



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Evolución de la red fotorreguladora en la bacteria *Myxococcus xanthus* y plasticidad en el modo de acción molecular de los fotorreceptores dependientes de la vitamina B<sub>12</sub>

**D. Ricardo Pérez Castaño**

2021





**D<sup>a</sup>. Montserrat Elías Aranz**, Catedrática de Universidad del Área de Genética, en el Departamento de Genética y Microbiología, y **D<sup>a</sup>. Marta Fontes Bastos**, Profesora Titular de Universidad, **AUTORIZAN:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Evolución de la red fotorreguladora en la bacteria *Myxococcus xanthus* y plasticidad en el modo de acción molecular de los fotorreceptores dependientes de la vitamina B<sub>12</sub>", realizada por D. Ricardo Pérez Castaño, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que se presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 18 de octubre de 2021

Montserrat Elías Aranz

Marta Fontes Bastos



*“I always question myself in the best of times, even when I was world number one for months, at certain times during the year I said, what can I improve? What do I need to change? Because if you don’t do anything or you just do the same thing over and over again, you stay the same. And staying the same means going backwards.”*

*Roger Federer*



***A Ricardo y Antonia,  
mis padres.***





# Agradecimientos

El camino para finalizar esta tesis ha sido largo y, al mirar atrás, no paro de ver personas que me han ayudado a recorrerlo. A todas ellas me gustaría dedicar mis agradecimientos. En primer lugar, a Montse y Marta, mis directoras de tesis. Gracias, porque casi sin conocerme, confiasteis en mí y me ofrecisteis la oportunidad de realizar esta tesis. Gracias a vuestra paciencia, rigor científico y ganas de enseñar e investigar, esta tesis ha salido adelante. Y por supuesto, muchas gracias Padhu, sin tus consejos, tus conversaciones llenas de conocimiento, tu perseverancia y, sobre todo, tu gran sentido del humor, nada hubiera sido lo mismo. Gracias a ti también Carmen, no solo por los helados que animaban las duras tardes de verano, sino también por ser tan buena compañera y ayudarme, tanto en las prácticas como en el laboratorio. Gracias Marisa por tu alegría y optimismo. Gracias Yogui por tu amabilidad a la hora de resolver las cuestiones que he tenido. Gracias Jose Antonio por tu disposición a ayudar siempre y, por tus lecciones de baile. Gracias también a Martin Warren y a Evelyne Deery, por acogerme en vuestro grupo de investigación incluso cuando la pandemia causada por el dichoso SARS-CoV-2 estaba en su punto más álgido.

Por supuesto, muchas gracias a mis compañeros de laboratorio. Todos habéis hecho que este camino sea súper ameno. Desde el primer momento el ambiente de trabajo ha sido inmejorable, haciendo que den ganas de trabajar cada día con vosotros. Diego, muchas gracias por todos tus consejos, eres un gran científico, pero, sobre todo, una de las mejores personas que he conocido. Gracias a Elena y Antonio (lo siento, sois inseparables), los momentos en el laboratorio y en las comidas con vosotros son tan buenos como imborrables. A Jesús y Aranza, por guiarme en mis comienzos en el laboratorio y enseñarme casi todas las técnicas que sé. Gracias Eva por tu gran compañerismo. Gracias a Alfonso e Irene (lo siento, también sois inseparables), aunque vinisteis más tarde, parece que estuvisteis en el laboratorio desde el primer día. También gracias a Lucia y Jesús Marín, por aguantarme como “profesor”.

No se me puede olvidar agradecer a todo el Ala B, ha tenido que ser difícil que os apagara la luz cada dos por tres, aun así, lo aceptabais, e incluso bromeabais conmigo. Gracias a Sergio, Jose, Carlos Lax y Pablo, por las conversaciones sobre deporte, entre otras cosas. A Thairi y Albert por acogerme en vuestro laboratorio de vez cuando. A Maribel y Carlos, no podríais formar mejor pareja. A Joseto, por saberlo todo cuando le preguntaba. A Sebi, Victor y Curro, gracias por vuestra amabilidad y consejos. Gracias también a los compañeros de otros Departamentos, por haber compartido

comidas, charlas y risas. Gracias Pepe, por organizar comidas de campo y por tu bondad. Gracias Dani por esas tartas tan ricas. Gracias PJ, por tu positividad, alegría, buen sentido del humor y, por supuesto, por presentarme a Consu.

Muchas gracias a todos los profesores que me han marcado, que son demasiados para nombrar aquí. Durante el grado y el máster me habéis guiado para que llegue a donde estoy. Gracias a todos y también a Maite y Fina, sin vuestras inspiradoras clases de biología en el I.E.S. Los Albares estoy seguro de que no hubiera tenido tan claro mi futuro. Me despertasteis el instinto de intentar saber cada día más.

Aunque nunca os lo he dicho, este camino no se hubiera andado si durante los cuatro años de Grado no os hubiera conocido. Muchas gracias, Paco, Jesús y David. Muchas gracias por haberme motivado a estudiar tanto durante el grado. Gracias por las vivencias que hemos tenido, que han sido increíbles, y por las que nos queda por vivir. Sois grandes científicos y amigos. Os espera un futuro brillante, estoy segurísimo de ello. Aquí estaré para verlo, animaros y ayudaros.

A mis amigos de Cieza, Miguel, Byby, Dani, Fran, Mario, Manu, Bernardo. Se que hay más y me lo vais a echar en cara en alguna fiesta... Gracias por hacer volar el tiempo. Podéis contar conmigo para lo que necesitéis.

A la suerte de mi vida. Muchas gracias Consu por tu cariño y ayuda. Eres una fuente de alegría y motivación. Y, por supuesto a Bunny y Darwin, los mejores gatitos del mundo. También gracias a mi familia política, Bea, Antonio y Carmen, por hacerme sentir uno más de vosotros.

Por último, muchas gracias a mi familia. Me habéis dado todo lo que tenéis, ADN incluido, pero también me habéis enseñado a ser como soy y me habéis apoyado en todo. Carmen, no podría haber tenido una hermana más generosa que tú. Me has dado de todo y no has pedido nada a cambio. A mi cuñado Roni, por ser fuente de cachondeo y buen humor. A Carmela y Clara, espero ser un buen tate y estar siempre a vuestro lado para ayudaros en lo que necesitéis. A mis padres, Ricardo y Toñi, ojalá llegar a ser algún día la mitad de buena persona que vosotros. Os quiero y estoy muy orgulloso de teneros como padres.

Trabajo realizado por el graduado Ricardo Pérez Castaño en el Área de Genética del Departamento de Genética y Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia, bajo la dirección y supervisión de D.<sup>a</sup> Montserrat Elías Aranz y D.<sup>a</sup> Marta Fontes Bastos, para optar al grado de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología con Mención de Doctorado Internacional.

Ricardo Pérez Castaño ha realizado la Tesis Doctoral financiado por una ayuda para contratos predoctorales para la formación de doctores, contemplada en el Subprograma Estatal de Formación del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad de la AEI (BES-2016-076883), y opta a la Mención de Doctorado Internacional gracias a la estancia realizada en la Universidad de Kent en Reino Unido durante 3 meses, financiada con la misma ayuda.



La presente Tesis Doctoral, de acuerdo con el informe correspondiente, autorizado por las Directoras de Tesis y la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología, se presenta como un compendio de tres trabajos previamente publicados o aceptados para su publicación. Las referencias completas de los trabajos que constituyen el compendio de la tesis son las siguientes:

- I. Fernández-Zapata, J.\*, Pérez-Castaño, R.\*, Aranda, J., Colizzi, F., Polanco, M. C., Orozco, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2018). Plasticity in oligomerization, operator architecture and DNA binding in the mode of action of a B<sub>12</sub>-based CarH photoreceptor. *Journal of Biological Chemistry*, 293(46), 17888–17905. \*Co-primeros autores.
- II. Padmanabhan, S., Pérez-Castaño, R., & Elías-Arnanz, M. (2019). B<sub>12</sub>-based photoreceptors: From structure and function to applications in optogenetics and synthetic biology. *Current Opinion in Structural Biology*, 57, 47–55.
- III. Padmanabhan, S., Pérez-Castaño, R., Osete-Alcaráz, L., Polanco, M. C., & Elías-Arnanz, M. (2022\*). Vitamin B<sub>12</sub> photoreceptors. *Vitamins and Hormones*, 119. \*Aceptado para su publicación.

Así mismo, se considera oportuno incluir como Anexos I y II de la presente Tesis Doctoral los siguientes artículos, que han constituido parte de la base formativa del doctorando y en los cuales figura como primer autor o coautor.

- IV. Pérez-Castaño, R., Bastida-Martínez, E., Fernández-Zapata, J., Polanco, M. C., Galbis-Martínez M.L., Iniesta A.A., Fontes, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2021). Evolution of B<sub>12</sub>-dependent and independent photoregulation of carotenogenesis in Myxococcales. Pendiente de ser enviado.
- V. Gallego-García, A.\*, Monera-Girona, A.J.\*, Pajares-Martínez, E.\*, Bastida-Martínez, E., Pérez-Castaño, R., Iniesta, A.A., Fontes, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. A bacterial light response reveals an orphan desaturase for human plasmalogen synthesis (2019). *Science*. 366, 128–132. \*Co-primeros autores.

El doctorando también ha participado en la siguiente publicación que no se ha incluido en la presente Tesis Doctoral ni como anexo ni como parte del compendio:

Padmanabhan, S., Monera-Girona, A. J., Pérez-Castaño, R., Bastida-Martínez, E., Pajares-Martínez, E., Bernal-Bernal, D., Galbis-Martínez, M. L., Polanco, M. C., Iniesta, A. A., Fontes, M., & Elías-Arnanz, M. (2021). Light-triggered carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: New paradigms in photosensory signaling, transduction and gene regulation. *Microorganisms*, 9(5), 1067.

# ÍNDICE





## Índice de contenidos

Summary .....	1
Resumen .....	3
Listado de abreviaturas.....	5
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
I.1 La luz y los fotorreceptores .....	9
I.2 <i>Myxococcus xanthus</i> y su respuesta a la luz .....	12
I.2.1 Características generales de las mixobacterias .....	12
I.2.2 Respuesta a la luz de <i>M. xanthus</i> .....	15
I.2.2.1 Carotenoides y la respuesta a la luz.....	15
I.2.2.2 Análisis genético de la respuesta a la luz de <i>M. xanthus</i> .....	17
I.3 Mecanismo de respuesta a la luz dependiente de B <sub>12</sub> .....	18
I.3.1 Vitamina B <sub>12</sub> .....	18
I.3.1.1 Estructura, química y fotoquímica de las cobalaminas .....	19
I.3.1.2 Enzimas que utilizan cobalamina como cofactor .....	22
I.3.1.2.1 Enzimas dependientes de MeCbl: metiltransferasas .....	22
I.3.1.2.2 Enzimas dependientes de AdoCbl: isomerasas .....	24
I.3.2 Regulación de la expresión génica mediada por cobalamina.....	25
I.3.2.1 Ribointerruptores.....	25
I.3.2.2 Regulación de la expresión génica mediada por AerR .....	27
I.3.3 El fotorreceptor CarH .....	29
I.4 Mecanismo de respuesta a la luz independiente de B <sub>12</sub> .....	33
I.4.1 Regulación de P <sub>B</sub> por el sistema CarA-CarS.....	35
I.4.2 La proteína transmembranal CarF .....	36
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>III. PUBLICACIONES .....</b>	<b>47</b>
III.1 Plasticity in oligomerization, operator architecture and DNA binding in the mode of action of a B <sub>12</sub> -based CarH photoreceptor.....	49
III.2 B <sub>12</sub> -based photoreceptors: from structure and function to applications in optogenetics and synthetic biology.....	51
III.3 Vitamin B <sub>12</sub> photoreceptors.....	53
III.4 Anexo I: Evolution of B <sub>12</sub> -dependent and independent photoregulation of carotenogenesis in Myxococcales.....	55
III.5 Anexo II: A bacterial light response reveals an orphan desaturase for human plasmalogen synthesis.....	57
III.6 Anexo III. Unpublished results: Effects of adenosylrhodibalamin, a nonnatural adenosylcobalamin homolog, on the CarH photoreceptor .....	59
<b>IV. CONCLUSIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>V. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>75</b>







# Summary

Light signals diverse biological processes but can also damage cells. *Myxococcus xanthus* has two pathways to sense light and control carotenogenesis, a photoprotective response. One uses 5'- deoxyadenosylcobalamin (AdoCbl), a B<sub>12</sub> form to which CarH (prototype of a new photoreceptor family) binds. The other requires CarA (a B<sub>12</sub>-independent CarH paralog) and other proteins, some of which are eukaryotic-like.

CarH and CarA repress carotenogenesis in the dark and have a DNA-binding (DBD) and a B<sub>12</sub>-binding (CBD) domain, but only CarH requires B<sub>12</sub>. Previous work with CarH from *M. xanthus* (CarH<sub>Mx</sub>) and *Thermus thermophilus* (CarH<sub>Tt</sub>) showed that AdoCbl provokes transition from a monomer to an AdoCbl-bound oligomer (a tetramer for CarH<sub>Tt</sub>) that binds DNA, and whose light-induced disassembly to monomers relieves repression. Crystal structures of CarH<sub>Tt</sub> revealed how AdoCbl-CarH<sub>Tt</sub> is used as a light sensor, and how three of its four DBDs contact three direct repeats (DRs). Whether the same mode of action applies to other CarH must be addressed to better understand these photoreceptors.

Here, *Bacillus megaterium* CarH homolog (CarH<sub>Bm</sub>) was analysed. ApoCarH<sub>Bm</sub> is a molten globule tetramer, rather than a monomer, that forms DNA-binding tetramers when bound to AdoCbl. Light disrupts CarH<sub>Bm</sub> tetramers to dimers, rather than to monomers. CarH<sub>Bm</sub> uses its four DBDs to bind four DRs at its promoter or three DRs and one pseudorepeat (dr) at P<sub>crtI</sub>, but can also bind just three, revealing a plasticity that may be related to the linker between its two domains. The CarH<sub>Bm</sub> operator design is conserved in an operator controlling SpxA2, a global redox-response regulator.

Analyses with AdoRhbl (a photostable synthetic AdoCbl homolog with rhodium replacing cobalt) showed that it binds to CarH, though with lower affinity than AdoCbl, promoting formation of oligomers that bind DNA but are unresponsive to light.

CarH is widely distributed among bacteria and often coexists with a standalone CBD of unknown function. Within myxobacteria, CarH exists in all three suborders, but CarA and its associated factors only in Cystobacterineae, with *carA* and *carH* invariably in tandem in a syntenic carotenogenic operon. The CarA pathway possibly evolved via gene duplication and divergence of an ancestral B<sub>12</sub>-dependent CarH, *de novo* gene emergence, and horizontal gene transfer, perhaps driven by necessity to cope with limited B<sub>12</sub>. Intriguingly, *Cystobacter/Mellitangium* species have CarH and the proteins of the CarA pathway except CarA. *Cystobacter* CarH is AdoCbl-dependent but, unlike other characterized homologs, it transitions from an inactive dimer to active AdoCbl-bound

dimers, which become inactive monomers upon photolysis. Moreover, *Cystobacter* CarH exhibits CarA-like properties in its stepwise DNA binding (to three tandem DRs and one dr) and its abrogation by CarS (the CarA antirepressor).

Analyses with *Sorangium cellulosum* (Sorangineae) and *Haliangium ochraceum* (Nannocystineae), which repress carotenogenesis in the dark with B<sub>12</sub>, revealed that even operators with one or two DRs (with flanking drs) are suitable for CarH binding. Altogether, the results highlight a remarkable plasticity in the behavior of B<sub>12</sub>-based photoreceptors, which can be helpful for its use as an optogenetic tool.

We also analysed the phylogenetic distribution of CarF, the protein known to act earliest in the B<sub>12</sub>-independent pathway and recently unmasked as the desaturase involved in plasmalogen biosynthesis. CarF bacterial homologs are present only in myxobacteria, Leptospiraceae and Alphaproteobacteria, but they are widespread in animals (including humans) and plants. Homologs from animals and *Leptospira* are significantly more similar to those in myxobacteria than those from Alphaproteobacteria and plants. Mutation of the conserved histidines in the human CarF homolog had the same effect as mutation of the equivalent histidines in CarF, thus reinforcing that they are closely related.

# Resumen

La luz señala diversos procesos biológicos, pero también puede causar daño celular. *Myxococcus xanthus* tiene dos rutas para detectar la luz y controlar la carotenogénesis, una respuesta fotoprotectora. Una usa 5'-desoxiadenosilcobalamina (AdoCbl), una forma de B<sub>12</sub> que se une a CarH (prototipo de una nueva familia de fotorreceptores). La otra requiere CarA (parálogo de CarH independiente de B<sub>12</sub>) y otras proteínas, algunas típicas de eucariotas.

CarH y CarA reprimen la carotenogénesis en la oscuridad y tienen un dominio de unión al DNA (DBD) y otro de unión a B<sub>12</sub> (CBD), pero solo CarH requiere B<sub>12</sub>. La unión de AdoCbl a CarH de *M. xanthus* (CarH<sub>Mx</sub>) y *Thermus thermophilus* (CarH<sub>Tt</sub>) provoca la transición de monómero a oligómero (tetramero para CarH<sub>Tt</sub>) que se une al DNA y cuya disgregación inducida por luz genera monómeros que no reprimen. Las estructuras de CarH<sub>Tt</sub> revelaron cómo AdoCbl-CarH<sub>Tt</sub> se utiliza como sensor de luz y cómo tres de sus cuatro DBDs contactan con tres repeticiones directas (DR). Para comprender mejor estos fotorreceptores, se debe estudiar si este comportamiento está conservado en otros CarH.

El análisis de CarH de *Bacillus megaterium* (CarH<sub>Bm</sub>) reveló que, a diferencia de apoCarH<sub>Tt</sub>, es un glóbulo fundido tetramérico que pasa a tetramero capaz de unir DNA cuando se asocia con AdoCbl. La luz descompone los tetrameros en dímeros. CarH<sub>Bm</sub> utiliza sus cuatro DBDs para unirse a cuatro DRs en su promotor o a tres DRs y una pseudorepetición (dr) en P<sub>crtH</sub>, pero también puede unirse solo a tres, revelando una plasticidad probablemente relacionada con el conector entre sus dominios. Este diseño se conserva en el operador que controla SpxA2, un regulador global de respuesta redox.

El análisis con AdoRhbl (un análogo sintético y fotoestable de AdoCbl, con rodio reemplazando al cobalto) mostró que interacciona con CarH, aunque con menor afinidad que la AdoCbl, promoviendo la formación de oligómeros que se unen al DNA, pero no responden a la luz.

CarH está ampliamente distribuido en bacterias y, frecuentemente, coexiste con un CBD independiente de función desconocida. En mixobacterias, CarH está presente en los tres subórdenes, pero CarA y sus factores solo en Cystobacterineae, con *carA* y *carH* invariablemente en tándem en un operón carotenogénico sintético. La vía CarA posiblemente evolucionó mediante duplicación génica y divergencia de un CarH ancestral, emergencia génica *de novo* y transferencia génica horizontal, quizás para afrontar la escasez de B<sub>12</sub>. Curiosamente, *Cystobacter/Mellitangium* tienen CarH y todas

las proteínas de la vía CarA, excepto CarA. CarH de *Cystobacter* depende de AdoCbl, pero es un dímero inactivo que pasa a dímero activo cuando une AdoCbl, y a monómeros inactivos tras la fotólisis. Además, se parece a CarA en su unión escalonada al DNA (a tres DR en tándem y una dr) y en su anulación por CarS (el antirrepresor de CarA).

Los análisis con *Sorangium cellulosum* (Sorangineae) y *Haliangium ochraceum* (Nannocystineae), que reprimen la carotenogénesis en la oscuridad con B<sub>12</sub>, revelaron que incluso operadores con una o dos DRs (con drs flanqueantes) sirven para unir CarH. Conjuntamente, estos resultados resaltan una plasticidad en el comportamiento de los fotorreceptores basados en B<sub>12</sub> que puede ser útil en Optogenética.

CarF, la proteína que actúa más temprano de la vía CarA e identificada recientemente como la desaturasa involucrada en la biosíntesis de plasmalógenos, solo presenta homólogos bacterianos en mixobacterias, Leptospiraceae y Alphaproteobacteria, pero está ampliamente extendida en animales (incluidos los humanos) y plantas. Los homólogos de animales y *Leptospira* son más cercanos a los de mixobacterias que los de Alphaproteobacteria y plantas. Las histidinas clave para la función de CarF también lo son para el homólogo humano, sugiriendo que ambas proteínas están estrechamente relacionadas.



# Listado de abreviaturas

- $^1\text{O}_2$ : Oxígeno singlete
- **AdoCbl**: Adenosilcobalamina
- **AdoRhbl**: Adenosilrodioalamina
- **AEPE**: Alquil éter fosfatidiletanolamina
- **AqCbl**: Aquocobalamina
- **Amp**: Ampicilina
- **CarH<sub>Bm</sub>**: Homólogo de CarH de *Bacillus megaterium*
- **CarH<sub>Cfe</sub>**: Homólogo de CarH de *Cystobacter ferrugineus*
- **CarH<sub>Cfu</sub>**: Homólogo de CarH de *Cystobacter fuscus*
- **CarH<sub>Mx</sub>**: CarH de *Myxococcus xanthus*
- **CarH<sub>Tt</sub>**: Homólogo de CarH de *Thermus thermophilus*
- **CBD**: *Cobalamin-binding domain*
- **Cbl**: Cobalamina
- **CNCbl**: Cianocobalamina
- **DBD**: *DNA-binding domain*
- **DMAPP**: Dimetilalil pirofosfato
- **DMB**: Dimetilbenzimidazol
- **DR**: *Direct repeat*
- **dr**: *Imperfect direct repeat*
- **FAD4**: *Fatty acid desaturase 4*
- **FMN**: Flavín mononucleótido
- **FPP**: Farnesil pirofosfato
- **GGPP**: Geranil geranil pirofosfato
- **GPP**: Geranil pirofosfato
- **Hcy**: Homocisteína
- **IHF**: *Integration host factor*
- **IPP**: Isopentenil pirofosfato
- **Kan**: Kanamicina
- **K<sub>D</sub>**: Constante de disociación
- **Liso-PE**: Lisofosfatidiletanolamina
- **MeCbl**: Metilcobalamina
- **MerR**: *Mercury-sensing regulator*
- **Meth**: Sintasa de metionina
- **MeTHF**: 5'- Metiltetrahidrofolato
- **OHCbl**: Hidroxocobalamina
- **PDB**: *Protein data bank*
- **PPIX**: Protoporfirina IX
- **RF**: *Rossmann fold*
- **RNAP**: Polimerasa de RNA
- **ROS**: Especies reactivas de oxígeno
- **SAM**: S-adenosil metionina
- **Spt**: Espectinomicina
- **TPP**: Pirofosfato de tiamina
- **UV**: Ultravioleta
- **UTR**: *Untranslated region*
- **VEPE**: Vinil éter fosfatidiletanolamina
- **WT**: *Wild type*

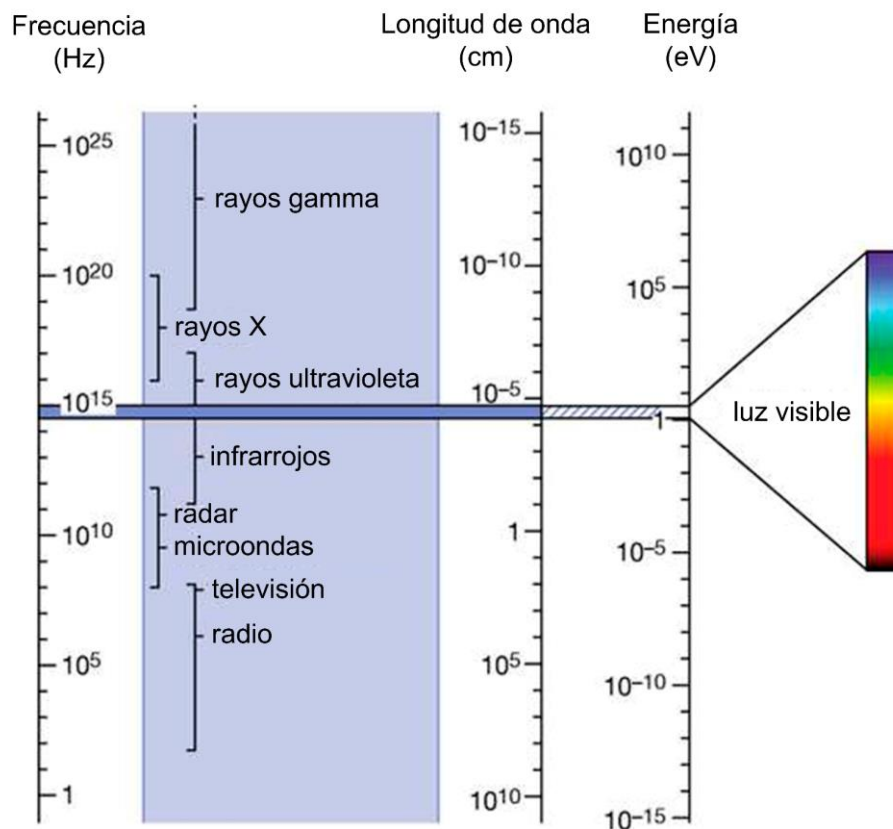


# I. INTRODUCCIÓN



## I.1 La luz y los fotorreceptores

La luz solar es el espectro total de radiación electromagnética proveniente del sol, sin la cual no se puede comprender el origen y mantenimiento de la vida en nuestro planeta. Numerosos procesos biológicos tales como el ritmo circadiano, el fototropismo, la morfología de los organismos, la reparación del daño celular, la biosíntesis de compuestos o la fotosíntesis se ven influidos por la luz o dependen de ella. De hecho, la mayor parte de la biomasa proviene de la conversión de la energía solar en energía química por bacterias fotosintéticas, algas y plantas (Croce & Van Amerongen, 2014). La visión humana detecta lo que llamamos luz visible, que corresponde a los rangos de longitud de onda del espectro electromagnético que van desde 380 a 760 nm (Figura 1).



**Figura 1. Espectro electromagnético** en función de la longitud de onda (cm) y la frecuencia (Hz). Se destaca la región visible del espectro (380–760 nm). Imagen modificada de Britannica (2021).

Sin embargo, a pesar de ser fundamental, la luz también puede ser perjudicial para la vida. Cuando ciertas biomoléculas fotosensibles, como las porfirinas, clorofilas o flavinas, absorben luz de una determinada longitud de onda pueden adquirir estados excitados que permiten la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Las ROS son altamente reactivas, pudiendo dañar a ácidos nucleicos, lípidos o proteínas. Además, la radiación UV también afecta al DNA,

## I. Introducción

ya que provoca que se formen dímeros de timina (Setlow, 1966). Debido a todos estos perjuicios, los organismos han desarrollado respuestas celulares para evitar, minimizar o reparar el daño inducido por la luz.

Para llevar a cabo una respuesta celular a la luz, ésta debe ser detectada y convertida a una señal celular que desencadene una respuesta para proteger al organismo. La detección de la luz en todos los dominios de la vida depende de proteínas fotorreceptoras (o fotorreceptores). Como la mayoría de luz que llega a la tierra está comprendida en el rango visible, y las cadenas polipeptídicas y cadenas laterales de aminoácidos no absorben en este rango de longitudes de onda, gran parte de los fotorreceptores contienen un componente orgánico no proteico, conocido como cromóforo, que puede estar o no unido covalentemente al módulo proteico. Por ejemplo, en los seres humanos la detección de la luz se produce en las células fotorreceptoras de la retina del ojo, conocidas como conos y bastones, que poseen en su membrana los fotorreceptores conopsina y rodopsina, respectivamente. Estos fotorreceptores constan de una parte proteica, la opsina, y un cromóforo derivado de la vitamina A, el 11-cis retinal (Grossniklaus *et al.*, 2015). Los fotorreceptores bacterianos se clasifican en distintas familias en función del cromóforo y del módulo proteico al que se asocia (Tabla 1). Los cromóforos, generalmente, absorben luz de una determinada longitud de onda, lo que provoca cambios químicos y/o estructurales en la molécula, que son transmitidos al módulo proteico, para generar una determinada respuesta (Gordley *et al.*, 2016).

**Tabla 1. Fotorreceptores bacterianos**

Módulo proteico	Cromóforo	Luz absorbida
LOV (Light, Oxygen and Voltage)	FMN	Azul
BLUF (Blue-Light sensing Using FAD)	FAD	Azul
<b>Criptocromo/Fotoliasa</b>	FAD	Azul
PYP (Photoactive Yellow Protein, Xantopsinas)	Ácido p-cumárico	Azul
OCP (Orange Carotenoid Protein)	3'-hidroxiequinenona (cetocarotenoide)	Azul/Verde
<b>Proteorrodopsina</b>	Retinal	Azul/Verde
<b>Bacteriofitocromo</b>	Tetrapirroles lineales/Bilinas	Roja/Roja lejana
<b>CarH</b>	Adenosilcobalamina	UV/Azul/Verde

(Padmanabhan *et al.*, 2017; Purcell & Crosson, 2008). Abreviaturas: FMN, flavín mononucleótido; FAD, flavín adenín dinucleótido.

El grupo de investigación en el que se ha realizado esta Tesis Doctoral estudia cómo las bacterias detectan y responden a la luz, utilizando típicamente *Myxococcus xanthus* como organismo modelo. En esta bacteria, la luz provoca una respuesta transcripcional que da lugar a la síntesis de carotenos, compuestos que protegen a las células de los efectos nocivos de la luz al anular los efectos del  $^1\text{O}_2$  y otras ROS. Sin embargo, hasta 2011 no se había identificado en *M. xanthus* ningún fotorreceptor que canalizara esta respuesta (Elías-Arnanz *et al.*, 2011). Ese mismo año, el grupo de investigación identificó una nueva familia de fotorreceptores bacterianos, denominados CarH, que utilizan la adenosilcobalamina (una forma de la vitamina B<sub>12</sub>) como cromóforo (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011) y que han sido objeto de estudio en este trabajo.

Los fotorreceptores presentan una gran plasticidad modular: pueden ser parte de una proteína con múltiples dominios o estar constituidos por un único dominio proteico. Esto permite generar respuestas muy diversas; desde dirigir interacciones moleculares (con proteínas, DNA, RNA, membranas y moléculas pequeñas) hasta reacciones enzimáticas (quinasas, diguanilato ciclasas, fosfodiesterasas) (Padmanabhan *et al.*, 2017). En los fotorreceptores que tienen múltiples dominios, la luz provoca cambios moleculares en el dominio fotorreceptor que son transmitidos al dominio efector para llevar a cabo la respuesta. En la naturaleza, un mismo módulo fotosensor lo podemos encontrar frecuentemente en distintas proteínas, articulando diferentes respuestas (Bhattacharyya *et al.*, 2006). De hecho, los fotorreceptores bacterianos pueden desempeñar un papel importante en procesos de señalización celular, síntesis de pigmentos, metabolismo de nucleótidos, reparación de DNA, adhesión, migración, patogénesis y en la formación de biofilms y cuerpos fructíferos (Gomelsky & Hoff, 2011; Inouye *et al.*, 1980).

La naturaleza modular de los fotorreceptores ha sido utilizada para generar quimeras artificiales, fusionando el dominio fotorreceptor a una proteína de interés cuya función puede ser posteriormente controlada con una elevada precisión temporal y espacial (Shcherbakova *et al.*, 2015). Estos avances han permitido el desarrollo de la Optogenética, la Optobioquímica y la creación de potentes herramientas y aplicaciones en Biología Celular y Neurobiología (Fenno *et al.*, 2011; Miesenböck, 2011; Seong & Lin, 2021). El descubrimiento y la extensa caracterización de CarH por parte de nuestro grupo ha permitido que en la actualidad sea una herramienta muy versátil en dichos campos.

## I.2 *Myxococcus xanthus* y su respuesta a la luz

### I.2.1 Características generales de las mixobacterias

Las mixobacterias son bacterias Gram negativas aerobias no fotosintéticas con forma bacilar, capaces de generar unas complejas estructuras multicelulares macroscópicas llamadas cuerpos fructíferos. El botánico Heinrich Friedrich Link describió por primera vez a las mixobacterias, refiriéndose a ellas como unos pequeños hongos gasteroides (Link, 1809). No fue hasta 1892 cuando Roland Thaxter las clasificó como un inusual grupo de bacterias que tenían un ciclo biológico que recordaba al de algunos hongos eucariotas (Thaxter, 1892). De acuerdo con el análisis del rRNA 16S y sus características morfológicas y fisiológicas, las mixobacterias pertenecen a la división  $\delta$  de las Proteobacterias, y se clasifican en tres subórdenes: Sorangiineae, Cystobacterineae (que incluye a *M. xanthus*), y Nannocystineae (Ludwig *et al.*, 1983; Oyaizu & Woese, 1985; Shimkets & Woese, 1992). Las mixobacterias tienen un tamaño relativamente grande, en relación con otras bacterias, ya que en su forma vegetativa miden entre 0,7-1,2  $\mu\text{m}$  de ancho y 3-12  $\mu\text{m}$  de largo. Se pueden encontrar mixobacterias en diversos ecosistemas. Aunque generalmente viven en suelos ricos en materia orgánica y vida microbiana, también están presentes en arenas, superficies rocosas, agua dulce, ambientes marinos e incluso en ambientes extremos (pH, temperatura o pocos nutrientes) (Dawid, 2000; Iizuka *et al.*, 1998). Aunque la mayoría de las mixobacterias son mesófilas, cabe destacar que en muestras procedentes de la Antártida se encontraron especies psicrófilas capaces de crecer a temperaturas entre 4-9 °C (Dawid, 2000). Otra característica distintiva es su capacidad depredadora de otros microorganismos, pudiendo lisar diversas especies de bacterias y hongos con el objetivo de obtener nutrientes (Dawid, 2000; Iizuka *et al.*, 1998).

Tanto la capacidad depredadora como la formación de cuerpos fructíferos dependen de una de las características principales de las mixobacterias: su capacidad para desplazarse sobre una superficie sólida por deslizamiento. *M. xanthus*, la mixobacteria más estudiada, se desplaza utilizando dos sistemas: movimiento individual (movimiento aventurero o A) y movimiento grupal (movimiento social o S). El movimiento aventurero impulsa la migración de células individuales desde los bordes de la colonia para la exploración de nuevos entornos, dejando senderos que pueden ser seguidos por otras células (Islam & Mignot, 2015). El movimiento social, sin embargo, se caracteriza por el desplazamiento en enjambre de grupos de células, para el cual son necesarios mecanismos de comunicación intercelular (Arnold & Shimkets, 1988; Kaiser, 2001). Esta



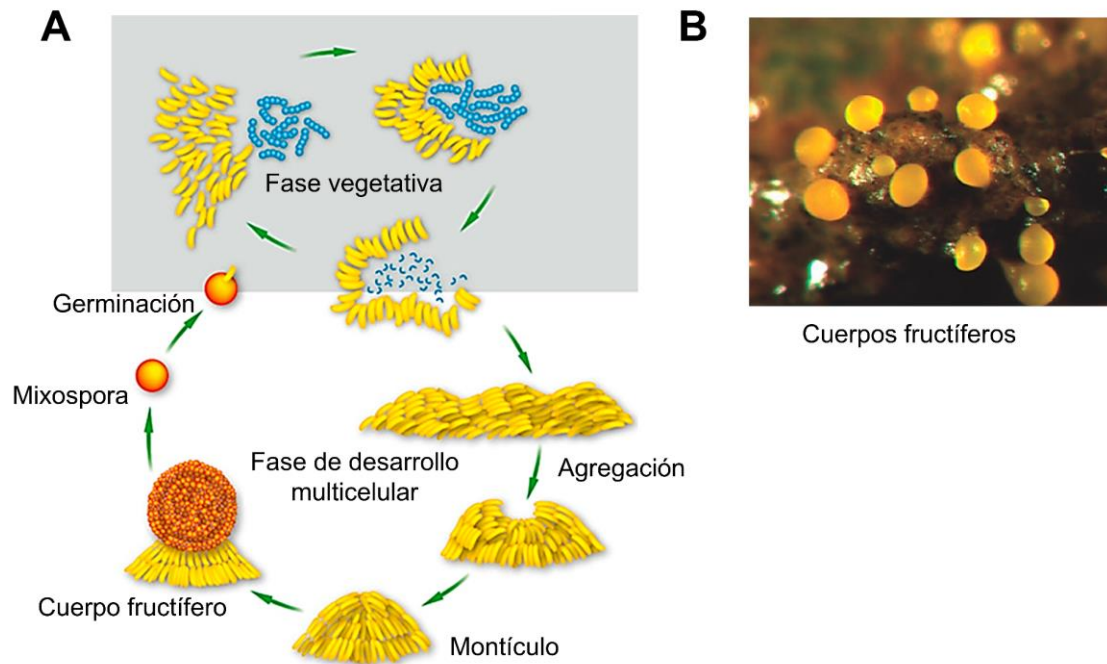
última estrategia es clave para la capacidad de depredación. Al detectar la presencia de otros microorganismos, las mixobacterias forman un enjambre que actúa como una “manada de lobos”, rodeando a la presa y digiriéndola mediante la liberación de metabolitos secundarios (antibióticos, entre ellos), proteasas, nucleasas, lipasas y glucanasas (Berleman *et al.*, 2014; Findlay, 2016, Keane & Berleman, 2016). Debido a su complejo comportamiento social y a otras características, las mixobacterias han sido propuestas como origen de las células eucariotas por la hipótesis sintrópica, en simbiosis con una arquea metanogénica y una Alphaproteobacteria (López-García & Moreira, 2020).

Las mixobacterias tienen un genoma con un alto contenido en G+C (67-71%) y de tamaño inusualmente grande en relación con el de otros procariontes. El de *M. xanthus*, por ejemplo, tiene 9,14 Mb, pero otros, como el de *Minicystis rosea*, tiene 16 Mb, siendo el genoma bacteriano más grande secuenciado hasta la fecha (Almpanis *et al.*, 2018). Esta expansión genómica podría ser debida, en parte, a una duplicación genética masiva que afecta a genes implicados en la señalización celular, la percepción sensorial de pequeñas moléculas y el control integrado de la transcripción, siendo este último muy importante para la evolución del estilo de vida multicelular de las mixobacterias (Goldman *et al.*, 2006; Kaiser, 2001). Por otro lado, la transferencia horizontal de genes también puede haber contribuido a la expansión genómica; de hecho, muchos genes implicados en la producción de metabolitos secundarios, claves para la capacidad depredadora de estas bacterias, parecen haber sido incorporados mediante este mecanismo (Yang & Higgs, 2014). Debido en gran parte a su amplio metabolismo secundario, en las últimas décadas las mixobacterias han sido una fuente muy prolífica de compuestos naturales con un enorme potencial biotecnológico. Dichos compuestos muestran diferentes actividades biológicas: antibióticos, antivirales, inmunosupresores y antioxidantes (Herrmann *et al.*, 2017)

Desde el punto de vista nutricional, las mixobacterias son complejas, siendo el estado metabólico un elemento clave que modula su ciclo de vida (Figura 2). En *M. xanthus*, durante la fase vegetativa de crecimiento, con abundancia de nutrientes, los aminoácidos que consigue a partir de las presas constituyen su fuente de carbono y energía, junto al acetato, glicerol, piruvato y varios intermediarios del ciclo de Krebs. En cambio, ni los monosacáridos (como las hexosas y pentosas) ni los polisacáridos pueden ser utilizados por la bacteria (Dworkin, 1962; Reichenbach & Dworkin, 1992). La leucina, isoleucina y, en ausencia de vitamina B<sub>12</sub>, la metionina, son esenciales para el crecimiento vegetativo, mientras que la falta de fenilalanina y/o triptófano en el medio es

## I. Introducción

capaz de desencadenar la formación de cuerpos fructíferos (Figura 2). Que la metionina sea un aminoácido esencial únicamente en ausencia de vitamina B<sub>12</sub> es debido a que la sintasa de metionina de *M. xanthus* utiliza cobalamina como cofactor. Como esta bacteria no puede sintetizar cobalaminas *de novo* (debido a que no tiene todos los genes implicados en esta ruta bioquímica), necesita su captación exógena para poder sintetizar metionina. Cuando los nutrientes escasean, las células entran en la fase de desarrollo multicelular, agregándose y formando los cuerpos fructíferos (Figura 2), que suelen medir entre 50 y 500 µm (Reichenbach & Dworkin, 1992). En los cuerpos fructíferos, la mayoría de las bacterias mueren; sin embargo, una pequeña parte de las células se diferencian en formas de resistencia, esféricas e inmóviles denominadas mixosporas. Finalmente, cuando los nutrientes vuelven a estar disponibles, las esporas germinan y completan el ciclo de vida, iniciando de nuevo la fase vegetativa (Elías & Murillo, 1991b, 1991a).



**Figura 2. Ciclo de vida de *M. xanthus*.** **A)** Fase vegetativa (fondo gris): cuando hay suficientes nutrientes, los grupos de células (en amarillo) crecen y se dividen, desplazándose en busca de nutrientes o presas (en azul). Fase de desarrollo multicelular (fondo blanco): en ausencia de nutrientes, las células se agregan en pequeños montículos hasta formar los cuerpos fructíferos macroscópicos. Cuando vuelve a haber disponibilidad de nutrientes, las mixosporas pueden germinar y completar el ciclo de vida. Esquema modificado de [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Myxococcus\\_xanthus](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Myxococcus_xanthus). **B)** Fotografía de cuerpos fructíferos de *M. xanthus* emergiendo del suelo; tomada de Foster (2006).

## I.2.2 Respuesta a la luz de *M. xanthus*

La respuesta a la luz de las bacterias ha sido muy estudiada en las últimas décadas, desde la fotosíntesis hasta la protección frente al daño fotooxidativo. En este último ámbito, *M. xanthus* se erige como una de las bacterias más estudiadas (Elías-Arnanz *et al.*, 2008, 2011; Padmanabhan *et al.*, 2021). En la oscuridad, *M. xanthus* presenta una coloración amarilla debida a la producción de un pigmento sensible a la luz, hidrosoluble y no carotenoide llamado DKxanteno (Meiser *et al.*, 2006). Cuando la luz incide sobre *M. xanthus*, la bacteria acumula diferentes carotenoides que imprimen un color rojo a las colonias o cultivos (Martínez-Laborda *et al.*, 1990) (Figura 3). El aislamiento y posterior análisis de estirpes mutantes de *M. xanthus* que no responden a la luz o que, por el contrario, producen carotenos de forma constitutiva, ayudó a identificar los genes involucrados en la síntesis de carotenos en respuesta a la luz (Balsalobre *et al.*, 1987; Martínez-Laborda *et al.*, 1986, 1990; Martínez-Laborda & Murillo, 1989).

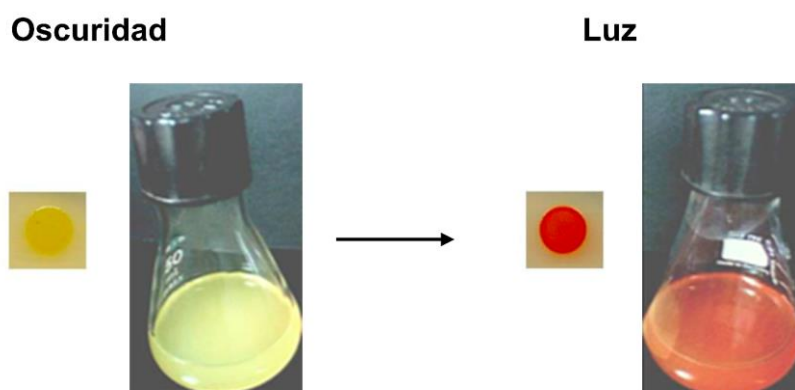


Figura 3. Producción de carotenos en *M. xanthus* en respuesta a la luz.

### I.2.2.1 Carotenoides y la respuesta a la luz

Los carotenoides son pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son sintetizados *de novo* por bacterias que realizan fotosíntesis anoxigénica, cianobacterias y también algunas bacterias no fotosintéticas. Las algas, plantas y algunos hongos también pueden sintetizar estos compuestos, pero los animales debemos obtenerlos a partir de la dieta (Goodwin, 1980). Los carotenoides constituyen uno de los grupos de pigmentos más extendidos en la naturaleza, conociéndose la existencia de más de seiscientos compuestos pertenecientes a este grupo (Milani *et al.*, 2017). Poseen una coloración que va desde el amarillo al rojo oscuro, característico de flores y frutos. Por ejemplo, el licopeno es el

## 1. Introducción

pigmento responsable del color rojo de los tomates maduros, mientras que el color naranja de la zanahoria es debido al  $\beta$ -xanteno. Incluso en crustáceos, el color rosado/rojo es debido al carotenoide astaxantina, que adquieren a través de su dieta (Astorg, 1997).

La estructura básica de los carotenoides consiste en un esqueleto hidrocarbonado de 40 átomos de carbono proveniente de la unión de 8 unidades de isopreno. En general, los carotenoides se pueden clasificar en dos grandes grupos: carotenos y xantofilas. Los primeros son estrictamente hidrocarburos, mientras que las xantofilas son derivados de los carotenos que contienen grupos oxigenados. En ambos casos, la estructura es modificada por deshidrogenaciones, condensaciones, ciclaciones y adición de diversos grupos funcionales. El estado de isomerización y el número de dobles enlaces conjugados de la estructura básica determinan las propiedades de absorción de luz cada carotenoide (Armstrong & Hearst, 1996; Maresca *et al.*, 2008; Sandmann, 2009; Tian & Hua, 2010).

Como son compuestos relativamente hidrofóbicos, los carotenos se suelen asociar con membranas, aunque también pueden presentarse unidos a proteínas. Su función principal es proteger a las células del daño fotooxidativo, desactivando las ROS que se originan cuando moléculas como las clorofilas y las protoporfirinas absorben luz (Frank & Brudvig, 2004).

Las etapas iniciales de la ruta de síntesis de carotenoides en *M. xanthus* son similares a las de otros organismos carotenogénicos (Figura 4). El precursor común es el isopentenil pirofosfato (IPP), una molécula de cinco carbonos que, al condensarse con su isómero, el dimetilalil pirofosfato (DMAPP), da lugar a geranil pirofosfato (GPP), de 10 átomos de carbono. La condensación sucesiva de GPP con dos moléculas de IPP da lugar primero a farnesil pirofosfato (FPP) y luego a geranil geranil pirofosfato (GGPP), una molécula con 20 carbonos. Cuando dos moléculas de GGPP se condensan dan lugar a fitoeno, de 40 carbonos, que es el primer caroteno (no coloreado) de la ruta. El fitoeno es posteriormente desaturado cuatro veces produciendo licopeno, que es ciclado en un extremo de la cadena, dando lugar al  $\gamma$ -caroteno. Finalmente, se produce la deshidrogenación, glucosilación y acilación del  $\gamma$ -caroteno dando lugar al pigmento mayoritario de *M. xanthus*, el myxobacton (Elías-Arnanz *et al.*, 2008; Iniesta *et al.*, 2007; Padmanabhan *et al.*, 2021; Sandmann, 2009).

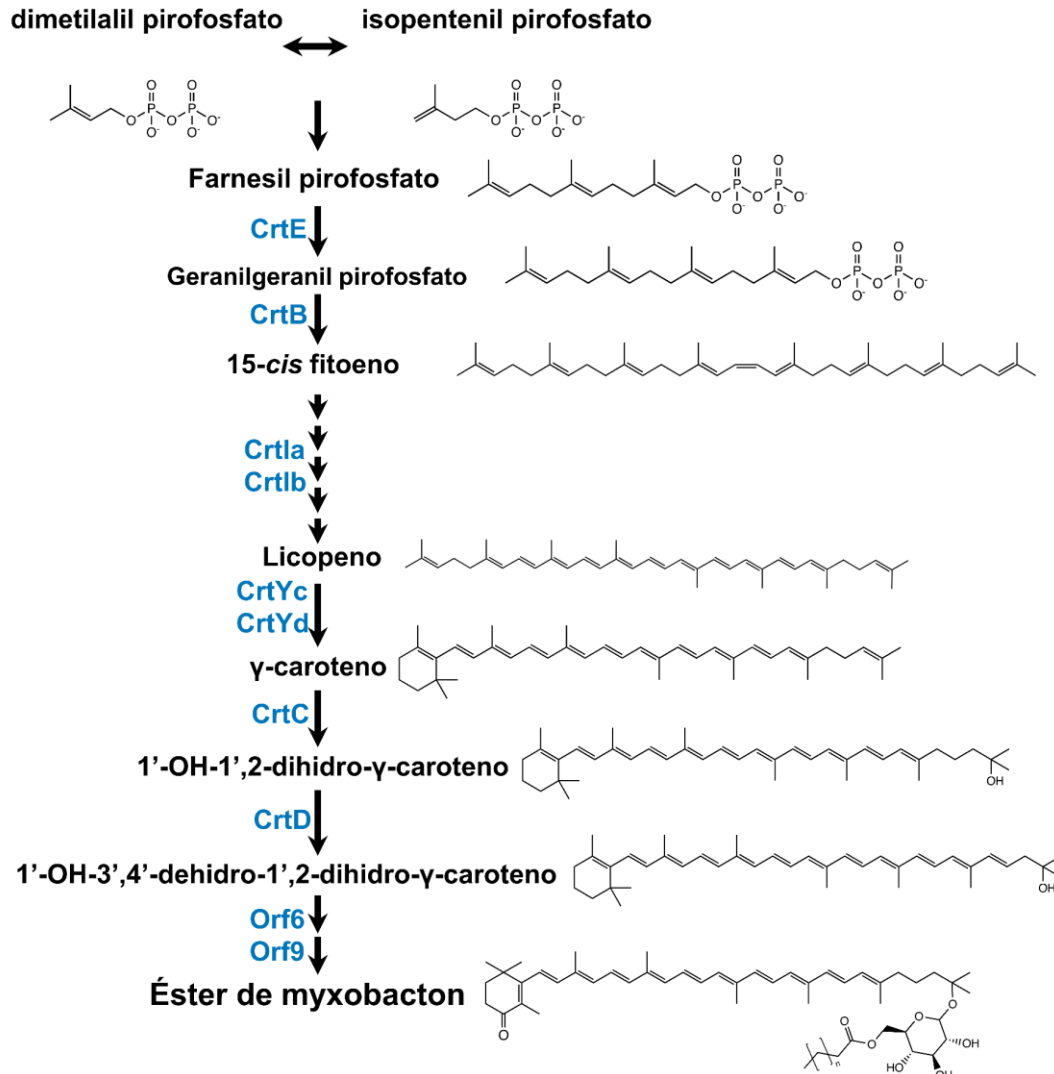


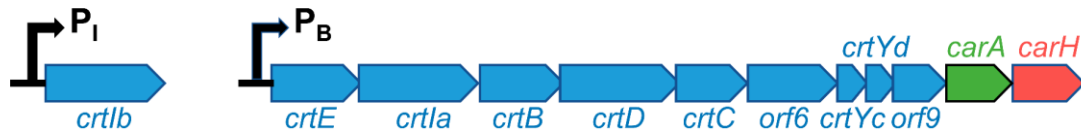
Figura 4. Ruta de síntesis de carotenoides en *M. xanthus* y las proteínas implicadas en cada paso. Imagen modificada de Padmanabhan *et al.* (2021).

### I.2.2.2 Análisis genético de la respuesta a la luz de *M. xanthus*

Desde el punto de vista energético, la producción de compuestos carotenoides es muy costosa, por lo que muchos organismos regulan genéticamente su síntesis en función de su necesidad. Desde que, por primera vez, se demostró que la luz activa la transcripción de genes carotenogénicos en *M. xanthus* en 1987 (Balsalobre *et al.*, 1987), se han identificado numerosos genes implicados en la carotenogénesis, la mayoría de ellos por el grupo en el que se ha realizado esta Tesis Doctoral. Estos genes se pueden clasificar en (a) genes estructurales que codifican enzimas implicadas en los diferentes pasos de la biosíntesis de carotenos; y (b) genes reguladores que activan o reprimen la expresión de los genes estructurales. Todos estos genes se encuentran situados en seis loci independientes del genoma de *M. xanthus*. El operón *carB* agrupa dos genes

## I. Introducción

reguladores (que codifican CarA y CarH) y todos los genes estructurales a excepción de *crtIb* (Figura 5). Por otro lado, hay dos operones que agrupan genes reguladores, *carQRS* y *carDG*, y dos genes reguladores (*carF* e *ihfA*) que no forman parte de ningún operón (Elías-Arnanz *et al.*, 2008, 2011).



**Figura 5. Representación gráfica de los genes estructurales de la carotenogénesis (color azul) caracterizados en *M. xanthus*.** El operon *carB* codifica nueve genes estructurales y dos reguladores (CarA y CarH). Modificada de Padmanabhan *et al.* (2021).

Al estar la mayoría de los genes estructurales agrupados en el operón *carB*, la regulación de su expresión resulta clave para controlar la síntesis de carotenos en *M. xanthus*. Para la correcta regulación por la luz de *carB* hay dos rutas paralelas: una dependiente de vitamina B<sub>12</sub>, regulada por CarH, y otra independiente de B<sub>12</sub>. En los siguientes apartados se describirán ambas rutas.

### I.3 Mecanismo de respuesta a la luz dependiente de B<sub>12</sub>

#### I.3.1 Vitamina B<sub>12</sub>

La vitamina B<sub>12</sub> (también llamada cobalamina por la presencia de cobalto en su estructura) es una vitamina hidrosoluble perteneciente al grupo B, importante para el metabolismo de bacterias, algas y animales, entre ellos los humanos. En animales es cofactor de enzimas claves en el metabolismo de ácidos grasos o del folato. De hecho, su descubrimiento se produjo a principios del siglo XX debido a su papel como factor anti-anemia perniciosa (Minot & Murphy, 1926; Whipple & Robscheit-Robbins, 1925). Este hallazgo mereció la concesión del premio Nobel de Fisiología o Medicina a Whipple, Minot y Murphy en 1934.

Sin embargo, la vitamina B<sub>12</sub> no se aisló hasta 1948 a partir de hígado de buey (Rickes *et al.*, 1948; Smith, 1948). La descripción de la estructura de la vitamina B<sub>12</sub> por Hodgkin *et al.* (1956) supuso un importante hito histórico en la cristalografía de moléculas pequeñas, hecho que también fue premiado con el Nobel de Química a Dorothy Hodgkin en 1964. La estructura tridimensional de la vitamina B<sub>12</sub> reveló que era uno de los cofactores más complejos de la naturaleza. Precisamente, esta complejidad y su llamativo color rojo le ha merecido el calificativo de “cofactor más bello de la naturaleza” (Stubbe, 1994).

Las cobalaminas son sintetizadas *de novo* exclusivamente por bacterias y arqueas. La primera vez que se sintetizó vitamina B<sub>12</sub> químicamente fue en la década de 1970, tras un trabajo titánico que llevó 12 años y requirió la colaboración de decenas de investigadores (Eschenmoser & Wintner, 1977). Actualmente, la producción industrial de B<sub>12</sub> se hace a partir de cultivos bacterianos (Fang *et al.*, 2017).

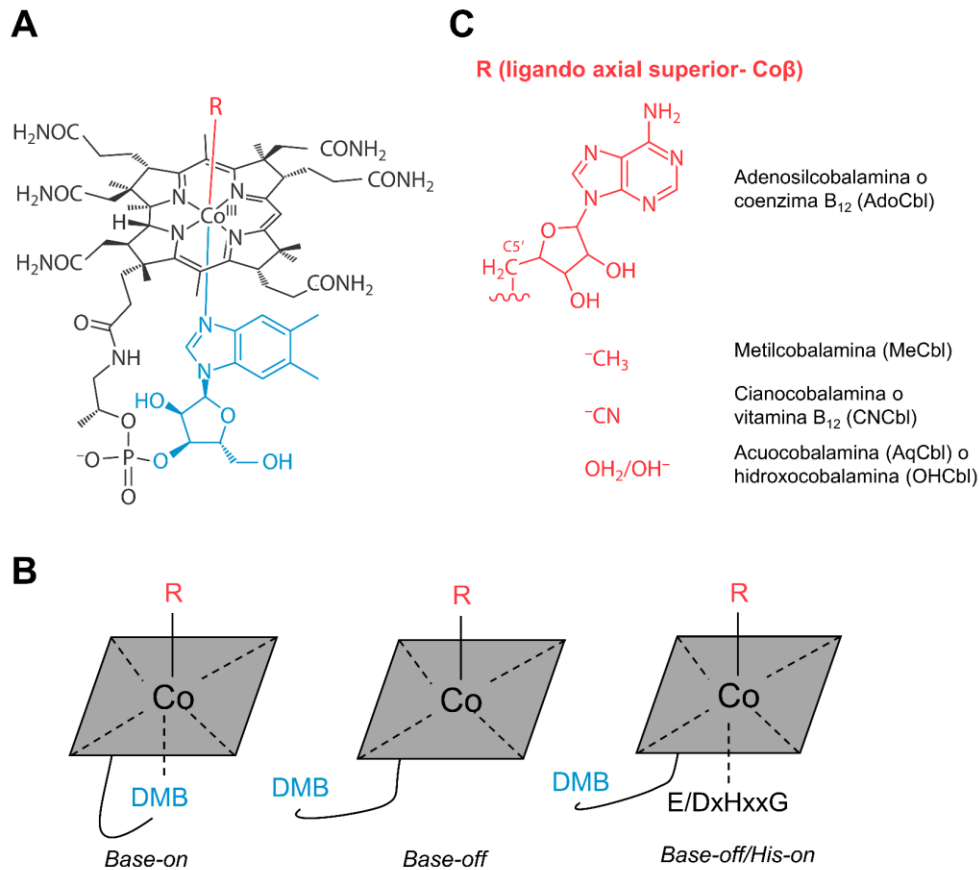
Más recientemente se han descubierto nuevas funciones de la cobalamina, además de su papel como cofactor enzimático. Por ejemplo, se ha demostrado que la vitamina B<sub>12</sub> es un metabolito importante para la organización de la estructura de comunidades microbianas en la microbiota intestinal (Degnan *et al.*, 2014) o que también participa en la regulación de la migración de las células gliales y la formación sináptica (Zhang *et al.*, 2020). Sin embargo, no menos impactante ha sido el descubrimiento de su papel como regulador de la expresión génica, ya sea como ribointerruptor (Bastet *et al.*, 2011) o como cromóforo en CarH (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011).

### I.3.1.1 Estructura, química y fotoquímica de las cobalaminas

Las cobalaminas (Cbl) están compuestas por tres partes: un núcleo central, un sustituyente axial inferior y un sustituyente axial superior (Figura 6A). La principal característica de las cobalaminas es su núcleo central, que está formado por un anillo corrínico, donde los cuatro nitrógenos pirrólicos coordinan un átomo central de cobalto que normalmente está en su estado de oxidación Co<sup>3+</sup>/Co (III). El anillo corrínico tiene como radicales grupos metilos, acetamida y propionamida.

Cuando la vitamina B<sub>12</sub> se encuentra en su forma libre y a pH fisiológico, el sustituyente axial inferior del cobalto (Co $\alpha$ ) es el nitrógeno 7 del 5',6'-dimetilbenzimidazol (DMB) que, a su vez, se encuentra unido covalentemente a la corrina a través de un enlace fosfodiéster de un grupo propionamida del anillo corrínico. A esta conformación de la cobalamina se la conoce como *base-on* o *DMB-on*. A pH ácido, la protonación del DMB provoca su reemplazo por agua, conformación conocida como *base-off* o *DMB-off* (Gruber *et al.*, 2011). Varias proteínas (incluida CarH), cuando se unen a B<sub>12</sub>, reemplazan el DMB por la histidina que forma parte del motivo de unión a B<sub>12</sub> Glu/Asp-X-His-X-X-Gly (o E/DxHxxG). Esta conformación se denomina *base-off/His-on* (Jost *et al.*, 2015a) (Figura 6B).

## I. Introducción



**Figura 6. Estructura química de la cobalamina y sus diferentes tipos. A)** Estructura química de la cobalamina en estado *base-on*, donde el sustituyente axial inferior (en azul) es el dimetilbenzimidazol (DMB). En negro se muestra el núcleo central y, en rojo (R), el sustituyente axial superior. **B)** Conformaciones alternativas de las cobalaminas con respecto al ligando axial inferior. La estructura planar representa el anillo corrínico de la cobalamina. Imagen modificada de Gruber, Puffer, & Kräutler (2011). **C)** Posibles sustituyentes que actúan como ligando superior (R, en rojo) del átomo de Co y que determinan los diferentes tipos de cobalamina. Imagen modificada de Padmanabhan *et al.* (2017).

Lo que diferencia a unas cobalaminas de otras es el sustituyente axial superior (Co $\beta$ , Figura 6C). Las dos formas de la vitamina B<sub>12</sub> más estudiadas, por su importante papel como cofactores enzimáticos, son dos alquilcobalaminas, en las que el sustituyente axial superior se une al cobalto a través de un carbono: la metilcobalamina (MeCbl), donde el cobalto está unido a un grupo metilo, y la adenosilcobalamina (AdoCbl), donde el cobalto se une a la 5'-desoxiadenosina a través de su carbono 5'. El enlace Co-C de la MeCbl y AdoCbl representa uno de los pocos enlaces organometálicos naturales conocidos y tiene algunas propiedades químicas bastante interesantes, como el hecho de que presente una energía de disociación de enlace relativamente baja (entre 24 y 40 kcal mol<sup>-1</sup>), lo que implica que el enlace se puede romper con bastante facilidad (Hay & Finke, 1986; Hung & Grabowski, 1999; Kozłowski *et al.*, 2016; Randaccio *et al.*, 2010; Rury *et al.*, 2015). Esta característica es la que permite el uso de MeCbl y AdoCbl como cofactores enzimáticos. De hecho, cuando de



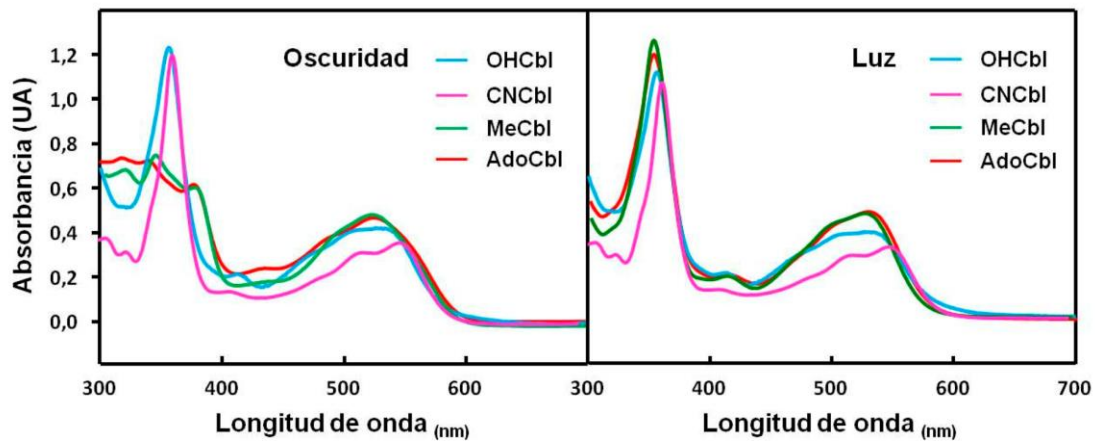
forma sintética se incorpora en el anillo de corrina un átomo diferente a cobalto, se alteran notablemente las propiedades de la molécula (Osman *et al.*, 2020). Por ejemplo, la inclusión de rodio en lugar de cobalto da lugar a un compuesto sintético, análogo a la AdoCbl, llamado adenosilrodibalamina (AdoRhbl). Dicha molécula es más estable y actúa como inhibidor enzimático de reacciones dependientes de AdoCbl (Widner *et al.*, 2016).

En solución acuosa y ausencia de otros ligandos, la B<sub>12</sub> une como ligando superior una molécula de agua, dando lugar a hidroxocobalamina (OHCbl) o acuocobalamina (AqCbl). Sin embargo, la forma de cobalamina que se comercializa como suplemento alimenticio o medicamento para humanos es la cianocobalamina (CNCbl), donde el sustituyente axial superior es el cianuro. La CNCbl no es un compuesto natural, sino que se obtiene a partir de OHCbl o AdoCbl y un exceso de cianuro, con el objetivo de mejorar su estabilidad (Ellis *et al.*, 1950; Kaczka *et al.*, 1950; Wijmenga *et al.*, 1950). La CNCbl no es una forma biológicamente funcional de la vitamina B<sub>12</sub>, por lo que tiene que ser convertida *in vivo* a MeCbl o AdoCbl.

La producción de vitamina B<sub>12</sub> es muy costosa energéticamente. De hecho, los microorganismos que son capaces de producir B<sub>12</sub> *de novo* necesitan en torno a 30 genes para ello. La síntesis tanto de cobalaminas como de otros tetrapirroles (hemo, sirohemo, clorofilas y coenzima F430) comienza a partir de uroporfirinógeno II. Se han identificado dos rutas de biosíntesis de cobalaminas, una aeróbica y otra anaeróbica, descubiertas en *Pseudomonas denitrificans* y *Salmonella typhimurium*, respectivamente (Roth *et al.*, 1996). Una de las mayores diferencias entre ambas rutas es el momento de inserción del cobalto: en la ruta anaeróbica ocurre al principio mientras que en la aeróbica ocurre al final. Las dos rutas convergen de nuevo a partir del ácido a,c-diamida cob(I)inico, para terminar de formar el anillo corrínico y que se produzca la unión de los sustituyentes axial superior e inferior (H. Fang *et al.*, 2017; Warren *et al.*, 2002).

Las propiedades del enlace Co-C han sido muy estudiadas por su importancia en el papel de las cobalaminas como cofactores enzimáticos. Algo característico de dicho enlace en la MeCbl y la AdoCbl es su rápida escisión por la absorción de radiación en el espectro UV-verde, que conlleva la pérdida del ligando superior (Hay & Finke, 1986; Randaccio *et al.*, 2010; Rury *et al.*, 2015). El espectro de absorción de la CNCbl y OHCbl muestra un pico característico máximo a 361 nm tanto en oscuridad como en luz. Por el contrario, la MeCbl y la AdoCbl exhiben espectros diferentes en oscuridad y en luz debido a la rotura del enlace Co-C (Figura 7).

## I. Introducción



**Figura 7. Espectro de absorción de diferentes cobalaminas.** Extraído de Fernández-Zapata (2018).

### I.3.1.2 Enzimas que utilizan cobalamina como cofactor

Durante años, la única función biológica conocida de las cobalaminas fue la de cofactor de enzimas cruciales implicadas en el metabolismo celular de humanos, animales y microorganismos. La MeCbl se utiliza por las metiltransferasas para transferir grupos metilos (Matthews, 2001). Por otro lado, muchas de las enzimas dependientes de AdoCbl actúan como fuente de radicales para mutasas, deshidratasas, desaminasas y reductasas de ribonucleótidos tipo II (Banerjee, 2003). La OHCbl también es utilizada como cofactor por enzimas como deshalogenasas reductoras o la reductasa de epoxiqueuosina, pero se conoce poco de su mecanismo de acción. Las actividades de estas enzimas se basan en la rotura del enlace Co-C y la formación de especies altamente reactivas. Sin embargo, el modo en el que se rompe dicho enlace y las reacciones resultantes son muy distintas. Normalmente, las enzimas dependientes de MeCbl producen la escisión heterolítica del enlace, mientras que las dependientes de AdoCbl lo hacen de forma homolítica (Jones, 2017).

#### I.3.1.2.1 Enzimas dependientes de MeCbl: metiltransferasas

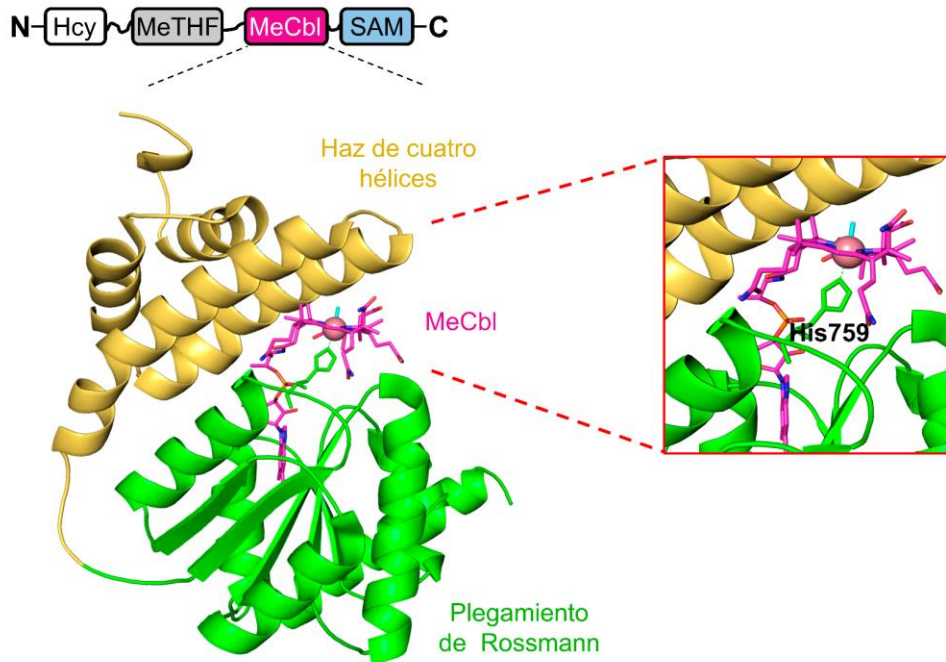
Las enzimas dependientes de MeCbl catalizan la ruptura del enlace Co-C de forma heterolítica para dar lugar a cob(I)alamina, que se queda con los dos electrones del enlace y es altamente reactiva, y un carbocatión metilo que es transmitido a un aceptor nucleofílico. En muchos microorganismos que habitan en ambientes anaeróbicos, su producción energética y crecimiento depende de sistemas de metiltransferasas dependientes de B<sub>12</sub>, que utilizan una gran variedad de donadores (como metanol, metilaminas y metiltetrahidrometanopterin) y aceptores (coenzima M y tetrahidrofolato) de grupos metilo (Matthews *et al.*, 2008; Ragsdale, 2008). Por ejemplo,

recientemente se ha descubierto en *Denitratisoma*, una  $\beta$ -proteobacteria anaeróbica, una metiltransferasa dependiente de B<sub>12</sub> que utiliza estrógenos como aceptores de grupos metilo. Como resultado, el estrógeno se transforma a andrógeno para su posterior degradación, algo de gran interés en biorremediación y en tratamientos de aguas residuales (Elías-Arnanz, 2020; Wang *et al.*, 2019).

De las enzimas dependientes de MeCbl, la más estudiada es la sintasa de metionina (MetH) de *Escherichia coli*, pero podemos encontrar homólogos de esta proteína tanto en otras bacterias como en animales. MetH de *E. coli* es un monómero de 136 KDa, que comprende cuatro dominios funcional y estructuralmente independientes. Cada uno de ellos une homocisteína (Hcy), 5'-metiltetrahidrofolato (MeTHF), MeCbl y S-adenosil metionina (SAM) (Goulding *et al.*, 1997) (Figura 8). La estructura de su dominio de unión a MeCbl permitió por primera vez la visualización de la vitamina B<sub>12</sub> unida a una proteína (Drennan *et al.*, 1994). En la estructura (Figura 8) se puede apreciar que el dominio de unión a cobalamina de MetH (similar al dominio C-terminal de CarA y CarH) atrapa la MeCbl entre sus dos subdominios: (a) el subdominio Rossmann, que une tanto la B<sub>12</sub> por su parte inferior como el DMB, y (b) el subdominio de haz de hélices (*helix bundle*) formado por dos pares de hélices  $\alpha$  antiparalelas, que une la B<sub>12</sub> por su parte superior y previene la pérdida del grupo metilo (Drennan *et al.*, 1994; Jarrett *et al.*, 1996). Por lo tanto, como la MeCbl es secuestrada en este compartimento, se requiere que los dominios de unión a MeTHF y Hcy desplacen el haz de hélices  $\alpha$  para que se produzca la reacción enzimática (Ludwig *et al.*, 1997; Matthews *et al.*, 2008).

Cuando MetH une MeCbl, se produce un cambio conformacional donde el sustituyente axial inferior, el DMB, es desplazado por la histidina 759 (His759) del motivo DxHxxG de la proteína, adquiriendo la conformación *base-off/His-on* (Figura 8). Este motivo está también conservado en enzimas dependientes de AdoCbl como metilmalonil-CoA mutasa y glutamato mutasa. Por lo tanto, la presencia de este motivo es un indicador del modo de unión a cobalamina *base-off/His-on* (Drennan *et al.*, 1994).

## I. Introducción



**Figura 8. Estructura del dominio de unión a B<sub>12</sub> de MetH.** Se representa en amarillo el subdominio de haz de hélices, en verde el subdominio Rossmann, en magenta la MeCbl, con el ligando axial superior en azul y el cobalto en rosa. En la estructura se observa cómo la MeCbl queda atrapada entre ambos subdominios. La His759 participa en el desplazamiento del DMB y en la formación del estado *base-off/His-on* (Drennan *et al.*, 1994). Código de acceso de *Protein Data Bank* (PDB): 1BMT.

### I.3.1.2.2 Enzimas dependientes de AdoCbl: isomerasas

Las isomerasas son la familia más numerosa de enzimas dependientes de B<sub>12</sub> en bacterias, donde juegan un papel importante en los procesos fermentativos (mutasa de glutamato y metilmalonil-CoA mutasa) y en la conversión de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos (por la reductasa de ribonucleótidos). La única enzima dependiente de AdoCbl que está tanto en bacterias como en arqueas y animales es la metilmalonil-CoA mutasa, que en humanos participa en la degradación de los ácidos grasos y algunos aminoácidos (tales como isoleucina, valina, metionina y treonina). La sintasa de metionina y la metilmalonil-CoA mutasa son las únicas dos enzimas dependientes de vitamina B<sub>12</sub> en humanos. Mutaciones que afectan a esta última enzima provocan aciduria metilmalónica, una enfermedad relativamente rara donde la conversión del metilmalonil-CoA a succinil-CoA está bloqueada y, por lo tanto, se incrementa la concentración de ácido metilmalónico. En casos muy severos de la enfermedad puede afectar al pH de la sangre del paciente, dando lugar a defectos en el desarrollo (Chalmers *et al.*, 1982).

Todas las enzimas dependientes de AdoCbl inician la catálisis promoviendo la rotura homolítica del enlace Co-C en respuesta a la unión del sustrato a sus sitios activos en la enzima, dando lugar a los radicales 5'-desoxiadenosilo y la cob(II)alamina. El resultado de la catálisis enzimática es una isomerización donde se intercambian hidrógenos entre carbonos del sustrato y de la AdoCbl para favorecer el reordenamiento estructural del sustrato (Kräutler *et al.*, 2012).

Las reacciones de isomerización dependientes de AdoCbl están basadas en el uso de radicales, por lo que se deben llevar a cabo en condiciones controladas para prevenir reacciones no deseadas y secuestrar los intermediarios oxidativos (Banerjee & Ragsdale, 2003). Por ello, estas enzimas unen AdoCbl en una cavidad que se origina fruto de la unión de dos dominios: un dominio de unión a sustrato, normalmente un barril TIM ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, y un dominio de unión a AdoCbl que puede ser tipo Rossmann u otro distinto (Dowling *et al.*, 2012).

### I.3.2 Regulación de la expresión génica mediada por cobalamina

Además de servir como cofactor enzimático de importantes reacciones bioquímicas, la vitamina B<sub>12</sub> puede actuar como regulador de la expresión génica, bien por medio de ribointerruptores (Nahvi *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002) o como cromóforo en la familia de fotorreceptores AerR (Cheng *et al.*, 2014) y CarH (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011).

#### I.3.2.1 Ribointerruptores

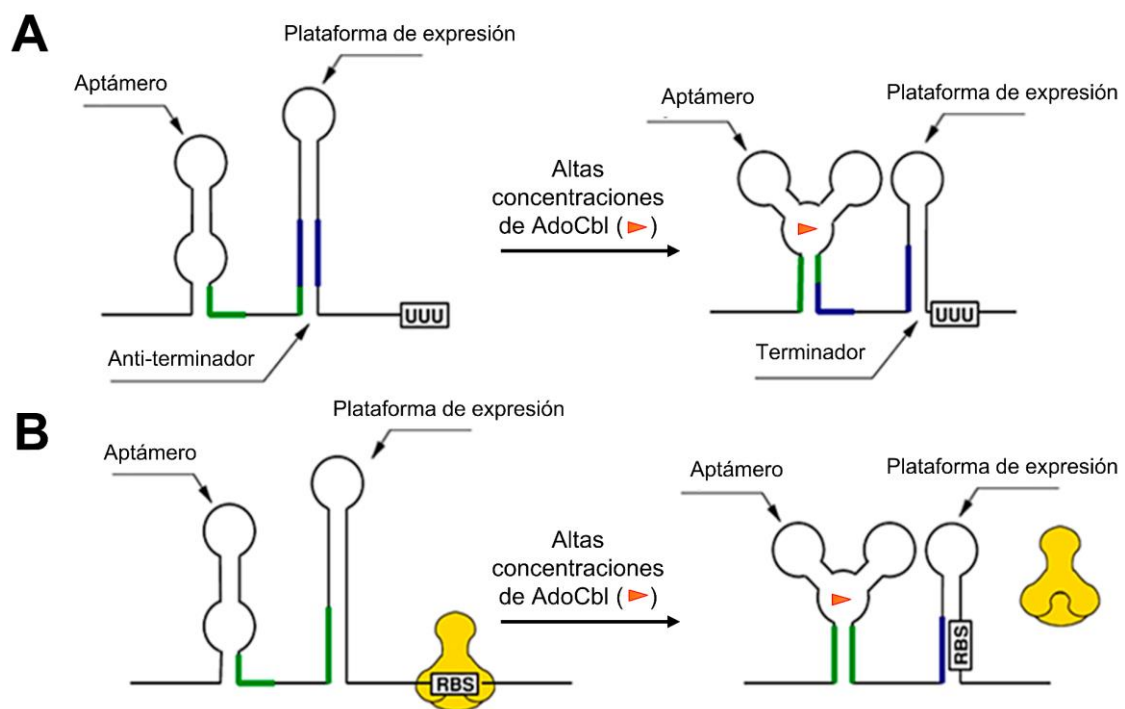
Los ribointerruptores son segmentos reguladores de una molécula de mRNA, que se unen a una molécula pequeña, lo que provoca un cambio conformacional que resulta en una alteración en la regulación transcripcional o traduccional. Los ribointerruptores se encuentran principalmente en bacterias y arqueas, pero también se han encontrado algunos en plantas y hongos (Breaker, 2018).

El primer ribointerruptor descubierto y el segundo que está evolutivamente más extendido es el que reconoce la AdoCbl. Desde hacía tiempo se sabía que la AdoCbl inhibía, de alguna manera, la expresión del gen *btuB* de *E. coli* y del operón *cob* de *Salmonella typhimurium* y que ambos conservaban una secuencia en el extremo 5' UTR que era importante para dicho control. Estos genes están involucrados en mantener una concentración adecuada de cobalamina en la célula. Sin embargo, no fue hasta 2002 cuando se demostró que la AdoCbl se unía a la región 5' UTR de *btuB* y promovía la reorganización del mRNA de una región de 315 nucleótidos en el extremo 5' UTR del

## I. Introducción

mensajero del gen *btuB*, regulando su expresión (Mandal & Breaker, 2004; Nahvi *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002). Actualmente, se sabe que los ribointerruptores son un elemento de control génico muy extendido en procariontas (Nahvi *et al.*, 2004) y hay evidencia de que controlan otros genes por medio de otros metabolitos como pirofosfato de tiamina (TPP), flavín mononucleótido (FMN), S-adenosil metionina (SAM), guanina y lisina (Mandal & Breaker, 2004).

En procariontas, la mayoría de ribointerruptores se localizan en la región 5' UTR de los mRNAs y se componen de dos dominios funcionales, el aptámero y la plataforma de expresión (Figura 9). El aptámero reconoce específicamente a un determinado metabolito, mientras que la plataforma de expresión (localizada inmediatamente aguas abajo) sirve para transducir la señal de la unión del metabolito para que se produzca el control génico, modulando alostéricamente la estructura de la región 5' UTR (Winkler & Breaker, 2003). Normalmente, la secuencia del aptámero está altamente conservada, mientras la secuencia de la plataforma de expresión varía mucho incluso en organismos evolutivamente cercanos (Mandal & Breaker, 2004).



**Figura 9. Representación esquemática del control de la expresión génica por ribointerruptores dependientes de B<sub>12</sub>.** Se representan dos ribointerruptores que actúan a nivel transcripcional (A) y traduccional (B). La estructura del mRNA es más compleja que la representada aquí. Se colorea de amarillo el ribosoma. RBS: sitio de unión al ribosoma. Modificado de Santillán & Mackey (2005).

En el caso del ribointerruptor de AdoCbl, se conocen dos mecanismos de control de la expresión génica. El primero (Figura 9A) regula la transcripción del RNA porque el ligando induce la formación de un terminador intrínseco de la transcripción, que es una estructura en forma de horquilla seguida de seis o más nucleótidos de uracilo que provoca la interrupción de la transcripción antes de que esta incluya a la porción codificante del mRNA (Gusarov & Nudler, 1999; Yarnell & Roberts, 1999). Cuando la concentración celular de AdoCbl no es suficiente, el aptámero no une AdoCbl, favoreciendo la formación de una horquilla “anti-terminadora” que permite la transcripción del mRNA completo. El segundo mecanismo (Figura 9B) funciona a nivel traduccional. En este último caso, la unión de la AdoCbl al aptámero provoca un cambio conformacional en el mRNA que impide la unión del ribosoma a su sitio de unión en el mensajero (Mandal & Breaker, 2004).

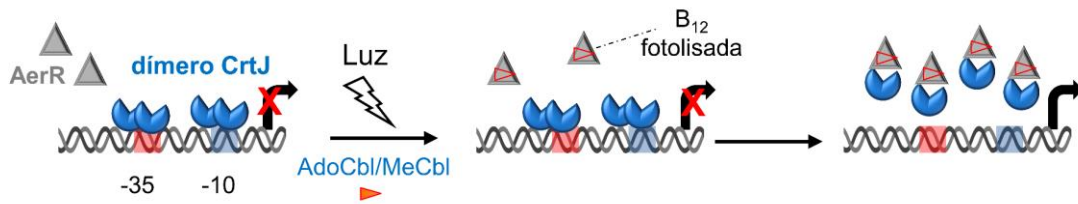
### I.3.2.2 Regulación de la expresión génica mediada por AerR

Hasta el descubrimiento de CarH en *M. xanthus*, no se había descrito ningún mecanismo de regulación de la expresión génica dependiente de B<sub>12</sub> en el que se emplee una proteína reguladora capaz de unirse a cobalamina y regular la expresión génica de una forma dependiente de la luz (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011; Pérez-Marín *et al.*, 2008). Sin embargo, en 2014, Cheng *et al.*, descubrieron otro modo de regulación parecido, donde la cobalamina, junto a la proteína AerR, juega un importante papel como fotorregulador en la bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus*.

AerR es una proteína de unión a B<sub>12</sub>, sin ningún dominio efector, que se encuentra tanto en *R. capsulatus* como en otras Alphaproteobacterias. AerR es el antirrepresor de CrtJ, un represor aeróbico de la expresión de los genes carotenogénicos. El dímero de CrtJ, en la oscuridad y en presencia de oxígeno, se une cooperativamente a dos secuencias palíndricas en tándem (TG<sub>N</sub>TN<sub>12</sub>ACA) situadas en los promotores de los genes diana (genes involucrados en la síntesis de carotenos, hemo, bacterioclorofila y proteínas estructurales del complejo fotosintético II), solapando con los elementos -35 y -10, para impedir el acceso de la polimerasa de RNA (RNAP) y, por tanto, reprimir la transcripción (Cheng *et al.*, 2012) (Figura 10).

En *R. capsulatus* se ha demostrado que AerR, con luz, une OHCbl, producto de la fotólisis de la AdoCbl o MeCbl. OHCbl-AerR es capaz de interactuar con el dímero de CrtJ con una estequiometría 1:1 AerR:CrtJ, desorganizar su oligomerización y, por tanto, su unión al DNA, desmantelando su actividad represora (Cheng *et al.*, 2014, 2016) (Figura 10).

## I. Introducción



**Figura 10. Control de la regulación génica de los genes fotosintéticos en *R. capsulatus* en presencia de oxígeno.** En gris se representa a AerR, en azul a CrtJ y en rojo la vitamina B<sub>12</sub>. Modificado de Padmanabhan *et al.* (2017).

AerR presenta el motivo consenso de unión a cobalaminas E/DxHxxG, típico del modo de unión *base-off/His-on*, que utiliza para unir la OHCbl. En esta unión están implicadas dos histidinas, una correspondiente a la unión *base-off/His-on* del dominio de unión a B<sub>12</sub> (His145) y otra que no está conservada en sus homólogos y parece estar implicada en establecer un enlace de coordinación con el Co tras la liberación del grupo metilo o 5'-desoxiadenosilo (His10), actuando de esta forma como ligando axial superior (Cheng *et al.*, 2014). Este último enlace, llamado bis-His, es muy estable y común en el caso de grupos hemo y solo se ha confirmado en el caso de las cobalaminas para CarH (Jost *et al.*, 2015a).

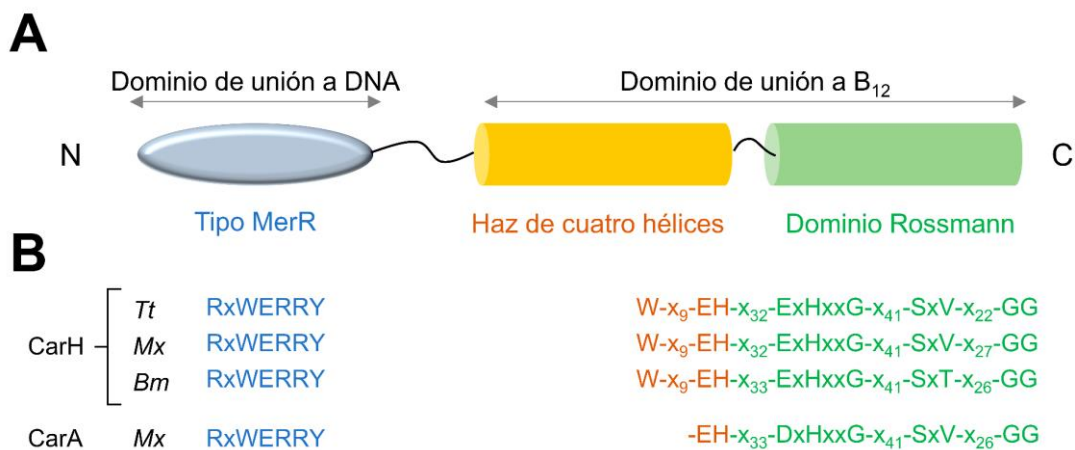
Más recientemente, el mismo grupo de investigación ha demostrado que AerR es traducida en dos isoformas diferentes: una larga (LAerR), predominante en condiciones fotosintéticas y que fue el objeto de los estudios anteriores, y otra corta (SAerR), que carece de 41 aminoácidos en el extremo amino terminal. LAerR se une fuertemente a la OHCbl (formada tras la fotólisis de la MeCbl/AdoCbl) a través del enlace bis-His, pero SAerR carece de la histidina implicada en dicho enlace, lo que le permite unir diferentes formas de B<sub>12</sub>. LAerR, en la luz, promueve la transcripción no solo de genes fotosintéticos, sino también de otros que afectan al metabolismo celular y a la motilidad de estas células (Yamamoto *et al.*, 2018). Otro estudio reciente del mismo grupo de investigación sostiene que la unión de OHCbl-LAerR a CrtJ, en lugar de desmoronar la unión al DNA de CrtJ, promueve un cambio en su interacción con el DNA, incrementando la extensión del DNA con el que interacciona (Fang & Bauer, 2017).

Quedan todavía más estudios para dilucidar con exactitud la regulación de la expresión genética llevada a cabo por AerR-CrtJ, pero está claro que en este proceso la vitamina B<sub>12</sub> juega un papel clave como cromóforo.



### I.3.3 El fotorreceptor CarH

Los reguladores transcripcionales CarA y CarH de *M. xanthus* son proteínas parálogas muy parecidas, con un porcentaje de identidad de secuencia del 35% y de similitud del 49% (Botella *et al.*, 1995; Cervantes & Murillo, 2002). En la Figura 11A se muestra la arquitectura de dominios de ambas proteínas. En su extremo N-terminal presentan un dominio de unión al DNA que adopta un plegamiento hélice-giro-hélice con dos “alas”, del tipo presente en los reguladores transcripcionales de la familia MerR (Jost *et al.*, 2015a; Navarro-Avilés *et al.*, 2007; Zheleznova Heldwein & Brennan, 2001), lo que les permite participar en la regulación directa de la expresión génica. Sin embargo, mientras que CarA y CarH funcionan como represores de la carotenogénesis en una respuesta a la luz, las otras proteínas de esta familia de factores transcripcionales procarióticos, de la que MerR (*mercury-sensing regulator*) es el arquetipo, son activadores de la transcripción de genes de resistencia a metales en respuesta a la presencia de dichos compuestos (Brown *et al.*, 2003). Por otro lado, mientras que los miembros de la familia MerR suelen presentar un dominio C-terminal que une un determinado metal, el dominio correspondiente de CarA y CarH presenta el motivo consenso de unión a cobalamina [D/ExHxxG, donde x representa cualquier aminoácido] típico del modo de unión *base-off/His-on* (Figura 11B) y, acorde con esta similitud, es capaz de unir cobalamina (Cervantes & Murillo, 2002; Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011; Pérez-Marín *et al.*, 2008).



**Figura 11. Arquitectura de los dominios de CarA y CarH, y los aminoácidos conservados evolutivamente.** **A)** Representación gráfica de los dominios de CarA y CarH. Se representa desde el extremo N-terminal (N) al extremo C-terminal (C): el dominio de unión al DNA (en azul), el haz de cuatro hélices (en amarillo) y el dominio Rossmann (en verde). **B)** Aminoácidos conservados evolutivamente en los diferentes dominios de CarA y CarH, donde x significa cualquier aminoácido. Abreviaturas: *Tt*, *Thermus thermophilus*; *Mx*, *Myxococcus xanthus*; *Bm*, *Bacillus megaterium*.

## 1. Introducción

Sorprendentemente, a pesar de que CarA es capaz de unir cobalaminas a través de su dominio C-terminal, no las requiere para llevar a cabo su función (López-Rubio *et al.*, 2002; Pérez-Marín *et al.*, 2008). Los ensayos de doble híbrido han demostrado que el dominio C-terminal media la oligomerización de CarA y que dicha oligomerización no se ve afectada por la luz ni alterada por las mutaciones en el dominio de unión a B<sub>12</sub> (Pérez-Marín *et al.*, 2008). Sin embargo, el dominio C-terminal es importante para favorecer la unión al DNA *in vitro* e imprescindible *in vivo*, ya que la expresión a niveles fisiológicos del dominio N-terminal por sí solo no es suficiente para restaurar el fenotipo silvestre para la carotenogénesis (Pérez-Marín *et al.*, 2004).

El descubrimiento de que la vitamina B<sub>12</sub> (en alguna de sus formas biológicamente activas) regula la síntesis fotoinducible de carotenoides a través de CarH se produjo al estudiar el efecto de la vitamina B<sub>12</sub> en una estirpe carente de CarA ( $\Delta carA$ ). Con dicha estirpe, que muestra una coloración anaranjada debido a la expresión en oscuridad del operón *carB*, se observó que la adición de vitamina B<sub>12</sub> al medio rescataba el fenotipo silvestre para la respuesta a la luz y que dicho rescate se perdía si, además, se eliminaba *carH* o si se introducían mutaciones en su motivo de unión a cobalaminas. Estos resultados demostraron que la vitamina B<sub>12</sub> es necesaria para la función represora de la proteína CarH, siendo por tanto CarH, a diferencia de CarA, un regulador transcripcional dependiente de cobalaminas (Pérez-Marín *et al.*, 2008).

El modo en el que CarH y la vitamina B<sub>12</sub> regulan la expresión génica, y la demostración, por primera vez, de la existencia de una familia de fotorreceptores bacterianos (CarH) dependientes de AdoCbl, fueron publicados en 2011, por el mismo grupo en el que se ha realizado la presente Tesis Doctoral (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011). En este estudio se demostró que la vitamina B<sub>12</sub>, junto con la presencia o no de luz, modula *in vivo* el estado oligomérico de la proteína. Como no se pudo purificar CarH de *M. xanthus* de forma nativa, se buscó una proteína homóloga en otro microorganismo para poder estudiarla con más profundidad. El hecho de que la bacteria termofílica *Thermus thermophilus* tuviera un homólogo de CarH (CarH<sub>Tt</sub>) fue bastante ventajoso porque las proteínas termofílicas suelen ser solubles y fácilmente purificables, posibilitando los análisis bioquímicos y estructurales. Además, se demostró que una proteína quimérica con el dominio N-terminal de CarH fusionado al dominio C-terminal de CarH<sub>Tt</sub> se comportaba *in vivo* como el propio CarH y era capaz de unirse *in vitro* al promotor del operón *carB*. Estos resultados sugirieron que, cualquiera que fuese el modo de acción preciso de CarH y CarH<sub>Tt</sub>, ambas proteínas son funcionalmente equivalentes. CarH<sub>Tt</sub> se pudo purificar a partir de su sobreexpresión en *E. coli*,

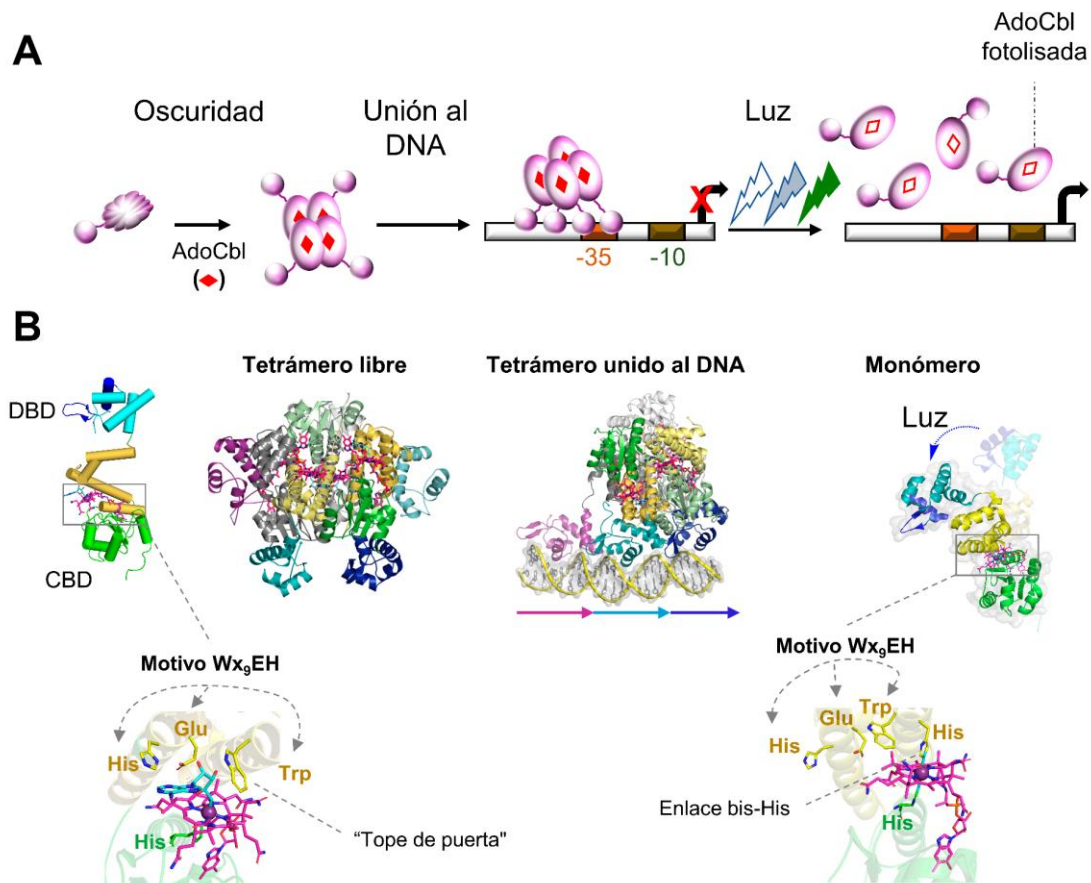
permitiendo descifrar el mecanismo de acción de CarH, la base molecular de su dependencia a B<sub>12</sub> y la forma específica de B<sub>12</sub> utilizada.

Ortiz-Guerrero *et al.* (2011) demostraron que CarH, que tiene un dominio de unión a B<sub>12</sub> muy parecido al de MetH, no depende de MeCbl, en contra de lo esperado, sino de AdoCbl. Solo en presencia de AdoCbl y en oscuridad, la apoproteína monomérica CarH<sub>Tt</sub> forma un tetrámero (con una estequiometría 1:1 AdoCbl:CarH<sub>Tt</sub>) capaz de unirse al DNA operador y reprimir la transcripción (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011), explicándose así la necesidad de B<sub>12</sub> para que ocurra la represión mediada por CarH. Por otro lado, se demostró que la exposición de AdoCbl:CarH<sub>Tt</sub> a la luz ultravioleta, azul o verde (pero no la roja), que causa la fotólisis de la AdoCbl (Bond *et al.*, 1972), provoca el desmantelamiento del tetrámero a monómeros que no se unen al DNA, permitiendo de esta forma el acceso de la RNAP al promotor y la expresión de los genes carotenogénicos (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011) (Figura 12A). Estos resultados supusieron el descubrimiento de una nueva faceta para la AdoCbl, la de actuar como cromóforo de una nueva familia de fotorreceptores que, a la vez, actúan como reguladores directos de la transcripción.

En 2015, fruto de la colaboración entre el grupo de investigación en el que se ha realizado la presente Tesis Doctoral y el laboratorio dirigido por la Prof. Catherine L. Drennan (Department of Chemistry & Department of Biology, Howard Hughes Medical Institute, Massachusetts Institute of Technology), se publicó la base estructural de la regulación génica mediada por CarH (Jost *et al.*, 2015a) (Figura 12B). La estructura cristalográfica de la forma unida a AdoCbl reveló que el tetrámero de CarH<sub>Tt</sub> está constituido por dos dímeros en orientación cabeza-cola. En cada uno de los protómeros, la estructura del dominio de unión a AdoCbl es sorprendentemente similar a la del dominio de unión a MeCbl de MetH, y la AdoCbl se dispone entre el haz de cuatro hélices y el subdominio Rossmann. En el subdominio Rossmann destaca el motivo ExHxxG, típico del modo de unión *base-off/His-on*, cuya histidina (H177) contacta con la parte inferior de la AdoCbl, actuando como ligando axial inferior, al desplazar al DMB (Figura 12B). La clave para que CarH<sub>Tt</sub> una AdoCbl y no MeCbl reside en el haz de cuatro hélices, en el que llaman la atención un Trp (W131), un Glu (E141) y una His (H142) que “adornan” el grupo adenosilo de la AdoCbl y que se encuentran altamente conservados en los miembros de la familia CarH, constituyendo el motivo W-x<sub>9</sub>-EH (Figura 11B y 12B). La presencia de este motivo y un pequeño movimiento del haz de cuatro hélices es lo que permite que CarH<sub>Tt</sub> acomode el grupo adenosilo, bastante más voluminoso que el grupo metilo, en el bolsillo de unión. Acorde con la importancia del motivo W-x<sub>9</sub>-EH, la mutación de cualquiera de los residuos conservados debilita la unión

## I. Introducción

de la AdoCbl a la proteína. Cabe destacar que el Trp de dicho motivo actúa como “tope de puerta” contra el grupo adenosilo, manteniendo el protómero de AdoCbl-CarH en una conformación “estirada o erecta”, necesaria para el ensamblaje del tetrámero en oscuridad (Jost *et al.*, 2015a) (Figura 12B). Resulta curioso que CarA, que es capaz de unir B<sub>12</sub> aunque no la requiere para su función (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011), tiene la Glu y la His, pero no el Trp (Figura 11B).



**Figura 12. Modo de acción de CarH. A)** Representación esquemática del modo de acción de CarH. La AdoCbl se muestra como un rombo rojo relleno (forma intacta) o vacío (forma fotolisada). CarH se muestra con sus dos dominios: el dominio de unión a DNA (círculo) y el dominio de unión a AdoCbl (óvalo). La forma unida a AdoCbl es un tetrámero en el caso de CarH<sub>Tt</sub> y un oligómero cuya envergadura se desconoce en el caso de CarH de *M. xanthus*. Modificado de Padmanabhan *et al.* (2021). **B)** Estructuras cristalográficas de CarH<sub>Tt</sub>. De izquierda a derecha: estructura del protómero unido a AdoCbl, del tetrámero en la oscuridad libre o unido al DNA, y del monómero formado tras la exposición a la luz. Los dominios de CarH se representan coloreados como en la Figura 11 y la AdoCbl en magenta exceptuando el grupo adenosilo, coloreado en azul. Códigos de acceso PDB: 5C8D (tetrámero en la oscuridad), 5C8E (tetrámero unido al DNA), 5C8F (monómero formado tras la exposición a la luz). Modificado de Padmanabhan *et al.* (2021).

La estructura del complejo con el DNA reveló un sorprendente modo de unión, donde tres de los cuatro dominios de unión a DNA (DBD) del tetrámero de CarH<sub>Tt</sub> contactan con el DNA (Figura 12B). Este modo de unión fue también corroborado

mediante ensayos de *footprinting* con radicales hidroxilo y retrasos de movilidad electroforética con sondas mutantes del operador de CarH<sub>Tt</sub>. El tetrámero tiene la misma arquitectura unido al DNA o libre, salvo el hecho de que los tres DBD se reorientan hacia el DNA para contactar con el operador (Figura 12B). El operador consta de tres repeticiones directas en tándem de 11 pares de bases, con la secuencia consenso nAnnTnnACAn (n: cualquier nucleótido), de entre las cuales la segunda contiene la región -35 del promotor, lo que explicaría que la unión de CarH<sub>Tt</sub> al operador reprima la transcripción (por bloqueo de la unión de la RNAP) (Jost *et al.*, 2015a). Este modo de unión de CarH difiere notablemente de otras proteínas MerR, que suelen reconocer secuencias operadoras más pequeñas y pseudopalindrómicas (Philips *et al.*, 2015).

La liberación del grupo adenosilo tras la fotólisis de la AdoCbl provoca que el haz de cuatro hélices del que forma parte el Trp del motivo W-x<sub>9</sub>-EH se mueva por el vacío que deja esta pérdida, provocando un cambio conformacional en el protómero de CarH<sub>Tt</sub>, desde su disposición “estirada o erecta” en la oscuridad a una conformación “doblada” en la luz (Figura 12B) que conlleva el desmantelamiento del tetrámero a monómeros (Jost *et al.*, 2015a). El cambio conformacional que provoca la luz hace que la His132, adyacente al Trp del motivo W-x<sub>9</sub>-EH, se coloque como ligando axial superior del cobalto en la cobalamina, formándose un enlace bis-His (Figura 12B). Aunque este tipo de enlace es común en proteínas que unen hemo, nunca se había observado en una proteína que une cobalamina.

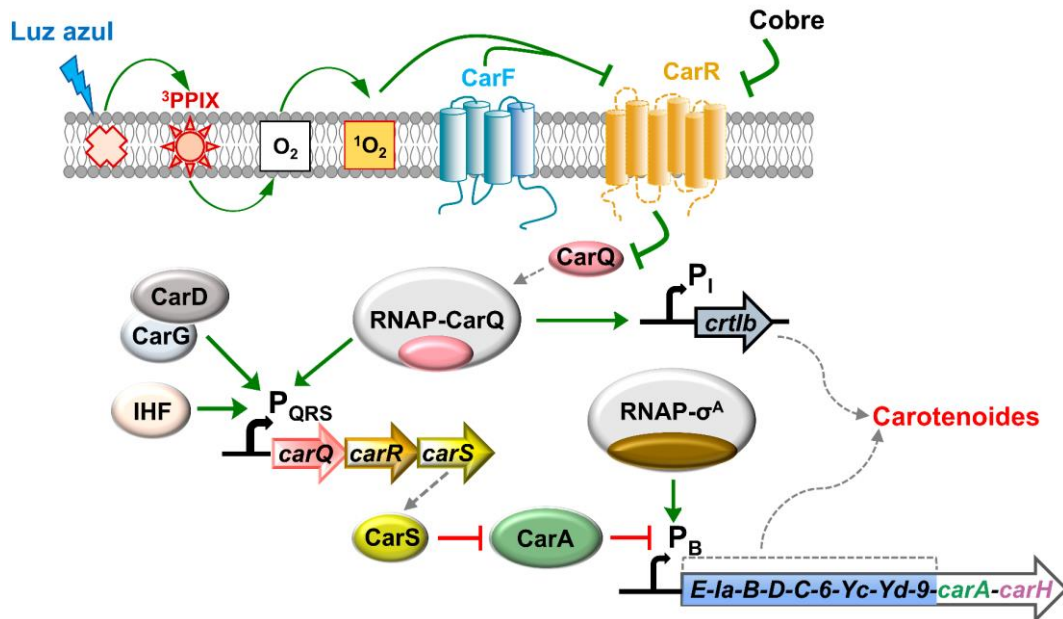
La fotólisis de AdoCbl libre genera radicales 5'-deoxiadenosilo. Resultaría, por tanto, paradójico que la exposición a la luz de AdoCbl-CarH produzca radicales que puedan dañar la célula, cuando la función última de CarH es precisamente proteger a la célula de este tipo de radicales nocivos provocados por la luz. Sin embargo, se ha demostrado que la fotólisis de AdoCbl en CarH<sub>Tt</sub> no produce el radical 5'-deoxiadenosilo sino una molécula inocua, no reactiva, llamada 4',5'-anhidroadenosina (Jost *et al.*, 2015b).

#### I.4 Mecanismo de respuesta a la luz independiente de B<sub>12</sub>

*M. xanthus* presenta un segundo mecanismo de respuesta a la luz que es independiente de CarH y de B<sub>12</sub>. En este mecanismo intervienen varias proteínas, algunas de las cuales presentan una similitud llamativa con enzimas y factores transcripcionales eucarióticos (Elías-Arnanz *et al.*, 2008, 2010; Galbis-Martínez *et al.*, 2008; Padmanabhan *et al.*, 2021). Entre los elementos que participan en esta vía de regulación de la respuesta a la luz, resumida en la Figura 13, juega un papel clave el

## I. Introducción

operón *carQRS* que codifica tres proteínas: CarQ, un factor  $\sigma$ -ECF (de función extracitoplasmática); su factor anti- $\sigma$ , CarR; y el antirrepresor CarS. CarR es una proteína transmembranal capaz de interactuar físicamente, secuestrar y, por tanto, inactivar a CarQ en oscuridad. En condiciones de iluminación, CarR libera a CarQ, que ahora puede asociarse a la RNAP y activar su propio promotor ( $P_{QRS}$ ) (Browning *et al.*, 2003) y el del locus *crtIb* ( $P_I$ ), que codifica *CrtIb*, una enzima carotenogénica (Martinez-Argudo *et al.*, 1998).



**Figura 13. Modelo de regulación de la respuesta a la luz por la vía independiente de  $B_{12}$  en *M. xanthus*.** La luz azul excita a la protoporfirina IX (PPIX), que genera  $^1O_2$ . El  $^1O_2$  inactiva al factor anti- $\sigma$  CarR mediante un mecanismo en el que participa CarF, liberando al factor  $\sigma$  CarQ, que se une a la RNAP y activa la expresión de su propio promotor ( $P_{QRS}$ ) y el de *crtIb* ( $P_I$ ). Esta activación es dependiente del complejo CarD/CarG y de IHF. Una vez se expresan los genes del operón *carQRS*, CarS se une al represor CarA, bloqueando su unión al DNA y permitiendo así la expresión de los genes carotenogénicos que se encuentran en el operón *carB*. La presencia de cobre también provoca la inactivación de CarR, pero de una forma independiente de CarF y luz. Modificada de Padmanabhan *et al.* (2021).

A diferencia de la ruta dependiente de  $B_{12}$ , que responde a luz UV, azul y verde, la ruta independiente de  $B_{12}$  es específica de la luz azul, pero en ella no participa ningún fotorreceptor al uso. En su lugar, la luz azul es detectada por la protoporfirina IX (PPIX), una molécula hidrofóbica que, por motivos desconocidos, se acumula en la membrana de *M. xanthus* (sobre todo en fase estacionaria). La PPIX, con la exposición a la luz azul, pasa a un estado triplete excitado ( $^3PPIX$ ) que transfiere su energía al  $O_2$ , produciendo  $^1O_2$ . Mediante un proceso que requiere la participación de la proteína transmembranal CarF, el  $^1O_2$  acaba provocando la inactivación de CarR y la liberación de CarQ, que puede unirse entonces al núcleo de la RNAP y activar la transcripción de sus genes

diana (Elías-Arnanz *et al.*, 2011; Galbis-Martínez *et al.*, 2012). Que CarF interactuara físicamente con CarR en el sistema del doble-híbrido bacteriano llevó a postular un posible papel anti-anti- $\sigma$  para CarF que, por un mecanismo desconocido, participaría en la inactivación directa de CarR (Galbis-Martínez *et al.*, 2008). Curiosamente, el cobre, que también es responsable de la formación de ROS (aunque no de  $^1\text{O}_2$ ) puede activar esta misma ruta, pero lo hace de forma independiente de CarF y por un mecanismo aún por determinar (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2005) (Figura 13).

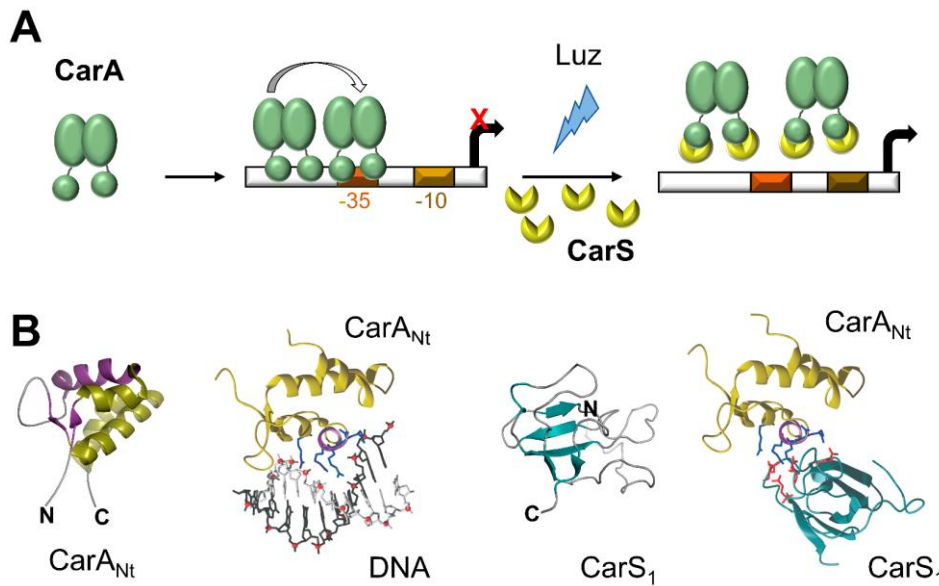
Además de CarQ, para que se activen los promotores  $P_{\text{QRS}}$  y  $P_{\text{I}}$  son necesarias las proteínas CarD y CarG, que forman un complejo transcripcional que presenta rasgos típicamente eucarióticos y que regula múltiples procesos celulares (Abellón-Ruiz *et al.*, 2014; Bernal-Bernal *et al.*, 2018; Elías-Arnanz *et al.*, 2010; Nicolás *et al.*, 1994; Peñalver-Mellado *et al.*, 2006). Por otro lado, la activación de  $P_{\text{QRS}}$  requiere también la proteína IHF (*Integration host factor*). Esta proteína, ampliamente distribuida en bacterias, está también implicada en procesos relacionados con el DNA como el empaquetamiento del cromosoma, la recombinación y la regulación de la transcripción (Browning *et al.*, 2010; Moreno *et al.*, 2001).

Por último, para que se exprese el operón *carB* es necesaria la proteína antirrepresora CarS, que contrarresta la represión ejercida por CarA sobre  $P_{\text{B}}$ . (Figura 13) (López-Rubio *et al.*, 2004).

#### I.4.1 Regulación de $P_{\text{B}}$ por el sistema CarA-CarS

Estudios *in vivo*, *in vitro* y estructurales han llevado al modelo de acción molecular para la regulación del operón *carB* por CarA y CarS que se resume en la Figura 14A. En oscuridad, CarA se une en forma de dímeros a su operador bipartito en el promotor  $P_{\text{B}}$ . Se ha propuesto que CarA primero se une con alta afinidad a una secuencia palindrómica interrumpida perfecta (pl), localizada aguas arriba de  $P_{\text{B}}$  y, después, cooperativamente a un segundo sitio pseudopalindrómico de baja afinidad (pII) que solapa con la región -35 del promotor (López-Rubio *et al.*, 2004). Es posible, sin embargo, que CarA utilice el mismo modo de unión que CarH, reconociendo repeticiones directas en el operador. En cualquier caso, la unión de CarA a su operador impide el acceso de la RNAP al promotor y, por tanto, la expresión del operón *carB* (López-Rubio *et al.*, 2002, 2004). En la luz, se expresa el antirrepresor CarS, que es capaz de unirse con una estequiometría 1:1 con el dominio de unión a DNA de CarA (Pérez-Marín *et al.*, 2004), impidiendo así su unión al DNA y, por tanto, su actividad represora de la carotenogénesis (Figura 14A).

## I. Introducción



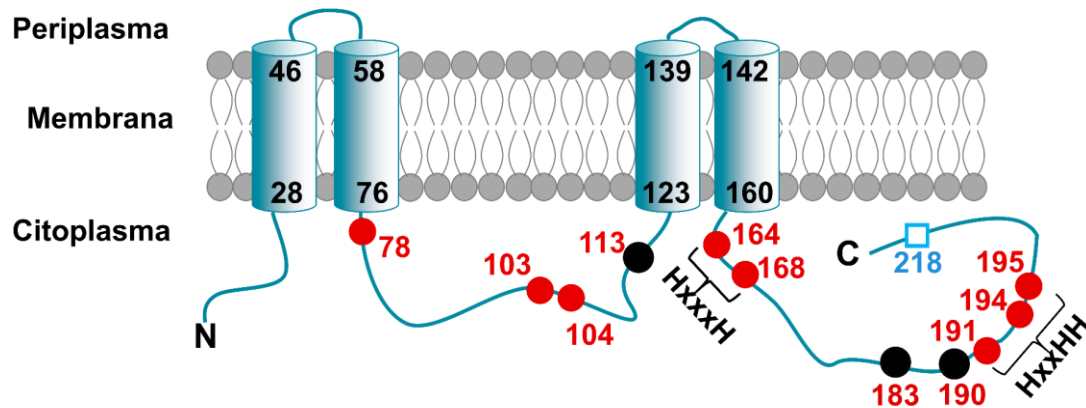
**Figura 14. Modo de acción de CarA y CarS de *M. xanthus*.** A) Se representa esquemáticamente a CarA en verde y a CarS en amarillo. B) Estructuras de CarA<sub>Nt</sub> (código de acceso en PDB: 2JML), de CarS<sub>1</sub> (una forma truncada de CarS, PDB: 2KSS) y los modelos estructurales de los complejos CarA<sub>Nt</sub>-DNA y CarA<sub>Nt</sub>-CarS<sub>1</sub>. Modificada de Padmanabhan *et al.* (2021).

La estructura tridimensional de CarS reveló un plegamiento tipo barril con 5 hebras  $\beta$  antiparalelas que imita la estructura y distribución de cargas del DNA del operador, lo que permite que el antirrepresor se una a la hélice de reconocimiento del DNA de CarA con una alta afinidad (Figura 14B) (León *et al.*, 2010; Navarro-Avilés *et al.*, 2007). Que la afinidad de CarS por CarA (Navarro-Avilés *et al.*, 2007) sea mayor que la de CarA por P<sub>B</sub> (León *et al.*, 2010), unido al incremento de la expresión de *carS* en la luz, explica la base molecular de la acción antirrepresora de CarS.

### I.4.2 La proteína transmembranal CarF

De entre las proteínas conocidas, CarF es la que actúa más temprano en el mecanismo de respuesta a la luz independiente de B<sub>12</sub>. Es una proteína de 281 aminoácidos imprescindible para la activación de los promotores P<sub>QRS</sub>, P<sub>I</sub> y P<sub>B</sub> por la luz. CarF se localiza en la membrana y, según las predicciones validadas experimentalmente, presenta 4 hélices transmembranales, estando la primera y la tercera orientadas hacia el espacio periplásmico y la segunda y la cuarta hacia el citoplasma (Galbis-Martínez *et al.*, 2008) (Figura 15). El análisis de su secuencia aminoacídica no refleja similitud con ningún fotorreceptor conocido, pero sí con unas proteínas de función desconocida ampliamente distribuidas en eucariotas y denominadas Kua/TMEM189 (en animales) o FAD4 (en plantas) (Fontes *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2009; Thomson *et al.*, 2000).





**Figura 15. Topología de CarF en la membrana y disposición de sus 12 histidinas.** Los cilindros azules representan las hélices transmembrales. En círculo se representan las histidinas conservadas en todos los homólogos de CarF (rojo) o en al menos el 50% de los homólogos (negro). El cuadrado azul representa la histidina presente únicamente en *M. xanthus*. Los corchetes engloban los motivos de histidinas con un patrón similar a los observados en hidroxilasas y desaturasas de ácidos grasos. Modificada de Galbis-Martínez *et al.* (2008).

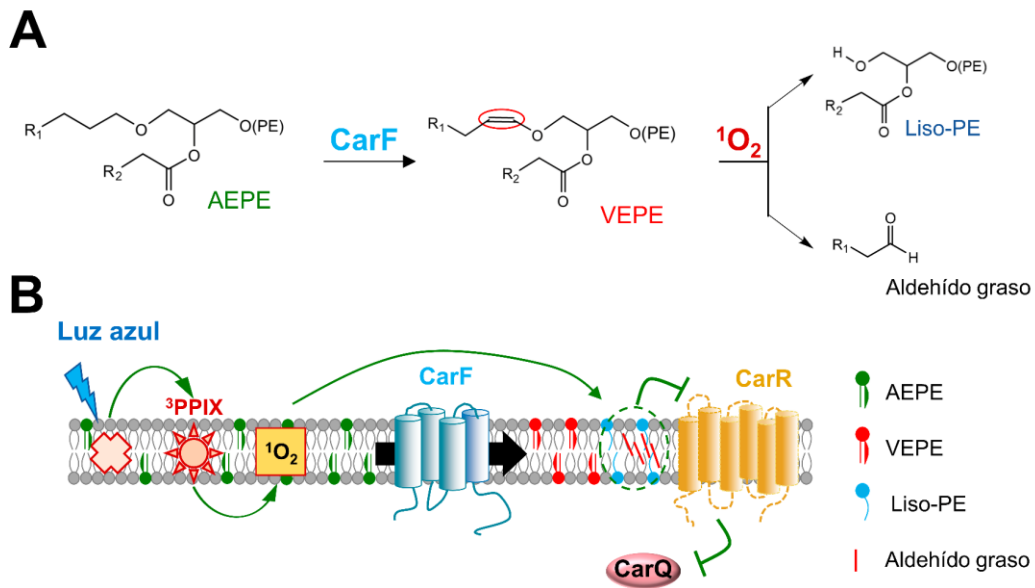
Una de las características de las proteínas Kua/TMEM189/FAD4 es la presencia de varias histidinas conservadas, algunas de ellas distribuidas siguiendo un patrón parecido al de hidroxilasas y desaturasas de ácidos grasos (HxxxH y HxxHH) (Figura 15) que, en otras proteínas, están involucradas en la formación de un complejo de dihierro, implicado en las interacciones con el O<sub>2</sub> y su activación para la oxidación del sustrato (Bai *et al.*, 2015; Shanklin *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 2015). Concretamente, CarF tiene 12 histidinas que, según la topología de la proteína en la membrana, estarían todas localizadas en el citoplasma. Ocho de estas histidinas están conservadas en todas las proteínas homólogas; tres solo están presentes en los homólogos de animales y de algunas bacterias, mientras que la His218 solo se encuentra en *M. xanthus* (Figura 15). Ya se ha demostrado que cinco de las histidinas de CarF (His78, His103, His113, His164 e His195) son importantes para su función en *M. xanthus*, pero no se descarta que el resto de las histidinas conservadas tengan un papel relevante. Por otro lado, la mutación de la His218 no tiene ningún efecto, acorde con su presencia únicamente en CarF (Fontes *et al.*, 2003; Galbis-Martínez *et al.*, 2008). También se ha demostrado que una extensión de unos 40 aminoácidos en el extremo C-terminal de CarF, que no está presente en el resto de proteínas homólogas, es prescindible para su función (Galbis-Martínez *et al.*, 2008).

Hasta el estudio de Gao *et al.* (2009), no se conocía la actividad funcional de ninguna de las proteínas que presentan homología con CarF. En dicho estudio se

## 1. Introducción

demostró que FAD4 (*Fatty Acid Desaturase 4*), uno de los tres homólogos de CarF presentes en la planta *Arabidopsis thaliana*, se localiza en la membrana de los cloroplastos y presenta una actividad desaturasa atípica. La gran mayoría de los ácidos grasos de las membranas de plantas contienen dobles enlaces en configuración *cis*. FAD4, sin embargo, genera un inusual doble enlace *trans* en la cadena del ácido graso que ocupa la posición *sn-2* de un fosfatidilglicerol (Gao *et al.*, 2009). Que el lípido resultante no esté presente en *M. xanthus* ni en animales, y que FAD4 carezca de la His113, esencial para la actividad de CarF, apunta a que CarF podría tener una función diferente a la de FAD4. No obstante, el parecido global de CarF con FAD4 (31% de identidad, 45% de homología) y la presencia de los mencionados motivos de histidinas sugiere que CarF podría ser también una desaturasa de ácidos grasos, aunque con una especificidad distinta. De ser así, el lípido resultante podría estar implicado en la detección del  $^1\text{O}_2$ , producto de la fotoexcitación de la PPIX, y desencadenar la respuesta genética que culmina con la síntesis de carotenos.

En los últimos años, el grupo de investigación en el que se ha realizado la presente Tesis Doctoral ha explorado la posibilidad de que CarF y sus homólogos animales, con los que comparte una identidad del 41-46% (56-59% de similitud), tengan actividad desaturasa de ácidos grasos. Los resultados obtenidos han sido publicados en un artículo en la revista *Science*, en el que el doctorando es coautor (Gallego-García *et al.*, 2019) y que no se ha incluido como parte del compendio de publicaciones, pero sí se presenta como anexo (Anexo II). En este estudio se demuestra que CarF y sus homólogos en animales (incluido el humano), pero no en plantas, son funcionalmente equivalentes y que, además, se corresponden con la desaturasa implicada en la síntesis de los plasmalógenos y buscada durante décadas. Los plasmalógenos (vinil éter fosfatidiletanolamina o VEPE) son un tipo particular de glicerofosfolípidos caracterizados por la presencia de un enlace vinil éter en la posición *sn-1* del glicerol, en lugar del típico enlace éster (Braverman & Moser, 2012; Dean & Lodhi, 2018). El enlace vinil éter de los plasmalógenos se produce por desaturación del enlace éter en el lípido precursor (alquil éter fosfatidiletanolamina o AEPE) y CarF/TMEM189 es precisamente la enzima responsable de dicha desaturación, dependiente de oxígeno (Gallego-García *et al.*, 2019) (Figura 16A). Así pues, CarF se requiere en la respuesta a la luz, no porque detecte directamente el estrés fotooxidativo, sino porque se requiere para la síntesis de los plasmalógenos que, al contrario que sus precursores, son esenciales en la cascada de señalización que culmina con la síntesis de carotenos (Gallego-García *et al.*, 2019) (Figura 16B).



**Figura 16. Papel de CarF y el  $^1O_2$  en la respuesta a la luz de *M. xanthus*.** **A)** Reacción enzimática llevada a cabo por CarF, que produce la desaturación del enlace éter en el AEPE para dar lugar al VEPE. El enlace vinil éter del VEPE es sensible a  $^1O_2$ , rompiéndose la molécula y liberándose un aldehído graso y la forma liso-PE. Se resalta en rojo el doble enlace vinil éter que genera CarF en el precursor para dar lugar al plasmalógeno. Abreviaturas: PE (fosfatidiletanolamina). Modificado de Gallego-García *et al.* (2019). **B)** Modelo de respuesta a la luz azul en *M. xanthus* mediada por plasmalógenos. Imagen modificada de Padmanabhan *et al.* (2021).

En el árbol de la vida, los plasmalógenos presentan una distribución muy atípica, ya que están ampliamente distribuidos en animales, pero están ausentes en plantas y hongos y, entre las bacterias aerobias, están restringidos a *M. xanthus* y otras mixobacterias (las únicas bacterias con homólogos genuinos de CarF, además de *Leptospira*) (Gallego-García *et al.*, 2019; Goldfine, 2017). Los plasmalógenos son componentes esenciales de las membranas celulares y, en mamíferos, abundan en cerebro, corazón y leucocitos, habiéndose asociado su deficiencia con varias enfermedades como cáncer y Alzheimer (Braverman & Moser, 2012; Dean & Lodhi, 2018; Messias *et al.*, 2018), pero nunca antes con la señalización del estrés fotooxidativo. La sensibilidad del enlace vinil éter al ataque por ROS (Jenkins *et al.*, 2018; Morand *et al.*, 1988; Zoeller *et al.*, 1988) podría ser la clave de su participación en un mecanismo para detectar la luz en *M. xanthus*, que no tiene precedentes. Como ocurre *in vitro*, la generación de  $^1O_2$  *in vivo* por la fotoexcitación de la PPIX podría provocar la rotura del plasmalógeno en lisofosfatidiletanolamina (liso-PE) y un aldehído graso (Gallego-García *et al.*, 2019) (Figura 16A). Estos compuestos podrían alterar las propiedades de la membrana y/o reaccionar con CarR en el caso del aldehído graso, provocando su inactivación y la liberación de CarQ (Figura 16B).



## **II. OBJETIVOS**



Como se ha comentado en la Introducción, *M. xanthus* dispone de dos rutas paralelas para responder a la luz. Una de ellas, la más simple, depende del fotorreceptor CarH y su asociación con AdoCbl, una de las formas biológicamente activas de la vitamina B<sub>12</sub>. La otra ruta, mucha más compleja, depende de CarA (un parálogo de CarH, pero independiente de B<sub>12</sub>) y de un conjunto especial de factores, algunos típicamente eucarióticos. Profundizar en el modo de acción de los fotorreceptores de la familia CarH en procariotas y en cómo han evolucionado las dos rutas que controlan la respuesta a la luz en mixobacterias han sido los objetivos globales de esta Tesis Doctoral. Dichos objetivos se han abordado a través de los siguientes objetivos específicos:

1. **Caracterización del homólogo de CarH de *Bacillus megaterium* (CarH<sub>Bm</sub>).** Los resultados obtenidos a partir de este objetivo se recogen en la siguiente publicación:

Fernández-Zapata, J.\* , Pérez-Castaño, R.\*, Aranda, J., Colizzi, F., Polanco, M. C., Orozco, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2018). Plasticity in oligomerization, operator architecture and DNA binding in the mode of action of a B<sub>12</sub>-based CarH photoreceptor. *Journal of Biological Chemistry*, 293(46), 17888–17905.

\*Co-primeros autores

Las conclusiones 1, 2, 3, 4 y 14 derivan de este objetivo.

2. **Caracterización del homólogo de CarH de *Cystobacter fuscus* (CarH<sub>Cfu</sub>) y *Cystobacter ferrugineus* (CarH<sub>Cfe</sub>).** El siguiente trabajo, incluido como un anexo (Anexo I), detalla los resultados obtenidos al cumplir este objetivo:

Pérez-Castaño, R., Bastida-Martinez, E., Fernández-Zapata, J., Polanco, M. C., Galbis-Martínez M.L., Iniesta A.A., Fontes, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2021\*). Evolution of B<sub>12</sub>-dependent and independent photoregulation of carotenogenesis in Myxococcales. \*Pendiente de ser enviado.

Las conclusiones 7, 8, 9, 10 y 14 derivan de este objetivo.

3. **Estudio del efecto sobre CarH de la AdoRhbl, un análogo sintético de la AdoCbl.** Los resultados obtenidos se han incluido como un anexo (Anexo III) y se están recopilando para la redacción de un artículo.

La conclusión 13 deriva de este objetivo.

4. **Revisión bibliográfica de los trabajos publicados hasta el momento sobre CarH, la conservación en su modo de acción, su distribución filogenética, y sus aplicaciones en optogenética y en biología sintética.** La consecución de este objetivo queda reflejada en las siguientes publicaciones:

Padmanabhan, S., Pérez-Castaño, R., & Elías-Arnanz, M. (2019). B<sub>12</sub>-based photoreceptors: from structure and function to applications in optogenetics and synthetic biology. *Current Opinion in Structural Biology*, 57, 47–55.

Padmanabhan, S., Pérez-Castaño, R., Osete-Alcaráz, L., Polanco, M. C., & Elías-Arnanz, M. (2022\*). Vitamin B<sub>12</sub> photoreceptors. *Vitamins and Hormones*, 119. Aceptado para publicación (se adjunta carta de aceptación del editor). \*Fecha prevista de publicación.

5. **Conservación evolutiva de la ruta dependiente e independiente de B<sub>12</sub> en mixobacterias.** El siguiente trabajo, incluido como un anexo (Anexo I), detalla los resultados obtenidos al cumplir este objetivo:

Pérez-Castaño, R., Bastida-Martínez, E., Fernández-Zapata, J., Polanco, M. C., Galbis-Martínez M.L., Iniesta A.A., Fontes, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2021\*). Evolution of B<sub>12</sub>-dependent and independent photoregulation of carotenogenesis in Myxococcales. \*Pendiente de ser enviado.

Las conclusiones 5, 6, 7, 11 y 12 derivan de este objetivo.

6. **Función de CarF, distribución filogenética y conservación evolutiva de su función en animales (incluido el ser humano).** Los resultados obtenidos a partir de este objetivo se detallan en la siguiente publicación, no incluida como parte del compendio de artículos sino como un anexo (Anexo II):

Gallego-García, A., Monera-Girona, A. J., Pajares-Martínez, E., Bastida-Martínez, E., Pérez-Castaño, R., Iniesta, A. A., Fontes, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2019). A bacterial light response reveals an orphan desaturase for human plasmalogen synthesis. *Science*, 366(6461), 128–132. Las conclusiones 15 y 16 derivan de este objetivo.



7. **Revisión bibliográfica de la regulación de la síntesis de carotenos en respuesta a la luz de *Myxococcus xanthus*.** La consecución de este objetivo queda reflejada en la siguiente publicación:

Padmanabhan, S., Monera-Girona, A. J., Pérez-Castaño, R., Bastida-Martínez, E., Pajares-Martínez, E., Bernal-Bernal, D., Galbis-Martínez, M. L., Polanco, M. C., Iniesta, A. A., Fontes, M., & Elías-Arnanz, M. (2021). Light-triggered carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: new paradigms in photosensory signaling, transduction and gene regulation. *Microorganisms*, 9(5), 1067.



## **III. PUBLICACIONES**



### III.1 Plasticity in oligomerization, operator architecture and DNA binding in the mode of action of a B<sub>12</sub>-based CarH photoreceptor.

Fernández-Zapata, J.\*, Pérez-Castaño, R.\*, Aranda, J., Colizzi, F., Polanco, M. C., Orozco, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2018). Plasticity in oligomerization, operator architecture and DNA binding in the mode of action of a B<sub>12</sub>-based CarH photoreceptor. *Journal of Biological Chemistry*, 293(46), 17888–17905.

\*Co-primeros autores

DOI: 10.1074/jbc.RA118.004838

#### **Abstract:**

Newly discovered bacterial photoreceptors called CarH sense light by using 5'-deoxyadenosylcobalamin (AdoCbl). They repress their own expression and that of genes for carotenoid synthesis by binding in the dark to operator DNA as AdoCbl-bound tetramers, whose light-induced disassembly relieves repression. High-resolution structures of *Thermus thermophilus* CarH<sub>Tt</sub> have provided snapshots of the dark and light states and have revealed a unique DNA-binding mode whereby only three of four DNA-binding domains contact an operator comprising three tandem direct repeats. To gain further insights into CarH photoreceptors and employing biochemical, spectroscopic, mutational, and computational analyses, here we investigated CarH<sub>Bm</sub> from *Bacillus megaterium*. We found that apoCarH<sub>Bm</sub>, unlike monomeric apoCarH<sub>Tt</sub>, is an oligomeric molten globule that forms DNA-binding tetramers in the dark only upon AdoCbl binding, which requires a conserved W-X<sub>9</sub>-EH motif. Light relieved DNA binding by disrupting CarH<sub>Bm</sub> tetramers to dimers, rather than to monomers as with CarH<sub>Tt</sub>. CarH<sub>Bm</sub> operators resembled that of CarH<sub>Tt</sub>, but were larger by one repeat and overlapped with the -35 or -10 promoter elements. This design persisted in a six-repeat, multipartite operator we discovered upstream of a gene encoding an Spx global redox-response regulator whose photoregulated expression links photooxidative and general redox responses in *B. megaterium*. Interestingly, CarH<sub>Bm</sub> recognized the smaller CarH<sub>Tt</sub> operator, revealing an adaptability possibly related to the linker bridging the DNA- and AdoCbl-binding domains. Our findings highlight a remarkable plasticity in the mode of action of B<sub>12</sub>-based CarH photoreceptors, important for their biological functions and development as optogenetic tools.

**Contribuciones del doctorando:**

El trabajo del doctorando contribuyó a establecer qué genes regula CarH<sub>Bm</sub>, así como su modo de unión a los operadores que regula y los cambios en su estado oligomérico, lo que sirvió para mostrar una plasticidad inesperada en el modo de acción molecular de los fotorreceptores CarH. Además, el doctorando participó en el análisis y discusión de los datos, así como en la edición y revisión crítica del artículo.

## III.2 B<sub>12</sub>-based photoreceptors: from structure and function to applications in optogenetics and synthetic biology

Padmanabhan, S., Pérez-Castaño, R., & Elías-Arnanz, M. (2019). B<sub>12</sub>-based photoreceptors: from structure and function to applications in optogenetics and synthetic biology. *Current Opinion in Structural Biology*, 57, 47–55.

DOI: 10.1016/j.sbi.2019.01.020

### **Abstract:**

Vitamin B<sub>12</sub>-based photoreceptor proteins sense ultraviolet (UV), blue or green light using 5'-deoxyadenosylcobalamin (AdoCbl). The prototype of this widespread bacterial photoreceptor family, CarH, controls light-dependent gene expression in photoprotective cellular responses. It represses transcription in the dark by binding to operator DNA as an AdoCbl-bound tetramer, whose disruption by light relieves operator binding to allow transcription. Structures of the 'dark' (free and DNA-bound) and 'light' CarH states and studies on the unusual AdoCbl photochemistry have provided fundamental insights into these photoreceptors. We highlight these, the plasticity within a conserved mode of action among CarH homologs, their distribution, and their promising applications in optogenetics and synthetic biology.

### **Contribuciones del doctorando:**

El doctorando contribuyó al análisis del modo de acción y de la distribución filogenética tanto de CarH como de su versión unimodular, compuesta únicamente por el dominio de unión a B<sub>12</sub>. Además, participó en la revisión crítica de las figuras y del manuscrito.





### III.3 Vitamin B<sub>12</sub> photoreceptors

Padmanabhan, S., Pérez-Castaño, R., Osete-Alcaráz, L., Polanco, M. C., & Elías-Arnanz, M. (2022\*). Vitamin B<sub>12</sub> photoreceptors. *Vitamins and Hormones*, 119. Aceptado para publicación (adjunto carta de aceptación del editor)

\*Fecha prevista de publicación.

#### **Abstract:**

Photoreceptor proteins enable living organisms to sense light and transduce this signal into biochemical outputs to elicit appropriate cellular responses. Their light sensing is typically mediated by covalently or noncovalently bound molecules called chromophores, which absorb light of specific wavelengths and modulate protein structure and biological activity. Known photoreceptors have been classified into about ten families based on the chromophore and its associated photosensory domain in the protein. One widespread photoreceptor family uses coenzyme B<sub>12</sub> or 5'-deoxyadenosylcobalamin, a biological form of vitamin B<sub>12</sub>, to sense ultraviolet, blue or green light, and its discovery revealed both a new type of photoreceptor and a novel functional facet of this vitamin, best known as an enzyme cofactor. Large strides have been made in our understanding of how these B<sub>12</sub>-based photoreceptors function, high-resolution structural descriptions of their functional states are available, as are details of their unusual photochemistry. Additionally, they have inspired notable applications in optogenetics/optobiochemistry and synthetic biology. Here, we provide an overview of what is currently known about these B<sub>12</sub>-based photoreceptors, their discovery, distribution, molecular mechanism of action, and the structural and photochemical basis of how they orchestrate signal transduction and gene regulation, and how they have been used to engineer optogenetic control of protein activities in living cells.

#### **Contribuciones del doctorando:**

El doctorando contribuyó analizando la estructura de proteínas de unión a cobalaminas, así como la del ribointerruptor de AdoCbl, para la elaboración de las figuras. También participó en la revisión crítica de las figuras y del manuscrito.



Elsevier Inc  
525 B Street, Suite 1650  
San Diego, CA 92101  
United States  
t +1 619 231 6616  
f +1 619 699 6320  
elsevier.com

14 July, 2021

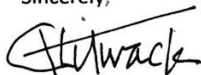
Re: Acceptance/publication of your invited chapter "Vitamin B12 photoreceptors" for the book, *VITAMIN B12*

Dear Dr. Elias-Amanz,

Your invited chapter "Vitamin B12 photoreceptors" authored by S. Padmanabhan, Ricardo Perez-Castano, Lucia Osete-Alcaraz, Maria Carmen Polanco and Montserrat Elias-Amanz for the new book entitled *VITAMIN B12*, which corresponds to volume 119 of the book series *VITAMINS & HORMONES*, has been reviewed and accepted for publication.

You will probably receive your proof for final corrections, if any, about a month or so before the final printing. The expected publication date for the book is May or June of 2022 but also could be sooner than that. After publication, you will receive an electronic copy of your chapter plus an electronic version of the entire book.

Sincerely,



Gerald Litwack, PhD

Editor of *VITAMIN B12*, and Series Editor of *Vitamins & Hormones*,

Formerly, Professor of Molecular & Cellular Medicine

Associate Director, Institute for Regenerative Medicine

Texas A&M Health Science Center

[gerald.litwack@gmail.com](mailto:gerald.litwack@gmail.com)

### III.4 Anexo I: Evolution of B<sub>12</sub>-dependent and independent photoregulation of carotenogenesis in Myxococcales

Pérez-Castaño, R., Bastida-Martinez, E., Fernández-Zapata, J., Polanco, M. C., Galbis-Martínez M.L., Iniesta A.A., Fontes, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2021\*). Evolution of B<sub>12</sub>-dependent and independent photoregulation of carotenogenesis in Myxococcales. \*Pendiente de ser enviado.

#### **Abstract:**

Light-induced carotenogenesis is a photoprotective response in many organisms. In *Myxococcus xanthus*, a soil bacterium with a complex lifestyle, it relies on direct photosensory regulation by the coenzyme B<sub>12</sub>-based CarH photoreceptor, which represses carotenogenesis in the dark, and on a parallel signaling cascade involving singlet oxygen (produced by photoexcited protoporphyrin IX), the B<sub>12</sub>-independent CarH paralog CarA, various proteins (some eukaryotic-like), and plasmalogens (glycerophospholipids typically metazoan). Why two pathways coexist and how they evolved remains enigmatic. We performed comparative genomic and phylogenetic analyses across 27 genomes of the order Myxococcales, experimentally validated various CarH/A homologs, and analyzed how light and B<sub>12</sub> affect carotenogenesis in representative myxobacteria. CarH was identified in all three Myxococcales suborders, with *carH* located predominantly among carotenoid biosynthesis genes. However, CarA and its associated set of unique factors occur only in Cystobacterineae, with *carA* and *carH* invariably in tandem in a syntenic carotenogenic operon. Intriguingly, every CarA pathway factor except CarA occurs in *Cystobacter/Melittangium*, whose CarH differs from well-characterized tetramer homologs in being active as a B<sub>12</sub>-bound dimer, with CarA-like cooperative stepwise DNA binding that is abrogated by the CarA antirepressor CarS, besides direct photoinactivation. Our analyses imply significant plasticity in CarH oligomerization, operator design, and DNA binding. Gene duplication and divergence of an ancestral light-sensing B<sub>12</sub>-dependent CarH, *de novo* gene emergence and horizontal gene transfer possibly entailed the extensive genetic rewiring that originated the intricate CarA-dependent pathway, which might have evolved to cope with limited B<sub>12</sub> and whose coexistence with CarH likely confers fitness advantage and adaptability.

**Contribuciones del doctorando:**

El doctorando contribuyó a establecer el modo de acción de los homólogos de CarH que se han analizado en el artículo, a determinar su modo de unión a los operadores que regulan y los cambios en su estado oligomérico, Además, participó en los análisis bioinformáticos realizados, en el análisis y discusión de los datos, así como en la edición y revisión crítica del artículo.

### III.5 Anexo II: A bacterial light response reveals an orphan desaturase for human plasmalogen synthesis

Gallego-García A., Monera-Girona A.J., Pajares-Martínez E., Bastida-Martínez E., Pérez-Castaño R., Iniesta A.A., Fontes M., Padmanabhan S., Elías-Arnanz M. (2019). A bacterial light response reveals an orphan desaturase for human plasmalogen synthesis. *Science*. 366, 128–132.

Abstract:

Plasmalogens are glycerophospholipids with a hallmark *sn*-1 vinyl ether bond. These lipids are found in animals and some bacteria and have proposed membrane organization, signaling, and antioxidant roles. We discovered the plasmanylethanolamine desaturase activity that is essential for vinyl ether bond formation in a bacterial enzyme, CarF, which is a homolog of the human enzyme TMEM189. CarF mediates light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*, and plasmalogens participate in sensing photooxidative stress through singlet oxygen. TMEM189 and other animal homologs could functionally replace CarF in *M. xanthus*, and knockout of TMEM189 in a human cell line eliminated plasmalogens. Discovery of the human plasmanylethanolamine desaturase will spur further study of plasmalogen biogenesis, functions, and roles in disease.

#### **Contribuciones del doctorando:**

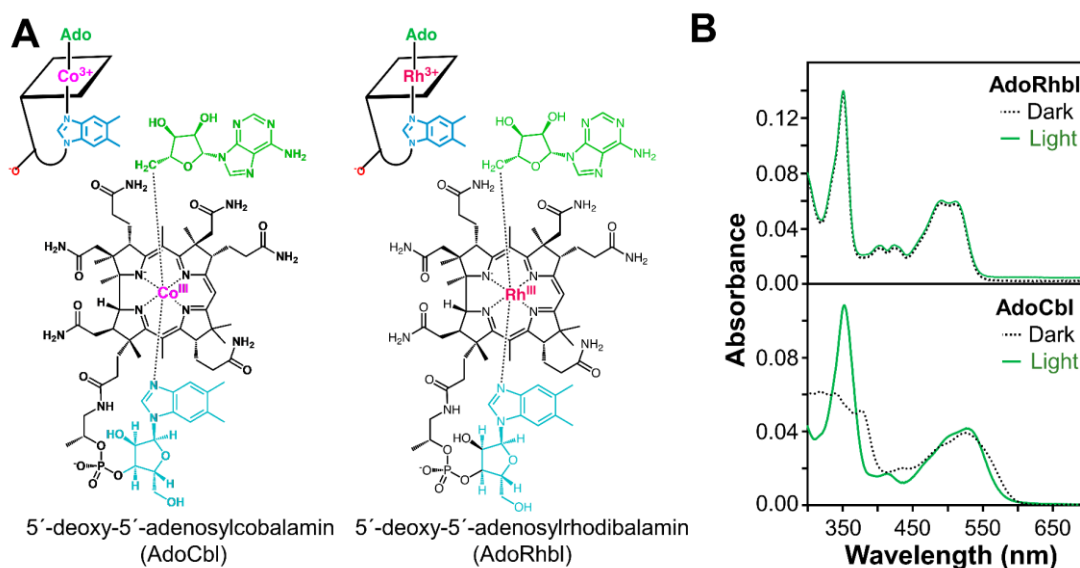
El doctorando realizó el análisis filogenético de CarF, así el estudio de la conservación evolutiva de sus homólogos y el análisis mutacional de las histidinas conservadas en la proteína TMEM189 humana. Además, participó tanto en el análisis y discusión de los datos, como en la revisión crítica del artículo.



### III.6 Anexo III. Unpublished results: Effects of adenosylrhodibalamin, a nonnatural adenosylcobalamin homolog, on the CarH photoreceptor

Cobalt is central to the biochemistry of AdoCbl, but why cobalt and not another metal was chosen by nature remains a longstanding question. Here, we address this by examining how a synthetic AdoCbl homolog with rhodium replacing cobalt, 5'-deoxy-5'-adenosylrhodibalamin (AdoRhbl), binds to AdoCbl-based CarH photoreceptors and affects oligomerization, DNA binding and function *in vitro* and *in vivo*. This analysis has been carried out in a collaborative work with Prof. Bernhard Kräutler (Center for Molecular Biosciences Innsbruck) and Prof. Martin J. Warren (University of Kent), whose laboratories produce this compound.

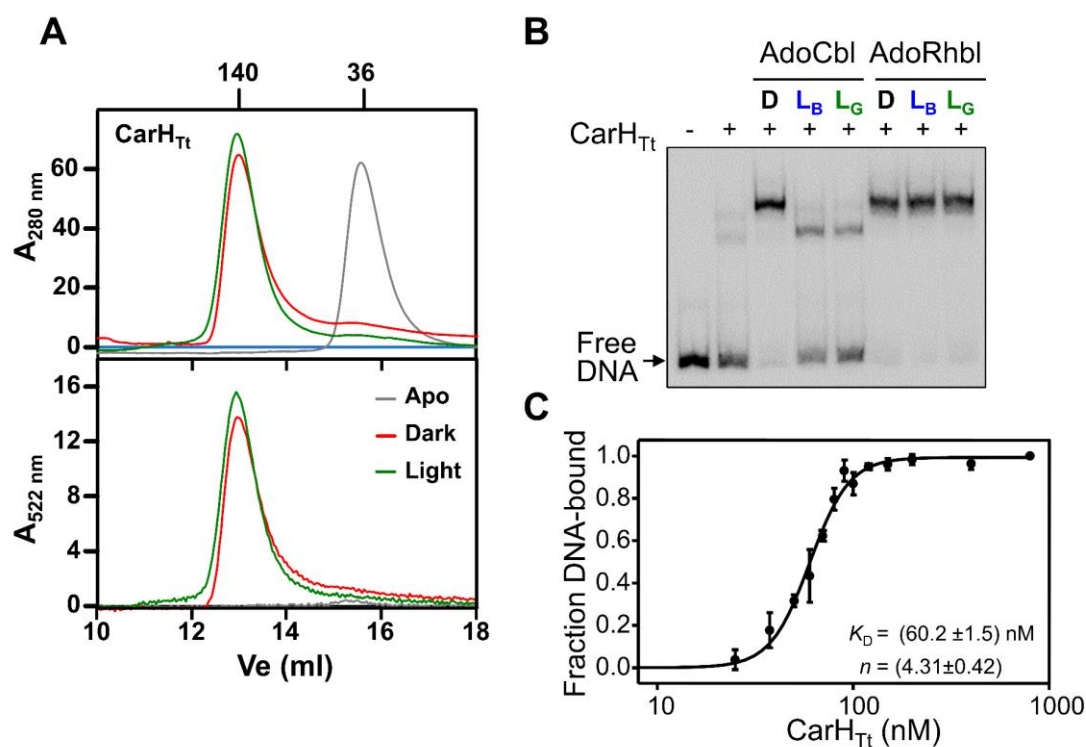
AdoRhbl structurally mimics AdoCbl (Figure 1A), with Rh<sup>III</sup> fitting in the corrin ring even better than the slightly smaller Co<sup>III</sup> (Widner *et al.*, 2016). Interestingly, AdoRhbl seems more photostable than AdoCbl and its UV-visible spectrum (Figure 1B) resembles not the “unique” UV-visible spectrum of AdoCbl (or MeCbl), but the “typical” spectrum of photolyzed AdoCbl, OHCbl or CNCbl. Moreover, AdoRhbl appears to inhibit B<sub>12</sub>-based enzyme activity (Widner *et al.*, 2016) but how AdoRhbl directly interacts with proteins remains unexplored.



**Figure 1. AdoCbl and its synthetic rhodium homolog AdoRhbl. A)** Chemical structures in the base-on conformation of AdoCbl and AdoRhbl, with simple cartoon representations on top. The central cobalt or rhodium is in the +3 state, and the upper axial 5'-adenosyl (Ado) and lower axial dimethylbenzimidazole (DMB) ligands are depicted in green and cyan, respectively. **B)** UV-visible spectra of AdoRhbl and AdoCbl in the dark and exposed to light.

### AdoRhbl binds to CarH to induce assembly of DNA-binding tetramers that are unresponsive to light

To assess AdoRhbl binding to CarH and changes in its oligomerization in the dark and under light we used size-exclusion chromatography (SEC). The apoCarH<sub>Tt</sub> monomer molecular weight is 33.1 kDa, as calculated from the sequence or by mass spectrometry, and elutes with an apparent molecular mass  $M_r \approx 36$  kDa. With AdoRhbl present, CarH<sub>Tt</sub> eluted with  $M_r \approx 140$  kDa in the dark but also in the light, with the absorbance of the eluted peak at 522 nm, besides at 280 nm, indicating bound AdoRhbl (Figure 2A). Thus, like AdoCbl, AdoRhbl binds to CarH<sub>Tt</sub> and induces the formation of tetramers. However, in contrast to the dissociation of light-exposed AdoCbl-CarH<sub>Tt</sub> tetramers to monomers (Jost *et al.*, 2015; Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011), the AdoRhbl-CarH<sub>Tt</sub> tetramers are not disrupted by light.



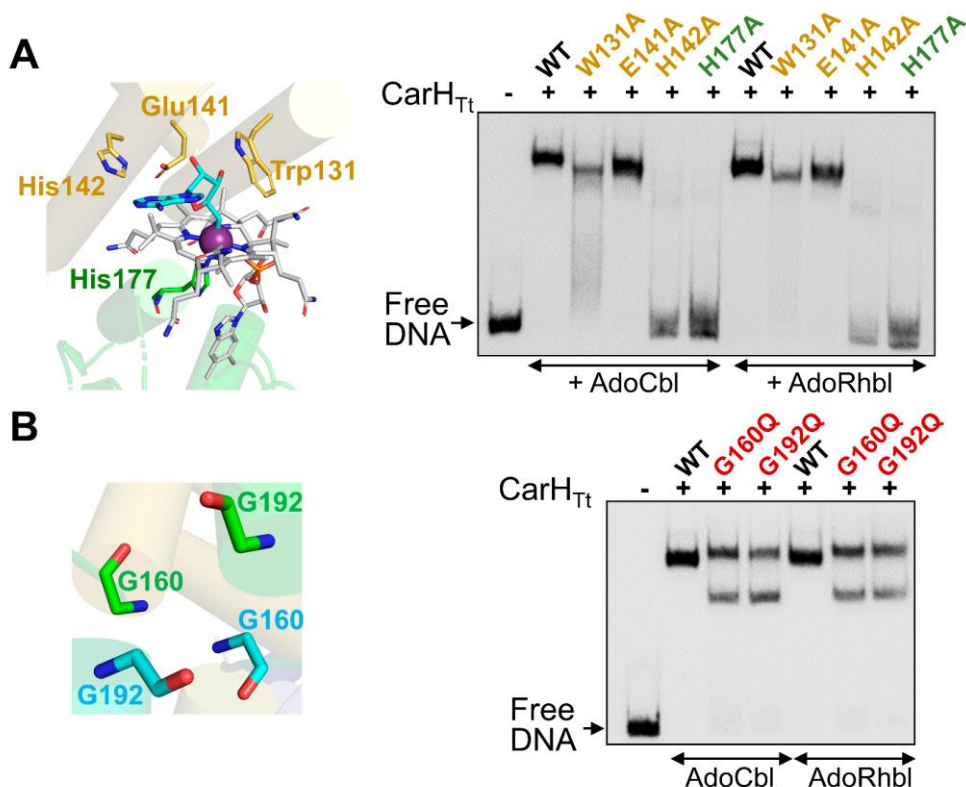
**Figure 2. Effects of AdoRhbl on CarH<sub>Tt</sub> oligomerization and DNA binding.** **A)** SEC profiles of a Superdex200 analytical column of CarH<sub>Tt</sub> in the apo form and with AdoRhbl present in the dark or after 5-min exposure to green light. Apparent molecular masses are indicated in kDa at the top. **B)** Representative EMSA gel for CarH<sub>Tt</sub> binding to a 130-bp DNA probe containing its operator-promoter region without or with a 5-fold molar excess of AdoRhbl present in the dark (“D”) or after 5-min exposure to blue (“L<sub>B</sub>”) or green (“L<sub>G</sub>”) light. **C)** EMSA titration data for CarH<sub>Tt</sub> binding to its 130-bp probe fit to the Hill equation to estimate binding affinity as  $K_D$ . Data are the mean of three independent EMSA titrations (indicated by dots with standard error bars) and the line is the fit of the data.



AdoCbl-CarH tetramers are active repressors that bind specifically to DNA in the dark and are inactivated in the light (Jost *et al.*, 2015; Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011). We therefore examined how CarH-DNA binding in the dark and upon exposure to light is affected by AdoRhbl using electrophoretic mobility shift assays (EMSA) and a 130-bp DNA probe containing the CarH<sub>Tt</sub> binding site. In the dark, CarH<sub>Tt</sub> bound to its DNA probe to yield a well-defined retarded band in the presence of AdoRhbl, just as with AdoCbl (Figure 2B). However, light (blue, green) did not abolish the specific DNA binding in the presence of AdoRhbl, in contrast to what happens with AdoCbl (Figure 2B). EMSA titrations yielded an apparent CarH<sub>Tt</sub>-DNA binding affinity,  $K_D$ , of  $(60 \pm 2)$  nM and a Hill coefficient of  $(4.3 \pm 0.4)$ , consistent with cooperative tetramer binding (Figure 2C) and comparable to those reported for CarH<sub>Tt</sub> with AdoCbl (Jost *et al.*, 2015). These results, together with the size-exclusion data, indicate that AdoRhbl induces the formation of CarH tetramers that are able to bind DNA but are insensitive to light.

### **Binding of AdoRhbl to CarH resembles that of AdoCbl**

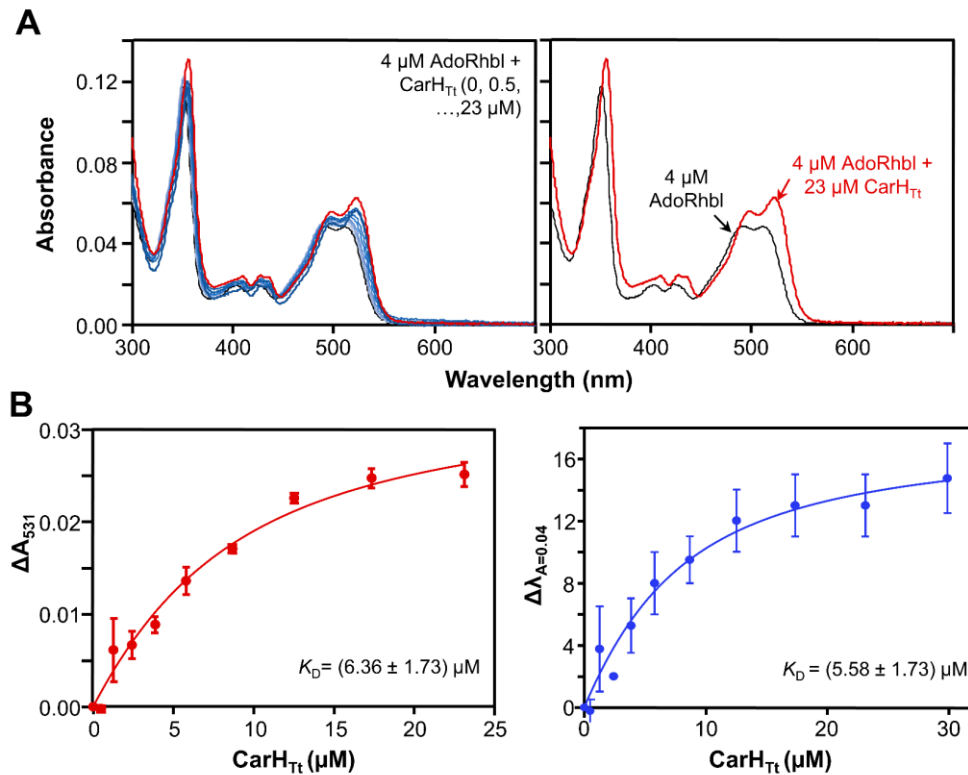
Mutation of CarH<sub>Tt</sub> residues crucial in AdoCbl recognition impair tetramer formation and DNA binding (Jost *et al.*, 2015). How purified CarH<sub>Tt</sub> variants bearing such mutations bind to DNA in the presence of AdoRhbl versus AdoCbl was analyzed by EMSA. The specific CarH<sub>Tt</sub> variants tested carried single mutations of: (i) Trp131, Glu141 or His142 to Ala of the Wx<sub>9</sub>EH motif; the lower axial ligand His177 to Ala; the two Gly (Gly160 and Gly192) at the dimer-dimer interface to Gln, a larger residue that leads to dimers instead of tetramers (Jost *et al.*, 2015). As with AdoCbl, DNA binding in the dark with AdoRhbl present was abrogated for the two His mutants, diminished for the Trp mutant, and marginally affected for the Glu variant (Figure 3A). The same pattern of DNA binding with AdoRhbl as with AdoCbl was also observed for each of the Gly mutants, yielding a lower band corresponding to one bound dimer, and an upper band with a mobility similar to that for the wild-type CarH<sub>Tt</sub> tetramer, which would correspond to two bound dimers (Figure 3B). These data indicate that AdoRhbl and AdoCbl bind CarH in a similar mode.



**Figure 3. DNA binding of CarH<sub>Tt</sub> variants in the presence of AdoRhbl versus AdoCbl. A)** Left: Close-up of the dark CarH<sub>Tt</sub> tetramer AdoCbl-binding pocket highlighting Trp131, Glu141, and His142 of the Wx<sub>9</sub>EH motif that cap the Ado group (cyan) of AdoCbl (gray), its cobalt atom (magenta sphere), and the lower axial cobalt ligand His177. Right: Representative EMSA gel comparing binding to the 130-bp DNA probe (as in Figure 2B) of the indicated CarH<sub>Tt</sub> mutants in the dark without or with a 5-fold molar excess of AdoCbl or AdoRhbl, as indicated. **B)** Left: Close-up of Gly160 and Gly192 at the dimer–dimer interface of the AdoCbl-bound CarH<sub>Tt</sub> tetramer, each of which when mutated to the larger Gln results in AdoCbl-bound dimers. Right: Representative EMSA gel comparing binding to the 130-bp DNA probe of the indicated CarH<sub>Tt</sub> mutants in the dark without or with a 5-fold molar excess of AdoCbl or AdoRhbl.

### CarH binds to AdoRhbl with lower affinity than to AdoCbl *in vitro*

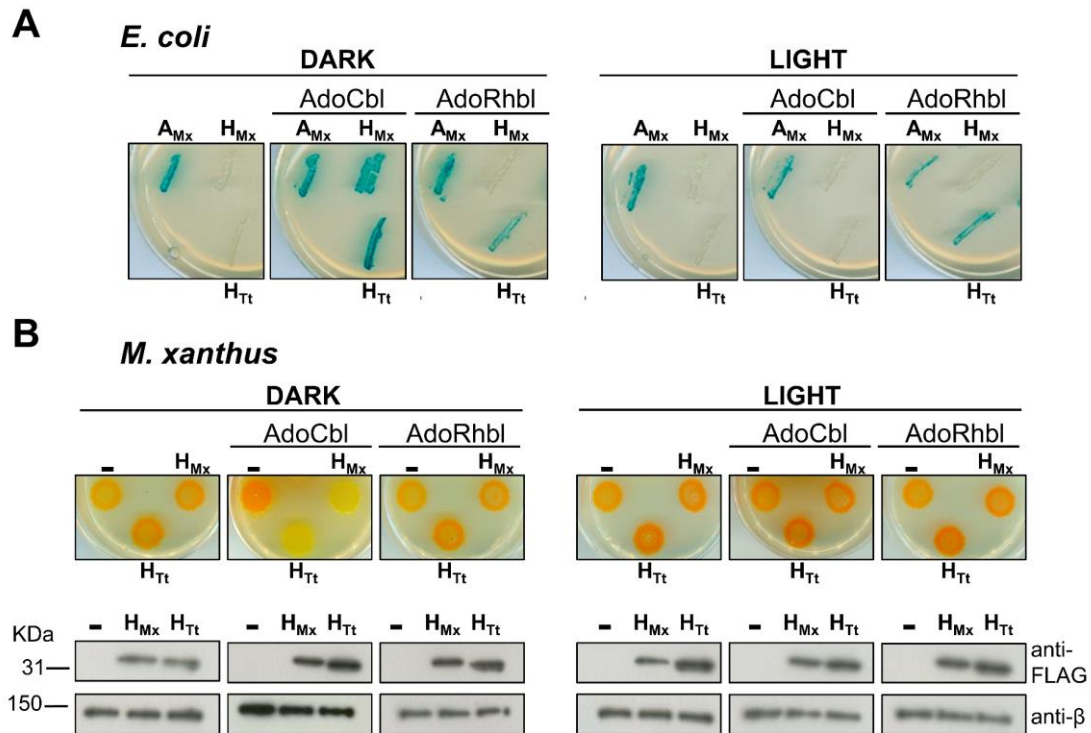
Binding to CarH redshifts the UV-visible spectrum of AdoCbl, based on which affinities ( $K_D$ ) in the 210–250 nM range were estimated for AdoCbl binding to CarH<sub>Tt</sub> (Kutta *et al.*, 2015). Titration with CarH<sub>Tt</sub> also redshifts the AdoRhbl UV-visible spectrum (Figure 4A), from which  $K_D$  for CarH<sub>Tt</sub>-AdoRhbl binding was estimated at ~6  $\mu$ M (Figure 4B). Thus, CarH<sub>Tt</sub> affinity is notably lower for AdoRhbl than for AdoCbl, even though both cofactors are isostructural and bind similarly to CarH<sub>Tt</sub>. This was not discerned in the tetramerization and DNA binding assays *in vitro* possibly because of the five-fold molar excess of AdoCbl and AdoRhbl over protein used and because of caging effects of the gel matrix. A lower affinity for AdoRhbl relative to AdoCbl would likely be consequential *in vivo*. Hence, we next examined AdoCbl and AdoRhbl effects on CarH oligomerization and light-dependent activity *in vivo*.



**Figure 4. Spectral evolution of AdoRhbl titrated with CarHT<sub>Tt</sub> and determination of their binding affinity.** **A)** Left panel: UV-visible spectra of AdoRhbl at a fixed concentration (4 μM) titrated with CarHT<sub>Tt</sub> (0-23 μM). The right panel shows the trace for 4 μM AdoRhbl alone and the shift when a six-fold excess of CarHT<sub>Tt</sub> is present. **B)** CarHT<sub>Tt</sub>-AdoRhbl binding affinity ( $K_D$ ) estimated from titrations of AdoRhbl with CarHT<sub>Tt</sub> as in **A** by fitting the change in absorbance at 531 nm ( $\Delta A_{531}$ ; left panel) or wavelength ( $\Delta \lambda_{0.04}$ ; right panel). Data shown are the mean and standard error from three independent titrations and the line is the best fit of data.

### CarH oligomerization and repressor activity *in vivo* are less effective with AdoRhbl than with AdoCbl despite similar cellular uptake

A bacterial adenylate cyclase two-hybrid (BACTH) system in *E. coli*, which cannot synthesize AdoCbl *de novo* but can take it up from the medium, was previously used to study CarH<sub>Mx</sub> and CarH<sub>Tt</sub> self-interaction (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011). In this BACTH assay, cells expressing two-hybrid fusions to CarH<sub>Mx</sub> or CarH<sub>Tt</sub> self-interact (inferred from the blue color on plates with X-Gal) only in the dark with AdoCbl present, while those expressing fusions to CarA<sub>Mx</sub>, a B<sub>12</sub>-independent CarH<sub>Mx</sub> paralog, self-interact in the dark or in the light and regardless of the presence or not of AdoCbl (Figure 5A). With AdoRhbl present, we found that cells expressing CarH<sub>Tt</sub> exhibited a blue color in the dark that persisted under light, consistent with AdoRhbl promoting also *in vivo* the formation of CarH<sub>Tt</sub> oligomers that are insensitive to light (Figure 5A). Nonetheless, AdoRhbl appears to be less favorable than AdoCbl for CarH oligomerization *in vivo* given that the blue color in the dark for CarH<sub>Tt</sub> was somewhat less intense with AdoRhbl and no color was developed with AdoRhbl by cells expressing two-hybrid fusions to CarH<sub>Mx</sub>.

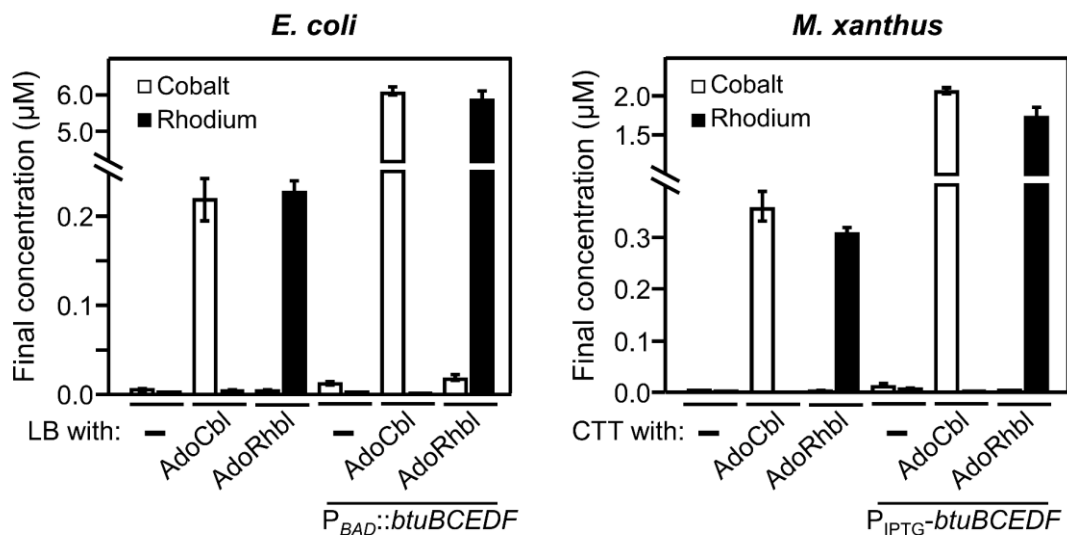


**Figure 5. Effects of AdoRhbl on CarH oligomerization and function *in vivo*.** **A)** Two-hybrid analysis in *E. coli* BTH101 cells expressing T25 and T18 fusions of CarH<sub>Mx</sub>, CarH<sub>Tt</sub> or CarA<sub>Mx</sub> (positive control for self-interaction under all conditions tested) streaked on LB-kanamycin (kan)-ampicillin (amp) agar plates containing X-Gal and IPTG without or with AdoCbl or AdoRhbl and grown in the dark or exposed to white light. A blue streak indicates self-interaction. **B)** Color phenotype of *M. xanthus* strains MR2648 (recipient, negative control, “-”), and MR2998 (“H<sub>Mx</sub>”) or MR2903 (“H<sub>Tt</sub>”), with vanillate-inducible expression of FLAG-tagged CarH<sub>Mx</sub> and CTt2, respectively, grown in the dark and under light on CTT-agar-vanillate plates, without or with AdoCbl or AdoRhbl. Below: Western blots of the cell extracts probed using anti-FLAG antibodies (top) or, as loading control, antibodies against the β subunit of RNAP (bottom).

We next compared the effects of AdoRhbl versus AdoCbl on CarH repressor activity in *M. xanthus*. For this, we used strain MR2648, which is devoid of the endogenous genes for CarH, CarA, CarS (the cognate CarA antirepressor) and PduO, the adenosyltransferase in *M. xanthus* essential to produce intracellular AdoCbl (its absence allows controlled exogenous supply of AdoCbl or AdoRhbl). In contrast to wild-type *M. xanthus*, which is yellow in the dark and orange red upon light-induced carotenoid synthesis, MR2648 is orange even in the dark because its lack of CarH and CarA leads to derepression of the gene cluster containing most genes for carotenoid synthesis. To examine CarH repressor activity *in vivo*, we generated derivatives of MR2648 that express, from a vanillate-inducible promoter (Iniesta *et al.*, 2012), N-terminally FLAG-tagged CarH<sub>Mx</sub> or chimera CTt2, a CarH<sub>Tt</sub> surrogate with its C-terminal domain fused to CarH<sub>Mx</sub> DBD and linker that is functional in *M. xanthus* (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011). While cells expressing CarH<sub>Mx</sub> or CTt2 were yellow in the dark with AdoCbl present, consistent with repression of carotenoid synthesis, and turned orange red in the

light as a result of AdoCbl photolysis, cells with AdoRhbl present remained orange red in the dark or light, like the parental strain MR2648 (Figure 5B; Western blots verified stable CarH<sub>Mx</sub> or CTt2 expression for the conditions examined). That AdoRhbl does not favor repressor activity (and oligomerization) of CarH<sub>Mx</sub> *in vivo* would accord with a lower affinity for AdoRhbl but could also result from poorer uptake of this form.

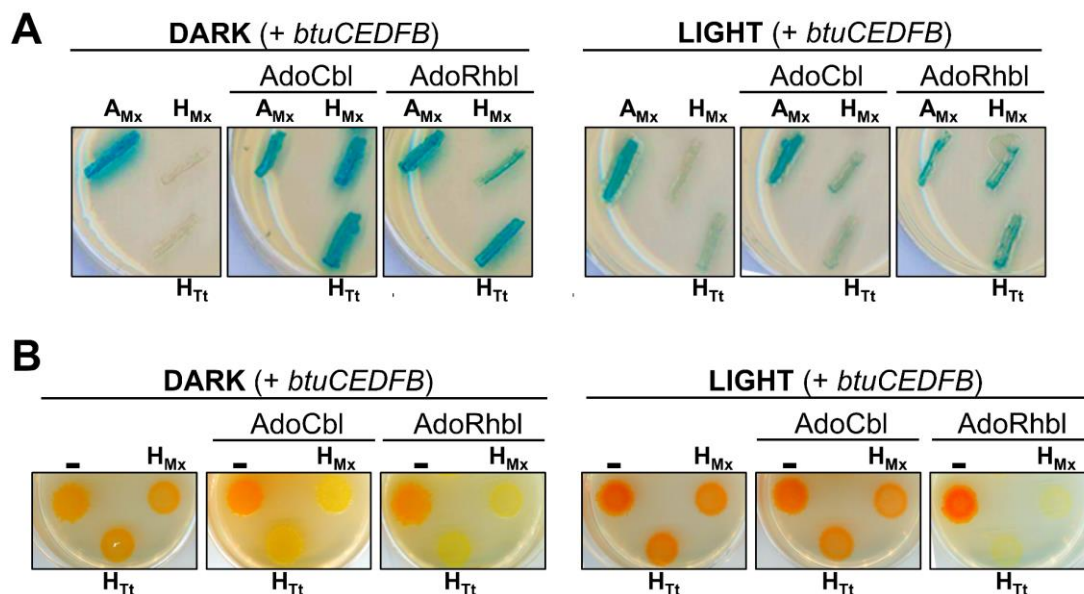
We therefore next examined intracellular accumulation of exogenously supplied AdoCbl or AdoRhbl in *E. coli* and *M. xanthus* strains used for *in vivo* analyses. Each strain was grown in media with or without AdoCbl or AdoRhbl under identical conditions, and the cells harvested and analyzed. An LC-MS/MS approach to estimate cellular AdoCbl/AdoRhbl contents was unsuitable under the conditions used, possibly due to acid-induced organometallic bond cleavage. Thus, we reasoned that simultaneous ICP-MS analysis of total cellular cobalt and rhodium could provide robust measures of AdoCbl/AdoRhbl contents. Whereas Co and Rh were essentially undetected by ICP-MS in *E. coli* BTH101 and *M. xanthus* MR2648 grown in the absence of AdoCbl or AdoRhbl, Co but not Rh was readily detected when cells were grown with AdoCbl, and Rh but not Co when they were grown with AdoRhbl (Figure 6). Moreover, Co and Rh levels in cells grown with AdoCbl and AdoRhbl, respectively, were comparable within error, suggesting similar cellular uptake of both forms.



**Figure 6. ICP-MS analysis of intracellular cobalt and rhodium** in: (left) *E. coli* BTH101 alone grown in LB medium, or with plasmid pBAD42-*btuCEDFB* (to express B<sub>12</sub> transporter proteins) in LB-spectinomycin (Spt)-arabinose medium, without or with AdoCbl or AdoRhbl; (right) *M. xanthus* MR2648 grown in CTT medium and MR3694 (with IPTG-inducible *btuCEDFB* expression) in CTT-tetracycline (Tet) medium, containing 1 mM IPTG, without or with AdoCbl or AdoRhbl. The mean and standard error of data from three biological replicates are shown.

### Higher intracellular AdoRhbl levels promote CarH oligomerization and repressor activity *in vivo* that persist even under light

Increasing intracellular AdoRhbl levels could conceivably offset the consequences of its lower affinity for CarH *in vivo*. Intracellular cobalamin levels and homeostasis in bacteria are subject to tight control by B<sub>12</sub> riboswitches and other mechanisms that regulate expression of genes for B<sub>12</sub> uptake, transport, utilization and biosynthesis. This control can be evaded to considerably enhance cobalamin levels in *E. coli* by overexpressing proteins crucial in cobalamin uptake and transport, as was achieved using the arabinose-inducible P<sub>BAD</sub> promoter to express genes *btuC*, *btuE*, *btuD*, *btuF*, and *btuB* (hereafter, *btuCDEFB*) (Lanz *et al.*, 2018). ICP-MS revealed that intracellular Co and Rh levels when grown in the presence of AdoCbl and AdoRhbl, respectively, increased ~25-fold in *E. coli* BTH101 (used in BACTH analysis) expressing arabinose-induced *btuCDEFB*, and ~6-fold in the *M. xanthus* MR2648 (used in CarH functional analysis) expressing IPTG-induced *btuCDEFB* (Figure 6). BACTH analysis in the dark with the increased intracellular AdoRhbl levels now allowed detection of CarH<sub>Mx</sub> self-interaction and a clearer self-interaction with CarH<sub>Tt</sub>, which were unaffected by light (compare Figures 7A with 5A). Furthermore, CarH<sub>Mx</sub> and CarH<sub>Tt</sub> repressor activity in the dark was now observed in *M. xanthus* (Figure 7B), with repression persisting under light.



**Figure 7. Effects of increasing intracellular AdoRhbl concentrations on CarH oligomerization and function *in vivo*.** **A)** Two-hybrid analysis in *E. coli* BTH101 cells with pBAD42-*btuCDEFB* expressing T25 and T18 fusions of CarH<sub>Mx</sub>, CarH<sub>Tt</sub> or CarA<sub>Mx</sub> streaked on LB-Kan-Amp-Spt agar plates with X-Gal, IPTG, and arabinose, without or with AdoCbl or AdoRhbl, and grown in the dark or exposed to white light. **B)** Color phenotype of *M. xanthus* strains MR3694 (negative control, “-”), MR3695 (“H<sub>Mx</sub>”) and MR3696 (“H<sub>Tt</sub>”), with vanillate-inducible expression of N-terminal FLAG-tagged CarH<sub>Mx</sub> and CTt2, respectively, grown in the dark or under light on CTT-agar plates with IPTG and without or with AdoCbl or AdoRhbl.

As an approach to better understand the interplay between CarH and AdoRhbl versus AdoCbl computational studies are being carried out in collaboration with Prof. Modesto Orozco (Institute for Research in Biomedicine, IRB, Barcelona).

## References

- Iniesta, A. A., García-Heras, F., Abellón-Ruiz, J., Gallego-García, A., & Elías-Arnanz, M. (2012). Two systems for conditional gene expression in *Myxococcus xanthus* inducible by isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactopyranoside or vanillate. *Journal of Bacteriology*, 194(21), 5875–5885.
- Jost, M., Fernández-Zapata, J., Polanco, M. C., Ortiz-Guerrero, J. M., Chen, P. Y., Kang, G., Padmanabhan, S., Elías-Arnanz, M., & Drennan, C. L. (2015). Structural basis for gene regulation by a B<sub>12</sub>-dependent photoreceptor. *Nature*, 526(7574), 536–541.
- Kutta, R. J., Hardman, S. J. O., Johannissen, L. O., Bellina, B., Messiha, H. L., Ortiz-Guerrero, J. M., Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S., Barran, P., Scrutton, N. S., & Jones, A. R. (2015). The photochemical mechanism of a B<sub>12</sub>-dependent photoreceptor protein. *Nature Communications*, 6, 7907.
- Lanz, N. D., Blaszczyk, A. J., McCarthy, E. L., Wang, B., Wang, R. X., Jones, B. S., & Booker, S. J. (2018). Enhanced solubilization of class B radical S-adenosylmethionine methylases by improved cobalamin uptake in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 57(9), 1475–1490.
- Ortiz-Guerrero, J. M., Polanco, M. C., Murillo, F. J., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2011). Light-dependent gene regulation by a coenzyme B<sub>12</sub>-based photoreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18), 7565–7570.
- Widner, F. J., Lawrence, A. D., Deery, E., Heldt, D., Frank, S., Gruber, K., Wurst, K., Warren, M. J., & Kräutler, B. (2016). Total synthesis, structure, and biological activity of adenosylrhodibalamin, the non-natural rhodium homologue of coenzyme B<sub>12</sub>. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(37), 11281–11286.





## **IV. CONCLUSIONES**



The research that comprises this thesis and the results obtained led to the following conclusions:

1. CarH<sub>Bm</sub> regulates light-induced carotenogenesis in the Gram-positive bacterium *Bacillus megaterium* by binding to its operator at P<sub>crtI</sub>.
2. ApoCarH<sub>Bm</sub> is an inactive molten globule tetramer (rather than a monomer) that transitions to a DNA-binding tetramer in the dark upon binding AdoCbl via its W-x<sub>9</sub>-EH motif. Light relieves DNA binding by disrupting holoCarH<sub>Bm</sub> tetramers to dimers (rather than to monomers).
3. CarH<sub>Tt</sub> uses only three of its four DNA-binding domains (DBDs) to bind three tandem 11-bp direct repeats (DRs, with the 5'-nnnnTnnACAn-3' consensus sequence) even when a fourth one is available. By contrast, CarH<sub>Bm</sub> uses its four DBDs to bind four DRs at its own promoter (P<sub>carH</sub>) or three DRs and one dr (TnnACA not fully conserved) at P<sub>crtI</sub>, but can also bind just three, revealing a striking plasticity in DNA binding that may be related to the linker between its DBD and its AdoCbl-binding domain (CBD).
4. CarH<sub>Bm</sub> can also bind to a six-repeat multipartite operator to repress expression of the global redox-response regulator SpxA2, thus controlling an additional line of defense against light-induced oxidative damage.
5. CarH homologs are widely distributed among bacteria and often coexist with a standalone CBD version of unknown function. Within myxobacteria, they are present in all three suborders (Cystobacterineae, which includes *Myxococcus xanthus*, Sorangiineae and Nannocystineae), suggesting that B<sub>12</sub>-dependent control of light-induced carotenogenesis is a common strategy against photooxidative stress in myxobacteria.
6. CarA and the unique set of factors (CarD, CarF, CarG, CarQ, CarR, CarS) required by *M. xanthus* for B<sub>12</sub>-independent control of carotenogenesis exist only in Cystobacterineae, with *carA* and *carH* invariably in tandem in a syntenic carotenogenic operon. Evolution of this complex pathway in Myxococcales may owe to gene duplication and divergence of an ancestral light-sensing B<sub>12</sub>-dependent CarH, *de novo* gene emergence and horizontal gene transfer, probably driven by a need to cope with limited B<sub>12</sub>.
7. Despite DNA operator and protein variations, all Cystobacterineae CarH homologs analyzed can replace CarH in *M. xanthus*, demonstrating their functional equivalence as well as DNA-binding plasticity.

#### IV. Conclusiones

8. *Cystobacter* species in Cystobacterineae, which repress the biosynthesis of carotenoids only in the dark with B<sub>12</sub> present, have CarH and all the proteins of the B<sub>12</sub>-independent pathway except precisely CarA.
9. *Cystobacter* CarH differs from well-characterized tetramer homologs in transitioning from an inactive dimeric apo form to active AdoCbl-bound dimers, which become inactive monomers upon photolysis.
10. The active *Cystobacter* CarH dimer exhibits CarA-like cooperative stepwise DNA binding to an operator at P<sub>crit</sub> comprising two overlapping sites, each composed of three tandem DRs and one dr, and both including the -35 promoter region. Besides direct photoinactivation, DNA binding by *Cystobacter* CarH can be abrogated by CarS, which typically acts as the antirepressor of CarA.
11. *Sorangium cellulosum* (a representative of Sorangiineae) and *Haliangium ochraceum* (a representative of Nannocystineae) repress the biosynthesis of carotenoids only in the dark with B<sub>12</sub> present.
12. Chimeras with the CarH<sub>Tt</sub> CBD fused to the *S. cellulosum* or *H. ochraceum* CarH DBDs allowed the identification of: (i) two CarH operators in *S. cellulosum*, each controlling two divergent promoters to afford self-regulation and light-induced carotenogenesis; (ii) one CarH operator in *H. ochraceum*, upstream the single carotenogenic gene cluster that also includes *carH*. This analysis revealed, for the first time, that even operators with only one or two DRs (with flanking drs) are suitable for CarH binding.
13. AdoRhbl, a photostable synthetic AdoCbl homolog with rhodium replacing cobalt, binds to CarH<sub>Tt</sub> like AdoCbl but with lower affinity. This drives CarH tetramerization and DNA binding, as with AdoCbl, but is insensitive to light.
14. The large plasticity in CarH photoreceptor oligomerization, DNA binding and operator design can be helpful for its use as an Optogenetics/Optobiochemistry tool.
15. Bacterial CarF homologs are present only in myxobacteria, a few Leptospiraceae and Alphaproteobacteria but they are widespread in animals (including humans) and in plants. CarF homologs from animals and from *Leptospira* are more related to those in *M. xanthus* and other myxobacteria, whilst those from Alphaproteobacteria and plants are less related to CarF.

16. The same histidines that are important for CarF activity, which may be involved in forming a di-iron cluster, are also essential for its human homolog, thus providing further evidence that the two proteins are closely related.



## V. BIBLIOGRAFÍA





- A**bellón-Ruiz, J., Bernal-Bernal, D., Abellán, M., Fontes, M., Padmanabhan, S., Murillo, F. J., & Elías-Arnanz, M. (2014). The CarD/CarG regulatory complex is required for the action of several members of the large set of *Myxococcus xanthus* extracytoplasmic function  $\sigma$  factors. *Environmental Microbiology*, 16(8), 2475–2490.
- Almpanis, A., Swain, M., Gatherer, D., & McEwan, N. (2018). Correlation between bacterial G+C content, genome size and the G+C content of associated plasmids and bacteriophages. *Microbial Genomics*, 4(4).
- Armstrong, G. A., & Hearst, J. E. (1996). Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB Journal*, 10(2), 228–237.
- Arnold, J. W., & Shimkets, L. J. (1988). Cell surface properties correlated with cohesion in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 170(12), 5771–5777.
- Astorg, P. (1997). Food carotenoids and cancer prevention: An overview of current research. *Trends in Food Science and Technology*, 8(12), 406–413.
- B**ai, Y., McCoy, J. G., Levin, E. J., Sobrado, P., Rajashankar, K. R., Fox, B. G., & Zhou, M. (2015). X-ray structure of a mammalian stearyl-CoA desaturase. *Nature*, 524(7564), 252–256.
- Balsalobre, J. M., Ruiz-Vazquez, R. M., & Murillo, F. J. (1987). Light induction of gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(8), 2359–2362.
- Banerjee, R. (2003). Radical carbon skeleton rearrangements: Catalysis by coenzyme B<sub>12</sub>-dependent mutases. *Chemical Reviews*, 103(6), 2083–2094.
- Banerjee, R., & Ragsdale, S. W. (2003). The many faces of Vitamin B<sub>12</sub>: Catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), 209–247.
- Bastet, L., Dubé, A., Massé, E., & Lafontaine, D. A. (2011). New insights into riboswitch regulation mechanisms. *Molecular Microbiology*, 80(5), 1148–1154.
- Bernal-Bernal, D., Abellón-Ruiz, J., Iniesta, A. A., Pajares-Martínez, E., Bastida-Martínez, E., Fontes, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2018). Multifactorial control of the expression of a CRISPR-Cas system by an extracytoplasmic function  $\sigma$ /anti- $\sigma$  pair and a global regulatory complex. *Nucleic Acids Research*, June, 1–20.
- Bhattacharyya, R. P., Reményi, A., Yeh, B. J., & Lim, W. A. (2006). Domains, motifs, and scaffolds: The role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 655–680.
- Bond, C., Lees, K., & RP Enever. (1972). Photolytic decomposition of 3 cobalamins: A quantitative study. *J Pharm Pharmacol, Suppl*:143.
- Botella, J. A., Murillo, F. J., & Ruiz-Vazquez, R. (1995). A cluster of structural and regulatory genes for light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *European Journal of Biochemistry*, 233(1), 238–248.

## V. Bibliografía

- Braverman, N. E., & Moser, A. B. (2012). Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(9), 1442–1452.
- Breaker, R. R. (2018). Riboswitches and translation control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(11), a032797.
- Britannica. (2021). *Electromagnetic spectrum*. Encyclopedia Britannica.
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P., & Hobman, J. L. (2003). The MerR family of transcriptional regulators. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 27, Issues 2–3, pp. 145–163).
- Browning, D. F., Grainger, D. C., & Busby, S. J. W. (2010). Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. *Current Opinion in Microbiology*, 13(6), 773–780.
- Browning, D. F., Whitworth, D. E., & Hodgson, D. A. (2003). Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: Functional characterization of the ECF sigma factor CarQ and antisigma factor CarR. *Molecular Microbiology*, 48(1), 237–251.
- C**ervantes, M., & Murillo, F. J. (2002). Role for vitamin B<sub>12</sub> in light induction of gene expression in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 184(8), 2215–2224.
- Chalmers, R. A., Lawson, A. M., Chalmers, R. A., & Lawson, A. M. (1982). Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In *Organic Acids in Man* (pp. 296–331). Springer Netherlands.
- Cheng, Z., Li, K., Hammad, L. A., Karty, J. A., & Bauer, C. E. (2014). Vitamin B<sub>12</sub> regulates photosystem gene expression via the CrtJ antirepressor AerR in *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular Microbiology*, 91(4), 649–664.
- Cheng, Z., Wu, J., Setterdahl, A., Reddie, K., Carroll, K., Hammad, L. A., Karty, J. A., & Bauer, C. E. (2012). Activity of the tetrapyrrole regulator CrtJ is controlled by oxidation of a redox active cysteine located in the DNA binding domain. *Molecular Microbiology*, 85(4), 734–746.
- Cheng, Z., Yamamoto, H., & Bauer, C. E. (2016). Cobalamin's (vitamin B<sub>12</sub>) surprising function as a photoreceptor. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(8), 647–650.
- Croce, R., & Van Amerongen, H. (2014). Natural strategies for photosynthetic light harvesting. *Nature Chemical Biology*, 10(7), 492–501.
- D**awid, W. (2000). Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 403–427.
- Dean, J. M., & Lodhi, I. J. (2018). Structural and functional roles of ether lipids. *Protein and Cell*, 9(2), 196–206.
- Degnan, P. H., Taga, M. E., & Goodman, A. L. (2014). Vitamin B<sub>12</sub> as a modulator of gut

- microbial ecology. *Cell Metabolism*, 20(5), 769–778.
- Dowling, D. P., Croft, A. K., & Drennan, C. L. (2012). Radical use of Rossmann and TIM Barrel architectures for controlling coenzyme B<sub>12</sub> chemistry. *Annual Review of Biophysics*, 41(1), 403–427.
- Drennan, C. L., Huang, S., Drummond, J. T., Matthews, R. G., & Ludwig, M. L. (1994). How a protein binds B<sub>12</sub>: A 3.0 Å x-ray structure of B<sub>12</sub>-binding domains of methionine synthase. *Science*, 266(5191), 1669–1674.
- Dworkin, M. (1962). Nutritional requirements for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 84(2), 250–257.
- E**lías-Arnanz, M. (2020). Anaerobic bacteria need their vitamin B<sub>12</sub> to digest estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(4), 1833–1835.
- Elías-Arnanz, M., Fontes, M., & Padmanabhan, S. (2008). Carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: A complex regulatory network. *Myxobacteria*, 211–225.
- Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S., & Murillo, F. J. (2010). The regulatory action of the myxobacterial CarD/CarG complex: A bacterial enhanceosome? *FEMS Microbiology Reviews*, 34(5), 764–778.
- Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S., & Murillo, F. J. (2011). Light-dependent gene regulation in nonphototrophic bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 14(2), 128–135.
- Elías, M., & Murillo, F. J. (1991a). Induction of germination in *Myxococcus xanthus* fruiting body spores. *Microbiology*, 137(2), 381–388.
- Elías, M., & Murillo, F. J. (1991b). Mutations affecting germination in *Myxococcus xanthus*. *Microbiology*, 137(2), 389–397.
- Ellis, B., Petrow, V., Beaven, G. H., Holiday, E. R., & Johnson, E. A. (1950). Conversion of vitamin B<sub>12b</sub> into vitamin B<sub>12</sub>. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(1), 735–735.
- Eschenmoser, A., & Wintner, C. E. (1977). Natural product synthesis and vitamin B<sub>12</sub>. *Science*, 196(4297), 1410–1420.
- F**ang, H., Kang, J., & Zhang, D. (2017). Microbial production of vitamin B<sub>12</sub>: A review and future perspectives. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1–14.
- Fang, M., & Bauer, C. E. (2017). The vitamin B<sub>12</sub>-dependent photoreceptor AerR relieves photosystem gene repression by extending the interaction of CrtJ with photosystem promoters. *MBio*, 8(2), 1–14.
- Fenno, L., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2011). The development and application of optogenetics. *Annual Review of Neuroscience*, 34(1), 389–412.
- Fernández-Zapata, J. (2018). Modo de acción molecular de CarH, el prototipo de una

## V. Bibliografía

nueva familia de fotorreceptores dependientes de la vitamina B<sub>12</sub>: plasticidad en su oligomerización, unión al DNA y diseño de su operador. *Tesis Doctoral*. Universidad de Murcia.

- Fontes, M., Galbis-Martínez, L., & Murillo, F. J. (2003). A novel regulatory gene for light-induced carotenoid synthesis in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 47(2), 561–571.
- Foster, K. R. (2006). Sociobiology: The Phoenix effect. *Nature*, 441(7091), 291–292.
- Frank, H. A., & Brudvig, G. W. (2004). Redox functions of carotenoids in photosynthesis. *Biochemistry*, 43(27), 8607–8615.
- G**albis-Martínez, L., Galbis-Martínez, M., Murillo, F. J., & Fontes, M. (2008). An anti-antisigma factor in the response of the bacterium *Myxococcus xanthus* to blue light. *Microbiology*, 154(3), 895–904.
- Galbis-Martínez, M., Padmanabhan, S., Murillo, F. J., & Elías-Arnanz, M. (2012). CarF mediates signaling by singlet oxygen, generated via photoexcited protoporphyrin IX, in *Myxococcus xanthus* light-induced carotenogenesis. *Journal of Bacteriology*, 194(6), 1427–1436.
- Gallego-García, A., Monera-Girona, A. J., Pajares-Martínez, E., Bastida-Martínez, E., Pérez-Castaño, R., Iniesta, A. A., Fontes, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2019). A bacterial light response reveals an orphan desaturase for human plasmalogen synthesis. *Science*, 366(6461), 128–132.
- Gao, J., Ajjawi, I., Manoli, A., Sawin, A., Xu, C., Froehlich, J. E., Last, R. L., & Benning, C. (2009). FATTY ACID DESATURASE4 of *Arabidopsis* encodes a protein distinct from characterized fatty acid desaturases. *Plant Journal*, 60(5), 832–839.
- Goldfine, H. (2017). The anaerobic biosynthesis of plasmalogens. *FEBS Letters*, 591(18), 2714–2719.
- Goldman, B. S., Nierman, W. C., Kaiser, D., Slater, S. C., Durkin, A. S., Eisen, J., Ronning, C. M., Barbazuk, W. B., Blanchard, M., Field, C., Halling, C., Hinkle, G., Iartchuk, O., Kim, H. S., Mackenzie, C., Madupu, R., Miller, N., Shvartsbeyn, A., Sullivan, S. A., ... Kaplan, H. B. (2006). Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(41), 15200–15205.
- Gomelsky, M., & Hoff, W. D. (2011). Light helps bacteria make important lifestyle decisions. *Trends in Microbiology*, 19(9), 441–448.
- Goodwin, T. W. (1980). The biochemistry of the carotenoids. In *The Biochemistry of the Carotenoids*.
- Gordley, R. M., Bugaj, L. J., & Lim, W. A. (2016). Modular engineering of cellular signaling proteins and networks. *Current Opinion in Structural Biology*, 39, 106–114.
- Goulding, C. W., Postigo, D., & Matthews, R. G. (1997). Cobalamin-dependent methionine synthase is a modular protein with distinct regions for binding

- homocysteine, methyltetrahydrofolate, cobalamin, and adenosylmethionine. *Biochemistry*, 36(26), 8082–8091.
- Grossniklaus, H. E., Geisert, E. E., & Nickerson, J. M. (2015). Introduction to the retina. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 134, 383–396.
- Gruber, K., Puffer, B., & Kräutler, B. (2011). Vitamin B<sub>12</sub>-derivatives - Enzyme cofactors and ligands of proteins and nucleic acids. *Chemical Society Reviews*, 40(8), 4346–4363.
- Gusarov, I., & Nudler, E. (1999). The mechanism of intrinsic transcription termination. *Molecular Cell*, 3(4), 495–504.
- H**ay, B. P., & Finke, R. G. (1986). Thermolysis of the Co—C bond of adenosylcobalamin. 2. Products, kinetics, and Co—C Bond dissociation energy in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, 108(16), 4820–4829.
- Herrmann, J., Fayad, A. A., & Müller, R. (2017). Natural products from myxobacteria: Novel metabolites and bioactivities. *Natural Product Reports*, 34(2), 135–160.
- Hodgkin, D. C., Kamper, J., MacKay, M., Pickworth, J., Trueblood, K. N., & White, J. G. (1956). Structure of vitamin B<sub>12</sub>. *Nature*, 178(4524), 64–66.
- Hung, R. R., & Grabowski, J. J. (1999). Listening to reactive intermediates: Application of photoacoustic calorimetry to vitamin B<sub>12</sub> compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 121(6), 1359–1364.
- I**izuka, T., Jojima, Y., Fudou, R., & Yamanaka, S. (1998). Isolation of myxobacteria from the marine environment. *FEMS Microbiology Letters*, 169(2), 317–322.
- Iniesta, A. A., Cervantes, M., & Murillo, F. J. (2007). Cooperation of two carotene desaturases in the production of lycopene in *Myxococcus xanthus*. *FEBS Journal*, 274(16), 4306–4314.
- Iniesta, A. A., García-Heras, F., Abellón-Ruiz, J., Gallego-García, A., & Elías-Arnanz, M. (2012). Two systems for conditional gene expression in *Myxococcus xanthus* inducible by isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside or vanillate. *Journal of Bacteriology*, 194(21), 5875–5885.
- Inouye, S., White, D., & Inouye, M. (1980). Development of *Stigmatella aurantiaca*: Effects of light and gene expression. *Journal of Bacteriology*, 141(3), 1360–1365.
- Islam, S. T., & Mignot, T. (2015). The mysterious nature of bacterial surface (gliding) motility: A focal adhesion-based mechanism in *Myxococcus xanthus*. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 46, 143–154.
- J**arrett, J. T., Drennan, C. L., Amaratunga, M., Scholten, J. D., Ludwig, M. L., & Matthews, R. G. (1996). A protein radical cage slows photolysis of methylcobalamin in methionine synthase from *Escherichia coli*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 4(8), 1237–1246.
- Jenkins, C. M., Yang, K., Liu, G., Moon, S. H., Dilthey, B. G., & Gross, R. W. (2018).

## V. Bibliografía

- Cytochrome c is an oxidative stress-activated plasmalogenase that cleaves plasmenylcholine and plasmenylethanolamine at the sn-1 vinyl ether linkage. *Journal of Biological Chemistry*, 293(22), 8693–8709.
- Jones, A. R. (2017). The photochemistry and photobiology of vitamin B<sub>12</sub>. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 16(6), 820–834.
- Jost, M., Fernández-Zapata, J., Polanco, M. C., Ortiz-Guerrero, J. M., Chen, P. Y., Kang, G., Padmanabhan, S., Elías-Arnanz, M., & Drennan, C. L. (2015a). Structural basis for gene regulation by a B<sub>12</sub>-dependent photoreceptor. *Nature*, 526(7574), 536–541.
- Jost, M., Simpson, J. H., & Drennan, C. L. (2015b). The transcription factor CarH safeguards use of adenosylcobalamin as a light sensor by altering the photolysis products. *Biochemistry*, 54(21), 3231–3234.
- Kaczka, E. A., Wolf, D. E., Kuehl, F. A., & Folkers, K. (1950). Vitamin B<sub>12</sub>: Reactions of cyano-cobalamin and related compounds. *Science*, 112(2909), 354–355.
- Kaiser, D. (2001). Building a Multicellular Organism. *Annual Review of Genetics*, 35(1), 103–123.
- Kozłowski, P. M., Garabato, B. D., Lodowski, P., & Jaworska, M. (2016). Photolytic properties of cobalamins: A theoretical perspective. *Dalton Transactions*, 45(11), 4457–4470.
- Kräutler, B., Herrmann, W., & Obeid, R. (2012). Biochemistry of B<sub>12</sub>-cofactors in human metabolism. *Sub-Cellular Biochemistry*, 56, 323–346.
- Kutta, R. J., Hardman, S. J. O., Johannissen, L. O., Bellina, B., Messiha, H. L., Ortiz-Guerrero, J. M., Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S., Barran, P., Scrutton, N. S., & Jones, A. R. (2015). The photochemical mechanism of a B<sub>12</sub>-dependent photoreceptor protein. *Nature Communications*, 6, 7907.
- Lanz, N. D., Blaszczyk, A. J., McCarthy, E. L., Wang, B., Wang, R. X., Jones, B. S., & Booker, S. J. (2018). Enhanced solubilization of class B radical S-adenosylmethionine methylases by improved cobalamin uptake in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 57(9), 1475–1490.
- León, E., Navarro-Avilés, G., Santiveri, C. M., Flores-Flores, C., Rico, M., González, C., Murillo, F. J., Elías-Arnanz, M., Jiménez, M. A., & Padmanabhan, S. (2010). A bacterial antirepressor with SH3 domain topology mimics operator DNA in sequestering the repressor DNA recognition helix. *Nucleic Acids Research*, 38(15), 5226–5241.
- Link, H. F. (1809). Observationes in Ordines plantarum naturales. Dissertatio Ima, complectens Anandrarum ordines Epiphytas, Mucedines Gastomycos et Fungos. *Der Gesellschaft Naturforschender Freunde Zu Berlin Magazin Für Die Neuesten Entdeckungen in Der Gesamten Naturkunds*, 3, 3–42.
- López-García, P., & Moreira, D. (2020). The Syntrophy hypothesis for the origin of eukaryotes revisited. *Nature Microbiology*, 5, 655–667.
- López-Rubio, J. J., Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S., & Murillo, F. J. (2002). A

- repressor-antirepressor pair links two loci controlling light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(9), 7262–7270.
- López-Rubio, J. J., Padmanabhan, S., Lázaro, J. M., Salas, M., Murillo, F. J., & Elías-Arnanz, M. (2004). Operator design and mechanism for CarA repressor-mediated down-regulation of the photoinducible *carB* operon in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28), 28945–28953.
- Ludwig, M. L., Matthews, R. G., Ludwig and, M. L., Matthews, R. G., Ludwig, M. L., & Matthews G., R. (1997). Structure-based perspectives on B<sub>12</sub>-dependent enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 66(1), 269–313.
- Ludwig, W., Schleifer, K. H., Reichenbach, H., & Stackebrandt, E. (1983). A phylogenetic analysis of the myxobacteria *Myxococcus fulvus*, *Stigmatella aurantiaca*, *Cystobacter fuscus*, *Sorangium cellulosum* and *Nannocystis exedens*. *Archives of Microbiology*, 135(1), 58–62.
- M**andal, M., & Breaker, R. R. (2004). Gene regulation by riboswitches. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(6), 451–463.
- Maresca, J. A., Graham, J. E., & Bryant, D. A. (2008). The biochemical basis for structural diversity in the carotenoids of chlorophototrophic bacteria. *Photosynthesis Research*, 97(2), 121–140.
- Martínez-Argudo, I., Ruiz-Vázquez, R. M., & Murillo, F. J. (1998). The structure of an ECF- $\sigma$ -dependent, light-inducible promoter from the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 30(4), 883–893.
- Martínez-Laborda, A., Balsalobre, J. M., Fontes, M., & Murillo, F. J. (1990). Accumulation of carotenoids in structural and regulatory mutants of the Bacterium *Myxococcus xanthus*. *MGG Molecular & General Genetics*, 223(2), 205–210.
- Martínez-Laborda, A., Elías, M., Ruiz-Vázquez, R., & Murillo, F. J. (1986). Insertions of Tn5 linked to mutations affecting carotenoid synthesis in *Myxococcus xanthus*. *Molecular and General Genetics MGG 1986 205:1*, 205(1), 107–114.
- Martínez-Laborda, A., & Murillo, F. J. (1989). Genic and allelic interactions in the carotenogenic response of *Myxococcus xanthus* to blue light. *Genetics*, 122(3), 481–490.
- Matthews, R. G. (2001). Cobalamin-dependent methyltransferases. *Accounts of Chemical Research*, 34(8), 681–689.
- Matthews, R. G., Koutmos, M., & Datta, S. (2008). Cobalamin-dependent and cobamide-dependent methyltransferases. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(6), 658–666.
- Meiser, P., Bode, H. B., & Müller, R. (2006). The unique DKxanthene secondary metabolite family from the myxobacterium *Myxococcus xanthus* is required for developmental sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 19128–19133.
- Messias, M. C. F., Mecatti, G. C., Priolli, D. G., & De Oliveira Carvalho, P. (2018).

## V. Bibliografía

- Plasmalogen lipids: Functional mechanism and their involvement in gastrointestinal cancer. *Lipids in Health and Disease*, 17(1), 1–12.
- Miesenböck, G. (2011). Optogenetic control of cells and circuits. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 731–758.
- Milani, A., Basirnejad, M., Shahbazi, S., & Bolhassani, A. (2017). Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1290–1324.
- Minot, G. R., & Murphy, W. (1926). Treatment of pernicious anemia by a special diet. *Journal of the American Medical Association*, 87(20), 1666.
- Moraleda-Muñoz, A., Pérez, J., Fontes, M., Murillo, F. J., & Muñoz-Dorado, J. (2005). Copper induction of carotenoid synthesis in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 56(5), 1159–1168.
- Morand, O. H., Zoeller, R. A., & Raetz, C. R. H. (1988). Disappearance of plasmalogens from membranes of animal cells subjected to photosensitized oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 263(23), 11597–11606.
- Moreno, A. J., Fontes, M., & Murillo, F. J. (2001). *ihfA* gene of the bacterium *Myxococcus xanthus* and its role in activation of carotenoid genes by blue light. *Journal of Bacteriology*, 183(2), 557–569.
- N**ahvi, A., Barrick, J. E., & Breaker, R. R. (2004). Coenzyme B<sub>12</sub> riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, 32(1), 143–150.
- Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M. S., Zou, X., Brown, K. L., & Breaker, R. R. (2002). Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chemistry and Biology*, 9(9), 1043–1049.
- Navarro-Avilés, G., Jiménez, M. A., Pérez-Marín, M. C., González, C., Rico, M., Murillo, F. J., Elías-Arnanz, M., & Padmanabhan, S. (2007). Structural basis for operator and antirepressor recognition by *Myxococcus xanthus* CarA repressor. *Molecular Microbiology*, 63(4), 980–994.
- Nicolás, F. J., Ruiz-Vázquez, R. M., & Murillo, F. J. (1994). A genetic link between light response and multicellular development in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Genes and Development*, 8(19), 2375–2387.
- O**rtiz-Guerrero, J. M., Polanco, M. C., Murillo, F. J., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2011). Light-dependent gene regulation by a coenzyme B<sub>12</sub>-based photoreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18), 7565–7570.
- Osman, D., Cooke, A., Young, T. R., Deery, E., Robinson, N. J., & Warren, M. J. (2020). The requirement for cobalt in vitamin B<sub>12</sub>: A paradigm for protein metalation. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1868, Issue 1, p. 118896). Elsevier B.V.
- Oyaizu, H., & Woese, C. R. (1985). Phylogenetic relationships among the sulfate



respiring bacteria, myxobacteria and purple bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 6(3), 257–263.

- P**admanabhan, S., Jost, M., Drennan, C. L., & Elías-Arnanz, M. (2017). A new facet of vitamin B<sub>12</sub>: gene regulation by photoreceptors. *Annu. Rev. Biochem*, 86:485–514.
- Padmanabhan, S., Monera-Girona, A. J., Pérez-Castaño, R., Bastida-Martínez, E., Pajares-Martínez, E., Bernal-Bernal, D., Galbis-Martínez, M. L., Polanco, M. C., Iniesta, A. A., Fontes, M., & Elías-Arnanz, M. (2021). Light-triggered carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: New paradigms in photosensory signaling, transduction and gene regulation. *Microorganisms*, 9(5), 1067.
- Peñalver-Mellado, M., García-Heras, F., Padmanabhan, S., García-Moreno, D., Murillo, F. J., & Elías-Arnanz, M. (2006). Recruitment of a novel zinc-bound transcriptional factor by a bacterial HMGA-type protein is required for regulating multiple processes in *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 61(4), 910–926.
- Pérez-Marín, M. C., López-Rubio, J. J., Murillo, F. J., Elías-Arnanz, M., & Padmanabhan, S. (2004). The N terminus of *Myxococcus xanthus* CarA repressor is an autonomously folding domain that mediates physical and functional interactions with both operator DNA and antirepressor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33093–33103.
- Pérez-Marín, M. C., Padmanabhan, S., Polanco, M. C., Murillo, F. J., & Elías-Arnanz, M. (2008). Vitamin B<sub>12</sub> partners the CarH repressor to downregulate a photoinducible promoter in *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 67(4), 804–819.
- Philips, S. J., Canalizo-Hernandez, M., Yildirim, I., Schatz, G. C., Mondragón, A., & O'Halloran, T. V. (2015). Allosteric transcriptional regulation via changes in the overall topology of the core promoter. *Science*, 349(6250), 877–881.
- Purcell, E. B., & Crosson, S. (2008). Photoregulation in prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 11(2), 168–178.
- R**agsdale, S. W. (2008). Catalysis of methyl group transfers involving tetrahydrofolate and B<sub>12</sub>. *Vitamins and Hormones*, 79, 293–324.
- Randaccio, L., Geremia, S., Demitri, N., & Wuerges, J. (2010). Vitamin B<sub>12</sub>: Unique metalorganic compounds and the most complex vitamins. *Molecules*, 15(5), 3228–3259.
- Reichenbach, H., & Dworkin, M. (1992). The Myxobacteria. In *The Prokaryotes* (pp. 3416–3487). Springer New York.
- Rickes, E. L., Brink, N. G., Koniuszy, F. R., Wood, T. R., & Folkers, K. (1948). Crystalline vitamin B<sub>12</sub>. *Science*, 107, 396–397.
- Roth, J. R., Lawrence, J. G., & Bobik, T. A. (1996). Cobalamin: synthesis and biological significance. *Annual Rev Microbiol*, 50(1), 137–181.
- Rury, A. S., Wiley, T. E., & Sension, R. J. (2015). Energy cascades, excited state dynamics, and photochemistry in cob(III)alamins and ferric porphyrins. *Accounts of Chemical Research*, 48(3), 860–867.

- S**andmann, G. (2009). Evolution of carotene desaturation: The complication of a simple pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483(2), 169–174.
- Santillán, M., & Mackey, M. C. (2005). Dynamic behaviour of the B<sub>12</sub> riboswitch. *Physical Biology*, 2(1), 29–35.
- Seong, J., & Lin, M. Z. (2021). Optobiochemistry: Genetically encoded control of protein activity by light. *Annual Review of Biochemistry*, 90(1), 475–501.
- Setlow, R. B. (1966). Cyclobutane-type pyrimidine dimers in polynucleotides. *Science*, 153(3734), 379–386.
- Shanklin, J., Whittle, E., & Fox, B. G. (1994). Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry*, 33(43), 12787–12794.
- Shcherbakova, D. M., Shemetov, A. A., Kaberniuk, A. A., & Verkhusha, V. V. (2015). Natural photoreceptors as a source of fluorescent proteins, biosensors, and optogenetic tools. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), 519–550.
- Shimkets, L., & Woese, C. R. (1992). A phylogenetic analysis of the myxobacteria: Basis for their classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(20), 9459–9463.
- Smith, E. L. (1948). Purification of anti-pernicious anæmia factors from liver. *Nature*, 161, 638.
- Stubbe, J. A. (1994). Binding site revealed of nature's most beautiful cofactor. *Science*, 266(5191), 1663–1664.
- T**haxter, R. (1892). On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes. *Botanical Gazette*, 17(12), 389–406.
- Thomson, T. M., Lozano, J. J., Loukili, N., Carrió, R., Serras, F., Cormand, B., Valeri, M., Díaz, V. M., Abril, J., Burset, M., Merino, J., Macaya, A., Corominas, M., & Guigó, R. (2000). Fusion of the human gene for the polyubiquitination coeffector UBE1 with Kua, a newly identified gene. *Genome Research*, 10(11), 1743–1756.
- Tian, B., & Hua, Y. (2010). Carotenoid biosynthesis in extremophilic *Deinococcus-Thermus* bacteria. *Trends in Microbiology*, 18(11), 512–520.
- W**ang, P.-H., Chen, Y.-L., Wei, S. T.-S., Wu, K., Lee, T.-H., Wu, T.-Y., & Chiang, Y.-R. (2019). Retroconversion of estrogens into androgens by bacteria via a cobalamin-mediated methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 714501.
- Warren, M. J., Raux, E., Schubert, H. L., & Escalante-Semerena, J. C. (2002). The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B<sub>12</sub>). *Natural Product Reports*, 19(4), 390–412.
- Whipple, G. H., & Robscheit-Robbins, F. S. (1925). Favorable influence of liver, heart and skeletal muscle in diet on blood regeneration in anemia. *American Journal of*

*Physiology*, 72, 404–418.

- Widner, F. J., Lawrence, A. D., Deery, E., Heldt, D., Frank, S., Gruber, K., Wurst, K., Warren, M. J., & Kräutler, B. (2016). Total synthesis, structure, and biological activity of adenosylrhodibalamin, the non-natural rhodium homologue of coenzyme B<sub>12</sub>. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(37), 11281–11286.
- Wijmenga, H. G., Veer, W. L. C., & Lens, J. (1950). Vitamin B<sub>12</sub>. II. The influence of HCN on some factors of the vitamin B<sub>12</sub> group. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, 6(C), 229–236.
- Winkler, W. C., & Breaker, R. R. (2003). Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *ChemBioChem*, 4(10), 1024–1032.
- Winkler, W., Nahvi, A., & Breaker, R. R. (2002). Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*, 419(6910), 952–956.
- Y**amamoto, H., Fang, M., Dragnea, V., & Bauer, C. E. (2018). Differing isoforms of the cobalamin binding photoreceptor AerR oppositely regulate photosystem expression. *ELife*, 7, 1–26.
- Yang, Z., & Higgs, P. I. (2014). *Myxobacteria : genomics, cellular and molecular biology*. Caister Academic Press.
- Yarnell, W. S., & Roberts, J. W. (1999). Mechanism of intrinsic transcription termination and antitermination. *Science*, 284(5414), 611–615.
- Z**hang, A., Ackley, B. D., & Yan, D. (2020). Vitamin B<sub>12</sub> regulates glial migration and synapse formation through isoform-specific control of PTP-3/LAR PRTP expression. *Cell Reports*, 30(12), 3981-3988.e3.
- Zheleznova Heldwein, E. E., & Brennan, R. G. (2001). Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug. *Nature*, 409(6818), 378–382.
- Zhu, G., Koszelak-Rosenblum, M., Connelly, S. M., Dumont, M. E., & Malkowski, M. G. (2015). The crystal structure of an integral membrane fatty acid  $\alpha$ -hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 290(50), 29820–29833.
- Zoeller, R. A., Morand, O. H., & Raetz, C. R. H. (1988). A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *Journal of Biological Chemistry*, 263(23), 11590–11596.