, tiene la capacidad de aclimatación cromática complementaria (ACC) tipo III y fotoaclimatación al infrarrojo cercano (FaRLiP). La ACC tipo III modifica el ficobilisoma mediante la inhibición de la síntesis de ficoeritrina y el aumento de la producción de ficocianina por la presencia de luz roja. La ventaja de usar *Synechococcus* PCC 7335 es que su genoma está completamente secuenciado, aunque solo parcialmente anotado; de esta forma se pueden identificar proteínas de interés.



**Fig. 22** Aislamiento y caracterización de FBS de células *Synechococcus* PCC 7335 cultivadas en luz blanca (WL) y luz roja (RL). **A.** Se representó gráficamente la absorbancia a 650 nm de cada fracción del gradiente de sacarosa de las células crecidas en WL (círculos) y RL (triángulos). **B.** Espectros de absorbancia de FBS; Fracción 5 para WL (línea continua) y fracción 6 para RL (línea discontinua). **C.** Un análisis de SDS-PAGE al 10% de las fracciones de FBS de los gradientes de sacarosa mostrados en A. Las fracciones 5 y 6 de WL y RL, respectivamente. Las bandas con números se sometieron a análisis MS / MS.

En mi proyecto de maestría estudié la ACC de *Synechococcus* PCC 7335. La cianobacteria se creció en luz blanca, verde y roja para determinar la constitución de cada FBS. Se cultivó en blanco, verde o luz roja durante 11 días. Cuando creció en luz blanca o verde, la cepa se volvía marrón, mientras que cuando crecía en luz roja se coloreaba de verde; el cambio de color es un efecto visible de ACC. El recambio en los pigmentos es responsable de la pigmentación visible de *Synechococcus* PCC 7335, por lo tanto, por gradiente de sacarosa se aislaron FBS después de cultivarla en luz blanca o roja. Para conocer la distribución del FBS en el gradiente de sacarosa se eligió una longitud de onda donde absorbaban las ficobiliproteínas, en este caso se decidió observar la distribución de AF que es FBP constante en ambos tipos de FBS (Fig. 22). La primera observación es que el gradiente WL tiene fracción de sedimentación rápida (F-3) que RL (F-4) con pesos aparentes en el gradiente de 7.200 y 4.500 kDa, respectivamente (Fig. 22A). En gradiente de WL, más del 82% del pigmento se encontró como FBS (fracciones 2-8). En el caso del gradiente RL, el 70% del pigmento se encontró como FBS. La fracción de sedimentación rápida

se representó gráficamente (Fig. 22B), para el gradiente de WL fue la fracción 5 mientras que el gradiente de RL fue la fracción 6.

El espectro de absorción de la fracción 5 (FE-FBS) presentó una absorción máxima a 565 nm y hombros a aproximadamente 620 y 650 nm (Fig. 22B, línea azul). Usando ecuaciones simultáneas con coeficientes de extinción reportados (Tandeau de Marsac 1988, Pérez-Gómez al. 2012), se obtuvo para [FE] 4.5  $\mu\text{M}$ , para [FC] 2.7  $\mu\text{M}$  y para [AF] 25  $\mu\text{M}$ . La estequiometría de FE-FBS para [FE]: [FC]: [AF] obtenida fue 1.8: 1.08: 1. El FBS obtenido a partir de células cultivadas en RL contenía 5.3  $\mu\text{M}$  de [FC] y 1.8  $\mu\text{M}$  de [AP] según el espectro de un pico a 625 nm y un hombro a 650 nm (Fig. 22B, línea discontinua). Se obtuvo la estequiometría FC-FBS de [FC]: [AF] de 2.9: 1. Los *linkers* de FE-FBS (LB) y FC-FBS (LR) se identificaron después del análisis de SDS-PAGE y espectrometría de masas de las fracciones 5 obtenidas de la centrifugación en gradiente de sacarosa. En la figura 22C se muestran las tiras de gel correspondientes a las fracciones 5 LB (FE-FBS) y 6 LR (FC-FBS). En la tira LB, hemos identificado: el *linker core membrane*  $L_{CM}^{101}$  (ApcE1); dos de los *linkers rods* de FE:  $L_R^{32.4}$  (CpeC),  $L^{28.1}$

(CpeD); el *linker rod-core*  $L_{RC}^{30}$  (CpcG); y el *linker core*  $L^{7.8}$  (ApcC). Sólo se identificaron tres FBP:  $\alpha^{FE}$  (CpeA),  $\beta^{FE}$  (CpeB) y  $\beta^{AF}$  (ApcB). En la tira RL, además de  $L_{CM}^{101}$ ,  $L_{RC}^{30}$  y  $L^{7.8}$  previamente identificados en FE-FBS, se identificaron los conectores asociados a FC,  $L_{RC}^{32.5}$  (CpcI) y  $L_{RC}^{31}$  (CpcH). El FBP identificado fueron:  $\alpha^{FC}$  (CpcAc),  $\beta^{FCc}$  (CpcBc);  $\alpha^{AF}$  (ApcA),  $\beta^{AF1}$  (ApcB1); y  $\alpha^{FCi}$  (CpcAi),  $\beta^{FCi}$  (CpcBi).

En geles de isoelectroenfoque (datos no mostrados) se detectaron las otras proteínas faltantes. En FE-FBS se detectó la subunidad  $\beta^{18.5}$  (ApcF) y en FC-FBS la subunidad  $\alpha^{AF-B}$  (ApcD). El  $\alpha^{FE}$ , y  $\beta^{FE}$  (CpeAB) se identificaron en ambas preparaciones. Por el contrario, FC inducible  $\alpha^{FCi}$ , y  $\beta^{FCi}$  (CpcAiBi) se detectaron sólo en el gel bidimensional de FC-FBS. Las dos proteínas enlazadoras que se pudieron detectar en este intervalo de pH fueron  $L_R^{11}$  (CpcD2) y  $L_R^{32.4}$

(CpeC). Este conjunto de datos son el preámbulo del trabajo de tesis doctoral que aborda principalmente la aclimatación al infrarrojo cercano y si dicha adaptación se puede realizar a partir de cualquier condición de inicio, LR o LB.

punteada azul) tienen una intensidad de 4  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Todos los espectros fueron normalizados.

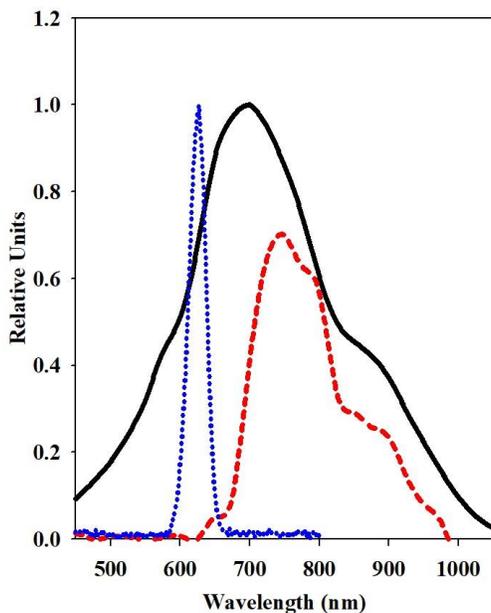


Fig. 23 Espectros de emisión de la fuente de tungsteno (OSRAM 72 W, línea negra). La luz infrarroja cercana (línea discontinua roja) fue suministrada por una fuente de tungsteno y una combinación de filtros de plástico: azul claro y rojo Marius, 165 y 787 respectivamente (catálogo en <http://www.leefilters.com/>). Estos filtros transmiten principalmente longitudes de onda superiores a 650 nm. (Punteado). Los espectros se normalizaron. La intensidad medida fue 12  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Los LEDs rojos (línea

***Condiciones experimentales para la aclimatación al cercano infrarrojo***

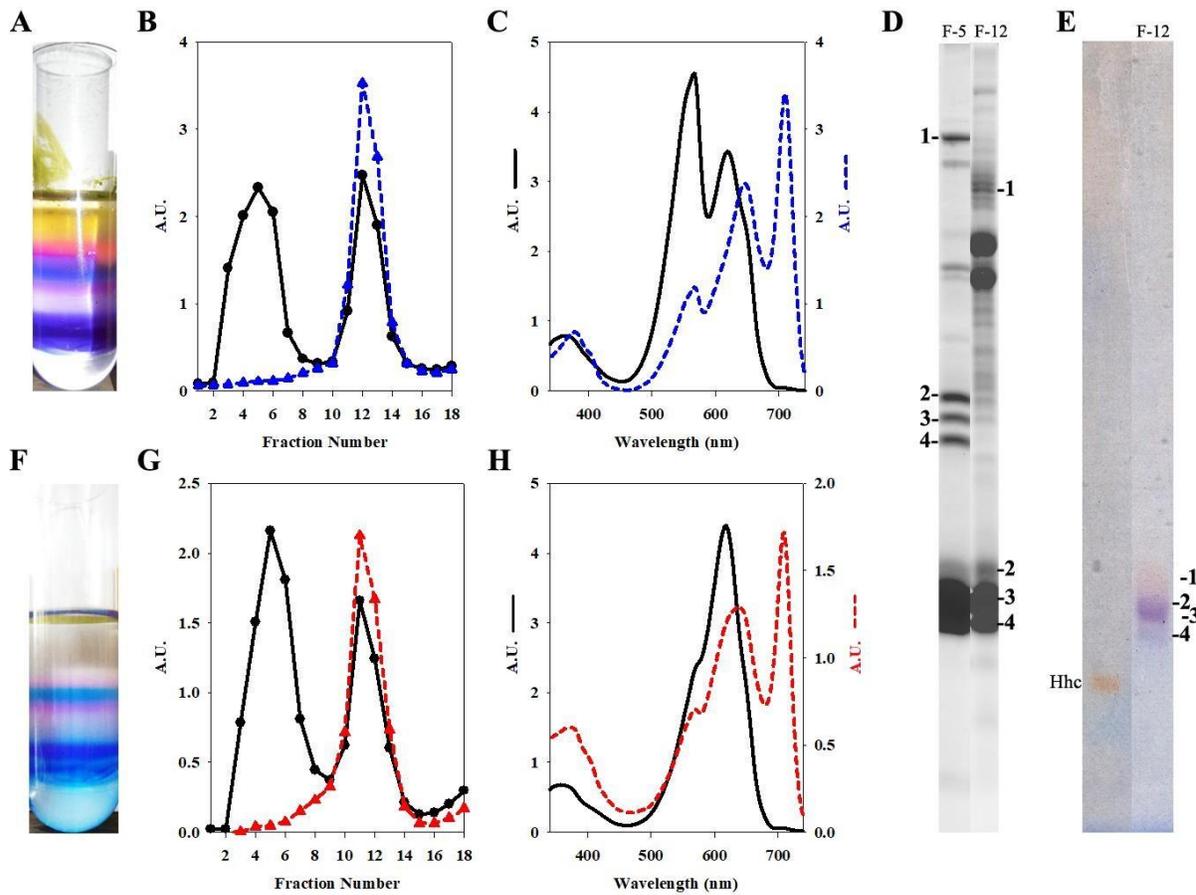
Para la aclimatación de *Synechococcus* PCC 7335 a la luz infrarroja se tuvieron dos importantes problemas: encontrar una fuente luminosa que emitiera  $> 700$  nm y la disipación de calor en espacios pequeños. Ya que el crecimiento celular depende de la cantidad de luz que se provea, era importante poner una fuente luminosa adecuada, esto implicó un problema, fuentes luminosas que emiten grandes cantidades de luz  $>700$  nm también proveen una cantidad considerable de calor. Se probó crecer a las células en dos tipos de fuentes luminosas: LEDs infrarrojos y foco de tungsteno con filtros rojo y azul (Fig. 23). Para disipar el calor se dejó una columna de aire entre los frascos y los focos, además se aumentó la ventilación en esa zona. Se probaron diferentes tiempos de crecimiento (8, 11 y 21 días).

Los mejores resultados obtenidos para crecer a *Synechococcus* PCC 7335 fueron creciéndola durante

11 días en luz roja o blanca y pasándola a foco de tungsteno junto con filtros rojo y azul por 21 días.

### Componentes del FBS aclimatado a luz infrarroja cercana

Después de adaptadas las células a luz infrarroja que provenían de luz blanca, se aislaron los ficobilisomas en un gradiente de sacarosa (0.5-2M), se observan cuatro bandas definidas por su color y por su posición en el gradiente. Una banda pesada color morado intenso, una banda ligera púrpura claro, encima de ésta una banda color cian y finalmente un color rosa (Fig. 24A). Se colectó el gradiente en fracciones de 1 mL y se realizaron espectros de absorción (340 – 800nm). Para conocer la distribución del FBS en el gradiente de sacarosa sólo se representa una longitud de onda, en este caso se decidió observar la distribución de AF que es FBP constante en todos los tipos de FBS y la FBP de los *rods* que en este caso es ficoeritrina, ya que vienen de luz blanca (Fig. 24B). La banda más pesada (fracciones 3-6) pertenece al ficobilisoma completo con un peso aparente del complejo de 7,200 kDa. La banda más ligera color purpura enriquecida en PE. La banda color cian (fracción 10-13) enriquecida con FE (565nm) y AF (650nm) y un pico no identificado previamente en 711nm. Este nuevo pico que no pertenece a las ficobiliproteínas estudiadas (FE, FC y AF) fue atribuido a una de las proteínas del nuevo clúster. Tras correr un SDS-PAGE de todas las fracciones del gradiente, se cortaron las bandas de la fracción 5 y 12, donde la fracción 12



**Fig. 24** Aislamiento y caracterización de FBS de células *Synechococcus* PCC 7335 cultivadas en FRL. **A.** Centrifugación en gradiente de sacarosa de WCE a partir de células cultivadas en WL durante una semana y luego 3 semanas en luz FRL. **B.** Patrón de fracciones obtenidas del gradiente. Se indica la absorbancia de cada fracción a 650 nm (círculos) y 710 nm (triángulos). **C.** Espectro de absorción de las fracciones 4 y 12 del patrón. El espectro de la fracción 4 (línea continua) tiene un máximo de absorbancia a 576 nm y un segundo pico a 625 nm con un hombro a 650 nm. El espectro de la fracción 11 (línea discontinua) tiene picos de absorbancia a 711 nm, 650 nm y 567 nm. **D.** Un 10% de SDS-PAGE Coomassie teñido con Mw (marcadores de peso molecular, números anotados en la izquierda), fracciones 5 y 12 del patrón en BE A 10% SDS-PAGE con hhc (corazón del caballo citocromo) y fracciones 12. Los colores de las bandas indican las FBP. **F.** La centrifugación en gradiente de sacarosa de WCE a partir de células cultivadas en RL de una semana y durante tres semanas en FRL. **G.** Patrón de fracciones obtenidas del gradiente, se indica la absorbancia de cada fracción a 650 nm (línea continua) y 711 nm (línea discontinua). **H.** Los espectros de absorción de las fracciones 5 (línea continua) y 11 (línea discontinua) son del patrón.

es la que absorbió a 711 nm. Las bandas fueron digeridas con tripsina y analizadas por espectrometría de masas (Fig. 24D y 24E). En las bandas de la fracción 5 se encontraron los *linkers* ApcE1, CpcG, CpeC, CpeD, CpeE, CpCI y CpcH (Tabla 5). Para el caso de la fracción 12 se detectaron ApcE2, ApcG1, ApcG2, ApcG3 y ApcB2. Del análisis de los resultados se observó que ApcB2 es la proteína con mejor puntaje y la más abundante de este FBS, ya que se encontró con una cobertura de hasta el 100% de la proteína y estuvo presente en todas las bandas analizadas. Para incrementar la sensibilidad del análisis de proteínas por espectrometría de masas se decidió correr un SDS-PAGE sin Coomassie, o sin teñir, ya que las FBP's cuentan con color es fácil identificarlas dentro del gel (Fig. 24E). El resultado fue la rectificación de los datos obtenidos anteriormente (Tabla 5).

Se realizó un análisis de los péptidos detectados por espectrometría de masas del L<sub>CM</sub>, la razón de esto es para saber si se codifica todo el gen *apcE2* o solo una parte. En otras cianobacterias, por ejemplo, *Calothrix* sp. 7601 que cuenta con el gen *apcE* para cuatro REPs de los cuales solo codifica tres. En el análisis de los péptidos obtenidos se encontraron péptidos de ApcE2 (L<sub>CM</sub><sup>87</sup>) con una confianza del 99% (Anexo D, letras en rojo) que pertenecen al inicio y final de la secuencia de aminoácidos. En consecuencia, se muestra que la molécula completa se conserva (Houmard et al. 1990, Sidler 1994).

El análisis de las bandas de la fracción 5 mostró que los *linkers* para ambos tipos de ficobilisomas (FC-FBS y FE-FBS), se encuentran presentes, así como el *linker core membrane*, ApcE1. Esto podría implicar que en esta fracción hay un ficobilisomas hemidiscoidal tricilíndrico unos con brazos de FC<sup>i</sup> y otros de FE (Tabla 6).

También se crecieron células en luz roja por 7 días y cambiaron a luz infrarroja por 21 días, al cosechar las células y aislar los ficobilisomas se observó el mismo patrón que en luz blanca dentro del gradiente de sacarosa, una banda pesada color azul, una banda ligera color púrpura, enseguida una banda color cian y finalmente una banda color rosa (Fig. 24F). El perfil mostró un ficobilisoma más ligero que el de LB a IR, de un peso aparente de 4,100 kDa (Fig. 22G). El ficobilisoma mostro ser rico en FC y AF. La banda color cian es la fracción 12 y al igual que en el caso anterior la banda color cian mostró tener el mismo patrón (Fig. 22H), un hombro a 565nm, un pico a 650nm y otro a 710nm.

Encontrar todas las subunidades del nuevo clúster no es suficiente para saber si se encuentra ensamblado y es funcional el ficobilisoma, en general las fracciones ligeras de este tipo de gradientes de sacarosa contiene subunidades de FBP's, por ejemplo, hexámeros de FE o PC. Por esto es necesario hacer espectros de fluorescencia a temperatura de nitrógeno líquido (esta temperatura permite menos movimiento entre las moléculas, por tanto, mayor sensibilidad para conocer la transferencia de energía) y observar si se transfiere la energía en el complejo. La fracción 12 del gradiente de LB a IR se llevó a temperatura de nitrógeno líquido y se midió su espectro excitación y emisión (Fig. 25). La primera observación fue una relación de la transferencia de energía eficiente desde 650nm a 711nm, la segunda fue que en el espectro de absorción se tiene un radio de  $A.U._{711\text{ nm}}/A.U._{650\text{ nm}} = 1.44$ , mientras que en el de fluorescencia es de  $F_{exc.711\text{ nm}}/F_{exc.650\text{ nm}} = 2.2$ .

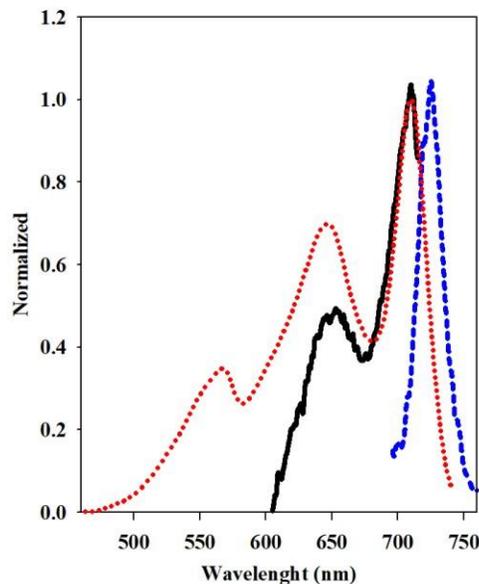


Fig. 25 Se midió el espectro de absorción de la fracción 11 (puntos) a temperatura ambiente. Los espectros de excitación de la fracción 11 registrados usando la longitud de onda de emisión a 725 nm (línea) se midieron a baja temperatura. Se midió el espectro de emisión de la fracción 11 registrada usando una longitud de onda de excitación de 620 nm (discontinua) a baja temperatura. Todos los espectros se normalizaron a 710 nm para facilitar la comparación.

Para intentar dilucidar la estequiometría de este ficobilisoma, se realizó un gel de isoelectroenfoque de pH 3-11 como primera dimensión y de SDS-PAGE en gradiente del 7-18% (Fig. 26). Tres FBP se encuentran muy cerca en peso molecular y pI, y no fue posible separarlas, estas son ApcG1 (17.8 kDa, pI 4.92), ApcB2 (17.47 kDa, pI 4.92) y ApcF (17.8 kDa, pI 4.9), ApcG2 (17.9 kDa, pI 5.56) quedo muy cerca de las otras tres FBP, en cambio ApcG3 (20.3 kDa, pI 8.3) se separó claramente. Todas fueron identificadas por espectrometría de masas (Tabla 7).

**Tabla 5** Identificación proteómica en SDS-PAGE de bandas con y sin tinción con azul Coomassie de las FBP que absorben a 711 nm (fracción 12) de células cultivadas durante una semana en luz blanca y tres semanas en FRL.

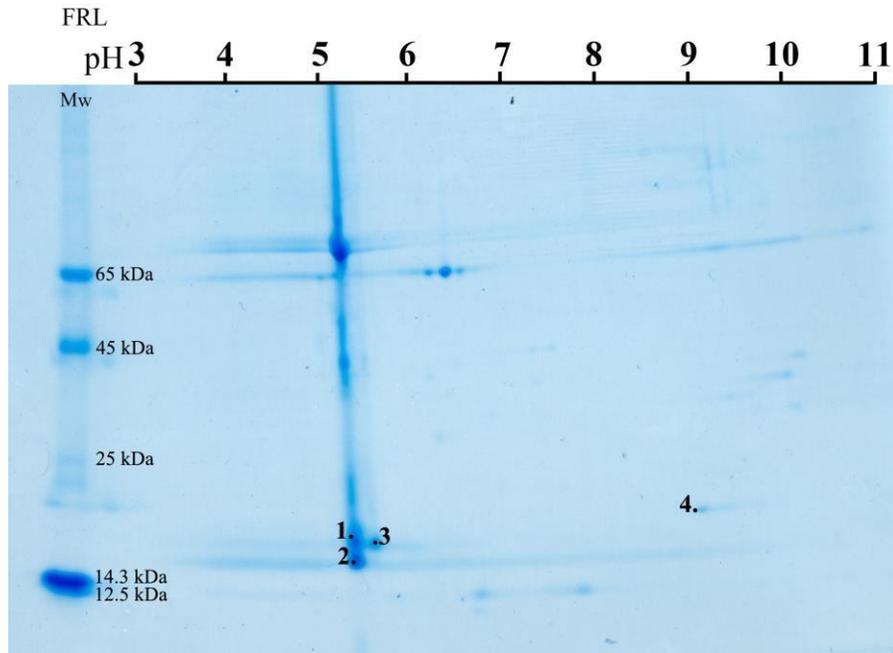
Gel con Coomassie (kDa)	Coverage Total	>95% Coverage	Gel sin Coomassie (kDa)	Coverage Total	>95% Coverage	I.D. UniProt	Gen	Peso Molecular Aparente	pI	Star nt	Stop nt
1 (76) *	86.2 <sup>2†</sup>	58.2				B4WKI6	<i>apcE2</i>	87.15	L <sub>CM</sub> <sup>87</sup>	2763353	2765704
2 (19.4)	77.9 <sup>2</sup>	53.6	1	82.9 <sup>2†</sup>	40.9	B4WKI4	<i>apcG3</i> ( <i>apcD3</i> )	20.316	α <sup>AF-E</sup>	2762617	2763162
2 (19.4)	89.9 <sup>2</sup>	76.3	2	88.2 <sup>2</sup>	53.9	B4WIH2	<i>apcF</i>	18.92	β <sup>AF-18.5</sup>	737592	738101
3 (17.3)	97.3 <sup>2</sup>	45.9	3	81.8 <sup>2</sup>	37.6	B4WKI7	<i>apcG2</i> ( <i>apcD2</i> )	17.874	α <sup>AF-D</sup>	2765751	2766230
3 (15.7)	77.2 <sup>4</sup>	41.7	3	93.7 <sup>4</sup>	59.5	B4WKI9	<i>apcG1</i> ( <i>apcD5</i> )	17.818	α <sup>AF-C</sup>	2766916	2767392
4 (15.7)	100 <sup>4</sup>	88.2	4	100 <sup>4</sup>	88.8	B4WKI8	<i>apcB2</i>	17.472	β <sup>AF-2</sup>	2766339	2766824

Gel con Coomassie, banda No. de la Fig. 4D, carril F-12. B. Gel sin Coomassie, banda N° de la Fig. 4E. El peso molecular aparente de las proteínas en kDa se determinó usando SDS-PAGE, como se muestra en paréntesis. Coverage total, todos los residuos de aminoácidos de la proteína identificada, por pmf (mass finger printing). > 95% de coverage. Los péptidos exceden el nivel de confianza del 95%. Función de acuerdo con Glasser 1992. Start nt, el nucleótido de inicio del gen en el genoma de *Synechococcus sp.* PCC 7335. Stop nt, nucleótido final del gen en el genoma de *Synechococcus sp.* PCC 7335. (76) \* el Mw aparente de ApcE2 y ApcE1 (88) se obtuvieron en el mismo gel en el que ambas proteínas fueron identificadas por MS/MS espectrometría. 1-4 † los superíndices muestran las veces en que se identificaron las proteínas en las bandas analizadas en ambos geles. En la tabla se muestra los mejores parámetros MS / MS.

**Tabla 6** La identificación proteómica en las bandas de SDS-PAGE de los componentes enlazadores del FBS hemidiscoidal (fracción 5) aislados de las células cultivadas durante una semana en LB y tres semanas en IR

Band No. App. Mw (kDa)	Total coverage	Score	I.D. UniProt	Gene	Predicted mass	pI	Función	Star nt.	Stop nt.
1 (88)	80.9	10415.86	B4WI78	<i>apcE1</i>	101.63	9.12	L <sub>CM</sub> <sup>101</sup>	636261	638978
2 (35)	75.9	6176.2	B4WG61	<i>cpcl</i>	32.55	9.42	L <sub>R</sub> <sup>32.5</sup>	4098455	4099330
2 (35)	73.1	7712.2	B4WGJ1	<i>cpeC</i>	32.42	6.16	L <sub>R</sub> <sup>32.4</sup>	489795	490676
3 (33)	57.7	4317.1	B4WG60	<i>cpcH</i>	31.09	9.02	L <sub>R</sub> <sup>30.4</sup>	4097548	4098366
4 (30)	67.6	6979.7	B4WGJ2	<i>cpeD</i>	28.1	8.4	L <sub>R</sub> <sup>28</sup>	490,835	491,578
4 (30)	63.4	4264.3	B4WN85	<i>cpcG</i>	30.44	5.39	L <sub>RC</sub>	1451554	1452342
4 (30)	62.5	4220.3	B4WGJ3	<i>cpeE</i>	27.97	9.37	L <sub>R</sub> <sup>27.9</sup>	492011	492772

N° de banda de la Fig. 3D carril F-5. El análisis de masa se obtuvo utilizando HPLC nano Acquity clase M acoplado al espectrómetro de masas ESI / IMS, Synapt G2-Si (Waters, Milford, MA, EE. UU.). Datos analizados utilizando Protein Lynx Global Server (PLGS) v3.0.3 (Waters, Milford, MA, EE. UU.).



**Fig. 26** Primera dimensión: Gel de isoelectroenfoque de la fracción 3 corrida en una tira de pH 3-11. Segunda dimensión: SDS-PAGE de acrilamida al 14%. El barrido densitométrico se hizo para obtener los pesos moleculares y las cantidades relativas de las proteínas por medio del programa ImageJ. Los marcadores de peso molecular usados fueron: albumina sérica bovina (65kDa), ovoalbúmina (45kDa), quimi tripsinogeno (25kDa), lisozima (14.3kDa) y citocromo c de caballo (12.5kDa).

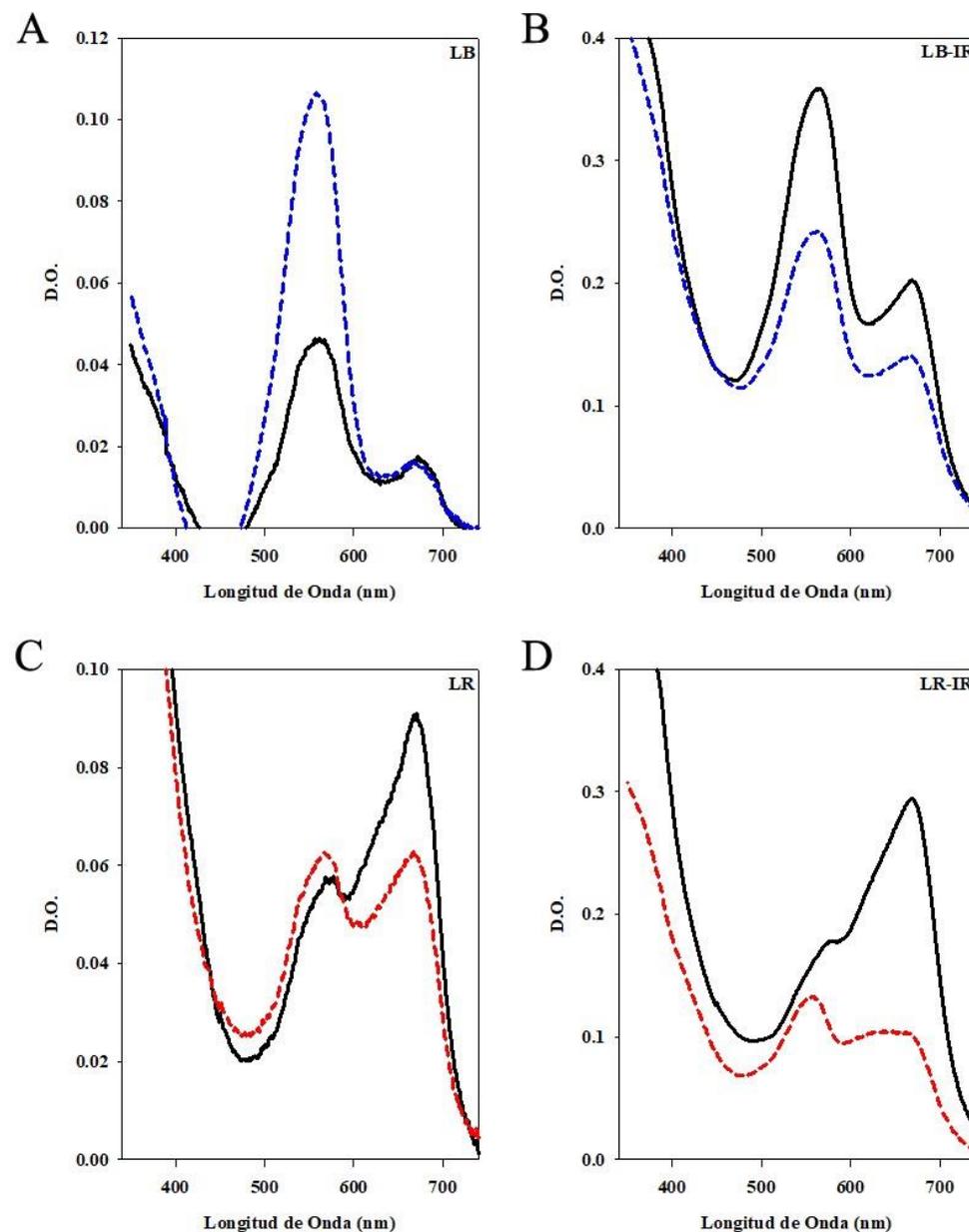
**Tabla 7** Identificación proteómica de los spots del gel de segunda dimensión SDS-PAGE de las ficobiliproteínas de la fracción 11 de células crecidas una semana en luz roja y tres semanas en FLR.

Spot de la 2 <sup>nd</sup> dimensión de gel FRL (kDa), [pI]	Coverage Total	Score	I.D. UniProt	Gene	Predicted mass (kDa)	pI	Funtion	Star	Stop
1 (15.7) [5.3]	65.8	5228	B4WKI8	<i>apcB2</i>	17.472	4.92	$\beta^{AF-2}$	2766339	2766824
	38.6	3419	B4WKI9	<i>apcG1</i>	17.818	4.92			
	66.7	2467	B4WIH2	<i>apcF</i>	18.92	4.93	$\beta^{AF-18.5}$	737592	738101
	48.4	1241	B4WKI7	<i>apcG2</i>	17.874	5.56	$\alpha^{AF-D}$	2765751	2766230
2 (14.2), [5.3]	77.6	8142	B4WKI8	<i>apcB2</i>	17.472	4.92	$\beta^{AF-2}$	2766339	2766824
	16.5	205	B4WKI9	<i>apcG1</i>	17.818	4.92	$\alpha^{AF-C}$	2766916	2767392
	18.3	49	B4WIH2	<i>apcF</i>	18.92	4.93	$\beta^{AF-18.5}$	737592	738101
3 (15.3), [5.6]	67.9	5823	B4WKI7	<i>apcG2</i>	17.874	5.56	$\alpha^{AF-D}$	2765751	2766230
	39.8	610	B4WKI8	<i>apcB2</i>	17.472	4.92	$\beta^{AF-2}$	2766339	2766824
4 (16.2), [9]	32	1195	B4WKI4	<i>apcG3</i>	20.316	8.34	$\alpha^{AF-E}$	2762617	2763162

### Identificación de los pigmentos en células en diferentes condiciones de crecimiento lumínico

El siguiente paso después de la identificación de los componentes del ficobilisoma, es conocer los pigmentos que podrían ser los responsables del corrimiento en el espectro a 711 nm y subsecuentemente encontrar las proteínas de los fotosistemas participan en la remodelación y los pigmentos que contienen.

Para encontrar la posible existencia de un nuevo pigmento en las fracciones del gradiente 5 y 11 se añadió ácido clorhídrico hasta lograr un pH de 2 y 8M de urea. Bajo estas condiciones las ficobiliproteínas exponen las ficobilinas y al registrar un espectro de absorción es posible saber que ficocianobilina está anclada. En los ficobilisomas de células crecidas en luz blanca (F-5) se encontraron picos a 560 y 660 nm pertenecientes a ficoeritrobilina y ficocianobilina, respectivamente (Fig. 27A, línea negra). El pigmento más abundante es el PEB, acorde con la abundancia de ficoeritrina. Los FBS aislados de células de LB a IR se encontraron PEB y PCB solamente, siendo PEB el pigmento más abundante (Fig. 27B).

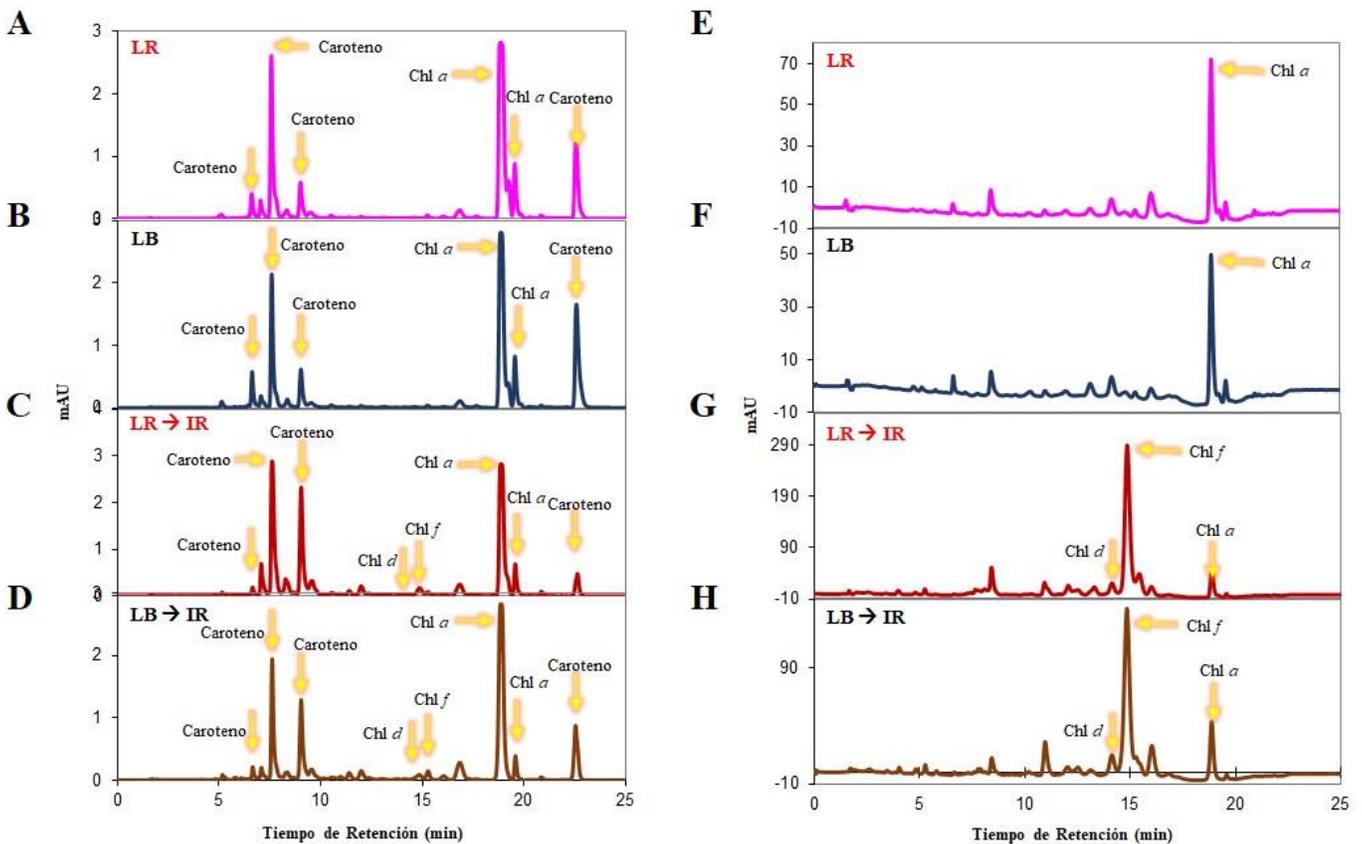


LR, se encontraron los mismos pigmentos PEB y PCB, pero el pigmento más abundante fue PCB (Fig. 27C). Los mismos resultados se obtuvieron para los FBS aislados de células de LR a IR (Fig. 27D). Las fracciones 11 de todas las condiciones no mostraron ningún pigmento diferente a PCB y PEB, la única diferencia fue la relación de los máximos de absorción de los picos.

Fig. 27 A. Ficobilisomas y ficobiliproteínas aisladas de células crecidas en luz blanca. Espectro de absorción de las fracciones 5 (línea negra) y 11 (líneas punteadas azul) desnaturalizadas en 8M urea a pH de 2. B. Ficobilisomas y ficobiliproteínas aisladas de células crecidas en luz blanca por 7 días y después pasadas a infrarrojo por 21 días. Espectro de absorción de las fracciones 5 (línea negra) y 11 (líneas punteadas azul) desnaturalizadas en 8M urea a pH de 2. C. Ficobilisomas y ficobiliproteínas aisladas de células crecidas en luz roja. Espectro de absorción de las fracciones 5 (línea negra) y 11 (líneas punteadas roja) desnaturalizadas en 8M urea a pH de 2. D. Ficobilisomas y ficobiliproteínas aisladas de células crecidas en luz roja por 7 días y después pasadas a infrarrojo por 21 días. Espectro de absorción de las fracciones 5 (línea negra) y 11 (líneas punteadas roja) desnaturalizadas en 8M urea a pH de 2.

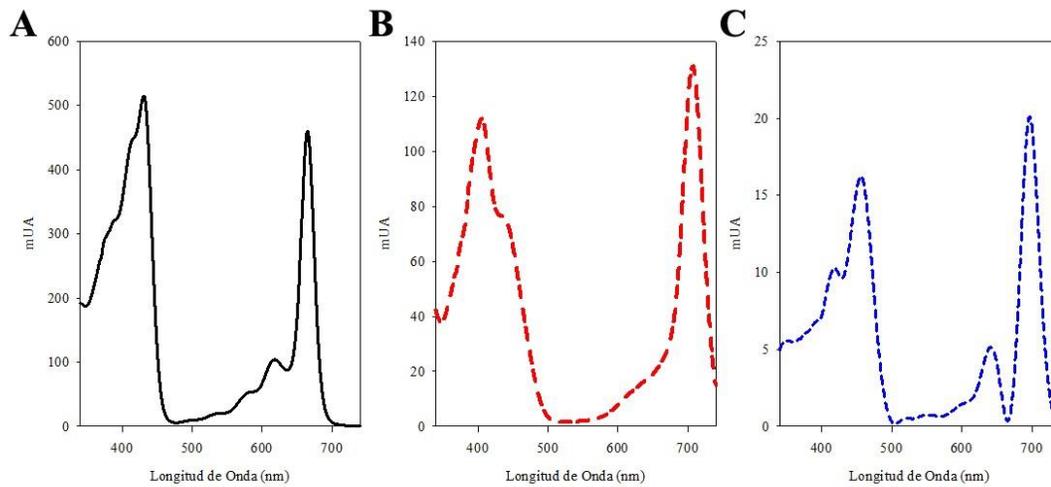
Una vez identificados los pigmentos de los ficobilisomas se procedió a aislar los pigmentos que contiene el siguiente aceptor de electrones: los fotosistemas. Las clorofilas son los pigmentos responsables de la transferencia de energía en los fotosistemas y los centros de reacción, los carotenos son los que impiden el fotodaño o protegen a estos sistemas. El ficobilisoma ensamblado en luz infrarroja transfiere la energía recolectada hasta 711 nm, los fotosistemas tradicionales solo pueden captar la energía en 650 nm (FSII) y 700 nm (FSI), por lo tanto, ninguno de esos puede recibir la energía de este nuevo ficobilisoma. Lo primero que se puede realizar para dilucidar el cambio en los fotosistemas es por medio de la identificación de los pigmentos liposolubles.

Los pigmentos liposolubles clorofilas y carotenos se extrajeron de 1g de células no rotas con la prensa de French con metanol: acetona (80:10). Se determinaron los pigmentos por medio de HPLC en una columna C18 y se monitoreó a 440 y 750 nm. Los resultados obtenidos de los pigmentos extraídos de células crecidas en luz roja (Fig. 28A) fueron 4 carotenos diferentes y clorofila *a*, los mismos resultados se obtuvieron en condiciones de crecimiento de luz blanca (Fig. 28B). Se observaron los mismos 4 carotenos con las células que pasaron de luz roja



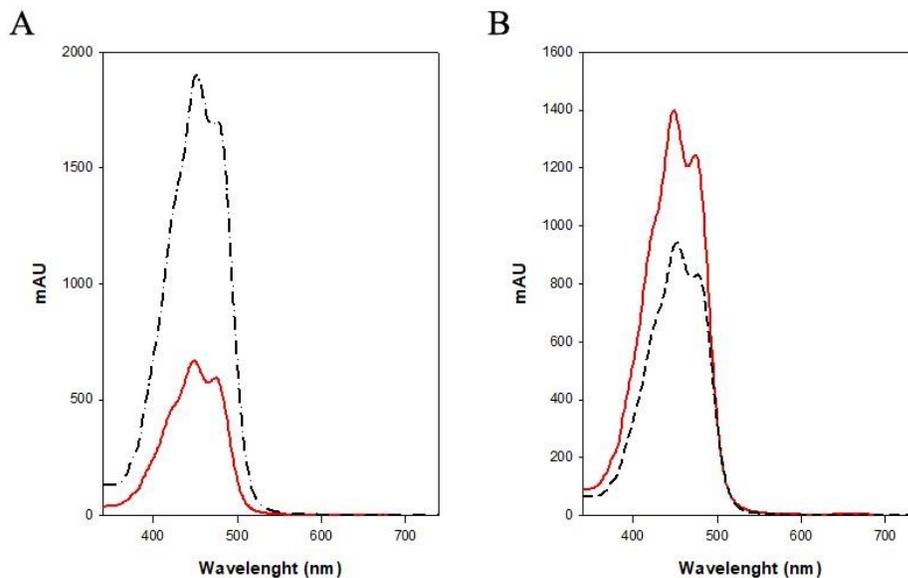
**Fig. 28** Cromatogramas de los pigmentos liposolubles de células de *Synechococcus* PCC 7335 crecidas bajo distintas condiciones de luz. HPLC monitoreado a 440 nm, los pigmentos se extrajeron de las células crecidas en luz roja (A), blanca (B), luz roja a infrarroja (C) y luz blanca a infrarroja (D). También se monitorearon a 750 nm las clorofilas de las células crecidas en luz roja (E), blanca (F), luz roja a infrarroja (G) y luz blanca a infrarroja (H).

a infrarrojo, además, clorofila *a*, *f* y *d* (Fig. 28C). Los pigmentos encontrados bajo el crecimiento de luz blanca y



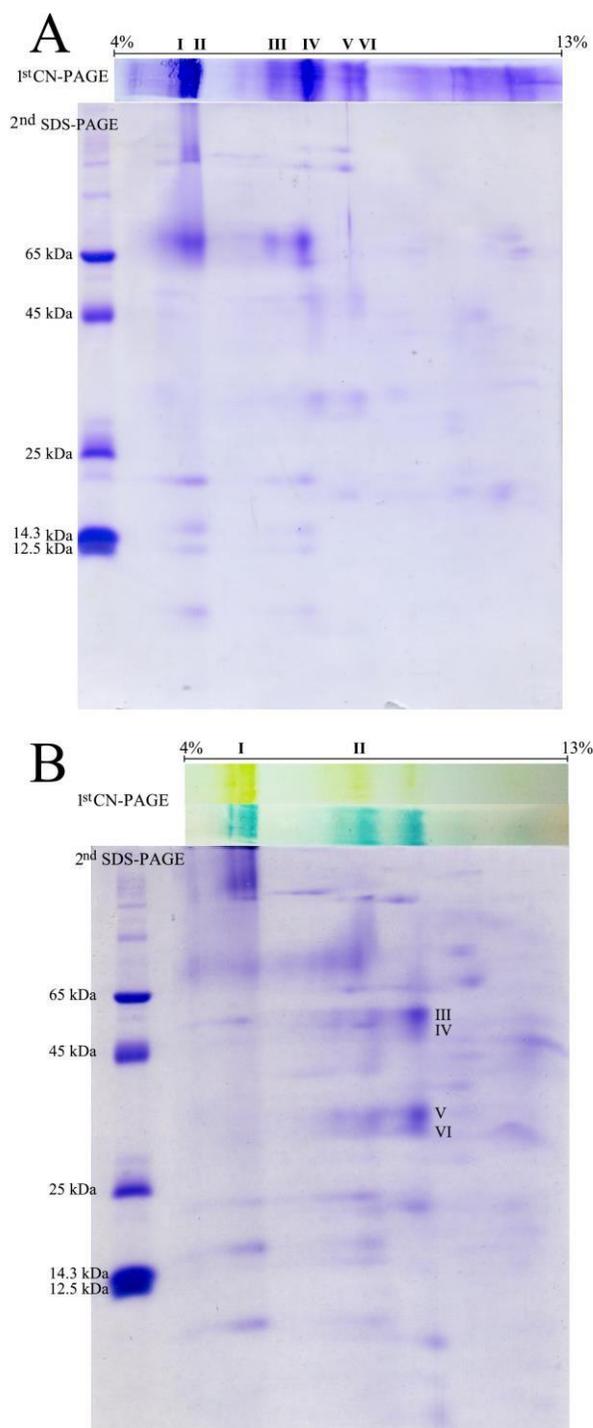
**Fig. 29** Las células de *Synechococcus* PCC 7335 crecidas luz roja/roja a infrarroja sintetizan clorofila *a* (A), *f* (B) y *f* (C).

pasadas infrarrojo (Fig. 28D) fueron los mismos que en el caso anterior, 4 carotenos, clorofila *a*, *f* y *d*. Para visualizar mejor las clorofilas se tiene el cromatograma a 750 nm, donde se observa claramente que en las condiciones de luz roja (Fig. 28E) y luz blanca (Fig. 28F) solo hay clorofila *a*, en cambio en la condición de crecimiento de LR a IR (Fig. 28G) y LB a IR (Fig. 28H) aparece clorofila *f* y *d*, donde la más abundante de estas dos es la clorofila *f*. La identificación por medio de espectrometría de masas de clorofila *f* y *d* está en el Anexo D. Los espectros de estas tres clorofilas en la condición de crecimiento de LR



**Fig. 30** Las células de *Synechococcus* PCC 7335 crecidas luz blanca (A) y luz blanca a infrarroja (B) sintetizan carotenos-- (línea negra) (línea roja).

a IR (Fig. 29A) y LB a IR (Fig. 29B) muestran que la clorofila más abundante es clorofila *a*, 20 veces menos abundante es la clorofila *f* y finalmente 100 veces menos es la clorofila *d*. En el caso de los carotenos que aparecen en los tiempos de retención de 9 y 22.6 min fue que en luz roja y blanca (Fig. 30A) se expresan en igual intensidad, en cambio, al pasar a infrarrojo la relación entre ellos se invierte (Fig. 30B).



**Fig. 31** Membranas tilacoideas solubilizadas en 0.5% de DDM de *Synechococcus* PCC 7335 crecidas en luz blanca (A), luz roja (B). Las membranas tilacoideas contienen 32.54  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de clorofila *a* y fueron cargadas a un gel del 4 al 13% CN-PAGE como primera dimensión. La segunda dimensión de la banda de gel fue con un gel al 10% SDS-PAGE. Los marcadores de peso molecular usados son albumina (65kDa), ovoalbumina (45kDa), quimi tripsinogeno (25kDa), lizosima (14.3 kDa) y citocromo de caballo (12.5kDa).

### **Identificación de las subunidades expresadas de los fotosistemas I y II en diferentes condiciones de crecimiento lumínico**

Una vez observado el recambio del FBS y los pigmentos, era necesario identificar si los componentes de los fotosistemas también recambiaban bajo la influencia de la luz infrarroja cercana como se predice.

Primero se identificaron las subunidades de los fotosistemas de células crecidas en luz blanca y roja. Se solubilizaron las membranas con un detergente suave como es el dodecil maltósido, y por medio de geles CN-PAGE del 4 al 13% de acrilamida se separaron los complejos membranales como primera dimensión. Y para separar cada subunidad de los complejos se realizó una segunda dimensión con SDS-PAGE al 10%. El estudio realizado por el M. en C. Jesús Barrera Rojas en su tesis de maestría “Subcomplejos y complejos de la fotosíntesis oxigénica en la cianobacteria *Prochlorococcus marinus* MIT 9313” nos permitió tener una predicción de los rangos de los pesos moleculares de los complejos y su posición en el CN-PAGE del 4-13%. El complejo más pesado encontrado en estos geles fue de 1000 kDa que corresponde al supercomplejo de *Prochlorococcus marinus* MIT 9313 cuya posición es muy cercana al gel el 4% y los más ligeros que se estudiaron fueron de 150 kDa, que están muy cercanos al gel el 13%.

Los complejos que queremos separar son los FSII (monómero: 382kDa) y FSI (monómero: 270kDa) en *Synechococcus* PCC 7335 para células crecidas en luz roja o blanca. En el caso del FSII se sabe es un dímero, por tanto, el peso que se predice es de 764kDa. Ya que en el genoma estas las subunidades que podrían ensamblar el trímero del FSI se predice sea de 816kDa.

El primer alineamiento de membranas se hizo de células que crecieron en luz blanca. El gel claro-nativo mostro dos bandas conspicuas: I y II (Fig. 31A), que fueron analizadas por espectrometría de masas. Las subunidades encontradas del fotosistema I: PsaA1, PsaB1, PsaD1, PsaE1 y PsaJ; para el fotosistema II: PsbA1, PsbA4, PsbC1, PsbD1 y Psb27; y se encontraron CpcL, el *linker* que tiene un cruce membranal, y CpeA, la subunidad alfa de ficoeritrina.

Se realizó el mismo experimento, pero ahora con membranas de células crecidas en luz roja. Los resultados

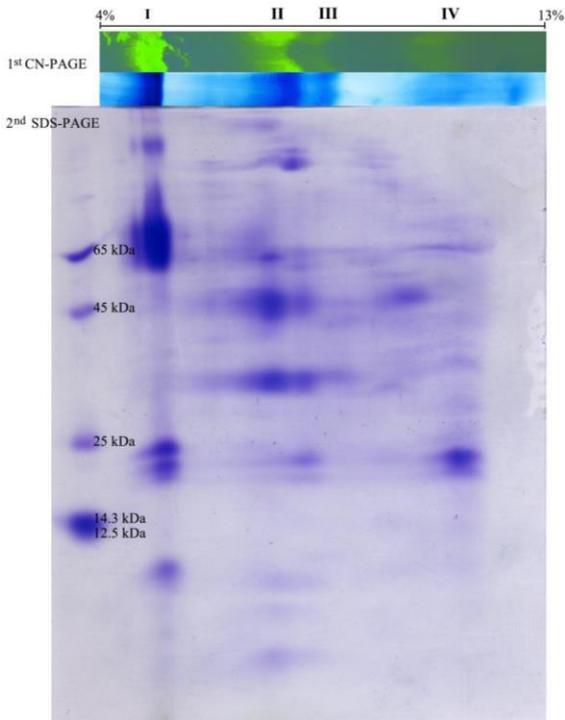
**Tabla 8** La identificación proteómica en las bandas de CN-PAGE de los componentes de los fotosistemas aislados de las células cultivadas durante 11 días en LB.

Banda	Unused	Total	%Coverage	%Coverage (95)	UniProt	Predicted Mass (kDa)	Gen	Star	Stop
I, II, IV	7.3, 8, 4	7.24, 8, 4	26.2, 29.2, 34.9	8.9, 8.5, 4.6	B4WIW1	83.47	<i>psaA1</i>	4,453,652	4,455,925
I, II, IV	6.3, 9.2, 6	6.3, 9.2, 6	35.2, 37.1, 87.1	9, 7.8, 31.6	B4WIW0	82.45	<i>psaB1</i>	4,451,398	4,453,626
I, II	6.9, 12	6.9, 12	80.7, 83.9	31.6, 50.3	B4WFP8	17.03	<i>psaD1</i>	411058	411525
I, II, IV	6, 8, 7.4	6, 8, 7.4	77.5, 77.5, 77.5	63.38, 77.5, 77.5	B4WSJ5	7.94	<i>psaE1</i>	4016464	4016679
II	2	2	21.95	21.95	B4WS89	4.63	<i>psaJ</i>		
III, VI	2, 4.92	2.02, 4.92	31.9, 34.77	5.46, 12.07	B4WU01	38.24	<i>psbA1</i>	440807	441898
V	4	4	34.72	8.61	B4WKS3	39.55	<i>psbA3</i>	1976322	1977404
III, IV	4.6, 2.8	4.6, 2.8	31.24, 42.52	6.29, 5.42	B4WGU0	50.28	<i>psbC1</i>	2332454	2333839
III, VI	2.96, 12	2.96, 12	30.97, 41.76	5.68, 20.45	B4WNY9	39.41	<i>psbD</i>	1616101	1617159
III	2.05	2.05	46.27	15.67	B4WHE1	14.58	<i>psb27</i>	573848	574252
I, II	3.92, 6	3.92, 6	51.82, 44.53	13.36, 18.22	B4WG63	28.17	<i>cpcL</i>	4099993	4100736
VI	5.74	5.74	53.05	20.12	B4WJ66	17.71	<i>cpeA</i>	767147	767641

**Tabla 9.** La identificación proteómica en las bandas de CN-PAGE de los componentes de los fotosistemas aislados de las células cultivadas durante 11 días en LR.

Banda/Spot	Percent Coverage	Num Unique Peps	Tot Indep Spectra	Porcentaje compartido del espectro	UniProt	Predicted Mass (kDa)	Gen	Star (nt)	Stop (nt)
I, III	85.2, 74.2	20, 13	200, 102	22.35, 7.18	B4WFP8	17.03	<i>psaD1</i>	411058	411525
I, III	14.8, 14.8	20, 20	42, 42	2.58, 2.58	<u>B4WIW1</u>	83.47	<i>psaA1</i>	4453652	4455925
I, III	19.4, 19.4	17, 14	164, 71	17.95, 4.87	<u>B4WIW0</u>	82,456	<i>psaB1</i>	4,451,398	4,453,626
I, III	43.2, 43.2	8, 8	97, 72	11.01, 5.2	<u>B4WS88</u>	16.88	<i>psaL1</i>	2079802	2080290
I, III	77.5, 77.5	10, 7	71, 16	7.48, 1.11	B4WSJ5	7.94	<i>psaE1</i>	4016464	4016679
I, III	43.4, 42.2	16, 11	60, 28	6.31, 1.93	<u>B4WS90</u>	24.43	<i>psaF</i>	2,080,655	2,081,155
II, III	22.6, 36.4	11, 18	32, 47	4.26, 3.29	B4WGU0	50.28	<i>psbC1</i>	2332454	2333839
II, IV	13.1, 20.3	5, 10	14, 113	1.9, 9.39	B4WU01, B4WKS3	39.55	<i>psbA1, psbA3</i>	4718928 1976322	4720010 1977404
II, VIII	26.1, 30.4	11, 17	98, 302	13.04, 46.7	B4WNY9	39.41	<i>psbD1</i>	1616101	1617159
II, III	30.6, 54.5	5, 8	8, 12	1.04, 0.81	B4WHE1	14.58	<i>psb27</i>	573848	574252
II, IV	38.6, 40.9	2, 6	3, 9	0.43, 0.79	<u>B4WII2</u>	4.89	<i>psbF1</i>	2490663	2490797
II, III	8.3, 15.1	2, 4	2, 4	0.28, 0.28	<u>B4WSJ8</u>	30.11	<i>psbO</i>	4019009	4019845
IV	23.9	4	40	3.41			<i>psbH1</i>	4700334	
IV	21.3	3	13	1.06	B4WII1	9.13	<i>psbE</i>	2490371	2490613
VII	12.4	5	6	0.88	<u>B4WKL2</u>	53.63	<i>cp43*</i> junto a <i>apcB3</i>	2791063	2792517
I, IV	57.9, 45.7	20, 13	28, 14	3.04, 1.19	B4WG63	28.17	<i>cpcL</i>	4099993	4100736
I, III	15, 19.2	12, 16	13, 16	1.41, 1.09	B4WI78	101.63	<i>apcE1</i>	636261	638978
I, IV	18.6, 43.5	3, 6	3, 6	0.33, 0.51	B4WI76	17.36	<i>apcB1</i>	636261	638978
I, III	18.5, 22.8	2, 3	3, 3	0.34, 0.21	B4WG59	17.47	<i>cpcAi</i>	4096803	4097291
III, IV	19.8, 23.3	3, 3	3, 3	0.22, 0.26	B4WG58	18.32	<i>cpcBi</i>	4096213	4096731
III, IV	22.8, 13.2	5, 4	5, 4	0.34, 0.58	B4WG60	31.09	<i>cpcH</i>	4097548	4097291





**Fig. 33.** Membranas tilacoideas solubilizadas en 0.5% de DDM de *Synechococcus* PCC 7335 crecidas 11 días en LR y 21 en FRL. Las membranas tilacoideas contienen 32.54  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de clorofila *a* y fueron cargadas a un gel del 4 al 13% CN-PAGE como primera dimensión. La segunda dimensión de la banda de gel fue con un gel al 10% SDS-PAGE. Los marcadores de peso molecular usados son albumina (65kDa), ovoalbumina (45kDa), quimiotripsinogeno (25kDa), lizosima (14.3 kDa) y citocromo de caballo (12.5kDa).

Ya identificadas las proteínas principales de los fotosistemas en condiciones de crecimiento de las células en luz blanca o roja, se procedió a realizar el aislamiento de membranas de células crecidas en luz roja y pasadas a luz infrarroja. En FaRLiP se predecía el que el peso molecular del FSI como trímero es de 816 kDa y del FSII dimérico es de 761 kDa, que no son pesos moleculares muy diferentes a los que se predicen para los fotosistemas de luz roja y blanca. Se realizó el mismo procedimiento que para las membranas en luz roja y blanca: se aislaron las membranas y se solubilizaron con dodecil-maltosido al 0.5% para obtener los complejos de los fotosistemas. Se separaron los complejos membranales en un CN-PAGE del 4 al 13%, y para separar las subunidades de cada complejo se realizó una segunda dimensión con SDS-PAGE al 10% (Fig. 33). Las bandas verdes observadas en la CN-PAGE fueron recortadas y analizadas por espectrometría de masas (Fig. 33, números romanos). Se encontraron las subunidades del fotosistema I: PsaA2, PsaB2, PsaD2, PsaF2 y PsaE en la banda I; para el fotosistema II: PsbA5, PsbB2, PsbC2, PsD2 y PsbH2 en la banda II y III, en la banda IV subunidades del ficobilisoma ApcE2, ApcB2, ApcB1, CpeA (Tabla 10). El *linker core membrane* (ApcE) es el responsable de ensamblar un ficobilisoma bicilíndrico y unir el ficobilisoma al fotosistema II, ApcE2 se encontró en la banda donde se encuentra precisamente el dímero del fotosistema II que recambio. La aparición de algunas subunidades del FBS

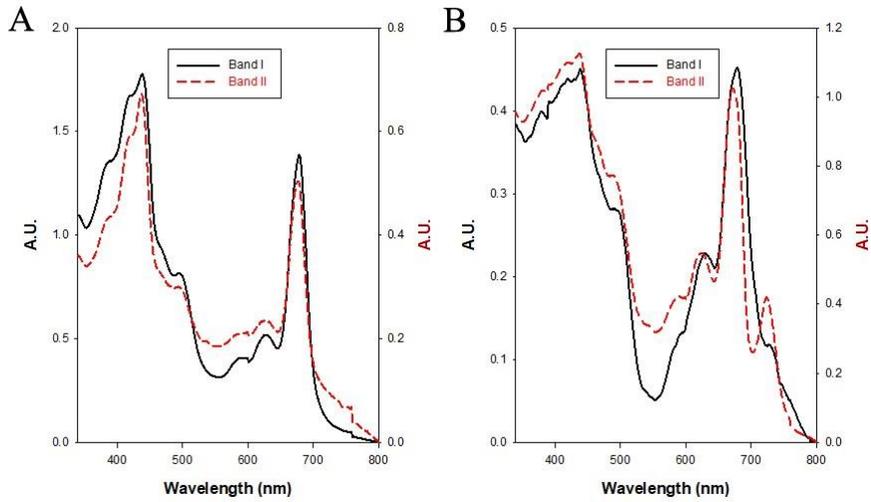
puede indicarnos que este aún se encuentra fuertemente anclado al fotosistema II por medio del ApcE2, ya que a pesar de que los FBS son un complejo crio lábil y que en el aislamiento de complejos membranas todo el procedimiento se lleva a cabo a 4°C, aun encontramos estas subunidades.

Las manchas del SDS-PAGE muestran la posición predicha de las subunidades grandes de los fotosistemas con una huella característica de cada una. Los spots que pertenecen a las subunidades de la banda I muestran proteínas de más de 65 kDa, estas se atribuyen a PsaA2 y PsaB2, los spots alrededor de 25 kDa a PsaF2, PsaD2 y PsaL2 y la mancha debajo de 12.5 kDa a PsaE. Los spots que pertenecen a las subunidades de la banda II muestran proteínas en pesos moleculares de 65 kDa pudiendo ser PsbB2, alrededor de 45 kDa para PsbC2 y PsbD2, el spot entre 45 y 25 kDa pertenecería a PsbA5 y PsbO. Como se puede observar en el gel, la banda II y III cuentan con spots en común, y el análisis de masas mostro que, en ambas, están las subunidades del fotosistema II, la diferencia de migración nos indica que en la banda II contamos con dímeros del fotosistema II, mientras que en la banda III con monómeros. Los spots de la banda IV muestran algunas subunidades de los fotosistemas son más susceptibles a desacoplarse. Otra observación importante es que los trímeros del fotosistema I y los dímeros del fotosistema II, parecen ser menos susceptibles a desacoplarse, ya que el mismo tratamiento en estas membranas no provoco monómeros del fotosistema I, como en el caso de las membranas de células crecidas en luz roja y blanca, además, se observa la presencia del dímero del fotosistema II, que en los otros casos no se encontró.

Una vez determinado que los fotosistemas también realizan el recambio de algunas de sus subunidades, la siguiente pregunta fue: ¿Cuál de los dos fotosistemas es el que contiene clorofila *f* o son ambos? Una de las bondades de los geles claros nativos (CN-PAGE) es que es posible preservar los pigmentos dentro de los complejos, como son las clorofilas. Este efecto se observa en los geles presentados (Fig. 32A, 32B y 33), todas las bandas donde están los complejos y subunidades de los fotosistemas son de color verde, por tanto, aún conservan parte de sus clorofilas. Para responder esta pregunta de cuál fotosistema tendría clorofila *f* o si ambos tendrían, se cortaron las bandas I y II de los geles CN-PAGE donde se encontraron las subunidades del FSI y FSII (Fig. 32B y 33) y se realizaron espectros de absorción de las bandas del gel (Fig. 34). En la banda I de ambos geles se encuentra el fotosistema I, en la banda II está el fotosistema II; en el CN-PAGE de membranas de células crecidas en luz infrarroja estos fotosistemas hicieron un recambio en sus subunidades y se espera que sean las responsables de unir a la clorofila *f*. Los espectros de absorción mostraron que en los fotosistemas de células crecidas en luz roja solo cuentan con clorofila *a*, en cambio, los fotosistemas de células crecidas en luz infrarroja cercana contienen clorofila *f*, siendo considerablemente más abundante en el fotosistema II.

**Tabla 10.** La identificación proteómica en las bandas de CN-PAGE de los componentes de los fotosistemas aislados de las células cultivadas durante 11 días en LR y 21 en FRL.

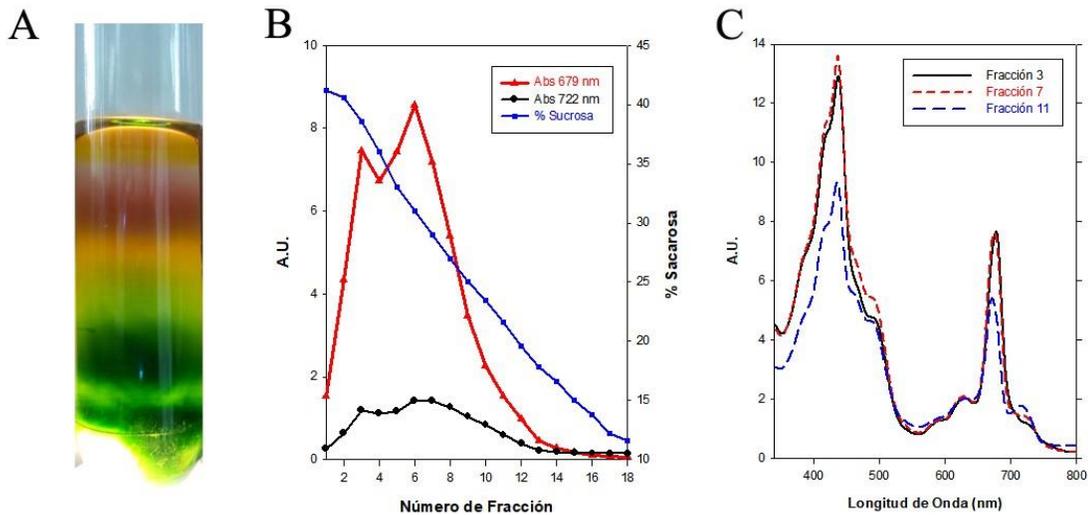
Banda	Unused	Total	%Cov	%Cov(95)	UniProt	MW Predicho (kDa)	Gen	Star (nt)	Stop (nt)
I	6.01	8.01	18.54	6.52	B4WP20	86.33	<i>psaA2</i>	1643943	1646291
I	16	16	13.06	9.69	B4WP21	83.13	<i>psaB2</i>	1,646,386	1,648,617
I	16	16	71.61	52.9	B4WFP8	17.03	<i>psaD</i>	411058	411525
I	6.68	6.68	80.28	54.93	B4WSJ5	7.94	<i>psaE</i>	4016464	4016679
I	3.6	3.6	24.40	24.40	B4WP24	18.55	<i>psaF2</i>	1,649,845	1,650,351
II, III	6, 4	6, 4	29.32, 15.58	9.88, 6.79	B4WKH9	35.66	<i>psbA5</i>	2756383	2757462
II, III	10.22, 6	10.22, 6	30.06, 28.09	9.23, 4.32	B4WKI1	52.39	<i>psbB2</i>	2758259	2759788
II, IV	8, 10	8, 10	32.78, 28.63	8.3, 11.83	B4WKI2	52.33	<i>psbC2</i>	2760004	2761452
IV	4	6	19.52	9.11	B4WGU0	50.28	<i>psbC1</i>	2332454	2333839
II, III	10, 4	10, 4	46.31, 35.51	12.22, 12.22	B4WKI3	39.57	<i>psbD2</i>	2761498	2762556
II, III	2, 10	8.01, 10	26.14, 27.27	11.93, 15.34	B4WNY9	39.41	<i>psbD1</i>	1616101	1617159
II, III	4, 4	4, 4	53.03, 34.85	15.15, 15.15	B4WKI0	7.24	<i>psbH2</i>	2757983	2758183
II, III	2.04, 6	2.04, 6	45.98, 30.65	1.66, 4.98	B4WKI6	87.15	<i>apcE2</i>	2763353	2765704
IV	2	2	54.66	9.32	B4WKI8	17.47	<i>apcB2</i>	2766339	2766824
IV	2	2	26.71	5.59	B4WI76	17.36	<i>apcB1</i>	636261	638978
IV	2.16	2.16	54.88	9.76	B4WJ66	17.71	<i>cpeA</i>	767147	767641



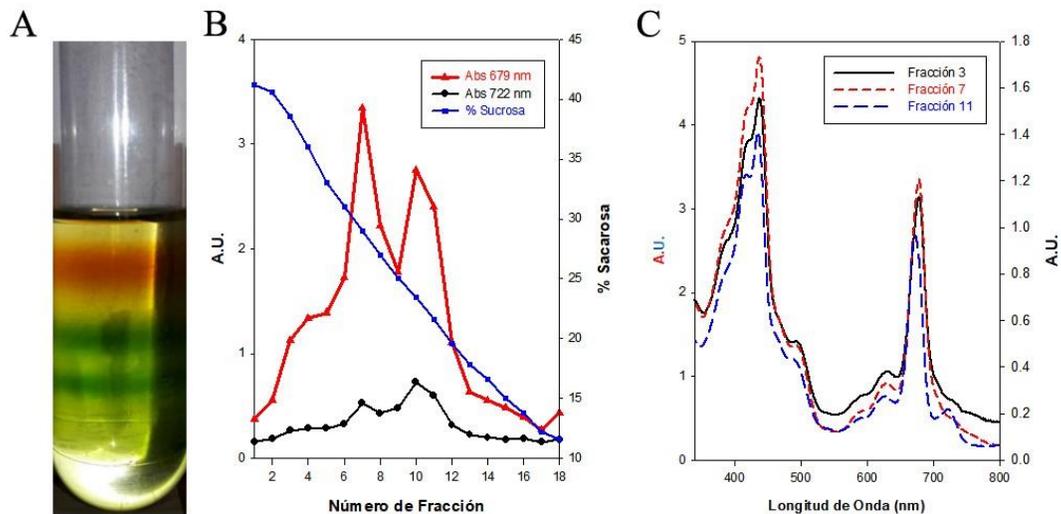
**Fig. 34** Espectro de las bandas de los geles claros nativos de membranas de células crecidas en luz roja (A) e infrarroja cercana (B).

similares a los obtenidos con los geles claros nativos. El gradiente fue colectado en fracciones de 1mL y se le realizaron espectros de absorción a cada fracción. Se eligió la longitud de onda de 679 y 722 nm de todas las fracciones para poder graficar un perfil del gradiente de sacarosa junto a la concentración de sacarosa de cada fracción (Fig. 35B). El perfil del gradiente muestra 3 picos correspondientes a las fracciones 3, 7 y 11. La fracción 3 es una fracción pesada o de rápida sedimentación donde se esperan complejos tales como el trímero del fotosistema I. En la fracción 7, ya que es una fracción intermedia se esperan monómeros del fotosistema I y dímeros del fotosistema II. La fracción 11 es una fracción ligera o de rápida sedimentación, por lo que se espera contengan subestructuras de los fotosistemas. Los espectros de absorción de estas tres fracciones (Fig. 35C) muestran que la

Otra forma de separar los complejos membranales es por medio de gradientes de sacarosa. Se formaron gradientes lineales con concentraciones de 0.25-1.5M de sacarosa con 0.01% de dodecil maltosido. Las membranas de células crecidas de luz roja a infrarroja cercana fueron solubilizadas con 0.5% de dodecil maltosido y cargadas al gradiente de sacarosa en una concentración de 1mg/mL de clorofila *a* (Fig. 35A). El gradiente de sacarosa muestra dos bandas verdes, correspondientes a dos complejos membranales que podrían ser



**Fig. 35** Aislamiento y caracterización de los complejos membranales de células *Synechococcus* PCC 7335 cultivadas en FRL. **A.** Gradiente de sacarosa de membranas solubilizadas con 0,5% de DDM a partir de células cultivadas en LR durante una semana y luego 3 semanas en luz FRL. **B.** Patrón de fracciones obtenidas del gradiente. Se indica la absorbancia de cada fracción a 679 nm (círculos rojos) y 722 nm (cuadrados negros). La concentración de sacarosa se muestra en puntos azules. **C.** Espectro de absorción de las fracciones 3, 7 y 11.

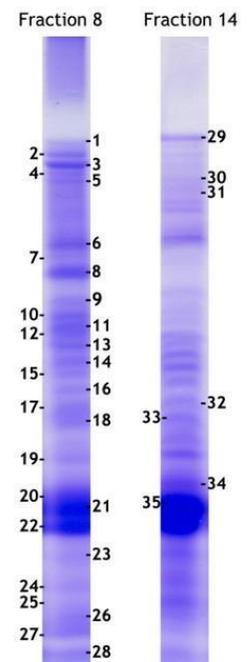


fracción 7 y 11 son las que contienen mayor cantidad de clorofila *f*. Por los experimentos previos, sabemos que se trata de complejos y subestructuras del fotosistema II.

Se realizó el mismo experimento, pero solubilizando las membranas con 2% de dodecil-maltosido. El gradiente de sacarosa de las membranas solubilizadas mostro dos bandas verdes abundantes en el centro del gradiente (Fig. 36A). El perfil mostró tres picos en las fracciones 3, 7 y 11 (Fig. 36B), las mismas posiciones que en la solubilización al 0.5%. Los espectros de absorción mostraron que en la fracción 3 y 7 solo se tenía clorofila *a*, mientras que en la fracción 11 se tiene clorofila *f* (Fig. 36C). Esto indica que las fracciones 3 y 7 pueden contener complejos del fotosistema I, mientras que la fracción 11 monómeros del fotosistema II, esto se infiere por su posición ligera en el gradiente de sacarosa.

Hasta este punto sabemos que tenemos dos tipos de ficobilisomas coexistiendo en las células crecidas en luz infrarroja cercana pero solo hemos encontrado las subunidades grandes que recambian en FaRLiP de los fotosistemas, así que nos surgieron algunas dudas: El core-FBS transfiere su energía a los fotosistemas que recambian en FaRLiP, pero ¿Qué pasa con el otro ficobilisoma que no es capaz de transferir su energía a estos fotosistemas de FaRLiP, pero se encuentra presente? ¿Cómo es posible tener un ficobilisoma y no sus respectivos fotosistemas? nuestros resultados no mostraron a por ejemplo a las subunidades grandes del fotosistema I PsaA1 y PsaB1 o PscC1y PscB1 del fotosistema II, que son los que acompañan a estos ficobilisomas, si están presentes ¿Dónde buscarlos?

Decidimos realizar un gel de acrilamida al 10% de las fracciones del gradiente de sacarosa y buscar estas subunidades en dos fracciones 8 y 14 (Fig. 37), por su posición en el gradiente nos mostrarían subestructuras de los complejos. Se analizaron 35 bandas de los geles, las cuales fueron escogidas por sus pesos moleculares aparentes y su posible correspondencia a alguna subunidad del fotosistema I, II o el ficobilisoma. Para sorpresa nuestra, los resultados mostraron 400 proteínas y cada banda del gel no ubicaba una única proteína. Lo que se procedió a hacer fue un análisis de abundancia de cada proteína,



**Fig. 37** Bandas de las fracciones 8 y 13 de los SDS-PAGE al 10% de las membranas solubilizadas con 0.5% de DDM.

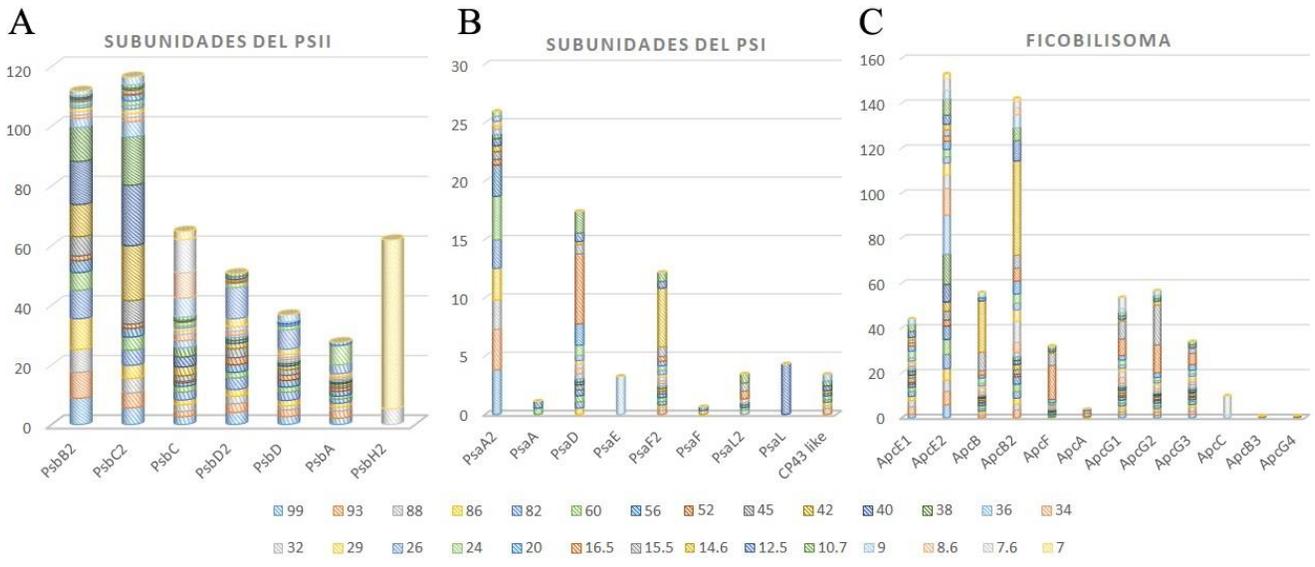


Fig. 38. Gráficas de columnas apiladas sobre los resultados de masas obtenidos de las bandas analizadas de la fracción 8. El valor en el eje y es el porcentaje compartido del espectro total. El eje x muestra la proteína analizada. A. Subunidades del fotosistema II. B. Subunidades del fotosistema I. C. Subunidades del core del ficobilisoma

considerando el porcentaje compartido del espectro total que se obtuvo en el análisis por espectrometría de masas. De esta forma, por ejemplo, se buscó a PsaA1 y se encontró en las bandas 37 y 38 con un porcentaje compartido del espectro de 7.5 y 6.7, y se graficó en barras apiladas que nos mostrara su relativa abundancia en cada fracción analizada. Las gráficas se separaron por subunidades de cada fotosistema y del ficobilisoma.

La gráfica de la fracción 8 donde se separaron las subunidades del fotosistema II (Fig. 38A), en ella encontramos que no solo esta PscB2 (la subunidad inducible en infrarrojo cercano) también PscB1 en una proporción menor. Lo mismo ocurre con PscD2 y PscD1. Para las subunidades del fotosistema I (Fig. 38B)

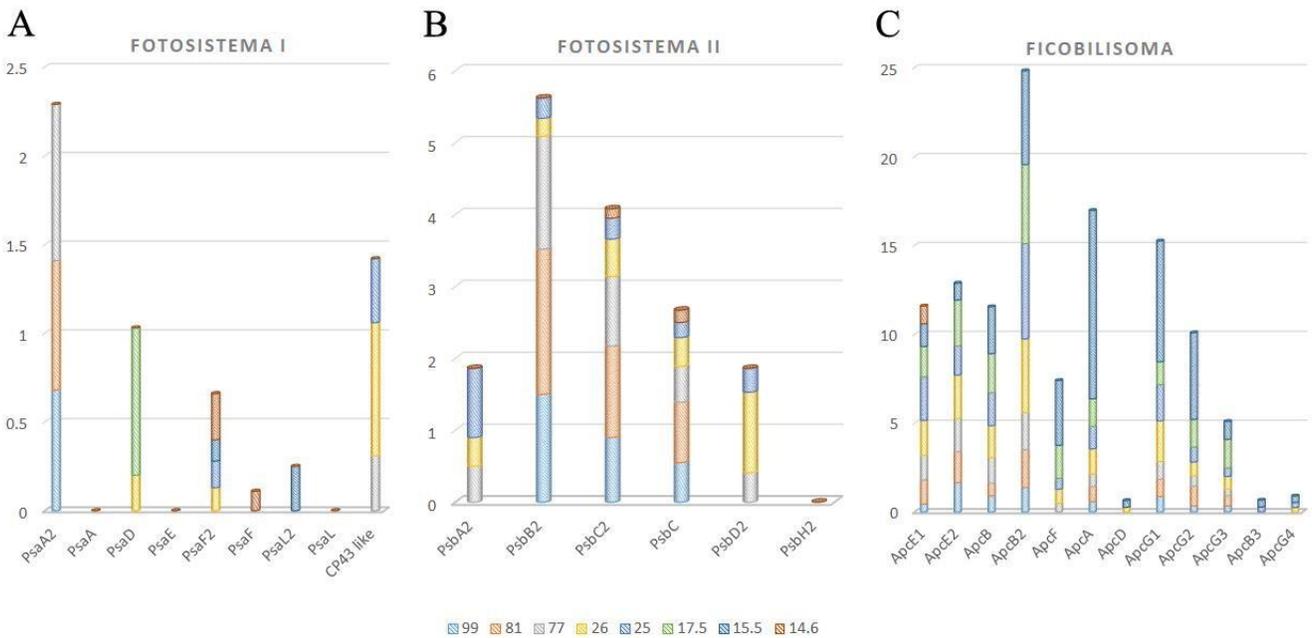
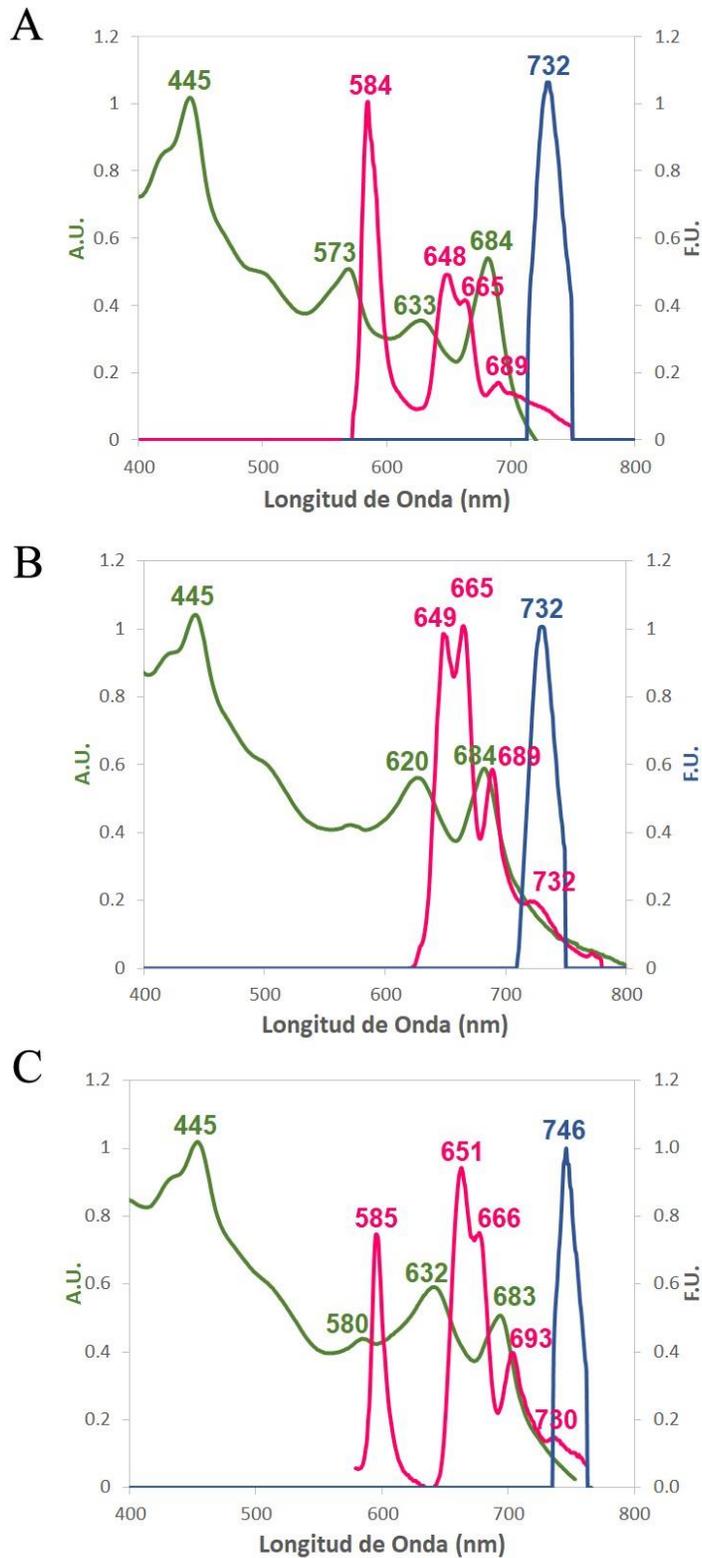


Fig. 39 Gráficas de columnas apiladas sobre los resultados de masas obtenidos de las bandas analizadas de la fracción 14. El valor en el eje y es el porcentaje compartido del espectro total. El eje x muestra la proteína analizada. A. Subunidades del fotosistema I. B. Subunidades del fotosistema II. C. Subunidades del core del ficobilisoma



encontramos a PsaA2 y PsaA1 en muy bajas proporciones. Una sorpresa fue que PsaL2 y PsaL1 estuvieran en proporciones equivalentes, recordemos que estas subunidades son una de las responsables del ensamblaje del trímero del FSI. Para el caso de las subunidades del ficobilisoma, se encontraron ambos *linker core membrane* ApcE2 y ApcE1, ApcB2 y ApcB1, y al igual que en los casos anteriores las subunidades inducibles en infrarrojo cercano son las más abundantes (Fig. 38C).

El análisis de las bandas de la fracción 14 mostro que para el fotosistema I, se encontraron PsaA2 y PsaA1, PsaL2 y PsaL1, pero en ambos casos las subunidades canónicas estaban en muy bajas proporciones y solo se detectaron una vez (Fig. 39A). Las subunidades del fotosistema II, PsbC2 y PsbC1, seguían mostrando una proporción mayor para la subunidad inducible (Fig. 39B). Las subunidades del ficobilisoma mostraron una abundancia mayor de ApcB2 con respecto de ApcB1, pero ApcE2 y ApcE1 tuvieron relativamente la misma abundancia (Fig. 39C).

### Transferencia de Energía

Una vez determinado que al crecer células de *Synechococcus* PCC 7335 de luz roja/blanca y pasarlas a infrarrojo cercano se realiza un recambio en el ficobilisoma, los fotosistemas y las clorofilas, se necesitó conocer como es la transferencia de energía entre estos complejos. Para mostrarlo se realizaron espectros de fluorescencia a baja temperatura en nitrógeno líquido sobre células (Fig. 40).

**Fig. 40 . Espectros de Absorción y Fluorescencia.** Se midió el espectro de absorción en células a temperatura ambiente (línea verde). **A.** Los espectros de emisión en células crecidas en luz blanca fueron registrados usando la longitud de onda de excitación a 550 nm (línea rosa) y 440 nm (línea azul), se midieron a baja temperatura. **B.** Los espectros de emisión en células crecidas en luz roja fueron registrados usando la longitud de onda de excitación a 590 nm (línea rosa) y 440 nm (línea azul), se midieron a baja temperatura. **C.** Los espectros de emisión en células crecidas en luz infrarroja cercana fueron registrados usando la longitud de onda de excitación a 520 nm (línea rosa) y 440 nm (línea azul), se midieron a baja temperatura

Para realizar el espectro de emisión de las células de *Synechococcus* PCC 7335 crecidas en luz blanca se excitó a 550 nm mostrando que la energía es transferida desde FE (584 nm), a FC (648 nm), después a AF (665 nm), y después de este punto la energía va hacia el FSII (689 nm). Para conocer el proceso de transferencia de la clorofila *a* se realizó un espectro de emisión excitando a 440nm, y solo se observó el FSI en 732 nm (Fig. 40A).

Al realizar el mismo experimento, pero en células crecidas en luz roja al realizar un espectro de emisión excitando a 520 nm, la energía se transfiere de las FC (649nm) a AF (665nm) y pasa al FSII (689nm), y parte de la energía de AF llega hasta el FSI (732nm). El espectro de emisión excitando a 440 nm mostró que las clorofilas transfieren su energía principalmente al FSI en 732nm (Fig. 40B), igual que en el caso de las células crecidas en luz blanca.

En el caso de las células adaptadas al infrarrojo, al realizar el espectro de emisión excitando a 520 nm se observa FE (585 nm), FC (651 nm) y AF (666 nm), este ligero corrimiento en el pico de los espectros puede implicar que los ficobilisomas no se encuentran perfectamente acoplados. Los últimos dos picos (693 y 730 nm) se infiere pertenecen al FSII y FSI, respectivamente. Se debe hacer hincapié en la variación de en la longitud de onda perteneciente al FSII, en luz roja o blanca fue de 689 nm, mientras que en infrarroja cercana fue de 693 nm. Al realizar un espectro de emisión excitando a 440 nm, solo observamos la transferencia de energía de las clorofilas, el espectro muestra un único pico a 730 nm, perteneciente al FSI.

#### ***Modelo propuesto del ficobilisoma de core bicilíndrico***

El análisis de la secuencia de aminoácidos de las ApcGs, así como su modelado *in silico* nos mostró sus diferencias y similitudes con respecto a las subunidades canónicas. En el alineamiento de las secuencias mostró que las subunidades ApcG tienen un alto grado de identidad con el receptor final ApcD. Una zona que resalta a primera vista por su discrepancia con el resto de las secuencias se encuentra entre los aminoácidos 57-84. Esta huella peptídica característica de las ApcGs contiene importantes residuos que se clasificaron en cuatro grupos: los aromáticos Trp58 y Trp85, que no es común encontrar en las FBPs; prolina, que provoca interrupción de las  $\alpha$ -hélices; aminoácidos que, por su posición, son potenciales donadores de hidrógeno para la ficocianobilina, Cys61, Thr64, Ser66, Asn67 and Ser68; y gaps de aminoácidos que promueven interacciones fuertes en enlaces  $\pi$ - $\pi$ , Phe57-Trp58 y Trp84-Tyr85. Al modelar las ApcGs, los aminoácidos de esta huella peptídica se encuentran rodeando el hueco donde va la ficocianobilina. Al comparar esta zona en las tres ApcGs con ApcA y ApcD, se observa que la cavidad tiene una forma más relajada, cuenta con menos  $\alpha$ -hélices lo que provoca que esta zona sea menos rígida (Anexo D), esto es producto de las prolina de la secuencia. En las subunidades canónicas, la rigidez de esta zona provoca que la ficocianobilina se tenga una geometría ZZZssa, mientras que la relajación de la cavidad provoca una geometría ZZZasa (Fig. 42) o una conformación más lineal. Dentro de las subunidades ApcD y el *linker* ApcE la geometría de la ficocianobilina es del tipo ZZZasa, esta geometría provoca un corrimiento al rojo en el espectro. Se debe señalar que en ambas son los receptores finales del ficobilisoma, ApcD donara la energía al FSI y ApcE al FSII, señalando que la geometría en la cavidad es importante para “sintonizar” la ficocianobilina.

La última peculiaridad es que dentro de la secuencia de aminoácidos de ApcG3 y ApcE2 no está la cisteína conservada que une la ficocianobilina. Experimentos con mutantes de *apcE* de *Synechococcus* PCC 7002 donde se mutó esta cisteína (C186V), provocaron que la ficocianobilina no esté unida covalentemente, sin embargo, se encuentra en su posición dentro del *linker*. El efecto que se provocó fue un corrimiento en el espectro de absorción hasta 710nm (Gindt et al. 1992). En los espectros de absorción donde se aíslan las subunidades de FaRLiP se observó un pico a 710 nm, se descartó la existencia de algún otro pigmento que diera esta longitud de onda, así que esta absorción debe ser dada por la ausencia de la cisteína en ApcG3 y la modificación de la cavidad que contiene la ficocianobilina.

La función que se propone para cada subunidad es la siguiente:

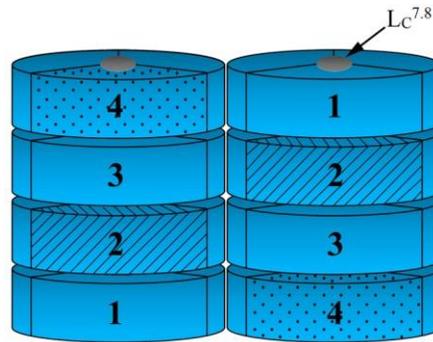


Con una estequiometría dentro del *core* de:



Esta estequiometría se calculó por los resultados obtenidos del gel de IEF, donde pudimos separar las ApcGs y por medio de los scores obtenidos por el análisis espectrométrico predecir su proporción. Para dilucidar el modelo del ficobilisoma y la posición de cada ficobiliproteína se tomaron en cuenta los siguientes factores: 1. Los protómeros de aloficocianina están formados por una subunidad alfa y una beta; 2. Un trímero de aloficocianina está constituido por tres dímeros de AF; 3. Un cilindro de aloficocianinas son cuatro trímeros de AF, dos cilindros para un *core* bicilíndrico, tres para uno tricilíndrico; 4. Los aceptores finales tienen una proporción de 2, tal como ApcE y ApcD en el ficobilisoma canónico; 5. ApcE se encuentra en medio del *core* en esta posición es capaz de anclar al FBS con el FSII y transferir la energía, ApcE cuenta con un dominio de subunidad alfa y esta es acompañada por ApcF ( $\beta^{18.5}$ ); 6. ApcD es el aceptor final en el ficobilisoma canónico y su posición es en la orilla más externa del ficobilisoma, donde es capaz de interactuar con el FSI.

Cumpliendo con los puntos anteriores el modelo los dímeros de aloficocianina serían: ApcG1-ApcB2, ApcE-ApcF, ApcG2-ApcB2 y ApcG3-ApcB2. Se propone que ApcG3 y ApcE2 sean los aceptores finales del este



1.  $(\alpha^{\text{AP-D}} \beta^{\text{AP-2}})_3 * L_C^{7.8}$
2.  $\alpha^{\text{Lcm}} \beta^{18.5} (\alpha^{\text{AP-C}} \beta^{\text{AP-2}})_2$
3.  $(\alpha^{\text{AP-C}} \beta^{\text{AP-2}})_3$
4.  $\alpha^{\text{AP-E}} \beta^{\text{AP-2}} (\alpha^{\text{AP-D}} \beta^{\text{AP-2}})_2 * L_C^{7.8}$

Fig. 41 Representación esquemática del *core* bicilíndrico de *Synechococcus* PCC 7335.  $L_C^{7.8}$  se encuentra al final de los cuatro trímeros de AP (1 y 4). Los puntos representan la posición del dímero aceptor final  $\alpha^{\text{AP-E}} \beta^{\text{AP-2}}$ . Las líneas diagonales representan la posición del dímero aceptor final  $\alpha^{\text{Lcm}} \beta^{18.5}$ .

core-FBS, donde ApcG3 sería en el donador final para el FSI y ApcE2 para el FSII. Ya que no hubo grandes diferencias en la proporción encontrada entre ApcG1 y ApcG2, predecimos que están en iguales proporciones pero que una de ellas es la que “sintoniza” mejor la energía para transferirla a los aceptores finales. Los trímeros de aloficocianina están ejemplificados en el modelo por su función (Fig. 42), por subunidad serían:

1.  $(\text{ApcG2} : \text{ApcB2})_3 \text{ApcC}$ ,
2.  $(\text{ApcE2} : \text{ApcF})(\text{ApcG1} : \text{ApcB2})_2$ ,
3.  $(\text{ApcG1} : \text{ApcB2})_3$ ,
4.  $(\text{ApcG3} : \text{ApcB2})(\text{ApcG2} : \text{ApcB2})_2 \text{ApcC}$ .

### Modelo propuesto de los fotosistemas

Enlistando los resultados encontrados en la fotoaclimatación al infrarrojo cercano de los fotosistemas se encontró:

1. Las subunidades PsaA2B2L2I2F2J2 y las subunidades PsbA5B2C2D2H2 se expresan.
2. Las clorofilas que se encontraron fueron clorofila *a* y *f* con una estequiometría de 1:20, así como 5 tipos de diferentes de carotenos.
3. La clorofila *f* es abundante en el fotosistema II.
4. El análisis *in silico* de la subunidad PsbA5 mostró un dominio conservado en todas las cepas que se aclimatan a infrarrojo cercano (YIPAL, 83-87aa).
5. El análisis *in silico* de la subunidad PsbD2 mostró un cambio en el W191 por Y, este aminoácido interacciona con P680 en las cepas tradicionales.
6. El análisis *in silico* de la subunidad PsaA cuenta con dos secuencias largas en las cianobacterias que cuentan con fotoaclimatación al infrarrojo cercano del aa 327-338 y aa 502-534, ninguna interacciona con alguna otra subunidad del fotosistema I.
7. Ninguna de las subunidades que recambian mostró diferencias en los sitios de unión de las clorofilas.
8. Las subunidades de los fotosistemas que recambian en infrarrojo cercano son más estables al ser aisladas y se disocian con menos facilidad.

La longitud de onda que emiten el *core*-FBS al FSII es a 725nm, para recibir esta energía el FSII recambio las

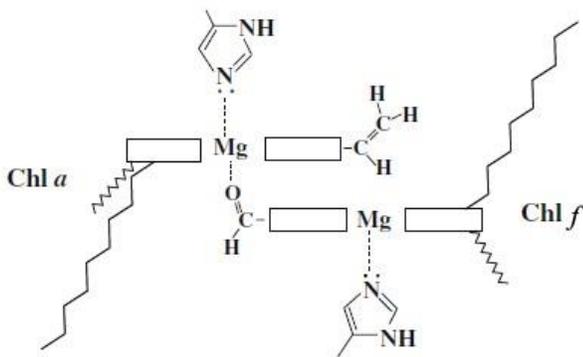


Fig. 42. Modelo del Centro de Reacción del Fotosistema II.

proteínas que contienen clorofila *a*. La estequiometría de 1:20 clorofila *a*:*f* muestra que aún es más abundante la clorofila *a*, el total de clorofilas entre ambos fotosistemas es de ~118, de las cuales 88 son del FSI y 33 del FSII. Como se encontró en los espectros de las bandas de los CN-PAGE, el FSII tiene la mayor cantidad de clorofila *f* y por la estequiometría encontrada esto implicaría que cuenta con 6 clorofilas *f* y 27 clorofilas *a* dentro de su estructura. En el análisis *in silico* de la subunidad PsbD2 se encontró el cambio del triptofano que une P680 en las cepas tradicionales, en la literatura se muestra que este triptofano cambia a leucina en *Acaryochloris marina*, una cianobacteria capaz de crecer en infrarrojo cercano, que sintetiza clorofila *d* y con un P740 en lugar de P700 (Ohashi *et al.* 2008). El modelo de los fotosistemas propuesto por

Ohashi y colaboradores indica que el FSII contiene clorofila *a* y *d* en el centro de reacción, donde la leucina sería la responsable de la selección de la clorofila *d* en esa posición. Bajo la propuesta de estos autores y la observación de que las cianobacterias que recambian en infrarrojo cercano no cuentan con el W191 si no con una tirosina, es de sospechar que esta sea la responsable de la selección por la clorofila *f*, con esto el centro de reacción estaría constituido por clorofila *a/f* (Fig. 42). La cantidad de clorofilas *f* encontradas muestra que es posible que la distribución y el alineamiento entre las clorofilas *a* sea el responsable de la transferencia eficiente de energía hasta el centro de reacción, no tenemos pruebas que refuten o sostengan esta teoría, ya que para esto es necesaria la cristalización de las subunidades PsbA5 y PsbD2. El modelo propuesto se encuentra en la figura 43.

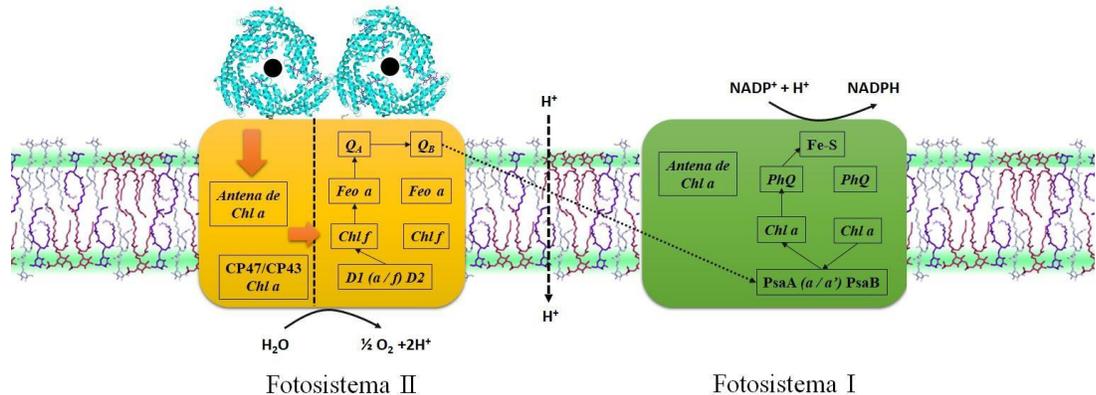


Fig. 43 Modelo de los Fotosistemas de la Fotoaclimatación al Infrarrojo Cercano.

### ***Nodularia spumigena* CCM 9**

El valle de Cuatro Ciénegas es considerado el humedal más importante dentro del desierto de Chihuahua y uno de los humedales más importantes en México. La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad lo incluye entre los sitios prioritarios para la conservación. A principios de esta década, la doctora Valeria Souza, del Departamento de Ecología Evolutiva del Instituto de Ecología de la UNAM, encontró esos grupos microbianos, que forman estructuras conocidas como estromatolitos. El valle de Cuatro Ciénegas también participó en la ruptura y separación del supercontinente Pangea, hace 220 millones de años. La primera falla tectónica que desencadenó la formación de los continentes que conocemos hoy es la Falla de San Marcos, que se encuentra justo debajo de Cuatro Ciénegas. Barbara Winsborough, de la Universidad de Texas descubrió diatomeas de hace 100 millones de años, vivas en Cuatro Ciénegas. Forest Rohwer, de la Universidad de San Diego y colaborador del equipo de la doctora Souza, encontró 17 000 tipos diferentes de virus marinos, todos nuevos para la ciencia, en apenas 10 gramos de estromatolitos. Así se pueden enumerar distintas especies tanto endémicas como encerradas tras varios cientos de años y con ello descubrir parte de la evolución de algunas especies. *Nodularia sp.* CCM9 fue aislada de esta región y la importancia de su estudio está basada en mostrar una cianobacteria que ha sobrevivido al paso del tiempo.

Se realizaron experimentos previos en 10 cianobacterias aisladas de Cuatro Ciénegas, Coahuila, a las que se les crecen en medio A<sup>+</sup> o BG11 y en presencia o ausencia de nitratos combinados, además del análisis del 16S rRNA e ITS. *Nodularia sp.* CCM9 se eligió por su rápido crecimiento y una identidad del 98% en el 16S rRNA y de 87% con el ITS con *Nodularia spumigena* CCY9414, una cianobacteria del mar Báltico cuyo genoma está secuenciado. Boß *et al.* (2013) mostraron que *Nodularia spumigena* CCY9414 es una cianobacteria filamentosa capaz de fijar nitrógeno por medio de la diferenciación celular a heterocistos. Su genoma es de 5.4 Mpb y genes para 5 294 proteínas, aproximadamente el 4% de la capacidad total de codificación se dedica a la producción de metabolitos secundarios, entre ellos la potente hepatotoxina nodularina, la espumigina lineal y la nodulapeptina cíclica. Además, cuenta con sistemas sofisticados para la absorción y asimilación de compuestos de hierro y fósforo, para la síntesis de solutos compatibles y para la formación de vesículas de gas, necesarios para el control activo de la flotabilidad. *Nodularia sp.* CCM9 logró crecer en ausencia de nitratos combinados y mostró la capacidad de diferenciación de célula a heterocistos, así como un biofilm extracelular. Para confirmar esta capacidad de adaptación, fue realizada la secuenciación del gen *nifH*, obteniendo una identidad del 94% con el de *Nodularia spumigena* CCY 9414.

*Nodularia spumigena* NSGG-1 aislado del Golfo de Gdansk mostró un efecto significativo de la salinidad sobre el crecimiento y la producción de nodularina (Mazur-Marzec *et al.* 2004). También se observó que la salinidad tiene otros efectos sobre NSGG-1; los filamentos fueron más largos a 7 psu, mientras que se formó un número mayor de akinetos a 35 psu. El número de heterocistos se redujo notablemente en las salinidades extremas. Este último hallazgo podría explicar por qué las proliferaciones de *Nodularia* NSGG-1 no ocurren fuera de un cierto rango de salinidad en aguas deficientes en nitrógeno. *Nodularia sp.* CCM9 fue crecida bajo diferentes condiciones de salinidad (datos no mostrados), y se logró su óptimo crecimiento en un medio BG11 + 0.2M de NaCl. Bajo estas condiciones de encontró la hepatotoxina HgB.

Chang *et al.* (2015) utilizaron microscopía electrónica de partículas individuales en combinación con análisis bioquímicos y moleculares en FBS intacto y un FBS en complejo con fotosistema II (PSII) de *Anabaena sp.* PCC 7120. En la estructura de FBS, todos los trímeros de PBP y los dominios de proteínas enlazadoras conservadas se localizaron inequívocamente, y se determinó la distribución global de todos los cromóforos. Proporcionamos evidencia de que ApcE y ApcF son fundamentales para la formación de una protrusión en el fondo de PBS, que

desempeña un papel importante en la mediación de la interacción de FBS con FSII. Sus proporcionan información sobre la arquitectura molecular de un PBS intacto en diferentes niveles de ensamblaje y proporcionan la base para comprender cómo se transfiere la energía de la luz absorbida por FBS a FSII. El trabajo realizado en este estudio fue sobre los componentes del ficobilisoma de *Nodularia spumigena* CCM 9. El análisis *in silico* mostró que en *Nodularia spumigena* CCY 9414, el ApcE (*linker core membrane*) cuenta con cuatro secuencias repetidas (REPs) que ensamblarían un FBS pentacilíndrico en caso de estar presente de forma completa, por su cercanía a *Nodularia spumigena* CCM 9, existía la posibilidad de que ambas tuvieran el mismo gen *apcE*. Por medio de PCR se amplificó el gen *apcE* de *Nodularia spumigena* CCM 9, dando como resultado cuatro secuencias REPs. Los geles de acrilamida y análisis de masas de las bandas corroboraron la existencia de esta proteína con un tamaño aproximado de 120 kDa. El análisis de las FBPs se realizó por medio de espectros de absorción, y solo mostró dos tipos de ficobiliproteínas: AF y FC. Para conocer el tamaño de los brazos del FBS fue necesario realizar el cociente de [FC]/[AF] que nos dio un valor de 1, esto implica un FC en cada brazo. Este valor nos resultó muy bajo, por lo cual procedimos a buscar que *linkers* se encontraban presentes en esta fracción pesada, encontramos tres: CpcG1, CpcG2 y CpcG4. Esto nos dice que el FBS aislado puede llegar a tener hasta tres PC, aunque solo encontramos una relación de [FC]/[AF] de 1. *Nodularia spumigena* CCM 9 ensambla un ficobilisoma con *core* pentacilíndrico parecido al de *Anabaena* sp. PCC 7120 y por lo tanto el modelo presentado se basó en el trabajo de Chang *et. al.* Este trabajo es solo el inicio de un intenso estudio en esta cepa.

### ***Synechococcus* PCC 7335**

En *Leptolyngbya* JSC-1 se demostró por primera vez la fotoaclimatación al infrarrojo cercano por Gan *et al.* (2014). Está ensambla un FBS pentacilíndrico en células cultivadas en luz blanca, roja o verde, ya que el *linker* ApcE1 tiene cuatro dominios REP. En la remodelación de *core*-PBS en IR, excepto ApcF y ApcC, todos los componentes relacionados con la aloficocianina que componen la subestructura del *core* de FBS se reemplazan en IR. ApcE2 tiene solo dos dominios REP (enlazador) y debe ensamblar una subestructura de *core* bicilíndrico en IR. Los FBS ensamblados en IR contienen algo de ficoeritrina. Los autores propusieron que en JSC-1 el ficobilisoma bicilíndrico cuenta con *rods* que mezclan ficoeritrina y ficocianina. Además, JSC-1 remodela su aparato fotosintético durante FaRLiP al sintetizar Chl *d* y *f*, reemplazando las subunidades centrales de FSI y FSII. Por otro lado, en *Halomicronema hongdechloris* se demostró que al crecer esta cepa en luz blanca se obtiene un ficobilisoma pentacilíndrico con *rods* de ficocianina, al crecerlas en IR se remodelaba el FBS a un *core*-FBS bicilíndrico, Li *et al.* (2016) mostraron una remodelación completa de los FBS y fueron los primeros en proponer este tipo de *core*-FBS. En nuestro caso, los experimentos mostraron, que, bajo la influencia de luz infrarroja cercana, no solo se ensamblan los *core*-FBS, también los hemidiscoidales tricilíndricos se encuentran presentes, coexistiendo ambos en la célula y manteniendo los ficobilisomas que tenía antes de pasar a infrarrojo cercano. Esto implicó que al crecer las células en luz roja y pasarlas a luz infrarroja cercana, obtuvimos FC-FBS y *core*-FBS. Mientras que al crecerlas en luz blanca y pasarlas a luz infrarroja cercana, se obtuvieron FE-FBS, PC-FBS y *core*-FBS. Estos resultados pueden interpretarse como una mala regulación por parte de la célula, esto puede ser por que los clústeres de genes de FaRLiP fueron adquiridos por transferencia horizontal de genes y no se transfirió alguno de los sistemas de regulación. Por ahora, es muy precipitado dar por sentado cualquier conjetura, ya que no se han realizado suficientes experimentos sobre cianobacterias con esta capacidad.

Gan *et al.* (2015) realizan análisis *in silico* de las ficobiliproteínas que se expresan en FaRLiP, estas ‘nuevas’ aloficocianinas fueron agruparon como ApcD. En este trabajo mostramos un árbol filogenético y alineamiento de 64 secuencias de subunidades alfa y beta de aloficocianina de otras cianobacterias junto con las que realizan FaRLiP. Se encontró que se dividen en cinco grupos: ApcA, ApcB, ApcD, ApcF y un nuevo grupo que denominamos ApcG. Las subunidades ApcB y ApcF son subunidades beta de aloficocianina y ambas comparten el mismo nodo. Dentro

del subgrupo ApcB están los segundos genes *apcB2* encontrado en el clúster de FaRLiP. Las subunidades ApcA, ApcD y ApcG son subunidades alfa de aloficocianina y entre ellas claramente el árbol se bifurca en dos, ApcA y ApcD en un extremo y ApcG en otro. En el grupo que denominamos ApcG están las proteínas Gan *et al.* (2015) denominaron como ApcD que se codifican en de FaRLiP. Nuestro análisis de las secuencias mostró que a pesar de que las ‘nuevas’ aloficocianinas son muy parecidas a ApcD, cuentan con cuatro importantes diferencias. Tienen un dominio único de 27 aa el cual cuenta con residuos importantes que promueven interacciones fuertes. Al modelar las ApcGs, los aminoácidos de esta huella peptídica forman la cavidad donde se encuentra el ficocianobilina. Se observo que estos provocan una forma más relajada ya que cuenta con prolinas dentro de la secuencia, cosa que ninguna otra ficobiliproteína tiene en esa zona. Estas observaciones nos llevaron a renombrar a las ‘nuevas’ aloficocianinas de ApcD a ApcG, estas fueron numeradas de acuerdo con su posición dentro del genoma, así tenemos a ApcG1, ApcG2 y ApcG3.

En el ficobilisoma canónico, después de la captación de energía por los brazos periféricos se transfiere la energía al *core* de AF y este al aceptor final de energía del FBS donde tiene dos caminos: uno entre la ficocianobilina unida al *linker* ApcE (cuya absorción se encuentra en 670nm) y de allí a las clorofilas *a* del fotosistema II (CP43), y otro camino donde ApcD transfiere la energía a la subunidad mayor del fotosistema I, esta subunidad es la antena proximal PsaA. En el caso del *core*-FBS ensamblado en la aclimatación a la luz infrarroja cercana, los aceptores finales recorren la longitud de onda que transfieren a más de 700nm, por lo que los fotosistemas canónicos no serían capaces de recibir dicha energía. Se buscaron en el genoma de *Synechococcus* PCC 7335 los genes relacionados a los fotosistemas, en el genoma se encontraron segundos clusters de genes para algunas subunidades de los fotosistemas, para el fotosistema I: *psaA5B2L2I2F2J2* y para el fotosistema II: *psbA2B2C2D2H2* designados como los genes de los fotosistemas de FaRLiP. Estos genes codifican para las subunidades que unen clorofila y que se encuentran participando en la transferencia de energía, así como en la excisión del agua.

Dentro el genoma algunas otras subunidades se encuentran en más de una copia, el gen *psbD* se encuentra en dos copias, aparte del que está en el clúster de FaRLiP. Este gen codifica para la subunidad D2 del FSII y siempre se transcribe junto a *psbC* (CP43). La segunda copia de *psbD* codifica para la misma proteína que el primero, este puede proveer un recurso alternativo a la transcripción cuando se realiza una sobre transcripción de D2 con respecto a CP43 (Colón-López y Sherman, 1998). En *Synechococcus* PCC 7335, *psbA* esta cuenta con seis copias dispersas en el genoma, *psaA1* es codifica en condiciones estándar de luz; existen dos copias idénticas: *psbA3* y *psbA6* que se transcriben bajo condiciones de luz intensa e inactivan a *psaA1* (Muo y Sicora, 2009). El gen *psbA2* es codificado en condiciones diazotróficas y se le conoce como ‘*rogue*’ la cual tiene variantes de residuos en el sitio de unión del OEC. Cuatro ligandos del OEC son diferentes del consenso, el Asp342 y Glu333 cambiando por una leucina y alanina, respectivamente; y otro ligando altamente conservado es Asp170 se convierte en uno glutamato (Murray 2012). La proteína que codifica el gen *psbA4* es la sintetasa de clorofila *f*. El descubrimiento de que un parálogo de la subunidad D1 del núcleo del FSII fue responsable de la síntesis de clorofila *f* fue inesperado, ya que la implicación fue que esta enzima debe estar estructural y funcionalmente relacionada con el FSII. Curiosamente, la oxidación de clorofila *a* a clorofila *f* es una oxidación similar a la del agua. El trabajo de Ho et al. 2016 sugiere que, dentro del contexto de la evolución de la FSII, hay dos maneras de ver el resultado de que clorofila *f* / PsbA4 sintetasa es una enzima que probablemente foto-oxida la clorofila *a* para producir clorofila *f*. En el primer escenario, clorofila *f* puede haber evolucionado desde la subunidad PsaA (D1) de un complejo FSII oxidante por la pérdida de los ligandos para unirse al clúster Mn<sub>4</sub>Ca<sub>1</sub>O<sub>5</sub>, con la retención de clorofilas catalíticamente útiles, la unión de la tirosina Y<sub>Z</sub> y la plastoquinona después de la duplicación y divergencia del gen. Aunque esta es ciertamente una posibilidad razonable, los análisis filogenéticos no respaldan esta hipótesis. Una posibilidad alternativa es quizás más atractiva: clorofila *f* / PsaA4 sintetasa podría ser ancestral a la PsaA del FSII, y PsaA podría haber surgido por

duplicación y divergencia de genes para unir un grupo  $Mn_4Ca_1O_5$  y para catalizar la oxidación de agua, proporcionando así una explicación del origen de FSII.

El análisis *in silico* PsbD2, la subunidad D2 del FSII que une al centro de reacción, mostró dentro de su secuencia una Y191 en lugar de un W191, este triptofano es conservado en las cepas clásicas y es uno de los responsables de la unión de una de las clorofilas *a* del dímero del centro de reacción. Esto ya se había observado en *Acaryochloris marina*, una cianobacteria capaz de crecer en infrarrojo cercano y que en el FSI cambia el W191 por una L191 (Ohashi *et al.* 2008). Los autores comentan que la restricción evolutiva en el residuo de triptófano se cambió en D2 de *Acaryochloris*, lo que indica una sustitución del par especial del lado D2 Chl *a* (P680) con Chl *d* en el centro de reacción del FSII de *A. marina*, aunque esta idea no ha sido ampliamente aceptada. Bajo esta suposición, sospechamos que lo mismo ocurre con las cianobacterias capaces de fotoaclimatarse al infrarrojo cercano, ya que el residuo triptofano tampoco está presente y fue cambiado por una tirosina lo que podría dar lugar a un centro de reacción con clorofila *a/f*, muy parecido al de *A. marina*.

James W. *et al.* (2006) opinan que las clorofilas pueden tener dos tipos de configuración dentro de las subunidades, una configuración  $\alpha$  y otra  $\beta$ , esta es dada por la interacción de la histidina con el Mg de la clorofila. En la configuración  $\alpha$  la histidina y la clorofila se encuentran situadas de manera perpendicular, mientras que la configuración  $\beta$ , la histidina se inclina  $45^\circ$ . Por lo general, la configuración de las Chl en las antenas fotosintéticas se realiza mediante la configuración  $\alpha$ ; esto es cierto para la mayoría de las Chls vinculadas a CP43 y CP47. La función de la pila transmembrana de Chls en CP43 y CP47 es desconocida, pero probablemente ayuda a la transferencia de energía de una capa a la otra. La interacción del exciton entre estas Chls podría ser el origen de los pigmentos "rojos" que se sabe que existen en CP43 y CP47 y se sospecha es efecto de la configuración  $\beta$  de las clorofilas. Varios de los residuos de histidina de CP43 y CP47 se han mutado, con los fenotipos resultantes que van desde tener una actividad reducida de PSII hasta una pérdida completa de crecimiento fotoautotrófico debido a la falta de ensamblaje de PSII. Uno de tales estudios indicó que el Chl ligada con His114 en CP47 tiene una configuración  $\beta$  y era el origen de la emisión de 695 nm a 77 K. En el caso de PsbB2 (CP47) de *Synechococcus* PCC 7335 al menos siete de doce Chls tienen configuración  $\beta$  unidas a His y 4 de las clorofilas de PsbC (Cp43), además de una unida a Asn, estas podrían ser las responsables de la transferencia de energía hasta el centro de reacción del FSII (Anexo D, Fig. 52 y 53).

Como se describió en los resultados, parece ser que el aislamiento de los supercomplejos de los fotosistemas canónicos de *Synechococcus* PCC 7335 son menos estables que los de FaRLiP, ya que bajo las mismas condiciones de ruptura celular y aislamiento membranal se encontraron más subestructuras de los fotosistemas en las condiciones de aislamiento de membranas de células crecidas en luz roja/blanca. En cambio, el aislamiento de estos complejos en células crecidas en luz infrarroja, mostro ser más estable y tuvo menos tendencia a la disociación en subestructuras. Esta observación puede deberse a la resistencia de los fotosistemas a las condiciones adversas, considerando la luz infrarroja cercana una de ellas, ya se ha demostrado que las subunidades que recambian de los fotosistemas en otras condiciones de aclimatación suelen ser más estables (Li M. *et al.* 2014). En condiciones normales de crecimiento es posible que la célula requiera menos super complejos, en cambio, en un estrés de luz como es la luz infrarroja cercana, donde se incrementa la cantidad de calor y se disminuye la cantidad de luz, los fotosistemas deban ser más estables en su forma de supercomplejo. Por último, pese a nuestros extensos análisis de masas no encontramos la clorofila *f*/PsbA sintetasa, que hubiera sido muy interesante analizar.

Este trabajo muestra las diferencias que exhiben en las estrategias de sobrevivencia, *Nodularia spumigena* CCM 9 y *Synechococcus* PCC 7335, principalmente en los complejos de captación de la luz. *Nodularia spumigena* CCM 9 cuenta con un ficobilisoma hemidisoidal pentacilíndrico que le permite absorber más cantidad de energía,

mientras que *Synechococcus* PCC 7335 tiene la capacidad de aclimatarse a diferentes longitudes de onda con FE-FBS, PC-FBS y core-FBS. La capacidad de *Nodularia spumigena* CCM 9 de producir vacuolas de aire le permite moverse a lo largo de la columna de agua, de esta manera puede posicionarse en la región de su conveniencia. En cambio, *Synechococcus* PCC 7335 no es capaz de producir vacuolas de aire, pero si un polímero extracelular que le permite anclarse a diversas superficies. Uno de los mecanismos de supervivencia ante depredadores de *Nodularia spumigena* CCM 9 es mediante cianotoxinas, su pariente más cercana *Nodularia spumigena* CCY9414 es capaz de sintetizar 11 diferentes cianotoxinas entre las cuales se encuentra una hepatotóxica, capaz de matar mamíferos del tamaño de perros (Marzec et al. 2005), *Synechococcus* PCC 7335 no cuenta con esta ventaja. Ambas cianobacterias mostraron en el análisis *in silico* genes relacionados a la diferenciación celular a heterocistos, pero este proceso solo se da en cianobacterias filamentosas con capacidad de fijar nitrógeno. Los genes encontrados en *Synechococcus* PCC 7335 pueden ser remanentes de un proceso que podría realizar, pero que perdió esa capacidad, ya que esta cianobacteria es unicelular pero su pariente más cercano es *Leptolyngbya* PCC 7535, una cianobacteria filamentosa con capacidad de realizar diferenciación celular a heterocistos y fijar nitrógeno.

## Conclusiones

---

Se identificaron los componentes del ficobilisoma de *Nodularia spumigena* CCM 9 en condiciones de crecimiento de luz blanca. Por medio de espectrometría de absorción, geles de acrilamida y análisis por espectrometría de masas, fue posible caracterizar el FBS hemidiscoidal pentacilíndrico con brazos de ficocianina, de *Nodularia spumigena* CCM 9.

Para el caso de *Synechococcus* PCC 7335 se logró conocer los componentes y estructura del ficobilisoma y los fotosistemas ensamblados en luz infrarroja cercana. Del aislamiento de los FBS de células crecidas en luz roja/blanca y pasadas a luz infrarroja cercana se caracterizaron dos tipos de ficobilisomas, un tricilíndrico hemidiscoidal y un bicilíndrico, ambos encontrados en esta misma condición de crecimiento. La estequiometría propuesta se pudo lograr mediante la separación de las ficobiliproteínas por su pI y peso molecular.

Así mismo se caracterizaron los fotosistemas canónicos y de FaRLiP de esta cepa, mostrando que se realiza el recambio de las subunidades de los fotosistemas que unen clorofila. El análisis de los pigmentos solubles mostró que no existe alguna otra ficocianobilina que sea la responsable del corrimiento a infrarrojo cercano que tienen las proteínas analizadas, mientras que el análisis *in silico* nos dio bases para poder afirmar que es el ambiente que la proteína da a la ficocianobilina, lo que provoca este corrimiento. El análisis de pigmentos liposolubles mostró que solo se encuentra clorofila *a* en condiciones de ACC, mientras que se tiene clorofila *a* y *f* en FaRLiP, además, dos carotenos invierten su proporción en el crecimiento en luz infrarroja comparado con el de luz roja/blanca. Los fotosistemas en FaRLiP resultaron ser menos susceptibles al desensamblarse con dodecil maltosido, con lo que logramos tener trímeros del FSI y dímeros del FSII que contenían las subunidades inducibles en luz infrarroja cercana.

A pesar de nuestros múltiples esfuerzos, no fue posible tener una fracción del gradiente de sacarosa enriquecida con el fotosistema II de FaRLiP y poder realizar el fotoblanqueo, y de esta forma conocer el valor del centro de reacción. Este experimento nos mostraría si el centro de reacción, habitualmente P680 en el FSII, recambia mostrando otra absorción diferente a 680nm. Nosotros esperamos que esto pase ya que el FBS transfiere su energía en 710 nm, dicha energía no podría ser utilizada por P680.

## Perspectivas

---

La caracterización de una nueva cepa, como es *Nodularia spumigena* CCM 9 es un trabajo muy extenso, el ficobilisoma es solo una de las antenas usadas en la fotosíntesis de las cianobacterias, *Nodularia spumigena* CCY 9414 cuenta con otros dos tipos de antenas intrínsecas de membrana inducibles, que aún no se han caracterizado.

Por otro lado, aún quedan muchas preguntas que responder sobre la aclimatación a la luz infrarroja cercana, la que se encuentra más inmediata es si el centro de reacción contiene clorofila *f* y con esto cambia su valor de absorción, esto por medio del fotoblanqueo del FSII en FaRLiP.

Otra pregunta que aún queda en el aire es si es capaz de realizar la aclimatación al infrarrojo cercano y, además, fijar nitrógeno.

Descubrir cómo es la regulación de los genes de FaRLiP será un trabajo muy amplio, aunque ya hay indicios de cuál es la función de las proteínas Rfp.

## Referencias

---

1. Airs RL, Temperton B, Sambles C, Farnham G, Skill SC, Llewellyn CA, (2014) Chlorophyll f and chlorophyll d are produced in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii* when cultured under natural light and near-infrared radiation. *FEBS Lett.* 588, 3770–3777.
2. Akutsu S, Fujinuma D, Furukawa H, Watanabe T, Ohkubo S, Miyashita H (2011). Pigment analysis of a chlorophyll f-containing cyanobacterium strain KC1 isolated from Lake Biwa. *Photomed. Photobiol.* 33,35–40.
3. Alcántara-Sánchez F, Leyva-Castillo LE, Chagolla-López A, González de la Vara L, Gómez-Lojero C (2017) Distribution of isoforms of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase (FNR) in cyanobacteria in two growth conditions. *Int J Biochem Cell Biol.*, 9;85:123-134.
4. Behrendt L, Brejnrod A, Schliep M, Sørensen SJ, Larkum AW, Kühl M, (2015) Chlorophyll f-driven photosynthesis in a cavernous cyanobacterium. *ISME J.* 9, 2108–2111
5. Cardona T, Murray JW, Rutherford AW, Origin and evolution of water oxidation before the last common ancestor of the cyanobacteria. *Mol. Biol. Evol.* 32, 1310–1328 (2015).
6. Chan YW, Nenninger A, Clokie SJ, Mann NH, Scanlan DJ, Whitworth AL, Clokie MR (2007) Pigment composition and adaptation in free-living and symbiotic strains of *Acaryochloris marina*. *FEMS Microbiol Ecol.* ;61(1):65-73.
7. Chang L, Liu X, Li Y, Liu CC, Yang F, Zhao J, Sui SF. (2015) Structural organization of an intact phycobilisome and its association with photosystem II. *Cell Res.*, 25(6):726-37.
8. Chen M, Blankenship RE (2011) Expanding the solar spectrum used by photosynthesis. *Cell Press* 6(8) 1360-1385.
9. Chen M, Li Y, Birch D, Willows RD. (2012) A cyanobacterium that contains chlorophyll far red absorbing photopigment. *FEBS Lett.*, 586(19):3249-54.
10. Chen M, Scheer H (2013). Expanding the limits of natural photosynthesis and implications for technical light harvesting. *J. Porphyrins Phthalocyanines* 17, 1–15.
11. Chen M. (2014) Chlorophyll modifications and their spectral extension in oxygenic photosynthesis. *Annu Rev Biochem.*, 83:317-40.
12. Colón-López MS1, Sherman LA (1998) Transcriptional and translational regulation of photosystem I and II genes in light-dark- and continuous-light-grown cultures of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142. *J Bacteriol.* 180(3):519-26
13. Chew AG, Bryant DA (2007) Chlorophyll biosynthesis in bacteria: The origins of structural and Funciónal diversity. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 113–129.
14. Deutsch EW, Mendoza L, Shteynberg D, Farrah T, Lam H, Tasman N, Sun Z, Nilsson E, Pratt B, Prazen B, Eng JK, Nesvizhskii A, Aebersold R, (2010). A guided tour of the trans proteomic pipeline. *Proteomics* 10, 1150–1159.
15. Dong C, Tang A, Zhao J, Mullineaux CW, Shen G, Bryant DA. (2009) ApcD is necessary for efficient energy transfer from phycobilisomes to photosystem I and helps to prevent photoinhibition in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Biochim Biophys Acta.*, 1787(9):1122-8.

16. Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K, Barber J, Iwata S (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 303:1831–1838
17. Fontecilla-Camps J.C., A. P. (2009). Structure–Función relationships of anaerobic gas-processing metalloenzymes. *Nature*, 460, 814-822.
18. Gan F, Bryant DA (2015) Adaptive and acclimative responses of cyanobacteria to far-red light. *Environmental Microbiology*, 17(10), 3450-3465.
19. Gan F, Shen G, Bryant DA. (2014) Occurrence of Far-Red Light Photoacclimation (FaRLiP) in Diverse Cyanobacteria. *Life (Basel)*, 5(1):4-24.
20. Gan F, Zhang S, Rockwell NC, Martin SS, Lagarias JC, Bryant DA (2104) Extensive remodeling of a cyanobacterial photosynthetic apparatus in far-red light. *Science*, 345(6202):1312-7.
21. Gao, E.-B., Gui, J.-F., & Zhang, Q.-Y. (2012). A Novel Cyanophage with a Cyanobacterial Nonbleaching Protein A Gene in the Genome. *Journal of Virology*, 86(1), 236–245.
22. Gindt YM, Zhou J, Bryant DA, Sauer K. (1992) Core mutations of *Synechococcus* sp. PCC 7002 phycobilisome: a spectroscopy study. *J. Photochem. PhotoBiol.*, 15(1-2):75-89
23. Glazer A. (1984) Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer *Biochim. Biophys. Acta*, 768, 29-51.
24. Gómez-Lojero C, Pérez-Gómez B, Krogmann DW, Peña-Díaz A (1997) The tricylindrical core of the phycobilisome *Arthrospira (Spirulina) maxima*. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29(7): 959-970.
25. Gómez-Lojero C, Pérez-Gómez B, Prado-Flores G, Krogmann DW, Cáravez-Trejo A, Peña-Díaz A (1997) The phycobilisomes of the Cyanobacteria *Arthrospira (Spirulina) maxima*. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29(10):1191-1205.
26. Gomez-Lojero C, Pérez-Gómez B, Shen G, Schluchter WM, Brayant DA (2003) Interaction of ferredoxin: NADP<sup>+</sup> oxidoreductase with phycobilisomes and phycobilisome substructures of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Biochemistry* 42:13800-13811.
27. Grossman, A.R.; Schaefer, M.R.; Chiang, G.G.; Collier, J.L. (1993) The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol. Rev.*, 57, 725–749.
28. Grotjohann I., Fromme P. (2005) Structure of cyanobacterial photosystem I. *Photosynth. Res.* 85, 51–72.
29. Gutu A1, Kehoe DM (2012) Emerging perspectives on the mechanisms, regulation, and distribution of light color acclimation in cyanobacteria. *Mol Plant.* 5(1):1-13
30. Heinz S, Liauw P, Nickelsen J, Nowaczyk M (2016) Analysis of photosystem II biogenesis in cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta*; 1857(3):274-87.
31. Ho MY, Gan F, Shen G, Bryant DA (2017) Far-red light photoacclimation (FaRLiP) in *Synechococcus* sp. PCC 7335. II. Characterization of phycobiliproteins produced during acclimation to far-red light. *Photosynth Res.*, 131(2):187-202.
32. Ho MY, Gan F, Shen G, Zhao C, Bryant DA (2017) Far-red light photoacclimation (FaRLiP) in *Synechococcus* sp. PCC 7335: I. Regulation of FaRLiP gene expression. *Photosynth Res.*, 131(2):173-186.

33. Ho MY, Shen G, Canniffe DP, Zhao C, Bryant DA.(2016) Light-dependent chlorophyll f synthase is a highly divergent paralog of PsbA of photosystem II. *Science*, 353(6302).
34. Hu Q, Miyashita H, Iwasaki I, Kurano N, Miyachi S, Iwaki M, Itoh S. (1998). A photosystem I reaction center driven by chlorophyll d in oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95(22):13319-23.
35. Hu Q, Miyashita H, Iwasaki I, Kurano N, Miyachi S, Iwaki M, Itoh S. (1998) A photosystem I reaction center driven by chlorophyll d in oxygenic photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 95(22):13319-23.
36. Hu Y., R. M. (2012). Nitrogenase assembly. *Biochem. and Biophys. Acta*, 1827, 1112-1122.
37. Itoh S, Ohno T, Noji T, Yamakawa H, Komatsu H, Wada K, Kobayashi M, Miyashita H. (2015) Harvesting Far-Red Light by Chlorophyll f in Photosystems I and II of Unicellular Cyanobacterium strain KC1. *Plant Cell Physiol.*, 56(10):2024-34
38. Kehoe DM, Gutu A (2006) Responding to color: the regulation of complementary chromatic adaptation. *Annu Rev Plant Biol.* 57:127-50.
39. Kiss E, Kós PB, Chen M, Vass I. (2012) A unique regulation of the expression of the psbA, psbD, and psbE genes, encoding the O1, O2 and cytochrome b559 subunits of the Photosystem II complex in the chlorophyll d containing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Biochim Biophys Acta.*; 1817(7):1083-94.
40. Kun Tanga, Wen-Long Dinga, Astrid Höppnerc, Cheng Zhaoa, Lun Zhanga, Yusaku Hontanid, John T. M. Kennisd, Wolfgang Gärtnerb, Hugo Scheere, Ming Zhoua, and Kai-Hong Zhaoa (2015) The terminal phycobilisome emitter,  $L_{CM}$ : A light harvesting pigment with a phytochrome chromophore. *PNAS*; 112(52): 15880-15885
41. Li M, Semchonok DA, Boekema EJ, Bruce BD (2014) Characterization and evolution of tetrameric photosystem I from the thermophilic cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp TS-821. *Plant Cell.* 26(3):1230-45
42. Li Y, Cai ZL, Chen M. (2013) Spectroscopic properties of chlorophyll f. *J Phys Chem B.*, 117(38):11309-17.
43. Li Y, Chen M. (2015) Novel chlorophylls and new directions in photosynthesis research. *Funcional Plant Biology* 42(6):493.
44. Li Y, Lin Y, Garvey CJ, Birch D, Corkery RW, Loughlin PC, Scheer H, Willows RD, Chen M (2016) Characterization of red-shifted phycobilisomes isolated from the chlorophyll f-containing cyanobacterium *Halomicronema hongdechloris*. *Biochim Biophys Acta*, 1857(1):107-14
45. Li, Y.; Scales, N.; Blankenship, R.E.; Willows, R.D.; Chen, M. (2012) Extinction coefficient for red-shited chlorophylls: Chlorophyll d and chlorophyll f. *Biochim. Biophys Acta*, 1817, 1292–1298
46. Lino B, Chagolla A, González de la Vara, E, (2016). Membrane proteins involved intransport, vesicle traffic and Ca<sup>2+</sup> signaling increase in beetroots grown insaline soils. *Planta* 244(1):87-101
47. Liu H, Zhang H, Niedzwiedzki DM, Prado M, He G, Gross ML, Blankenship RE (2013). Phycobilisomes Supply Excitations to Both Photosystems in a Megacomplexes in Cyanobacteria. *Science*, 342 (6162).
48. MacColl R, (2004) Allophycocyanin and energy transfer *Biochim Biophys Acta*, 1657(2-3):73-81.

49. Mazur-Marzec H, Żeglińska L, Pliński M (2004) The effect of salinity on the growth, toxin production, and morphology of *Nodularia spumigena* isolated from the Gulf of Gdańsk, southern Baltic Sea, *Journal of Applied Phycology*, (17)2, 171–179.
50. Miao D, Ding WL, Zhao BQ, Lu L, Xu QZ, Scheer H, Zhao KH (2016) Adapting photosynthesis to the near-infrared: non-covalent binding of phycocyanobilin provides an extreme spectral red-shift to phycobilisome core-membrane linker from *Synechococcus* sp. PCC7335. *Biochim Biophys Acta.*, 1857(6):688-94.
51. Miyashita H, Ohkubo S, Komatsu H, Sorimachi Y, Fukayama D, Fujinuma D, Akutsu S, Kabayashi M (2014) Discovery of chlorophyll d in *Acaryochloris marina* and chlorophyll f in a unicellular cyanobacterium, strain KC1, isolated from Lake Biwa. *J. Phys. Chem. Biophys.* 4, 149. doi:10.4172/2161-0398.1000149
52. Mulo P, Sicora C (2009) Cyanobacterial psbA gene family: optimization of oxygenic photosynthesis. *Cell Mol Life Sci.* 66(23): 3697-3710.
53. Murray JW, (2012) Sequence variation at the oxygen-evolving centre of photosystem II: A new class of ‘rogue’ cyanobacterial D1 proteins. *Photosynth. Res.* 110, 177– 184.
54. Mutsuda M, Michel KP, Zhang X, Montgomery BL, Golden SS. (2003) Biochemical properties of CikA, an unusual phytochrome-like histidine protein kinase that resets the circadian clock in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Biol Chem.* 23;278(21):19102-10.
55. Pérez-Gómez B, Mendoza-Hernández G, Cabellos-Avelar T, Leyva-Castillo LE, Gutiérrez-Cirlos EB, Gómez-Lojero C. (2012) A proteomic approach to the analysis of the components of the phycobilisomes from two cyanobacteria with complementary chromatic adaptation: *Fremyella diplosiphon* UTEX B590 and *Tolypothrix* PCC 7601. *Photosynth Res*, 114(1):43-58
56. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria, *Microbiology* 111: 1-61.
57. Rockwell NC, Lagarias JC. (2017) Phytochrome diversification in cyanobacteria and eukaryotic algae. *Curr Opin Plant Biol.*; 37:87-93.
58. Schägger H, Cramer WA, von Jagow G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* 217:220-230.
59. 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. *Anal Biochem.*, 166(2):368-79.
60. Schubert WD, Klukas O, Saenger W, Witt HT, Fromme P, Krauss N (1998) A common ancestor for oxygenic and anoxygenic photosynthetic systems: a comparison based on the structural model of photosystem I. *J Mol Biol* 280:297–314
61. Shen G, Gan F, Bryant D (2016) The siderophilic cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. strain JSC-1 acclimates to iron starvation by expressing multiple isiA-family gene, *Photosynth Res* (2016) 128:325–340
62. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M., (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* 1,2856–2860,

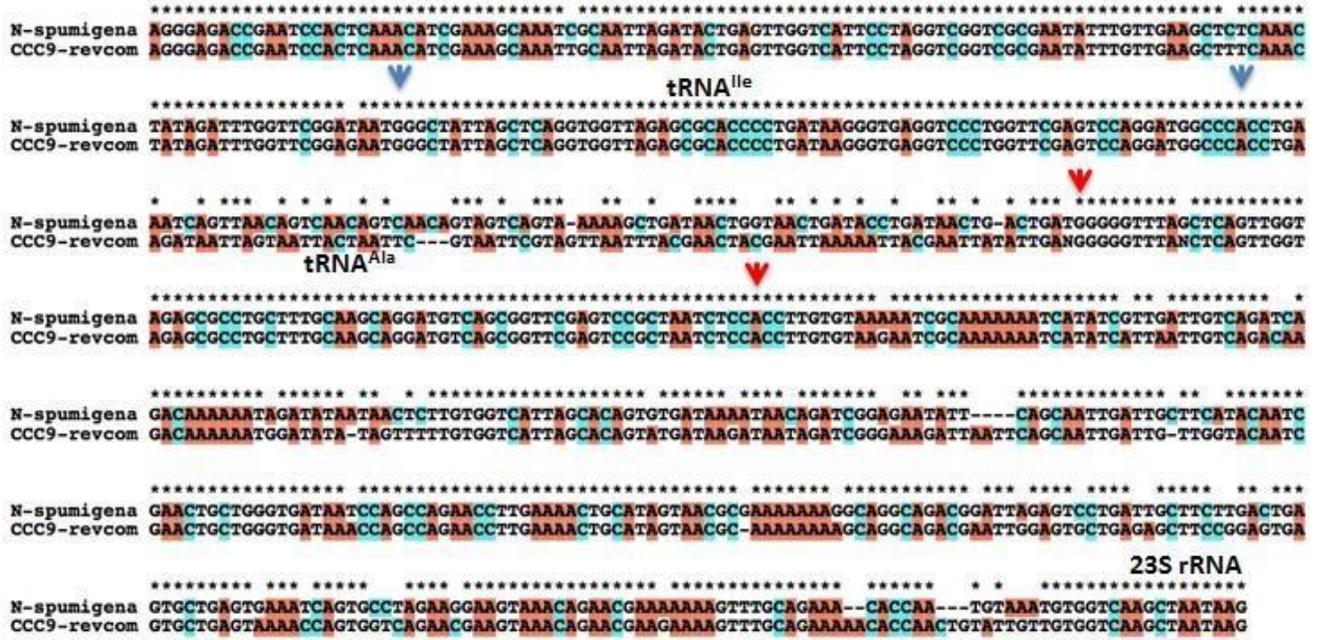
63. Shi LX, Hall M, Funk C, Schröder WP. (2012) Photosystem II, a growing complex: updates on newly discovered components and low molecular mass proteins. *Biochim Biophys Acta*; 1817(1):13-25.
64. Sivakumar V, Wang R, Hastings G. (2003) Photo-oxidation of P740, the primary electron donor in photosystem I from *Acaryochloris marina*. *Biophys J.*; 85(5):3162-72.
65. Sobczyk, A., Bely, A., Tandeau de Marsac, N., and Houmard, J. (1994). A phosphorylated DNA-binding protein is specific for the red-light signal during complementary chromatic adaptation in cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* 13, 875–885.
66. Swingley WD, Chen M, Cheung PC, Conrad AL, Dejesa LC, Hao J, Honchak BM, Karbach LE, Kurdoglu A, Lahiri S, Mastrian SD, Miyashita H, Page L, Ramakrishna P, Satoh S, Sattley WM, Shimada Y, Taylor HL, Tomo T, Tsuchiya T, Wang ZT, Raymond J, Mimuro M, Blankenship RE, Touchman JW (2008) Niche adaptation and genome expansion in the chlorophyll d-producing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 105(6):2005-10.
67. Tandeau de Marsac N, Houmard J (1988) Complementary chromatic adaptation: Physiological conditions and action spectra, *Methods in Enzymology*, 167: 318–328.
68. Tandeau de Marsac N. (1977) Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *J Bacteriol.*,130(1):82-91.
69. Theiss C, Schmitt FJ, Pieper J, Nganou C, Grehn M, Vitali M, Olliges R, Eichler HJ, Eckert HJ. (2011) Excitation energy transfer in intact cells and in the phycobiliprotein antennae of the chlorophyll d containing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *J Plant Physiol.*, 168(12):1473-87.
70. Tomo T, Kato Y, Suzuki T, Akimoto S, Okubo T, Noguchi T, Hasegawa K, Tsuchiya T, Tanaka K, Fukuya M, Dohmae N, Watanabe T, Mimuro M. (2008) Characterization of highly purified photosystem I complexes from the chlorophyll d-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina* MBIC 11017. *J Biol Chem.*; 283(26):18198-209.
71. Trampe E, Kühn M (2016) Chlorophyll f distribution and dynamics in cyanobacterial beachrock biofilms. *J Phycol.* 52(6):990-996.
72. Voß B, Bolhuis H, Fewer DP, Kopf M, Möke F, Haas F, El-Shehawy R, Hayes P, Bergman B, Sivonen K, Dittmann E, Scanlan DJ, Hagemann M, Stal LJ, Hess WR (2013) Insights into the physiology and ecology of the brackish-water-adapted Cyanobacterium *Nodularia spumigena* CCY9414 based on a genome-transcriptome analysis, *PLoS One.* 2013;8(3):e60224.
73. Watanabe M, Ikeuchi M. (2013) Phycobilisome: architecture of a light-harvesting supercomplex. *Photosynth Res.*, 116(2-3):265-76.
74. Willows RD, Li Y, Scheer H, Chen M (2013). Structure of chlorophyll f. *Org. Lett.* 15, 1588–1590.
75. Wittig I, Karas M, Schägger H. (2007) High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics.* 2007 Jul;6(7):1215-25.
76. Xu QZ, Han JX, Tang QY, Ding WL, Miao D, Zhou M, Scheer H, Zhao KH (2016) Far-red light photoacclimation: Chromophorylation of FR induced  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of allophycocyanin from *Chroococcidiopsis thermalis* sp. PCC7203. *Biochim Biophys Acta*, 1857(9):1607-16.

77. Zlenko DV, Krasilnikov PM, Stadnichuk IN (2016) Structural modeling of the phycobilisome core and its association with the photosystems. *Photosynth Res.* 130(1-3):347-356.

Anexos

Anexo A

ITS-with tRNAs, identities 87%, 606/697; Gaps 3%



ITS short, identities 88%, 333/378; Gaps 2%

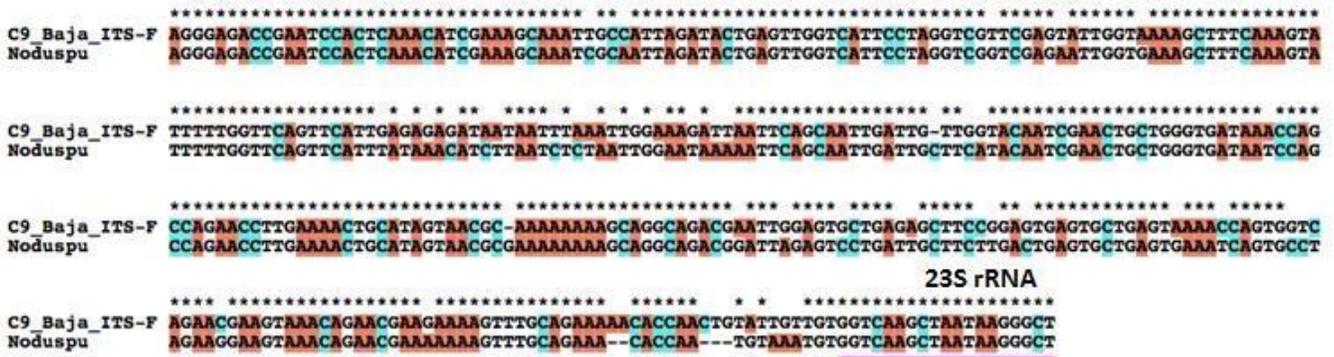


Fig. 44 Comparación de las secuencias de ITS con tRNAs y ITS cortos de CCM 9 y *N. spumigena* CCY9414. Las flechas azules son el inicio y final del tRNA de isoleucina. Las flechas rojas son el inicio y final del tRNA de alanina. La línea rosa representa el inicio del 23S rRNA.



## Anexo B

Genes encontrados *in silico* en el genoma de *Nodularia spumigena* CCY9414

### Ficobilisoma

Gene	PM Predicho Da	Proteína	pI Predicho	UniProt Access	Start	Stop
<i>apcF</i>	18785.38	phycobilisome core component	5.55	<b>A0ZHQ6</b>	1656475	1656984
<i>apcC</i>	7890.24	Phycobilisome 7.8 kDa linker	10.44	<b>A0ZF14</b>	2381348	2381554
<i>apcB</i>	17258.68	Allophycocyanin beta chain	5.45	<b>A0ZF13</b>	2381784	2382269
<i>apcA</i>	17396.75	Allophycocyanin alpha chain	4.92	<b>A0ZF12</b>	2382339	2382824
<i>apcE</i>	126951.51	linker core membrane	9.39	<b>A0ZF10</b>	2383363	2386773
<i>cpcB</i>	18481.88	Phycocyanin, beta subunit	5		2472624	2473145
<i>cpcA</i>	17456.55	Phycocyanin, alpha subunit	6.08		2473224	2473715
<i>cpcC</i>	32220.98	Phycobilisome linker polypeptide	9.25	<b>A0ZN82</b>	2473938	2474798
<i>cpcD</i>	8942.03	phycobilisome linker polypeptid	9.67	<b>A0ZN81</b>	2474836	2475078
<i>cpcF</i>	29812.29	phycocyanobilin lyase beta subunit	5.01		2475088	2475918
<i>cpcE</i>	17102.51	phycocyanobilin lyase subunit alpha	5.37	<b>A0ZN80</b>	2476000	2476596
<i>cpcG1</i>	32141.48	Phycobilisome rod-core linker protein	9.11	<b>A0ZKM3</b>	2476692	2477531
<i>cpcG2</i>	28846.73	Phycobilisome rod-core linker protein	8.82	<b>A0ZKM2</b>	2477812	2478555
<i>cpcG3</i>	29481.22	Phycobilisome rod-core linker protein	9.41	<b>A0ZKM1</b>	2478695	2479462
<i>peth</i>	50306.23	Ferredoxin--NADP reductase	7.15	<b>A0ZEU2</b>	3653066	3654406
<i>apcD</i>	17842.59	Allophycocyanin alpha-B subunit apoprotein	6.34	<b>A0ZB23</b>	5303874	5304359

### Nitrogenasa

Gene	PM Predicho Da	Proteína	PI Predicho	Uniprot Acces	Start	Stop
<i>nifH</i>	32,544	Nitrogenase (molybdenum-iron) reductase and maturation protein NifH		<b>A0ZCU4</b>	3,512,043	3,512,939
<i>nifB</i>	53,397	Nitrogenase FeMo-cofactor synthesis FeS core scaffold and assembly protein NifB		<b>W6FUU7</b>	4,100,423	4,101,865
<i>nifS</i>	43,996	Cysteine desulfurase, NifS subfamily		<b>A0ZAW7</b>	4,102,464	4,103,666
<i>nifU</i>	31,838	Iron-sulfur cluster assembly scaffold protein NifU		<b>W6FWN7</b>	4,103,769	4,104,665
<i>nifH</i>	15,515	Nitrogenase (molybdenum-iron) reductase and maturation protein NifH		<b>A0ZAW4</b>	4,105,517	4,105,954
<i>nifH</i>	15,790	Nitrogenase (molybdenum-iron) reductase and maturation protein NifH		<b>W6FTP0</b>	4,111,146	4,111,571
<i>nifD</i>	57,378	Nitrogenase (molybdenum-iron) alpha chain	5.33	<b>A0ZAV4</b>	4,111,707	4,113,149
<i>nifK</i>	54,151	Nitrogenase (molybdenum-iron) beta chain	7.61	<b>A0ZAV9</b>	4,117,745	4,119,280
<i>nifE</i>	50,286	Nitrogenase FeMo-cofactor scaffold and assembly protein NifE	6.69	<b>A0ZAV2</b>	4,119,982	4,121,361
<i>nifN</i>	48,110	Nitrogenase FeMo-cofactor scaffold and assembly protein NifN	5	<b>A0ZAV1</b>	4,121,493	4,122,821
<i>nifX</i>	14,434	Nitrogenase FeMo-cofactor carrier protein NifX	5.25	<b>A0ZAV0</b>	4,122,931	4,123,320
	17,598	NifX-associated protein		<b>A0ZAU9</b>	4,123,341	4,123,817
<i>nifW</i>	12,243	Nitrogenase stabilizing/protective protein NifW	4.98	<b>A0ZAU7</b>	4,124,412	4,124,729
<i>hesA</i>	29,292	Protein hesA, heterocyst		<b>A0ZAU6</b>	4,124,740	4,125,540

<i>hesB</i>	13,495	putative iron binding protein from the HesB_IscA_SufA family		<b>A0ZFB7</b>	4,125,640	4,126,011
		Ni,Fe-hydrogenase maturation factor			4,132,456	4,132,923
<i>nifV</i>	43,409	Homocitrate synthase		<b>W6FV96</b>		
<i>nifU</i>	33,448	NifU protein, putative	4.92	<b>A0ZAW6</b>	4,145,790	4,146,623
<i>nifO</i>	19,511	Nitrogenase-associated protein NifO		<b>W6FTW0</b>	4,161,633	4,162,151
<b>Hidrogenasa de rescate</b>						
<i>Gene</i>	PM Predicho Da	Proteina	PI Predicho	Uniprot Acces	Start	Stop
		hupL element site-specific recombinase			4,109,578	4,111,005
<i>hupL</i>		Uptake hydrogenase large subunit*			4,133,375	4,134,463
	56800	hupL element site-specific recombinase	8.9	<b>A0ZAT4</b>	4,134,592	4,136,058
<i>hupL</i>	21749.99	Uptake hydrogenase large subunit*	7.64		4,141,935	4,142,519
<i>hupS</i>	21940.32	Uptake hydrogenase small subunit precursor	8.69	<b>B0YIT6</b>	4,142,724	4,143,323
<i>hupL</i>		Uptake hydrogenase small subunit precursor			4,142,724	4,143,323
<i>hypF</i>	86779	[NiFe] hydrogenase metallocenter assembly protein HypF	6.02	<b>A0ZAS0</b>	4,147,912	4,150,254
<i>hypC</i>	9427	[NiFe] hydrogenase metallocenter assembly protein HypC	5.18	<b>A0ZAR9</b>	4,150,308	4,150,568
<i>hypD</i>	41845	[NiFe] hydrogenase metallocenter assembly protein HypD	6.32	<b>A0ZAR8</b>	4,150,634	4,151,773
<i>hypE</i>	38676	[NiFe] hydrogenase metallocenter assembly protein HypE	5.09	<b>A0ZAR6</b>	4,152,124	4,153,221
<i>hypA</i>	11752	[NiFe] hydrogenase nickel incorporation protein HypA	4.95	<b>A0ZAR5</b>	4,153,392	4,153,721
<i>hypB</i>	30950	[NiFe] hydrogenase nickel incorporation-associated protein HypB	5.43	<b>A0ZAR4</b>	4,153,724	4,154,575
<b>Hidrogenasa</b>						
<i>Gene</i>	PM Predicho Da	Proteina	PI Predicho	Uniprot Acces	Start	Stop
<i>hoxE</i>	19,539	NAD-reducing hydrogenase subunit HoxE		<b>A0ZDY2</b>	2,858,335	2,858,874
<i>hoxF</i>	57,279	NAD-reducing hydrogenase subunit HoxF		<b>A0ZDY1</b>	2,858,861	2,860,462
<i>hoxU</i>	26,455	NAD-reducing hydrogenase subunit HoxU		<b>A0ZDY0</b>	2,860,528	2,861,244
<i>hoxY</i>	17,987	NAD-reducing hydrogenase subunit HoxY		<b>W6G310</b>	2,861,520	2,862,011
<i>hoxH</i>	53,799	NAD-reducing hydrogenase subunit HoxH		<b>A0ZDX8</b>	2,862,178	2,863,629
<b>Heterocistos</b>						
<i>Gene</i>	PM Predicho Da	Proteina	PI Predicho	Uniprot Acces	Start	Stop
<i>ntcA</i>		Global nitrogen regulatory protein, CRP family of transcriptional regulators		A0ZMA8	253,595	254,266
<i>hetP</i>		Heterocyst differentiation protein HetP			782052	782417
		heterocyst differentiation involved protein			1278342	1279013
<i>hglE</i>		beta-ketoacyl synthase (heterocyst glycolipid synthase)		A0ZCD9	1,406,220	1,413,212
<i>hlyD</i>		heterocyst specific ABC-transporter, membrane fusion protein DevB-like protein		A0ZCE3	1415700	1,416,893
<i>devA</i>		heterocyst specific ABC-transporter, membrane fusion		A0ZLE8	1506106	1,507,317

<i>devC</i>	DevC protein		1639078	1640253
<i>devB</i>	Secretion protein HlyD (heterocyst specific ABC-transporter, membrane fusion protein DevB-like protein)	A0ZHP3	1640304	1641509
<i>hetR</i>	Main regulator of heterocyst differentiation HetR		1713373	1714215
<i>pfaA</i>	Protein FraG required for filament integrity and heterocyst maturation		1715127	1717688
<i>devC</i>	DevC protein		2,000,405	2,000,647
<i>devA</i>	Heterocyst specific ABC transporter ATP-binding protein		2000813	2001274
<i>fraH</i>	putative heterocyst to vegetative cell connection protein (fraH)		2121874	2122791
<i>hetF</i>	heterocyst differentiation protein	A0ZHG2	2208221	2210758
<i>patA</i>	Protein PatA	A0ZM33	2468161	2469237
<i>devB</i>	heterocyst specific ABC-transporter, membrane fusion protein DevB-like protein		2686162	2687328
<i>devC</i>	ABC transporter permease protein	A0Z9R0	2,687,450	2,688,646
<i>devA</i>	Methionine ABC transporter ATP-binding protein	A0ZIF6	3,321,043	3,321,756
<i>devC</i>	heterocyst specific ABC-transporter, membrane spanning subunit	A0ZIF7	3,322,051	3,323,241
<i>devB</i>	Secretion protein HlyD (heterocyst specific ABC-transporter, membrane fusion protein DevB-like protein)	A0ZIF8	3323329	3324768
<i>devT</i>	putative transcription factor for heterocyst differentiation DevT		3567211	3568212
<i>hetP</i>	Heterocyst differentiation protein HetP		3736212	3736484
<i>patU</i>	Protein PatU		4042201	4043181
<i>hesA</i>	Protein hesA, heterocyst		4124740	4125540
<i>hglE</i>	heterocyst glycolipid synthase	A0ZFX6	4,676,391	4,681,484
<i>hlyD</i>	Secretion protein HlyD (heterocyst specific ABC-transporter, membrane fusion protein DevB-like protein)	A0ZFX3	4,685,165	4,686,373
<i>devB</i>	heterocyst specific ABC-transporter, membrane fusion protein DevB-like protein	A0ZCM2	4705384	4706673
<i>devC</i>	DevC protein	A0Z9Q9	4,707,655	4,708,821
<i>devA</i>	Methionine ABC transporter ATP-binding protein		4,708,856	4,709,605

**Anexo C**  
M1

tr|A0ZF10|Phycobilisome core-membrane linker polypeptide (Nodularia spumigena CCY9414)

1	MSIKASGGSS	VARPQLYQTL	PVATISQAEQ	QDRFLGNGEL	SELASYFASG
51	AKRLEIAQML	TDNSEIIVSR	AANRIFVGGG	PMAFLEKPQE	RELAMAGAVG
101	ASEASVAEGM	KLGTVTYVES	RGGFLENLRS	IFNSSPSGPI	PPGFRPINVA
151	RYGPSNMAKS	LRDLSWFLRY	<b>ATYAIVAGDP</b>	<b>NIISVNTRGL</b>	REIIENACST
201	EATVVALQEI	KAASLSYFRK	DTVATEIVSQ	YMDVLLNEFK	APTPSNKVRQ
251	RPSGDQQGLQ	LPQIYSVAEE	RRPKFAMKPG	LSASEKIEVV	KAAYRQLFER
301	DITRAYLSLI	SDLESKVKNG	DISMKEFVRR	LAKSPLYQKQ	FYQPFINSRV
351	IELAFRHILG	RGSSSREEVQ	KYFAIISNGG	LPALVDALVD	SDEYGDYFGE
401	ETVPYLRGLG	QEAQEERNWG	PQQDLFKFSA	PFRKVPQFIT	TFAAYDRPLP
451	DQHPYGSND	PLEIQFGAIF	PKETRNPSSS	PAPFGKDTRR	<b>ILIHQGPGIN</b>
501	<b>NQLSNPQARG</b>	EFPGSLGPKV	FRLDQVPSTL	SRKGGKGVSV	KFSESSTQAV
551	<b>IRAIYLQVFG</b>	<b>RDVYEQRLK</b>	VAEIKLENGE	ITVREFVRIL	AKSDLFRKMY
601	WTSLYVCKAI	EYIHRRLGR	PTYGRQENNK	YFDIASKKGF	<b>YAVVDAILDT</b>
651	<b>PEYSEAFGED</b>	<b>TVPYERYLTP</b>	AGVSLRQLRV	GSIREDVGTG	KVEKVETPRF
701	VELGTVTENR	TEPDIQFRIN	QGVTKQREQT	KVFKLVANTS	DKVAVHTLIS
751	AAYRQIFERD	VAPYIIKNEF	SALESKLGNG	EISVKEFIAG	<b>LGYSNLYLKE</b>
801	FYTPYPNTKV	IEMGTKHFLG	<b>RAPIDQAEIR</b>	KYNQILATQG	IRAFINAMVE
851	SVEYSQAFGE	DTVPYRRFPT	LPAANFPNTQ	<b>KLYNQLTKQN</b>	KDLVVPSFET
901	VKPRMNSANM	PILAKAIADL	AAQARQMDKT	<b>KPLFIELGRS</b>	FNDGRGQSVE
951	VGVGTSRRKP	ARIHRMTLGA	NQAEKQLVIN	<b>AAYCQVLDIF</b>	<b>SGQVPQDFRR</b>
1001	SNLDSKLRNG	EISVREFVRE	LASSEIYRKR	FYTPYPNTKV	IEFLFRHILG
1051	<b>RAPATQGEIR</b>	QYNKLLADSG	LRAAVEAIVD	SQEYARFFGE	DVVYPYRYP
1101	<b>LPAGNYLGSV</b>	<b>QAAADLVKQS</b>	WSSLSPAVLT	GRPSDR	

M2

tr|K9WWI1| Phage tail sheath protein FI OS=Cylindrospermum stagnale PCC 7417 GN=Cylst\_1915 PE=4 SV=1

MPRLDYFAPGVYVEEVD RGSRP IEGVSTNIAGFIGFTEDVRGDAE I FKPMLVTSWNEYLEYFAKQGS DGYTDFDAYLPFAVNG  
WFLNGGGRCWVASIGTKLPGTALPPAEETALKIRTTGNRPSLQFALKPAEDEDANDQAAAAGRINIS I IESEPLPPGSPEAEP  
PLNTGEFFKVIIVSRDGEVLEQYDHLNPEVEAQVGTIYAVTALQD SPFLNVADLGTGQPLSRRPANGMYEVT PPPVSTPDR  
FPRDVQGVRRDRTGLQGI FEI DEITMLSFPDLMRAYQSG I LNLDQVHGIMEALVSMCEGNAPGRMVALDPPPCKGGGAPVPPS  
QMKPQHVAQWLSAFNRR **SQFAALYWPWIK** VPNPRNGGRP IMVPPSGHMLGVWCRTDETRGVYKAPANDT PRGVI GLAYETNLR  
EQELLNPLGINCIRTFPNRGIRIWGARTLVEPDNVQWR YISVRR LMSYIEK **SVELGTQWVWFEPNDQDLWAR** VTRTVTSTFLER  
LWREGALFGGTAAEFYVKCDASINTHETMMLGRLYIEVGVCVPRPAEFVIFRFSQWSPNQ

M3

tr|A0ZN82| Phycobilisome rod linker polypeptide, phycocyanin-associated OS=Nodularia spumigena CCY9414  
GN=N9414\_13280 PE=4 SV=1

MAITTAASRLGTEPFS DARRVELRPNASKDEAEV VIR AAYRQILGNDYLMASER **LVS AESLLR** DGNLSVREFVRSIAKSELYK  
**NKFFYNSFQTR** LIELNYKHLGR **APYDEAEVVYHLDLYQNKGYDAEIDS YIDSPEYQNNFGDNIVPYR** GFDNQPGQKTVGFT  
RMFRLYRGYANS DRTQVEGTSRLAQDLASNK **SSSIVGPSGSDNWN YR** ASSDVAPKKNLGNVGVGDRVYRIEVT AIRGSGY  
PSIR **SSSTAFIVPYER** LSDKIQQIHKQGGKIVSITSA

M4

tr|A0ZKM3| Phycobilisome linker polypeptide OS=Nodularia spumigena CCY9414 GN=N9414\_13260 PE=4 SV=1

MSIPLLNSYTTQNQRVEGYEVPNEDTPTMYRLAAATSDDTDIDAI IWAAYRQIFSEHLIIASNRQK FLESQLRNRRAINVRDFI  
RGLGKSEVYRTQVADINTNYRLVDITLKRFGVGRAYNKDEEIAWSIVIGTKGLHGFIDTLLDSEEYLQNFGDDIVPFQRRRYK  
DRPFNLVNPRYGSYWRDRMMLESIGGRSFYNARTTGVASKEEIRRIIPANFMSMAGEILAPEFNYQRTIATVTSQIKDIKIPD  
NSREIGTPQPTMKPVAVALPYRYIPANPTN

### M5

tr|A0ZKM1| Phycobilisome rod-core linker polypeptide, phycocyanin-associated OS=Nodularia spumigena CCY9414  
GN=N9414\_13250 PE=4 SV=1

MSLPLLKYKPSQNHVASFVADLNEDTPYIYRIEDVSSYTDIQNIWASRYRQIFSEHEILKFNQRQKTLSQLKTGSLSVRD  
FIRGLAKSETYYRLVSSNNNYRLVDITLKRVLGRASYNKDEQIAWSIVIGTKGFGGFVDALVDSEEYTONFGDNIVPYQRKR  
MEGRPHNLVTPRYGQDFREKVGTVETDWRFTLEKFYTRKFQEKRLPEGDPRKYADMAASVGGKGNYAQKLSAFDIDYLSAVPY  
RGGSR

### M6

tr|A0ZKM2| Phycobilisome rod-core linker polypeptide, phycocyanin-associated OS=Nodularia spumigena CCY9414  
GN=N9414\_13255 PE=4 SV=1

MTIPLLEYKPSQNHVAGVEVPNEDTPRIYRIEDCAFDSVQELIWAAYRQIFSEHEILKFYRQTNLESQIKNRAITVRDFI  
RGLAKSETFRNLVVQTNNSNYRLVDIALKRILGRASYNKDEEIAWSIKIATLGWNGFVDALINSQEQSNFGDNIVPYQRRRYK  
DRPFNLVTPRYGNYWRDKLEDARYKAGDIKNFMELANSIEIKMLKFTPVNLSAVEIPDMTRDINPQGIPVSSINSSANFPVR

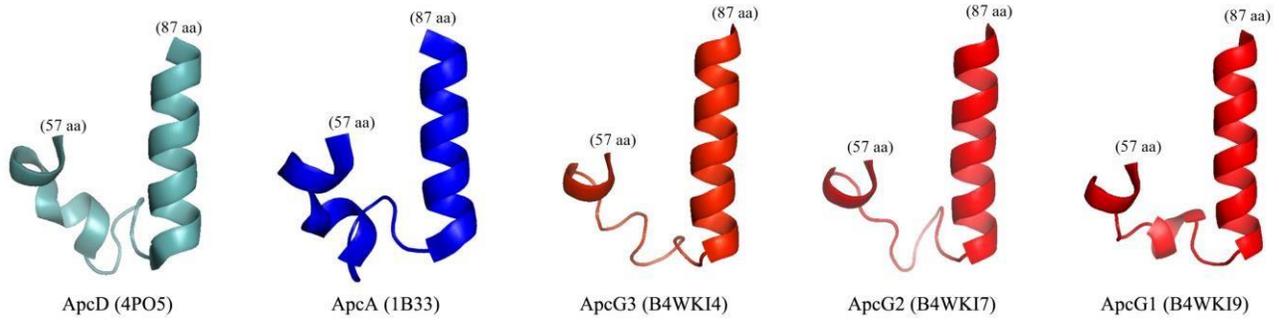
### M7

tr|A0ZN81| CpcD phycobilisome linker-like protein OS=Nodularia spumigena CCY9414 GN=N9414\_13275 PE=4  
SV=1

MFGQTTLGAGSVSSSASRIFRYEVVGLRQNAETDKNQFDIRSGSVFITVPYSRMNEEMQRINRLGGRIINISPLSADEN

## Anexo D

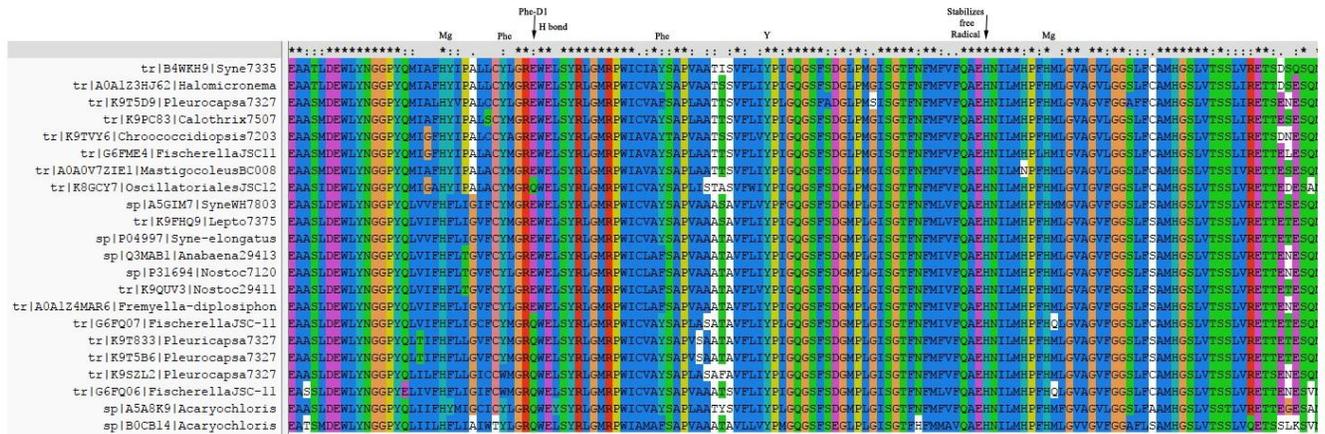
### A



### B



**Fig. 47 A.** Estructuras de aminoácidos (de 57 a 87) a ApcA (1B33), ApcD (4PO5) y estructura predicha por modelado de Swiss-Model ExPASy a ApcG3 (B4WKI4), ApcG2 (B4WKI7) y ApcG1 (B4WKI9) con alineación de plantilla PDB = 4PO5. **B.** Estructuras de ficocianobilina dentro de ApcE por PDB = 4XXI y ApcD por PDB = 4PO5 (Tang 2005, Peng et al 2014).

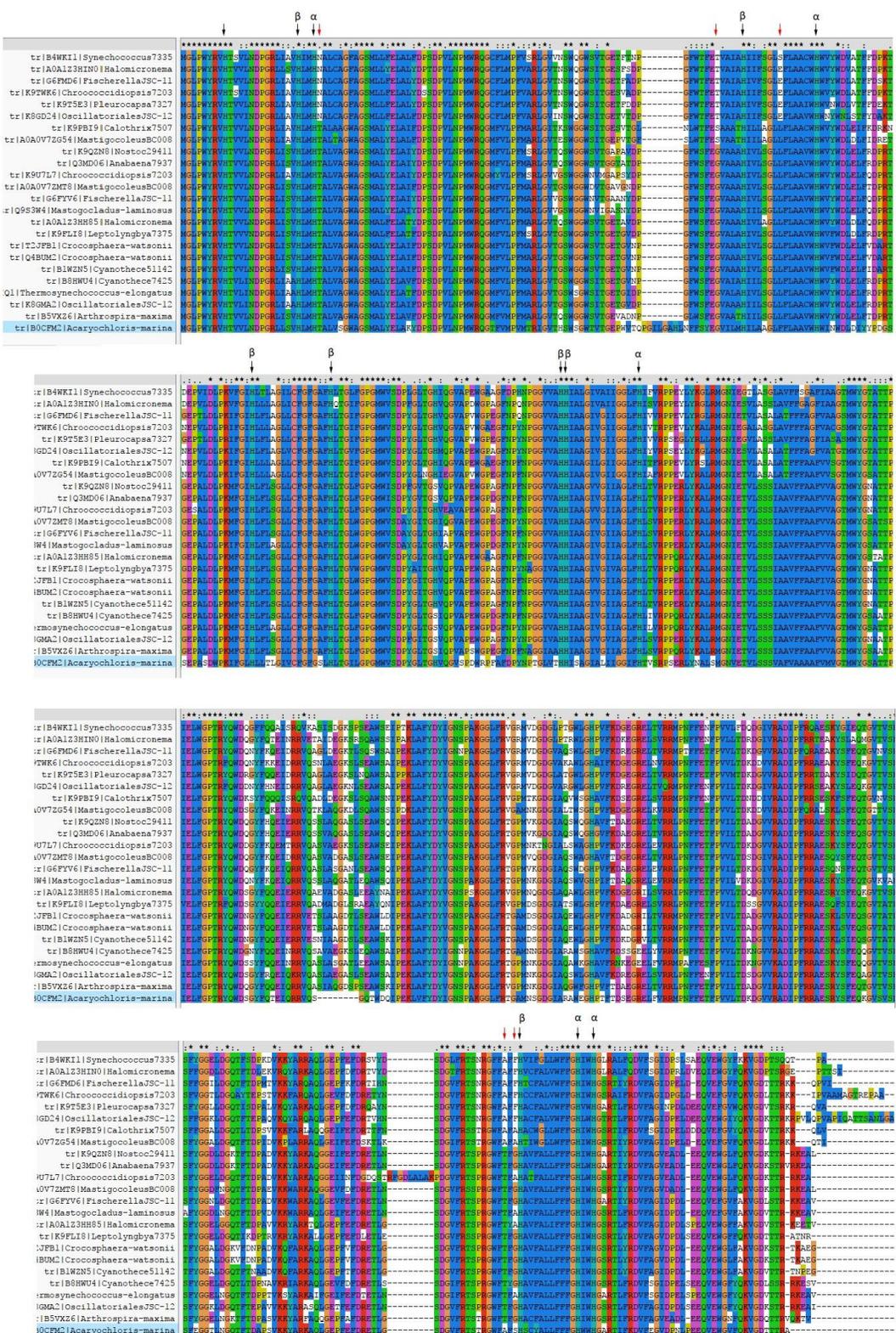


**Fig. 48** Análisis *in silico* de la proteína PsbA (Subunidad D1 del FSII) que muestra los sitios de unión a los componentes del centro de reacción. Los aminoácidos mostrados van desde el aa 61 hasta el 196.

	P680	P680	Phe	Phe <sup>o</sup>
	*:*:*.*.***	* **	*:*:*	* **
sp B1WQ89 Cyanothece51142	FILFLOGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FILFLOGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FILFLOGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FILFLOGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED
tr T2IKV8 Crocosphaera	FILFLOGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FILFLOGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FILFLOGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FILFLOGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED
sp P20898 Syne7002	FILFLOGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FILFLOGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FILFLOGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FILFLOGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED
tr K9SZH6 Pleurocapsa7327	FILFVQGFHNFTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFQD	FILFVQGFHNFTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFQD	FILFVQGFHNFTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFQD	FILFVQGFHNFTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFQD
tr K8GLN4 OscillatorialesJSC-12	FILFVQGFHNFTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FILFVQGFHNFTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FILFVQGFHNFTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FILFVQGFHNFTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED
tr B4WNY9 Synechococcus7335	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFQD	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFQD	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFQD	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFQD
tr K9F3V1 Leptolyngbya7375	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED
tr A0A1V8NDW1 Halomicronema	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFKD	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFKD	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFKD	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFKD
tr A0A0V7ZWI5 MastigocoleusBC008	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED
tr A0A0V7ZJR7 MastigocoleusBC008	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED
tr G6FXW1 FischerellaJSC-11	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED
tr K9QMT7 Nostoc29411K9QMT7_NOSS7	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED
sp Q3MA59 Anabaena7937	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFLQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED
tr B8HP68 Cyanothece29141	FILFVQGFHNFTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FILFVQGFHNFTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FILFVQGFHNFTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FILFVQGFHNFTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED
tr K8GE66 OscillatorialesJSC-12	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFEE	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFEE	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFEE	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFEE
tr A0A0V7ZIP6 Mastigocoleus	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFKD	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFKD	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFKD	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFKD
tr G6FMD8 FischerellaJSC-11	FLLFFQAFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFRD	FLLFFQAFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFRD	FLLFFQAFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFRD	FLLFFQAFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFRD
tr K9TX47 Chroococciopsis7203	FLLFFQAFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFRD	FLLFFQAFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFRD	FLLFFQAFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFRD	FLLFFQAFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFRD
tr B4WKI3 Syne7335	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVQNTLFRD	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVQNTLFRD	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVQNTLFRD	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVQNTLFRD
tr A0A1Z3HIJ9 Halomicronema	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVQNTLFRD	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVQNTLFRD	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVQNTLFRD	FLLFFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVQNTLFRD
tr K9T2W2 Pleurocapsa7327	FVLFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVQNTIFED	FVLFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVQNTIFED	FVLFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVQNTIFED	FVLFQGFHNWTLNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVQNTIFED
sp B0C3P0 Acaryochloris	FLLFVQGFHNLTNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFVQGFHNLTNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFVQGFHNLTNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED	FLLFVQGFHNLTNPFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVENTLFED

**Fig. 49** Análisis in silico de la proteína PsbD2 (Subunidad D2 del FSII) que muestra los sitios de unión a los componentes del centro de reacción. Los aminoácidos mostrados van desde el aa 181 hasta el 205.





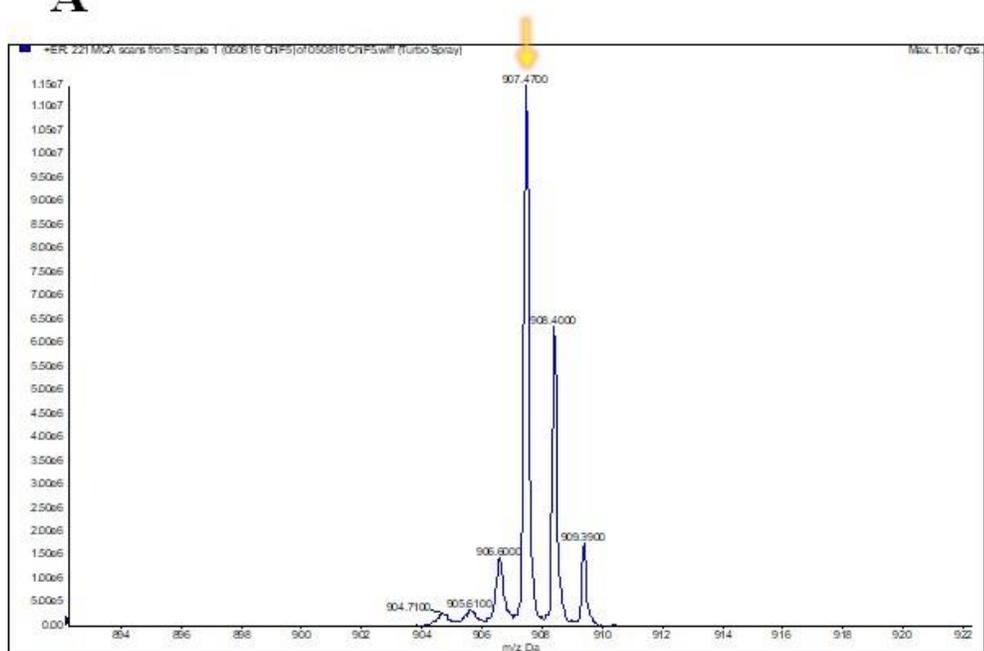
**Fig. 51** Análisis in silico de la proteína PsbB2 (Cp47). Las flechas negras muestran los sitios de unión con las clorofilas así como su configuración. Las flechas rojas muestran los cambios en los aminoácidos únicamente en las cepas con fotoaclimatación al infrarrojo cercano.



**Fig. 52** Análisis in silico de la proteína PsbC2 (Cp43). Las flechas negras muestran los sitios de unión de las clorofilas y la configuración que posee el ligando.

# Anexo E

## A



## B

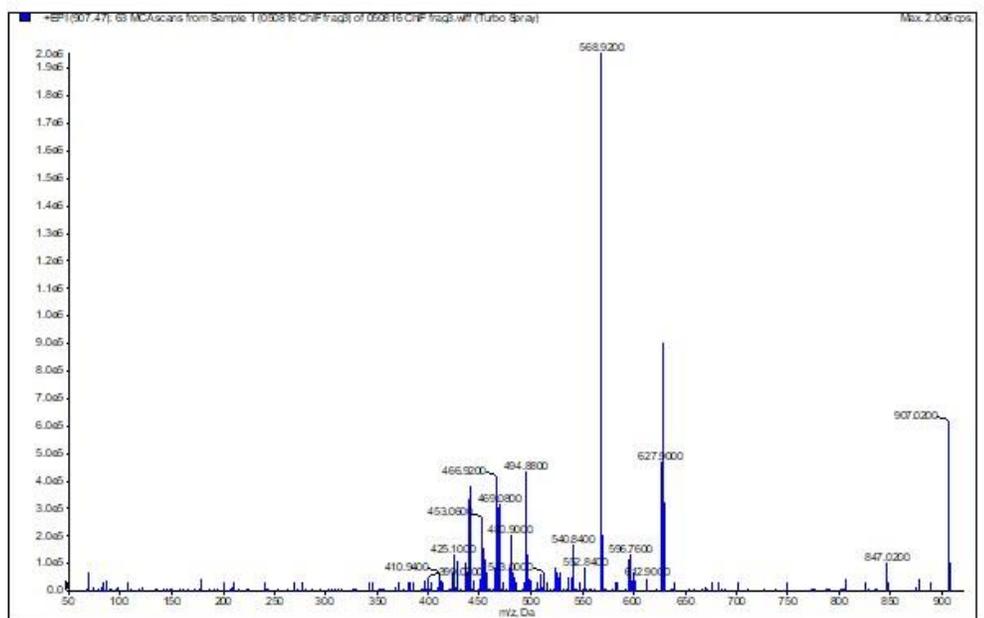


Fig. 53 Espectro obtenido del análisis de masas de las clorofilas *f* (A) y *d* (B).