UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Modo de Acción Molecular de CarH, el Prototipo de una Nueva Familia de Fotorreceptores Dependientes de la Vitamina B_{12}: Plasticidad en su Oligomerización, Unión al DNA y Diseño de su Operador

D. Jesús Fernández Zapata

2018

Dª. Montserrat Elías Arnanz, Catedrática de Universidad del Área de Genética, en el Departamento de Genética y Microbiología, y **D. Subramanian Padmanabhan Iyer**, Profesor de Investigación del CSIC, **AUTORIZAN**:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Modo de acción molecular de CarH, el prototipo de una nueva familia de fotorreceptores dependientes de la vitamina B_{12}: plasticidad en su oligomerización, unión al DNA y diseño de su operador", realizada por D. Jesús Fernández Zapata, 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 24 de septiembre de 2018

Departamento de
Genética y Microbiología
Campus de Espinardo
30100 Murcia
T. +34 868 884 949
F. +34 868 883 963

“Hermoso es lo que vemos. Más hermoso es lo que sabemos. Pero mucho más hermoso es lo que no conocemos”

Niels Steensen

A Bego, Clara

y mi familia

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN 1

I.1 La luz y los fotorreceptores 3

I.2 Las cobalaminas 8

I.2.1 Estructura y química 9

I.2.2 Fotoquímica de las cobalaminas 11

I.2.3 Origen ancestral de las cobalaminas y su distribución en la naturaleza 13

I.3 Enzimas que emplean cobalaminas como cofactor 14

I.3.1 Metiltransferasas 15

I.3.2 Isomerasas 19

I.4 Regulación de la expresión génica mediante cobalaminas 23

I.4.1 Regulación de la expresión génica por ribointerruptores 23

I.4.2 Regulación de la utilización de etanolamina 28

I.4.3 Regulación de la expresión génica por el antirrepresor AerR 29

I.5 *Myxococcus xanthus* y la carotenogénesis como respuesta fotoprotectora 31

I.5.1 Características generales de las mixobacterias 31

I.5.2 Carotenoides y la respuesta a la luz 36

I.5.3 Análisis genético de la respuesta a la luz: genes estructurales y reguladores 39

I.6 Las proteínas represoras CarA y CarH 42

I.6.1 Arquitectura modular y modo de acción 42

I.6.2 Distribución taxonómica de las proteínas CarA/CarH 50

I.6.3 Aplicaciones en Optogenética 55

I.7 Objetivos 58

II. MATERIALES Y MÉTODOS 59

II.1 Estirpes, plásmidos y oligonucleótidos 61

II.1.1 Estirpes 61

II.1.2 Plásmidos 63

II.1.3 Oligonucleótidos 66

II.2 Medios de crecimiento 71

II.2.1 Medio rico para *M. xanthus* 71

II.2.2 Medio rico para *E. coli* y *B. megaterium* 72

II.3 Condiciones de cultivo 73

II.3.1 Condiciones de cultivo para *M. xanthus* 73
II.3.2 Condiciones de cultivo para *E. coli* y *B. megaterium* 73
II.4 Tampones y soluciones 73
II.4.1 Preparación de DNA plasmídico 73
II.4.2 Electroforesis de DNA 73
II.4.3 Electroforesis de proteínas 74
II.4.4 Purificación de proteínas 74
II.4.5 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) 75
II.4.6 Ensayos de protección frente a DNasaI, radical hidroxilo y Exonucleasa III 75
II.4.7 Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos 75
II.4.8 PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR) 75
II.4.9 Determinación de la actividad β-galactosidasa 76
II.4.10 Dicroísmo circular y Fluorometría 76
II.5 Extracción de DNA 76
II.6 Transferencia de DNA 76
II.6.1 Transferencia de DNA en *E.coli* 76
II.6.2 Transferencia de DNA en *M. xanthus* 76
II.7 Tratamiento enzimático del DNA 77
II.8 Amplificación del DNA por PCR 77
II.9 Mutagénesis dirigida y obtención de genes quiméricos 78
II.10 Secuenciación del DNA 79
II.11 Técnicas electroforéticas 79
II.11.1 Electroforesis de DNA en gel de agarosa 79
II.11.2 Electroforesis de DNA en gel de poliacrilamida no desnaturalizante 79
II.11.3 Electroforesis de DNA en gel de poliacrilamida desnaturalizante 79
II.11.4 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS 80
II.12 Expresión y purificación de proteínas fusionadas a colas de histidinas .. 80
II.13 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) 81
II.14 Ensayos de protección frente a DNasa I, radical hidroxilo y Exonucleasa III 82
II.15 Ensayo de proteólisis limitada por GluC 85
II.16 Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos 85
II.17 Ensayo de PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR) 86
II.18 Ensayo de doble híbrido bacteriano (DHB) 87
II.19 Expresión de β-galactosidasa en *E. coli* 88

II.20 Cromatografía de filtración en gel 89
II.21 Espectroscopia de ultravioleta-visible 90
II.22 Espectrometría de masas 91
II.23 Dicroísmo circular 91
II.24 Fluorometría 92
II.25 Análisis bioinformático 92
III. RESULTADOS 95
III.1 El fotorreceptor CarH: relación estructura-función 97
III.1.1 Modo de oligomerización y unión a AdoCbl 99
III.1.2 Unión de TtCarH al DNA operador 116
III.1.3 La luz desencadena el movimiento del haz de hélices α y la formación de un enlace bis-His 124
III.2 Caracterización del modo de acción de la proteína CarH de *Bacillus megaterium* 131
III.2.1 Conservación en BmCarH de los motivos de unión al DNA y a AdoCbl de TtCarH . 134
III.2.2 Oligomerización y unión al DNA de BmCarH 136
III.2.3 ApoBmCarH es un glóbulo fundido 139
III.2.4 Importancia funcional del motivo W-x(9)-EH en BmCarH 142
III.2.5 Los operadores de BmCarH: mayor tamaño pero conservación del diseño y modo de unión 149
III.2.6 Análisis de la unión de BmCarH al operador de TtCarH y viceversa 155
III.2.7 Intercambio del *linker* de BmCarH y TtCarH, y su efecto en la unión al DNA operador 157
IV. DISCUSIÓN 161
IV.1 Mecanismo de acción de TtCarH 163
IV.1.1 Dependencia de AdoCbl en la oligomerización de TtCarH 164
IV.1.2 Modo de unión del represor TtCarH a su operador 170
IV.1.3 Desrepresión por movimiento del haz de hélices α en TtCarH provocado por la luz 173
IV.2 Modo de acción de BmCarH 177
IV.2.1 Formación del tetrámero y papel de la AdoCbl en BmCarH 178
IV.2.2 Plasticidad en la unión de BmCarH al DNA 179
IV.3 Conservación en la naturaleza y aspectos evolutivos de la familia de fotorreceptores CarH 186
V. CONCLUSIONES 191
V.I. BIBLIOGRAFÍA 197

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bandas del espectro electromagnético 4
Figura 2. Resumen de la estructura de los fotorreceptores bacterianos **.....6**
Figura 3. Estructura química general de la molécula de cobalamina y sus diferentes tipos..... 9
Figura 4. Ruta de adenosilación de vitamina B_{12} 11
Figura 5. Espectro de absorción de cobalaminas en el rango de longitudes de onda de 300 a 700 nm..... 11
Figura 6. Relación entre las rutas de síntesis de tetrapirroles modificados..... 14
Figura 7. Resumen de las reacciones llevadas a cabo por la sintetasa de metionina 16
Figura 8. Dominio de unión a cobalamina de la sintetasa de metionina 17
Figura 9. Alineamiento de los residuos conservados en los dominios de unión a B_{12} de sintetasas de metionina y de glutamato mutasas dependientes de AdoCbl..... 18
Figura 10. Las tres posibles conformaciones de las cobalaminas 19
Figura 11. Esquema de la reacción de isomerización catalizada por la mutasa de glutamato..... 21
Figura 12. Estructura de enzimas dependientes de AdoCbl que poseen dominios Rossmann y barriles TIM..... 23
Figura 13. Estructura secundaria de los ribointerruptores de cobalamina..... 25
Figura 14. Estructura cristalina de ribointerruptores dependientes de cobalamina..... 27
Figura 15. Modelo de regulación de la respuesta a la luz por CrtJ y AerR en *R. capsulatus* 30
Figura 16. Ciclo de vida de *M. xanthus*..... 32
Figura 17. Movimiento aventurero y movimiento social de *M. xanthus* 34
Figura 18. Ruta de síntesis de carotenoides en *M. xanthus* y los genes implicados en cada paso 38
Figura 19. Producción de carotenos en *M. xanthus* en respuesta a la luz azul 39
Figura 20. Modelo de regulación de la respuesta a la luz en *M. xanthus* 40
Figura 21. Alineamiento de varias proteínas con dominio de unión al DNA tipo MerR y estructura cristalina de BmrR..... 44
Figura 22. Modelo de regulación de la expresión del operón *carB* por CarA y CarS... 45
Figura 23. Estructura de CarS y del dominio de unión a DNA de CarA 46
Figura 24. Alineamiento del dominio de unión a cobalamina de las sintetasas de metionina de *E. coli* (P13009) y *Mycobacterium leprae* (Q49775) con el dominio C-terminal de CarA (CAA79964.1) y CarH (CAA79965.2)..... 47
Figura 25. Modelo de regulación de la expresión del operón *carB* por CarH..... 49
Figura 26. Alineamiento de proteínas tipo CarH: 9 proteínas de mixobacterias y la de *T. thermophilus* 53
Figura 27. Alineamiento de proteínas tipo CarA de cinco mixobacterias 54
Figura 28. Aplicación del fotorreceptor CarH en la regulación de la expresión génica y la señalización por receptores de membrana..... 56
Figura 29. Aplicación de CarH en la elaboración de hidrogeles fotosensibles..... 57

Figura 30. Representación esquemática de la obtención de construcciones génicas por extensión de productos de PCR solapante 78
Figura 31. Representación gráfica de los ensayos de protección frente a DNasa I, radical hidroxilo y Exonucleasa III 84
Figura 32. Esquema del sistema de doble híbrido bacteriano basado en la reconstitución funcional de Cya A 88
Figura 33. Alineamiento de las secuencias de CarA y CarH de *M. xanthus*, y CarH de *T. thermophilus* 98
Figura 34. Unión de TtCarH a su región operadora 100
Figura 35. EMSA con TtCarH expuesta a luces de diferente longitud de onda 101
Figura 36. Estructura del protómero de TtCarH y comparación con BmrR y MetH 102
Figura 37. Comparación de los contactos con el sustituyente axial superior de la cobalamina en MetH y CarH 103
Figura 38. Estructura del tetrámero de TtCarH 104
Figura 39. El dímero con una disposición “cabeza-cola” 105
Figura 40. Análisis por SEC de los mutantes de TtCarH 107
Figura 41. Análisis por SEC de los mutantes G160Q y G192Q de TtCarH 108
Figura 42. Caracterización de los mutantes afectados en el estado oligomérico mediante EMSA 110
Figura 43. Gráfica utilizada para el cálculo de la afinidad por el DNA de la proteína WT y los mutantes G160Q y G192Q 111
Figura 44. Análisis mediante DHB del efecto de mutaciones en los aminoácidos conservados en CarH de *M. xanthus* (MxCarH) en el dominio de unión a B_{12} y las superficies de interacción monómero-monómero y dímero-dímero 113
Figura 45. Ensayos de complementación en *M. xanthus* 114
Figura 46. Ensayos de complementación en *M. xanthus* con las versiones mutadas en el dominio de unión a B_{12} y en las superficies de interacción monómero-monómero y dímero-dímero de CarH 115
Figura 47. Comparación del operador de CarA con el posible operador de TtCarH .. 116
Figura 48. Unión de TtCarH al DNA 118
Figura 49. Análisis de la unión de TtCarH al DNA mediante ensayos de *footprint*. 119
Figura 50. Análisis de la unión de TtCarH a oligonucleótidos mutados 120
Figura 51. Interacciones entre TtCarH y su operador 121
Figura 52. Unión a AdoCbl y oligomerización de los mutantes que afectan al DBD de TtCarH 122
Figura 53. Unión al DNA de los mutantes que afectan al DBD de TtCarH 123
Figura 54. Efecto en *M. xanthus* de las mutaciones en aminoácidos del DBD de CarH 124
Figura 55. La luz induce cambios conformacionales en TtCarH 125
Figura 56. La mutación H132A facilita la disociación de la Cbl después de la fotólisis 127
Figura 57. La ligación bis-His impide el intercambio de la Cbl en TtCarH 128
Figura 58. Análisis espectrofotométrico del mutante H132 130
Figura 59. Cambio de color asociado a la exposición a la luz de la estirpe DSM 32 de *B. megaterium* 132

Figura 60. Regulación de la expresión génica por BmCarH..... 133
Figura 61. Estructura secundaria predicha para BmCarH en comparación con TtCarH 134
Figura 62. BmCarH conserva los motivos implicados en la unión al DNA y a AdoCbl 136
Figura 63. Comparación del comportamiento en SEC de BmCarH y TtCarH en diferentes condiciones..... 137
Figura 64. Espectros de absorción de UV-visible de BmCarH y oligomerización de BmCarH *in vivo* 138
Figura 65. Análisis mediante EMSA de la unión *in vitro* de BmCarH a P_{BmcarH} y P_{crtI}. 139
Figura 66. Ensayo de dicroísmo circular en el UV lejano con BmCarH..... 140
Figura 67. Ensayos de dicroísmo circular en el UV cercano y espectroscopía de fluorescencia intrínseca de Trp..... 141
Figura 68. Ensayo de fluorescencia con ANS y BmCarH o TtCarH..... 142
Figura 69. Análisis de los mutantes de BmCarH en ausencia y presencia de AdoCbl usando CD UV-lejano y espectroscopía de fluorescencia con ANS 143
Figura 70. Ensayos de SEC con los mutantes en el motivo W-x(9)-EH de BmCarH. 144
Figura 71. Ensayos de afinidad de BmCarH (izquierda) y del mutante H154A (derecha) por AdoCbl mediante espectroscopía UV-vis..... 145
Figura 72. Análisis de la unión a P_{BmcarH} y P_{crtI} de los mutantes en el motivo de unión a AdoCbl 146
Figura 73. Análisis de la unión de la proteína quimérica CBm al promotor P_B de *M. xanthus* 147
Figura 74. Ensayos de complementación en *M. xanthus* para evaluar *in vivo* el efecto de las mutaciones en el motivo de unión a AdoCbl de BmCarH.... 148
Figura 75. BmCarH no retiene la Cbl tras la fotólisis y es capaz de intercambiarla por AdoCbl intacta 149
Figura 76. Alineamiento de las tres repeticiones directas de 11 pb en tándem del operador de TtCarH (*Tt*) y las repeticiones directas identificadas mediante análisis de la secuencia en P_{BmcarH} y P_{crtI}..... 150
Figura 77. Análisis de la unión de BmCarH a las regiones promotoras P_{BmcarH} y P_{crtI} mediante técnicas de *footprint* 152
Figura 78. Unión de BmCarH a oligonucleótidos correspondientes a la región operadora de P_{BmcarH} y P_{crtI} 153
Figura 79. Análisis de la unión de BmCarH a las repeticiones directas en P_{BmcarH} y P_{crtI} 154
Figura 80. Unión de BmCarH al operador de TtCarH, y de TtCarH a los operadores de BmCarH 156
Figura 81. Efecto de la sustitución de la región conectora entre TtCarH y BmCarH.. 158
Figura 82. Análisis comparativo de la proteólisis de BmCarH y TtLkB con GluC. 159
Figura 83. Regulación de la síntesis de carotenoides en *M. xanthus* y *T. thermophilus* 164
Figura 84. Comparación de la conformación de AdoCbl unida a TtCarH en oscuridad y unida a otras enzimas dependientes de AdoCbl 167

Figura 85. Conservación de la pareja de residuos implicados en la formación de dímeros en las proteínas CarH de mixobacterias..... 169
Figura 86. Estructura cristalográfica de GabR y su modo de unión al DNA 170
Figura 87. Comparación del modo de unión al DNA de SoxR y TtCarH 171
Figura 88. Análisis del operador P_B de *M. xanthus* en relación al modo de unión de TtCarH..... 172
Figura 89. Alineamiento de secuencias de CarH de diferentes especies bacterianas..... 175
Figura 90. Esquema de la fotólisis de AdoCbl libre o unida a CarH..... 176
Figura 91. Modo de acción y estados oligoméricos de TtCarH/MxCarH y BmCarH .. 178
Figura 92. Identificación de tres posibles operadores de BmCarH 181
Figura 93. Comparación de las DRs de P_{spxA2}, P_{dnaA} y P_{hlyIII}, y modo de acción de BmCarH..... 183
Figura 94. Unión de MepR al operador de *mepA*..... 184
Figura 95. Efecto del *linker* en BmCarH, TtCarH y TtLkB..... 186
Figura 96. Distribución filogenética de CarH y de su dominio de unión a AdoCbl..... 188

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fotorreceptores bacterianos 5
Tabla 2. Estirpes de *M. xanthus* utilizadas en este trabajo 61
Tabla 3. Estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo 63
Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo 63
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en este trabajo 67
Tabla 6. Parámetros de unión al DNA de las versiones mutadas de TtCarH 111

I. INTRODUCCIÓN

I.1 La luz y los fotorreceptores

La luz solar contiene radiación electromagnética que comprende desde los rayos X hasta las ondas de radio, pero es la energía derivada de la región visible e infrarroja la que sostiene la mayoría de los ecosistemas terrestres y acuáticos (Purcell & Crosson, 2008). La luz es un factor ambiental clave en multitud de procesos biológicos tales como ritmos circadianos, fototropismo, cambios en la morfología, reparación del daño celular, producción de energía, y biosíntesis de compuestos, entre otros (Ballaré, 2014; Chaves *et al*., 2011; Cohen & Golden, 2015; Fankhauser & Christie, 2015; Nagel & Kay, 2012; Sancar *et al*., 2010; Zisapel, 2018). Sin embargo, la luz también puede producir daño fotooxidativo y muerte celular. Esto ocurre porque la absorción de la energía luminosa por pigmentos fotosintéticos (clorofila) u otras moléculas fotosensibilizadoras, tales como los tetrapirroles (porfirinas y hemo) y los derivados de flavinas, genera estados excitados que permiten la formación de oxígeno singlete ($^1O_2$) y otras especies reactivas del oxígeno (ROS). Estas ROS pueden reaccionar rápidamente con lípidos de membrana, proteínas o ácidos nucleicos, dañando los componentes celulares. Además, la luz UV desencadena la formación de lesiones en el DNA en forma de dímeros de timina. Estos dímeros de timina distorsionan la estructura de la doble hebra de DNA de tal forma que compromete la replicación o la transcripción, por lo que han de ser reparados. Así pues, los organismos han desarrollado mecanismos de defensa para reparar y protegerse del daño fotooxidativo, tales como el uso de fotoliasas o la síntesis de pigmentos (carotenos, clorofilas, melanina), entre otros (Elías-Arnanz *et al*., 2011; Glaeser *et al*., 2011; Ziegelhoffer & Donohue, 2009).

La detección de la luz está mediada por proteínas fotorreceptoras. Debido a que la luz que llega a la tierra en su mayoría está comprendida en el rango visible y a que la cadena principal del polipéptido y las cadenas laterales de los aminoácidos no absorben en este rango de longitudes de onda, la mayoría de los fotorreceptores contienen un componente orgánico no proteico conocido como cromóforo, que sirve como el sitio primario de absorción de fotones y que se encuentra unido covalententemente o no al módulo proteico. Los cromóforos están parcialmente insaturados, lo que permite la deslocalización de electrones a través de un sistema π conjugado. Cuanto mayor es el cromóforo, mayor es la posible extensión de la deslocalización de electrones y más larga es la longitud de onda a la que absorberá (Möglich *et al*., 2010). Como ejemplo, en la especie humana, la detección de la luz se produce en la retina del ojo mediante la presencia de células fotorreceptoras

conocidas como conos y bastones. Estas células poseen en su membrana los fotorreceptores conopsina/rodopsina, que constan de una parte proteica, la opsina, y un cromóforo derivado de la vitamina A, el 11-cis retinal. Estos fotorreceptores permiten al ser humano ver en el rango visible, que se corresponde al rango de longitud de onda 370-760 nm del espectro electromagnético (Figura 1) (Palczewski, 2012; Wald, 1968). En ocasiones, como en el caso de la proteína UVR8 (locus 8 de resistencia UV) descubierta en *Arabidopsis thaliana*, no se requiere la asociación con un cromóforo sino que la proteína explota un grupo especifico de sus propios triptófanos para absorber la luz ultravioleta (280-315 nm) (Christie *et al*., 2012; Di Wu *et al*., 2012; Rizzini *et al*., 2011).

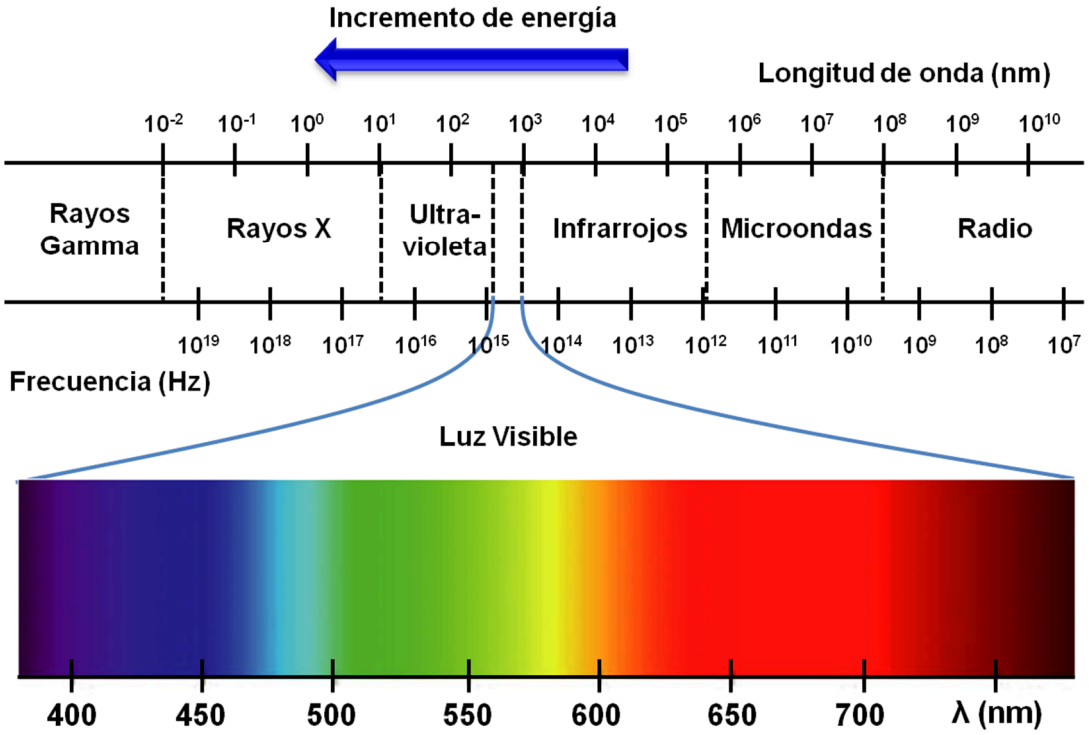


Figura 1. Bandas del espectro electromagnético en función de la longitud de onda (nm) y frecuencia (Hz). Se destaca la región visible del espectro (380- 760 nm) Imagen modificada de Nudel & Hellingwerf (2015).

Los fotorreceptores bacterianos se clasifican en función del cromóforo y el módulo proteico al que se encuentran asociados (Tabla 1) (Möglich *et al*., 2010). Entre los cromóforos identificados hasta la fecha que actúan en el rango visible se incluyen los siguientes: los derivados de flavina FAD (flavín adenín dinucleótido) y FMN (flavín mono nucleótido), el ácido p-cumarínico, el retinal (derivado de la vitamina A), los tetrapirroles lineales y los cetocarotenoides. Por otro lado, entre los posibles módulos proteicos de los fotorreceptores bacterianos se incluyen (Tabla 1 y Figura 2): a) los que unen flavinas y absorben luz azul tales como el dominio LOV (*light, oxygen,*

voltage) que se asocia a FMN, y el dominio BLUF (*blue-light utilizing FAD*) y los criptocromos que se asocian a FAD; b) las xantopsinas que se unen al ácido p-cumarínico y absorben luz azul; c) las OCP (*orange carotenoid proteins*) que se unen a cetocarotenoides y también absorben luz azul; d) las proteorodopsinas que se asocian al retinal y absorben luz azul/verde; e) los bacteriofitocromos que se unen a tetrapirroles lineales que absorben luz roja/roja lejana. Recientemente, el grupo de investigación en el que se ha realizado esta Tesis Doctoral ha descubierto una nueva familia de fotorreceptores bacterianos, denominados CarH, que utilizan la adenosilcobalamina (una forma de la vitamina B_{12}) como cromóforo (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011) y que han sido objeto de estudio en este trabajo.

Tabla 1. Fotorreceptores bacterianos

Módulo Proteico	**Cromóforo**	**Luz absorbida**
LOV (Light, Oxigen and Voltage)	FMN (Flavín mononucleótido)	Azul
BLUF(Blue-Light sensing Using FAD)	FAD (Flavín adenosín dinucleótido)	Azul
PYP (Photoactive Yellow Protein)	Ácido p-cumarínico	Azul
Criptocromo/Fotoliasa	FAD	Azul
Proteorrodopsinas	Retinal	Azul/Verde
Bacteriofitocromos	Bilinas/Tetrapirroles lineales	Rojo/Rojo lejano
OCP (Orange Carotenoid Protein)	3'-hidroxiequinenona (cetocarotenoide)	Azul/Verde
CarH	Adenosilcobalamina	UV/Azul/Verde

*(Leverenz *et al*., 2015; Purcell & Crosson, 2008)

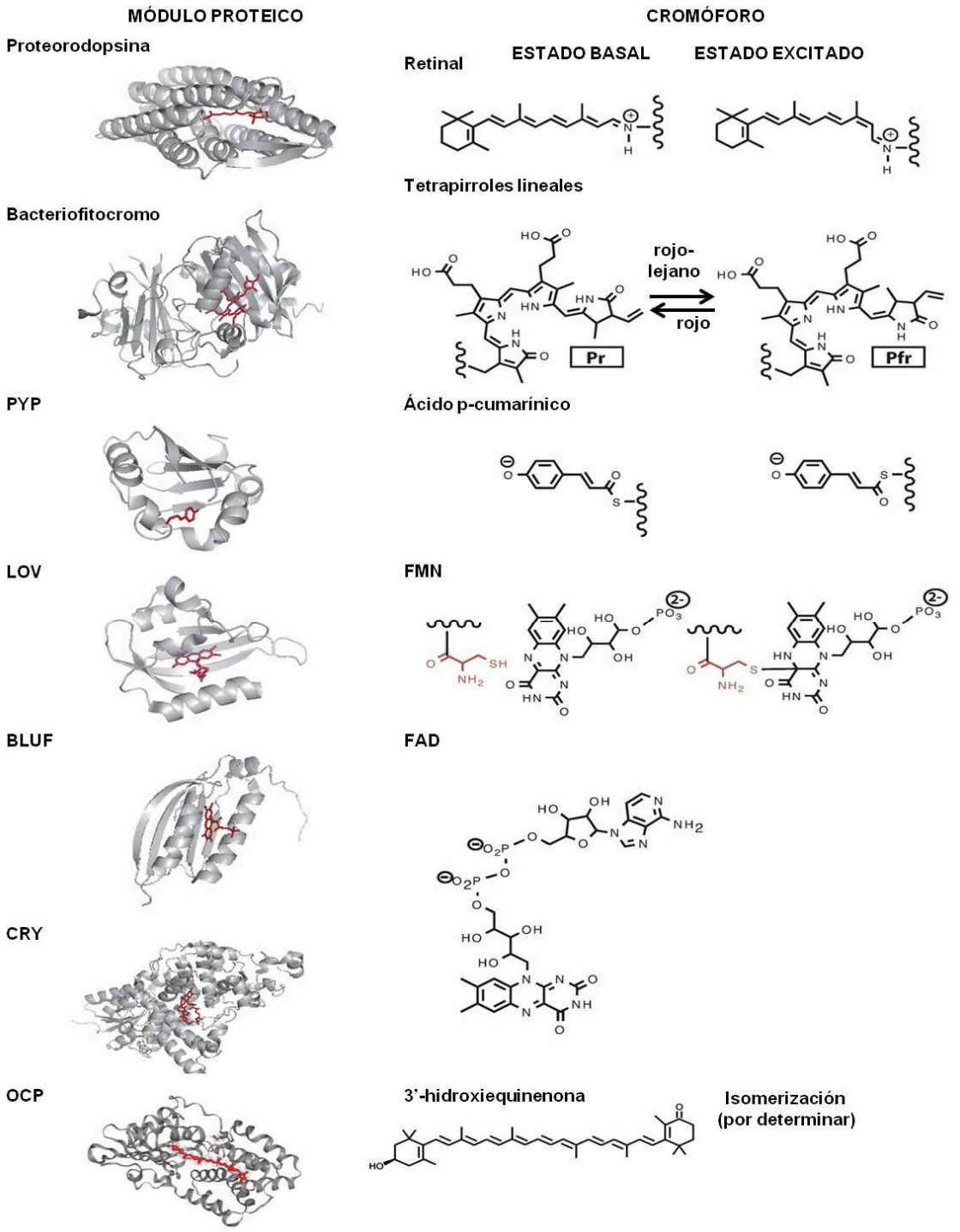


Figura 2. Resumen de la estructura de los fotorreceptores bacterianos. A la izquierda, estructuras tridimensionales de los dominios proteicos fotosensoriales representativos y los cromóforos (en rojo) a los que se unen. A la derecha, se muestran las transiciones estructurales inducidas por la luz; el movimiento de electrones no se muestra. Para el cromóforo FMN del fotorreceptor LOV se marca en rojo el residuo de cisteína conservado, que forma un aducto covalente con el carbono 4a del anillo de flavina. En el caso del fotorreceptor OCP, se produce una isomerización del cromóforo aunque todavía no se conoce con exactitud el mecanismo (Kish *et al*., 2015; Leverenz *et al*., 2015; Purcell & Crosson, 2008).

La absorción de luz por los cromóforos conlleva cambios en la molécula (que inducen cambios conformacionales en el fotorreceptor) que dependen de la fotoquímica particular de cada cromóforo: a) isomerización *cis-trans*, como en el caso del cromóforo de proteorrodopsinas y bacteriofitocromos; b) transferencia de electrones mediada por la fotoquímica de las flavinas, como el caso de criptocromos y BLUF, o en la formación de aductos con la cisteína en los fotorreceptores LOV (Leverenz *et al*., 2015; Möglich *et al*., 2010; Purcell & Crosson, 2008).

Durante años, los fotorreceptores en procariotas se consideraron exclusivos de las bacterias fototróficas, en las que regulan la producción de la maquinaria fotosintética y/o las respuestas fototácticas. Sin embargo, esta suposición se vio desafiada por el hallazgo de fotorreceptores, involucrados en una amplia gama de respuestas fisiológicas, en los organismos quimiotróficos de diversos grupos taxonómicos (M. Gomelsky & Hoff, 2011). Los primeros fotorreceptores descubiertos en bacterias no fotosintéticas fueron los bacteriofitocromos en *Deinococcus radiodurans* y *Pseudomonas aeruginosa* (BphP), y un fotorreceptor tipo LOV (YvtA) en *Bacillus subtilis* (Davis *et al*., 1999; Aba Losi *et al*., 2002; Nudel & Hellingwerf, 2015). El creciente número de genomas procarióticos secuenciados revela que aproximadamente 1/4 de las bacterias poseen al menos un posible bacteriofitocromo, criptocromo, proteína LOV o BLUF (Purcell & Crosson, 2008). La proporción es aún mayor si además se consideran las proteorrodopsinas, las OCP y las proteínas CarH (con más 600 proteínas homólogas distribuidas en distintos grupos taxonómicos (Padmanabhan *et al*., 2017).

Los fotorreceptores pueden estar constituidos por un único dominio proteico o formar parte de una proteína con múltiples dominios. Gracias a esta plasticidad modular del dominio fotorreceptor, la absorción de luz puede provocar respuestas tan diversas como dirigir interacciones moleculares (con proteínas, DNA, RNA, membranas, moléculas pequeñas) o catálisis enzimática (quinasas, diguanilato ciclasas, fosfodiesterasas). Por ello, los fotorreceptores en bacterias no fotosintéticas pueden desempeñar un papel en los procesos de señalización celular, síntesis de pigmentos, metabolismo de nucleótidos, reparación del DNA, adhesión, migración o patogénesis, integrando así otras señales ambientales tales como la temperatura, el estado redox o el estrés salino, o regular comportamientos multicelulares como la formación de biofilms y cuerpos fructíferos (M. Gomelsky & Hoff, 2011; A. Losi & Gärtner, 2008; Nudel & Hellingwerf, 2015; van der Horst *et al*., 2007).

El presente trabajo se centra en una nueva familia de fotorreceptores descubiertos en la bacteria *Myxococcus xanthus*, los fotorreceptores de tipo CarH, que usan la cobalamina o vitamina B_{12} como cromóforo (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011; Pérez-Marín *et al*., 2008). Este hallazgo supuso el descubrimiento de una nueva faceta de la vitamina B_{12}, hasta entonces conocida principalmente por su papel como cofactor enzimático.

I.2 Las cobalaminas

El descubrimiento de la vitamina B_{12} se produjo a principios del siglo XIX, debido a su papel en el metabolismo como factor anti-anemia perniciosa (Minot & Murphy, 1926; Whipple & Robscheitt-Robbins, 1925). Se aisló por primera vez en 1948 a partir de hígado (Rickes *et al*., 1948; Smith, 1948), hecho que supuso un gran avance en el tratamiento de la anemia perniciosa mediante la comercialización de un concentrado de vitamina B_{12} como un compuesto rojo y cristalino. No pasó mucho tiempo hasta que se produjo la descripción por Hodgkin de su estructura cristalográfica (Hodgkin *et al*., 1956). La complejidad de la molécula le ha merecido el calificativo del "cofactor más bello en la naturaleza" (véase Apdo. I.2.1).

Su gran tamaño (entre 1.300-1.600 daltons, dependiendo de la forma de B_{12}) y complejidad química hicieron que el estudio de su biosíntesis constituyera un auténtico desafío. A través de los esfuerzos combinados de Woodward, Eschenmoser y colaboradores, un período de 12 años de investigación en la síntesis de productos naturales orgánicos culminó con la síntesis química de la vitamina B_{12} en los años setenta (Eschenmoser & Wintner, 1977). En la naturaleza, las cobalaminas son sintetizadas *de novo* exclusivamente por bacterias, jugando importantes roles en el metabolismo de bacterias, algas, animales y humanos (pero no en hongos, plantas y algunas bacterias). Su papel de cofactor de enzimas importantes en el metabolismo de los ácidos grasos o del folato convierten a la vitamina B_{12} en un compuesto esencial para humanos y animales (Barker *et al*., 1958; Giedyk *et al*., 2015; Guest *et al*., 1962). Aunque durante años solo se conoció su función biológica como cofactor enzimático, recientemente se ha descubierto su papel como regulador de la expresión génica, ya sea en los ribointerruptores (Bastet *et al*., 2011) o en el fotorreceptor CarH (Jost *et al*., 2015b; Ortiz-Guerrero *et al*., 2011; Pérez-Marín *et al*., 2008), lo que refleja la gran versatilidad funcional de las cobalaminas.

I.2.1 Estructura y química

La vitamina B_{12} es el cofactor orgánico más complejo que se conoce, y para su biosíntesis se requieren al menos 25 enzimas. Estructuralmente, la molécula de B_{12} está compuesta por tres partes: un núcleo central, un sustituyente axial inferior y un sustituyente axial superior. El núcleo central está formado por un anillo tetrapirrólico plano llamado anillo corrínico, que posee como radicales grupos metilo, acetamida y propionamida (Figura 3A). El anillo corrínico posee cuatro nitrógenos pirrólicos coordinando un átomo de cobalto central, que normalmente está en el estado de oxidación Co (III). El sustituyente axial inferior del cobalto, Coα, es el el nitrógeno 7 del dimetilbencimidazol (Dmb). El Dmb se encuentra unido covalentemente al anillo corrínico como parte del denominado "bucle nucleotídico". El nucleótido (3´fosforribosil-dimetilbencimidazol o 3´PRDmb) se une a través de un enlace fosfodiéster a un grupo propionamida del anillo D del anillo corrínico. Este enlace es interesante porque se produce con fosfato en posición 3´ de la ribosa en lugar de 5´, que es lo que ocurre en la mayoría de los nucleótidos (Roth *et al*., 1996; Warren *et al*., 2002) (Figura 3A). A esta conformación de la cobalamina se la conoce como *base-off*.

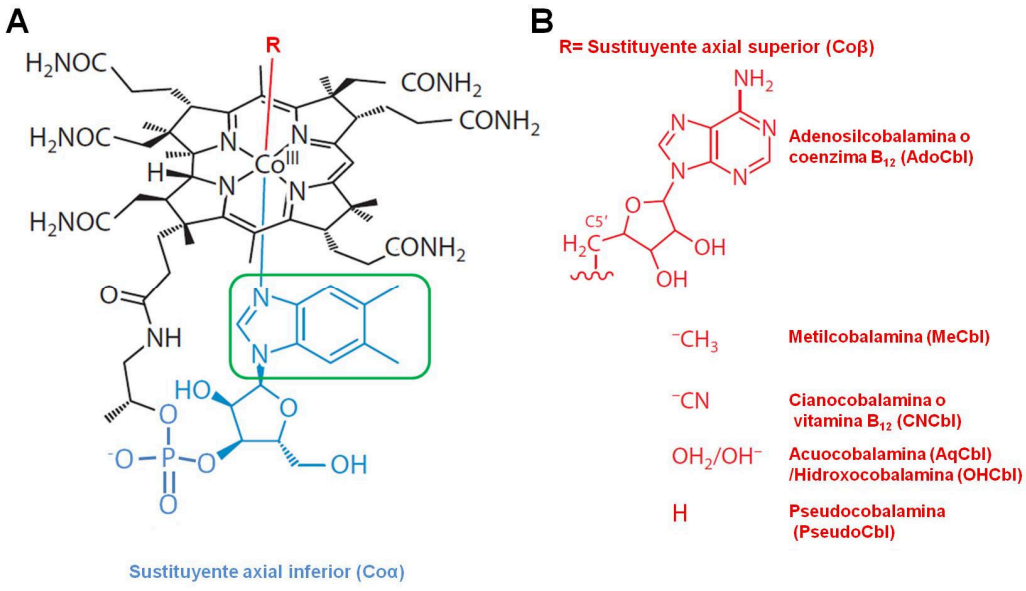


Figura 3. Estructura química general de la molécula de cobalamina y sus diferentes tipos. (Izquierda) Estructura química de la cobalamina en estado *base-off*; el sustituyente axial inferior, recuadro verde, es el dimetilbenzimidazol (Dmb); en azul, el 3'-fosforribosil-dimetilbenzimidazol (3'PRDmb); (Derecha) los seis tipos posibles de sustituyentes que actúan como ligando superior del átomo de Co y que determinan los diferentes tipos de cobalamina existentes. Imagen modificada de Padmanabhan *et al*., (2017).

Existen distintos tipos de cobalaminas en función del sustituyente axial superior (Coβ) (Figura 3B). Las dos formas biológicamente activas, utilizadas por las enzimas dependientes de B_{12}, son dos alquilcobalaminas: la metilcobalamina (MeCbl), en la que el cobalto está unido a un grupo metilo, y la adenosilcobalamina (AdoCbl) o coenzima B_{12}, cuyo ligando superior es un grupo 5'-desoxiadenosina. El enlace Co-C de la MeCbl y la AdoCbl representa uno de los pocos enlaces organometálicos naturales conocidos (Banerjee & Ragsdale, 2003; Drennan *et al*., 1994; Lenhert & Hodgkin, 1961; Rossi *et al*., 1985). Aunque el término "vitamina B_{12}" suele utilizarse para referirse a distintas formas de cobalamina, estrictamente hablando la vitamina B_{12} se corresponde con la cianocobalamina (CNCbl), una forma biológicamente inactiva que presenta un grupo ciano. La hidroxocobalamina, la aquocobalamina y la pseudocobalamina presentan un grupo hidroxilo (OH), una molécula de H_2O, o un H, respectivamente (Grossman, 2016; Lenhert, 1968; Ludwig & Matthews, 1997).

La forma de cobalamina que se comercializa como medicamento o suplemento alimenticio para humanos es la forma inactiva CNCbl, que debe ser convertida una vez ingerida a cualquiera de las formas biológicamente funcionales. En el caso de AdoCbl, dicha conversión se produce en primer lugar por una decianasa y una reductasa, que eliminan el grupo ciano generando cobalto (I) (Johnson *et al*., 2011; Roth *et al*., 1996). Posteriormente, actúan las adenosiltransferasas de ATP:corrinoides (ATR) que catalizan la formación del enlace inusual Co-C de la AdoCbl, al transferir el grupo adenosilo (Ado) de una molécula de ATP a una cob(I)alamina, desempeñando un papel crítico en la biosíntesis de AdoCbl (Figura 4). Así, las ATR son las responsables de mantener el suministro de AdoCbl requerido durante el metabolismo, utilizando precursores corrinoides rescatados de fuentes externas (como la vitamina B_{12}) o en el caso de ciertas bacterias, a partir de síntesis *de novo*. En base a la similitud de su secuencia aminoacídica, las adenosiltransferasas y sus homólogos se pueden dividir en tres familias: las de tipo PduO, las de tipo CobA y las de tipo EutT (Pallares *et al*., 2017; Yamanishi *et al*., 2005). La formación de MeCbl es llevada a cabo por las propias enzimas que la utilizan como cofactor, las metiltransferasas. El cofactor de cobalamina en estas enzimas sirve como donador del grupo metilo y también de aceptor para su regeneración (Koutmos *et al*., 2009). Las propiedades del enlace Co-C han sido ampliamente estudiadas, por su relevancia en el papel como cofactor enzimático de las cobalaminas. Por otro lado, una propiedad significativa de dicho enlace 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).

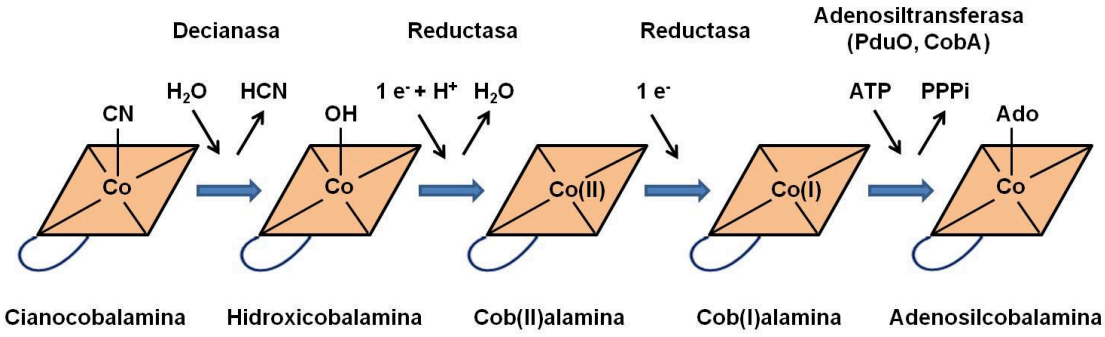


Figura 4. Ruta de adenosilación de vitamina B_{12}. La estructura planar representa el anillo tetracorrínico de la cobalamina, unido mediante cuatro enlaces al átomo de cobalto. El lazo negro se corresponde con el Dmb. En el primer paso de la reacción, una decianasa elimina el grupo CN de la cobalamina dando lugar a OHCbl. Posteriormente, una reductasa lleva a cabo una reacción de reducción y deshidratación, produciendo una molecula de agua y reduciendo OHCbl a Cob(II)alamina, que seguidamente será reducida a Cob(I)alamina. Por último, la adenosiltransferasa transfiere un grupo adenosilo a partir de ATP, formando AdoCbl. Imagen modificada de Johnson *et al.*, (2011).

I.2.2 Fotoquímica de las cobalaminas

Las cobalaminas poseen una compleja fotoquímica y propiedades fotofísicas derivadas de su capacidad de absorción en el rango UV-visible, que está modulada por el estado de oxidación del cobalto y la naturaleza de los ligandos superior e inferior (Liptak & Brunold, 2006; Stich *et al.*, 2003). La CNCbl y la AqCbl muestran un espectro de absorción "típico", con un pico unitario máximo a 361 nm. Por el contrario, las alquilcobalaminas, tales como MeCbl y AdoCbl, exhiben espectros de absorción característicos en oscuridad y luz (Figura 5).

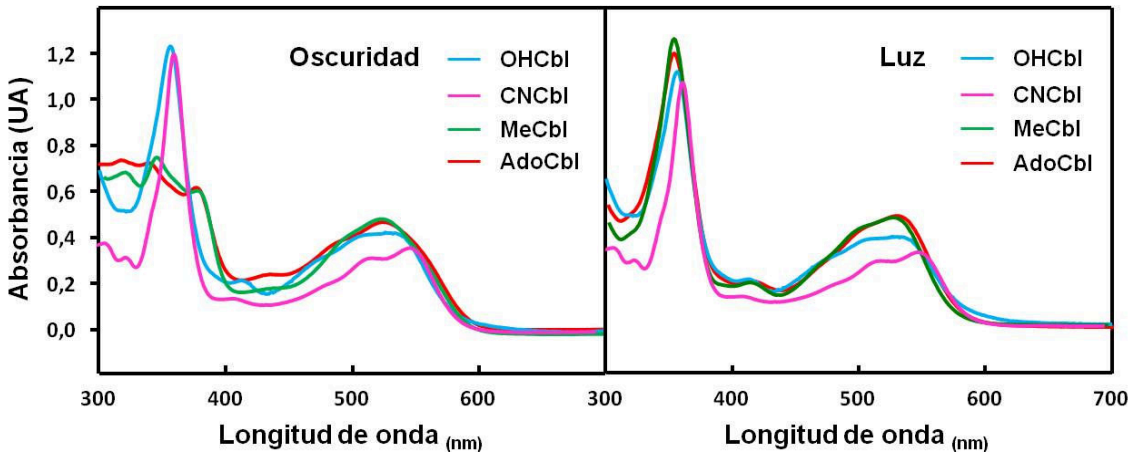


Figura 5. Espectro de absorción de cobalaminas en el rango de longitudes de onda de 300 a 700 nm. (Izquierda) Espectro de absorción en oscuridad, en el que se observa el pico característico a 361 nm para OHCbl y CNCbl; MeCbl y AdoCbl muestran un espectro distinto. (Derecha) La fotólisis del enlace Co-C de MeCbl y AdoCbl, produce cambios en el espectro de

absorción.

El estudio, mediante cálculos teóricos y espectroscopía ultrarrápida, de los estados electrónicos excitados producidos por la absorción de luz ha revelado aspectos fotoquímicos fundamentales para entender el funcionamiento de las alquilcobalaminas. Los procesos fotoquímicos subyacentes a la escisión del enlace Co-C son controlados por dinámicas de relajación electrónicas que se producen en escalas de tiempo de 10 a 100 picosegundos. La absorción en el espectro de longitudes de onda comprendido entre el visible (<530 nm) hasta cerca de UV (~400 nm) es la responsable de la ruptura del enlace Co-C y la formación de productos intermedios. Para la MeCbl, pero no para la AdoCbl, existen diferencias de rendimiento energético según la longitud de onda incidente, siendo alto a 400 nm y mucho más bajo a 522 nm. La absorción de luz produce una escisión que normalmente es homolítica, generando radicales alquilo y cob(II)alamina, que pueden regenerar el enlace o disociarse. La recombinación de los radicales alquilo para regenerar el enlace Co-C depende de la temperatura, de la naturaleza del solvente y del tamaño del radical alquilo, y la escala de tiempo varía desde unas pocas decenas de picosegundos para el radical metilo a alta fluidez o hasta más de un nanosegundo para los radicales más grandes a baja fluidez (Stickrath *et al*., 2009; Walker, Jarrett, *et al*., 1998; Walker, Shiang, *et al*., 1998). El rendimiento final de la fotólisis en este caso viene dado por una competición entre la regeneración del enlace Co-C y la disociación, que se ve favorecida por la presencia de oxígeno molecular, que puede interceptar los radicales formados y evitar la regeneración (Chen, 1989; Yamada *et al*., 1966).

Cuando no se produce la regeneración del enlace Co-C tras la fotólisis, los radicales alquilo y la cob(II)alamina sufren una serie de reacciones complejas que dependen de las condiciones ambientales. En el caso de la AdoCbl fotolisada, en condiciones aeróbicas se genera un radical 5´-desoxiadenosilo que rápidamente reacciona con oxígeno molecular para formar 5´-peroxiadenosina, que se descompone en 5´-aldehído adenosina como producto mayoritario (con adenosina y adenina como productos minoritarios). Sin embargo, en ausencia de oxígeno, el radical adenosilo se transforma en 5´,8-cicloadenosina mediante la formación de un enlace entre el C5´ de la ribosa y el C8 de la adenina (Hogenkamp, 1963; Jost *et al*., 2015b). El otro producto principal de la fotólisis de AdoCbl, la cob(II)alamina, es estable en condiciones anaeróbicas pero se oxida rápidamente en presencia de oxígeno a AqCbl, una reacción en la cual interviene el compuesto intermediario 5´ peroxiadenosina (Schwartz & Frey, 2007).

I.2.3 Origen ancestral de las cobalaminas y su distribución en la naturaleza

La vitamina B_{12} es excepcional en comparación con otras vitaminas y coenzimas por varias razones. En primer lugar, debido a su complejidad estructural, que también se refleja en sus requisitos biosintéticos. En segundo lugar, por la distribución en la naturaleza de la capacidad de biosíntesis de B_{12}. Los organismos que no tienen enzimas dependientes de este cofactor (plantas, hongos y algunos procariotas), poseen enzimas o vías metabólicas alternativas. Existen también muchos microorganismos que poseen enzimas dependientes e independientes de B_{12} para la misma reacción, como es el caso de *Escherichia coli* para la sintetasa de metionina (Pejchal & Ludwig, 2005; Ubhi & Robertus, 2015; Wheatley *et al*., 2016). La dificultad en la biosíntesis de B_{12} se ve compensada en bacterias y arqueas por la existencia de mecanismos de transporte de intermediarios de la ruta de síntesis, con la consecuente disminución del gasto energético en la síntesis de este valioso cofactor (Fang *et al*., 2017).

La síntesis de *novo* comienza a partir de uroporfirinógeno III, que representa el punto común de las vías de síntesis de cobalaminas y otros tetrapirroles tales como el grupo hemo, sirohemo, las clorofilas y coenzima F430 (Figura 6). Existen dos rutas posibles de síntesis de cobalaminas, aeróbica y anaeróbica (descubiertas en *P. denitrificans y Salmonella typhimurium*, respectivamente), que se diferencian en el momento de la inserción del cobalto (al principio en la vía aeróbica y al final en la ruta anaeróbica) y en el método utilizado para la contracción del anillo, diferencias que se reflejan a nivel genético por la presencia o ausencia de ciertos genes. Ambas rutas convergen de nuevo a partir del compuesto ácido a,c-diamida cob(II)inico, para terminar de formar el anillo corrínico y que se produzca la unión de los dos sustituyentes (Cobα y Cobβ) (Fang *et al*., 2017; Warren *et al*., 2002) (Figura 6).

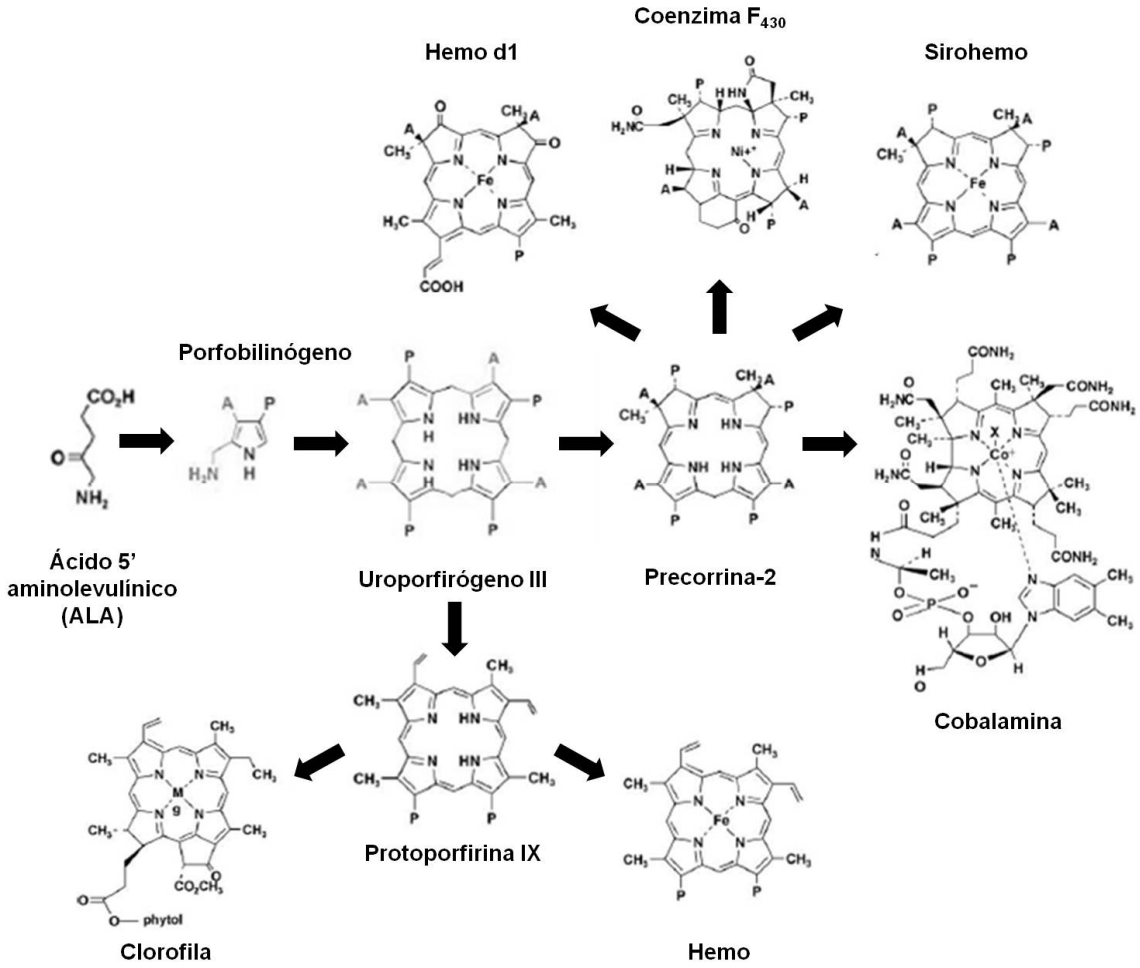


Figura 6. Relación entre las rutas de síntesis de tetrapirroles modificados. Todos los tetrapirroles modificados, tales como hemo, clorofila, sirohemo, hemo d1, coenzima F430 y cobalaminas derivan del ácido 5-aminolevulínico (ALA). El uroporfirinógeno III puede sufrir decarboxilación y oxidación para dar protoporfirina IX, el precursor del hemo y la clorofila, o puede sufrir metilación para producir precorrin-2, el progenitor de sirohemo, coenzima F430, hemo d1 y cobalaminas. Imagen modificada de Warren *et al*., (2002).

I.3 Enzimas que emplean cobalaminas como cofactor

Las cobalaminas juegan un papel importante como cofactores enzimáticos en el metabolismo de microorganismos, animales y humanos (Banerjee & Ragsdale, 2003; Gruber *et al*., 2011; Ludwig & Matthews, 1997). La MeCbl se utiliza por las metiltransferasas para las reacciones de transferencia de grupos metilo; la AdoCbl se utiliza por isomerasas tales como mutasas y también por deshidratasas, desaminasas y ribonucleótido reductasas de clase II; y la cobalamina sin un ligando superior se utiliza por deshalogenasas y por la enzima epoxiqueuosina reductasa, que modifica el ARN (Dowling *et al*., 2016; Payne, Fisher, *et al*., 2015; Payne, Quezada, *et al*., 2015).

Las actividades de estas enzimas, que se unen a su cofactor con K_D en el rango nM-mM (Sukumar, 2013), se basan en la escisión del enlace Co-C y la formación de especies altamente reactivas. Normalmente, las enzimas dependientes de MeCbl producen una escisión heterolítica del enlace Co-C, mientras que las dependientes de AdoCbl lo hacen de manera homolítica. A continuación, se describe más detalladamente el funcionamiento de las metiltransferasas y las isomerasas.

I.3.1 Metiltransferasas

En las metiltransferasas dependientes de B_{12}, la MeCbl juega un papel crucial en la reacción enzimática, dado que la transferencia del grupo metilo se produce mediante la ruptura heterolítica del enlace Co-C de la MeCbl. Esta ruptura da lugar a un cobalto reducido que se queda con los electrones del enlace, originando cob(I)alamina, y un carbocatión metilo preparado para ser transferido. Estas enzimas desempeñan un papel importante en el metabolismo de aminoácidos en muchos organismos (incluidos los seres humanos), así como en el metabolismo de compuestos monocarbonados y la fijación de CO_2 en microorganismos anaeróbicos (Banerjee & Ragsdale, 2003; Goulding *et al*., 1997; Ludwig and & Matthews, 1997).

La primera metiltransferasa dependiente de B_{12} que se caracterizó y la que más ha sido estudiada es la sintetasa de metionina de *Escherichia coli* (MetH), que cataliza la transferencia de un grupo metilo de metilcobalamina a homocisteína, produciendo metionina y cob(I)alamina unida a la enzima. El cofactor se regenera aceptando el grupo metilo del tetrahidrofolato (CH_3-H_4 folato), regenerando MeCbl y liberando H4 folato (Banerjee & Ragsdale, 2003). La reacción de transferencia del grupo metilo de MeCbl y su posterior regeneración constituyen las primeras etapas del ciclo de reacciones catalizadas por la sintetasa de metionina. En ocasiones, el cofactor cob(I)alamina se oxida a una forma inactiva, cob(II)alamina, que debe ser reactivada mediante una metilación reductiva utilizando flavodoxina reducida como donador de electrones y adenosilmetionina como donador de metilo (Figura 7) (Goulding *et al*., 1997).

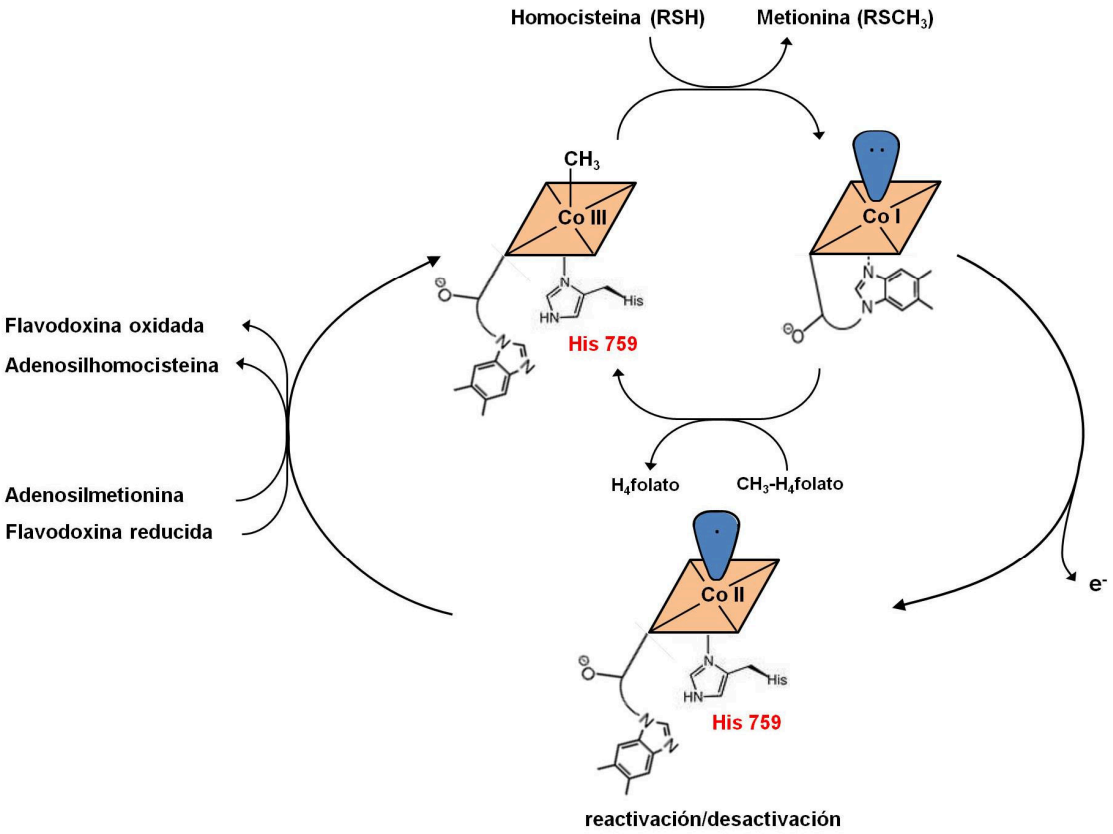


Figura 7. Resumen de las reacciones llevadas a cabo por la sintetasa de metionina. Se representa el estado de oxidación del Co y la coordinación del Co con el dimetilbenzimidazol o la histidina 759 de la sintetasa de metionina. Imagen modificada de Goulding *et al*., (1997).

MetH es un único polipéptido de 136 kDa, que comprende cuatro dominios o regiones: los dos primeros son la región aceptora de unión a homocisteína (38 kDa) y la región de unión a metiltetrahidrofolato (33 kDa). Estructuralmente, ambos son barriles TIM (de *triosa fosfato isomerasa*) compuestos por 8 hélices α y 8 láminas β plegadas. El dominio de unión a homocisteína cataliza la transferencia de un grupo metilo de metilcobalamina al aceptor unido para formar metionina y cob(I)alamina, mientras que el dominio de unión a folato cataliza la transferencia del grupo metilo del metiltetrahidrofolato a cob(I)alamina. La tercera región es la de unión a cobalamina (27 kDa) y la cuarta es un dominio de activación (38 kDa) que es el responsable de la reactivación del cofactor cuando éste es oxidado a la forma cob(II)alamina (Evans *et al*., 2004; Goulding *et al*., 1997; Matthews *et al*., 2009).

El dominio de unión a cobalamina de MetH (similar en secuencia al dominio C-terminal de CarA y CarH de *M. xanthus*, objeto de estudio de esta Tesis) comprende dos subdominios: (a) un subdominio N-terminal (subdominio I) de unos 90 aminoácidos constituido por dos pares de hélices α antiparalelas, tipo *helix bundle*

(haz de hélices) y un subdominio tipo barril α/β, que se asemeja al dominio Rossmann típico de proteínas de unión a nucleótidos (subdominio II), compuesto por 6 hélices alfa y 5 láminas β plegadas (Figura 8). En esta estructura, el anillo de corrina de la MeCbl está intercalado entre los dos subdominios (entre las láminas β IIβ1 y IIβ3). El subdominio *helix bundle* (hélices Iα3 y Iα4) actúa como una caperuza del grupo metilo (Coα) de la corrina, protegiéndolo del solvente. Esta caperuza dificulta el acceso de los sustratos para la transferencia del grupo metilo, haciendo necesario el desplazamiento de las hélices α del subdominio para que tenga lugar la acción enzimática (Drennan *et al*., 1994; Jarrett *et al*., 1996).

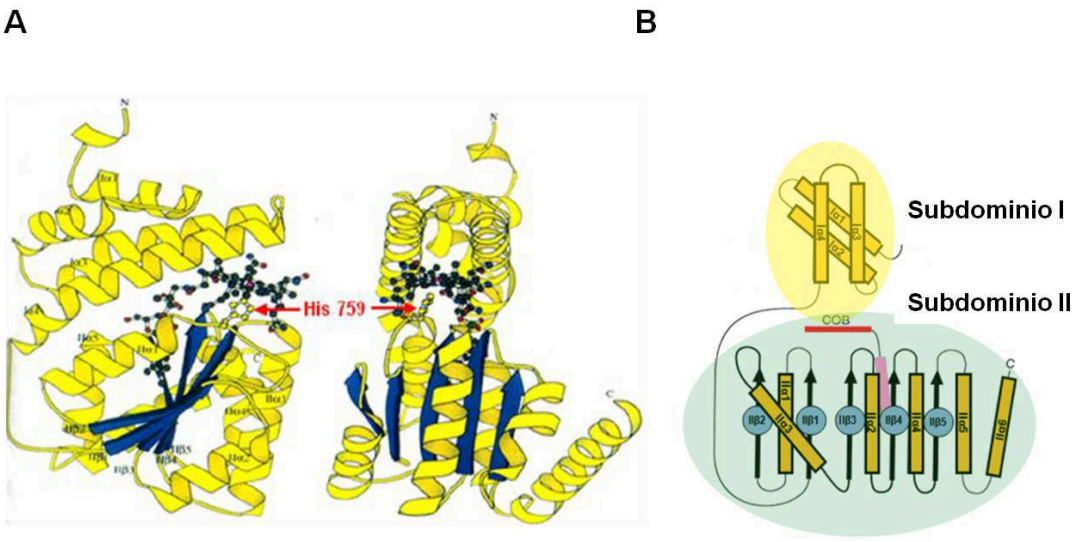


Figura 8. Dominio de unión a cobalamina de la sintetasa de metionina. (A) En amarillo las hélices α, en azul las láminas β plegadas; la parte superior se corresponde con el subdominio *helix bundle* (I), la inferior con el subdominio Rossmann (II); en ambas estructuras se observa la cobalamina (bolitas azules) y la His 759 que participa en el desplazamiento del Dmb y la formación del estado *base-off His-on*. **(B)** Diagrama topológico. COB: metilcobalamina. Se representa el Dmb situado en un "bolsillo" del subdominio Rossmann (sombreado verde); el anillo tetrapirrólico y el sustituyente superior se sitúan entre el dominio helix bundle (sombreado amarillo) y el dominio Rossmann (Drennan *et al*., 1994; Ortiz-Guerrero, 2013).

El sustituyente inferior de la MeCbl, el Dmb, se queda en una especie de "bolsillo" del subdominio tipo Rossmann (Figura 8B) en la forma *base-off*, en la cual el 3´PRDmb está descoordinado del Co(III). La descoordinación ocurre por una protonación del 3´PRDmb que permite que una histidina acceda al cobalto dando lugar a la configuración *His-on*. El cambio de *base-on* a *base-off His-on* depende de un motivo conservado de unión a cobalamina (Drennan *et al*., 1994; Gruber *et al*., 2011) compuesto por 7 aminoácidos del subdominio α/β. Este motivo está presente en las sintetasas de metionina de *E. coli*, *Mycobacterium leprae* y *M. xanthus*, pero también

en enzimas dependientes de AdoCbl como la metilmalonil-CoA mutasa humana o la glutamato mutasa de *Clostridium tetanomorphum*. Por lo tanto, la presencia de este motivo es un indicador del modo de unión a cobalamina *base-off His-on* (Figura 9).

Figura 9. Alineamiento de los residuos conservados en los dominios de unión a B_{12} de sintetasas de metionina y de glutamato mutasas dependientes de AdoCbl. MxMs: sintetasa de metionina de *M. xanthus*; EcMS, sintetasa de metionina de *E. coli*; MlMS: sintetasa de metionina de *M. leprae*; HsMM, metilmalonil-CoA mutasa de *Homo sapiens*; CtGM: glutamato mutasa de *C. tetanomorphum*. En verde, el motivo consenso de unión a cobalamina situado en el subdominio Rossmann (Drennan *et al*., 1994).

El mecanismo por el cual se produce el desplazamiento del Dmb se muestra en la Figura 10: cuatro de los siete aminoácidos conservados, tres glicinas y una serina, se localizan en el "borde" del bolsillo que aloja la cola nucleotídica. La primera glicina se sitúa en la hélice IIα1 y a través de su cadena lateral establece contactos cercanos al fosfato y la ribosa de la cola nucleotídica. Las otras dos glicinas producen un impedimento estérico al chocar con la ribosa y el Dmb; la serina es capaz de unir hidrógeno al nitrógeno N3 del Dbm, el mismo nitrógeno que está coordinado con el Co. La histidina conservada sustituye al Dmb que estaba unido al Co, la leucina está adyacente a la histidina y el aspártico establece un enlace por puente de hidrógeno con la histidina, de gran importancia para el funcionamiento de la enzima (Drennan *et al*., 1994).

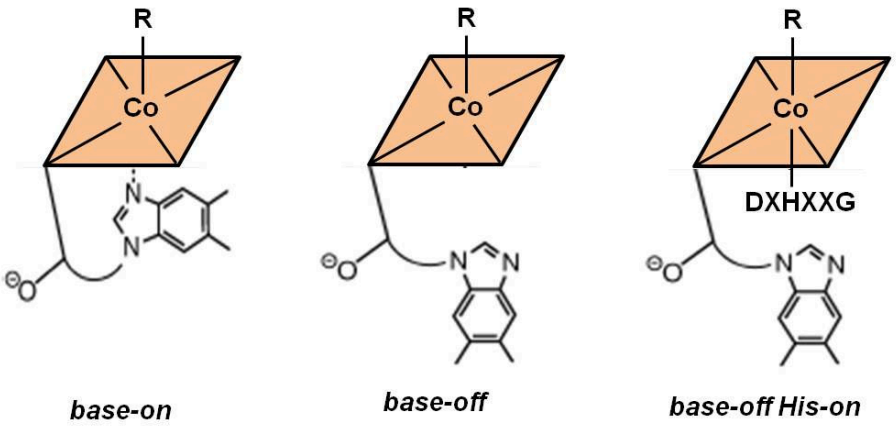


Figura 10. Las tres posibles conformaciones de las cobalaminas. El cofactor libre puede existir en conformación *base-on* o *base-off*, siendo el primero predominante a pH fisiológico. En algunas enzimas se produce la sustitución del Dmb por una histidina, dando lugar a la conformación *base-off His-on*. La histidina forma parte de un dominio de unión a cobalamina, "DXHXXG". Imagen modificada de Gruber *et al*., (2011).

El aspártico también se une mediante otro puente de hidrógeno a un residuo de serina, conservado en las metiltransferasas, pero no en las mutasas, que se encuentra en una posición más exterior. Así, estos tres residuos His-Asp-Ser (conocidos como tríada-ligando) forman un "canal" para la transferencia de protones entre el disolvente y la histidina. La protonación y desprotonación del par His-Asp modula la estabilidad y reactividad de la cobalamina en la sintetasa de metionina, influyendo en la fuerza del enlace N-Co y promoviendo la formación y ruptura heterolítica del enlace C-Co que resultan críticas para la actividad de esta enzima (Drennan *et al*., 1994). Diferentes estudios de fotoestabilidad y reactividad de la enzima silvestre y de varios mutantes en alguno de estos residuos confirman la importancia del papel de la tríada-ligando (Amaratunga *et al*., 1996; Jarrett *et al*., 1996).

I.3.2 Isomerasas

La AdoCbl sirve como cofactor de varias enzimas que desempeñan un papel importante en la fermentación y el catabolismo. Todas estas enzimas inician la catálisis promoviendo la rotura homolítica del enlace Co-C del cofactor en respuesta a la unión del sustrato a sus sitios activos (Conrad *et al*., 2015). De las enzimas dependientes de AdoCbl, las isomerasas constituyen la subfamilia de enzimas más grande en bacterias, donde juegan un papel importante en las vías de fermentación. La única excepción es la metilmalonil-CoA mutasa, que está ampliamente distribuida en la naturaleza, desde bacterias y Archaea a los animales, incluidos los humanos, participando en la degradación de ácidos grasos. En algunos organismos, una

ribonucleótido reductasa dependiente de B_{12} cataliza la conversión de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos, que es importante para la replicación y reparación del ADN. El modo de acción de las isomerasas dependientes de B_{12} está basado en la ruptura homolítica del cofactor, que cataliza intercambios de hidrógeno entre carbonos del sustrato y AdoCbl para favorecer el reordenamiento estructural del sustrato. Estas reorganizaciones incluyen cambios estructurales del esqueleto de carbono (llevadas a cabo por enzimas de Clase I), reacciones de eliminación (enzimas de Clase II) y reacciones aminomutasa (enzimas clase III, que también requieren piridoxal fosfato como cofactor adicional). El hidrógeno puede proceder del carbono (en metilmalonil-CoA mutasa, isobutiril-CoA mutasa, glutamato mutasa y metilenglutarato mutasa), el nitrógeno (en etanolamina amoniaco liasa, D-ornitina aminomutasa y β-lisina mutasa) o el oxígeno (en diol deshidratasa) (Banerjee & Ragsdale, 2003; Dowling *et al*., 2012).

El primer paso para la actividad de las isomerasas es la homólisis del enlace Co-C del cofactor, repartiendo un electrón para el Co y otro para el grupo adenosilo, para generar un par de radicales, cob(II)alamina y el radical 5' adenosilo. Esto permite la propagación de la reacción que, en el mecanismo más simple, involucra la sustracción del átomo de hidrógeno del sustrato, la reordenación de un sustrato radical y la reabstracción de un átomo de hidrógeno de la desoxiadenosina (Figura 11). Luego, los radicales derivados del cofactor, en una inversión del primer paso, se recombinan para completar un ciclo de renovación catalítica. La ruptura del enlace Co-C de AdoCbl mediante escisión homolítica es inusual y no se conoce con profundidad, pero se ha demostrado que la enzima es capaz de acelerar la velocidad de la reacción unas 10^{12} veces (Marsh & Ballou, 1998; Padmakumar *et al*., 1997). Es posible que interacciones electrostáticas entre la coenzima disociada y la proteína, y un posicionamiento preciso en la proteína del radical adenosilo contribuyan a la acción enzimática (Román-Meléndez *et al*., 2014). La descomposición fotolítica no enzimática de AdoCbl en condiciones aeróbicas, que también da como resultado la formación de cob(II)alamina y el radical 5'-desoxiadenosilo, se considera un sistema modelo para el estudio de la acción enzimática de la coenzima (Schwartz & Frey, 2007).

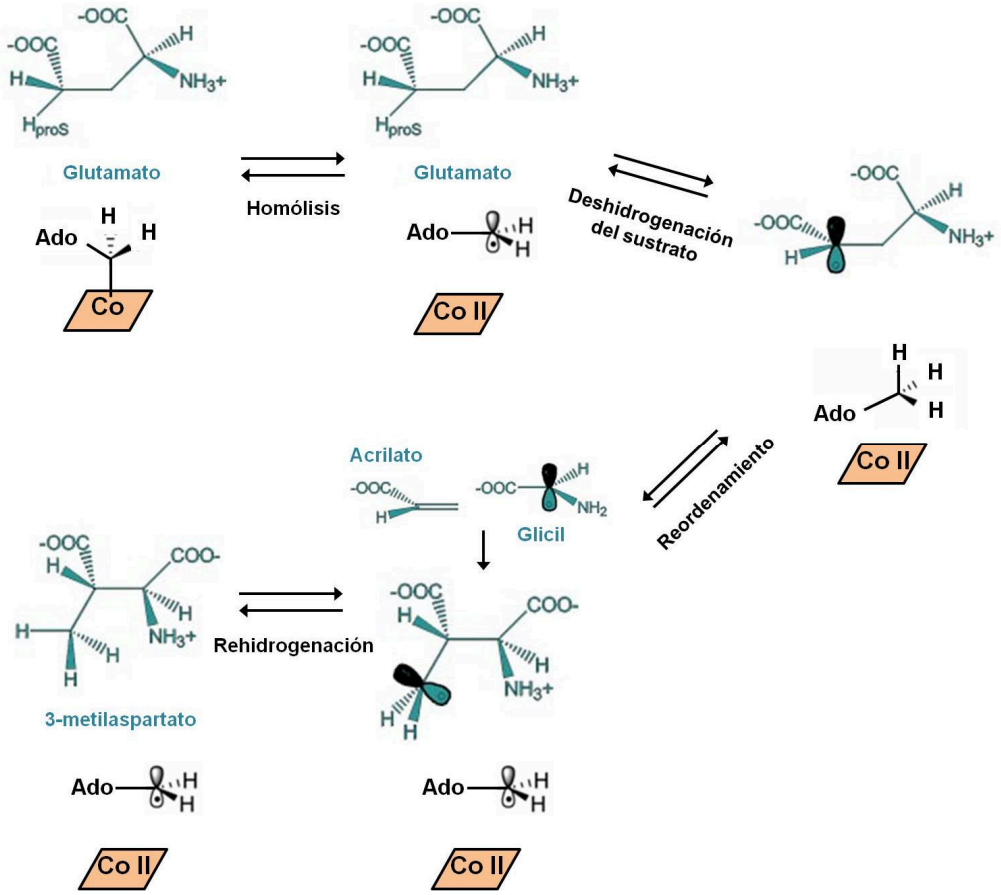


Figura 11. Esquema de la reacción de isomerización catalizada por la mutasa de glutamato. Imagen modificada de Kratky & Gruber (2006).

Las distintas clases de isomerasas dependientes de AdoCbl se diferencian en la posición que ocupa el Dmb. Las de tipo I y III tienen Dmb como ligando axial inferior y éste es desplazado (al igual que ocurre en las metiltransferasas) adoptando la configuración *base-off His-on* característica del motivo DXHXG…SXL…GG (Mancia *et al*., 1996). Por el contrario, en las enzimas tipo II, que carecen de dicho motivo, el sustituyente axial inferior es el Dmb, adoptando la conformación *base-on* (Shibata *et al*., 1999).

Las isomerasas de tipo I presentan una estructura común. Las que mejor han sido caracterizadas son la mutasa de glutamato y la de metilmalonil-coA. La mutasa de glutamato de *C. tetanomorphum* fue la primera enzima dependiente de B_{12} descubierta y cataliza la conversión reversible de (S)-glutamato a (2S, 3S)-3- metilaspartato. La enzima metilmalonil-CoA cataliza la conversión de metilmalonil-CoA en succinil-CoA, permitiendo que los productos de descomposición de los ácidos grasos de cadena

impar, varios aminoácidos hidrófobos (isoleucina, valina, metionina y treonina) y el colesterol entren en el metabolismo primario.

En general, las isomerasas dependiente de AdoCbl presentan un dominio de unión a sustrato (sitio activo) compuesto por plegamientos proteicos α/β, que es típicamente un barril TIM (8α 8β), en substitución del haz de hélices α de las metiltransferasas. Las láminas β paralelas forman la pared interior, que le dan su forma de barril, mientras que las hélices α forman la pared exterior. Cada lámina β se conecta con la adyacente en el barril a través de un largo bucle, que incluye una de las hélices. La excepción notable es la ribonucleótido reductasa, en la que el sitio activo se encuentra en un barril α/β de 10 cadenas que se parece más a otras clases de ribonucleótido reductasas. Este dominio TIM se asienta sobre el sustituyente axial superior de la cobalamina favoreciendo la unión de la coenzima. Además, al igual que las metiltransferasas, poseen un dominio similar al dominio Rossman (α/β), donde se encuentra el motivo de unión a B_{12} situado en un bucle largo y flexible que permite la unión de la histidina al cobalto una vez desplazado el Dmb, que queda situado en un "bolsillo" (Banerjee & Ragsdale, 2003; Dowling *et al*., 2012). Existen algunas diferencias sustanciales entre las isomerasas. En concreto, la mutasa de glutamato (MutES) está compuesta por dos polipéptidos independientes, MutE y MutS en *Clostridium cochlearium* (GlmE y GlmE en *C. tetanomorphum*). Mut E (GlmE) contiene el sitio activo para el sustrato, mientras que Mut S (GlmS) está formado por el dominio de unión a cobalamina tipo Rossmann (Figura 12). Se requiere que ambas subunidades se unan a AdoCbl, y en su forma activa, la enzima es un tetrámero E_2S_2 que une dos moléculas de AdoCbl en la interfaz entre las subunidades E y S. Por lo tanto, AdoCbl está intercalada entre las subunidades E y S, produciéndose la mayoría de los contactos proteicos entre las cadenas laterales de propionamida de la coenzima y las amidas de la cadena principal de los bucles que conectan los elementos principales del barril (Dowling *et al*., 2012; Marsh, 2000). La metilmalonil CoA (MCM) es una de las enzimas mutasas mejor caracterizadas en bacterias (*Propionibacterium shermanii*) y en humanos (Marsh & Drennan, 2001; Thomä & Leadlay, 1996). A diferencia de MutES, el barril TIM (N-terminal) se conecta al dominio Rossmann (C-terminal) mediante una región conectora larga, constituyendo un protómero. Tanto las enzimas bacterianas como las humanas son dímeros, pero la MCM bacteriana es un heterodímero con un protómero activo y un protómero inactivo, mientras que la enzima humana es un homodímero en el que cada protómero contiene una molécula de AdoCbl (Figura 12). Se desconoce la importancia funcional, si la hubiera, del protón inactivo en la enzima bacteriana (Dowling *et al*., 2012).

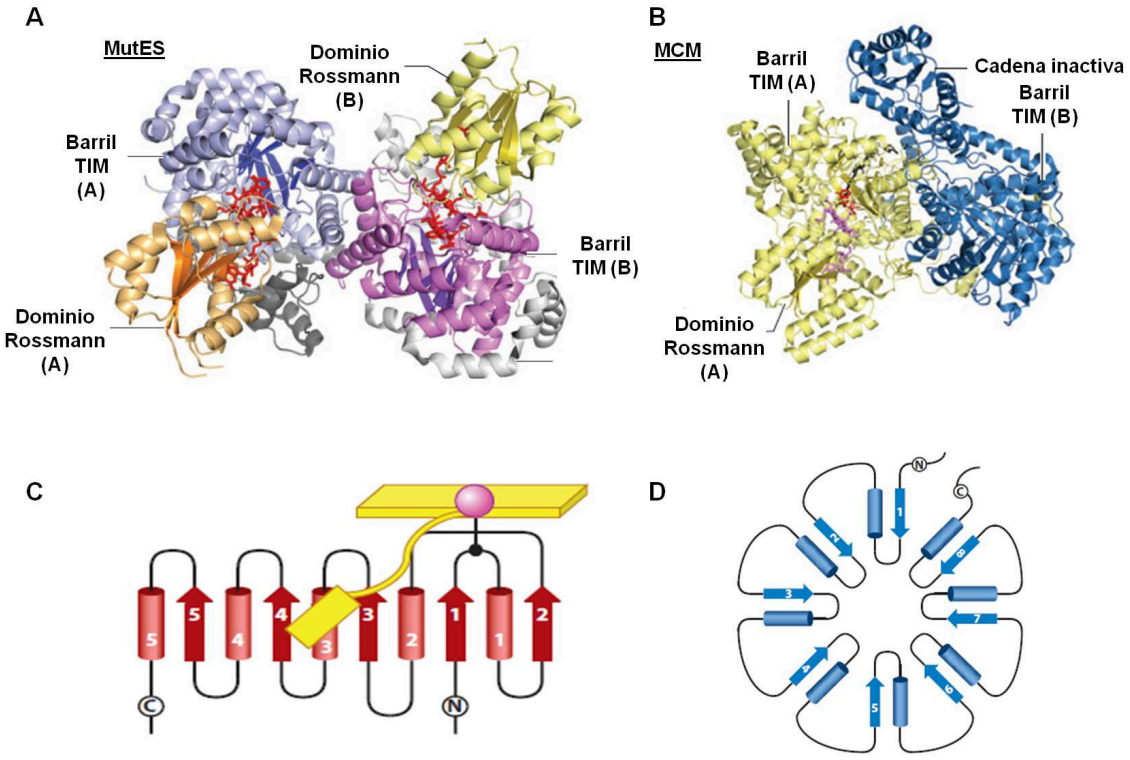


Figura 12. Estructura de enzimas dependientes de AdoCbl que poseen dominios Rossmann y barriles TIM. **(A)** Estructura cuaternaria de la mutasa de glutamato de *C. cochlearium*. El heterotetrámero está formado por dos dominios de unión a AdoCbl tipo Rossmann y dos dominios de unión a sustrato (catalíticos) tipo barril TIM. **(B)** Estructura cuaternaria de la metilmalonil CoA mutasa de *P. shermanii*. El heterodímero está formado por un protómero activo y un protómero inactivo. **(C)** Diagrama topológico del dominio Rossmann unido a cobalamina (amarillo, Co en rosa). **(D)** Diagrama topológico del barril TIM. Imagen modificada de Dowling *et al*., (2012).

I.4 Regulación de la expresión génica mediante cobalaminas

I.4.1 Regulación de la expresión génica por ribointerruptores

Además del ya mencionado papel como cofactor enzimático, las cobalaminas pueden actuar regulando la expresión génica. La forma más común de hacerlo es a través de elementos de RNA denominados ribointerruptores, que modulan la expresión génica mediante la unión específica de metabolitos celulares (purinas y sus derivados, aminoácidos, coenzimas) o mediante la detección de cambios en parámetros físico-químicos (temperatura, pH) (Reining *et al*., 2013; Serganov & Patel, 2012). La gran mayoría de ribointerruptores actúan en *cis* y se encuentran en la región 5’ no traducida (5’ UTR) de los mRNA, aunque los ribointerruptores eucarióticos también pueden residir en intrones y en la región 3' no traducida (3´UTR) (Bocobza & Aharoni, 2008;

Serganov & Patel, 2012). Suelen constar de dos dominios: un módulo de detección o aptámero, conservado evolutivamente, que reconoce los metabolitos celulares con especificidad elevada, y una plataforma de expresión no conservada, para el control de la expresión génica. La unión de metabolitos a los aptámeros causa una reordenación alostérica en regiones cercanas del mRNA, generalmente entre un estado "encendido" que permite la expresión del gen y un estado "apagado" en el que se reprime la expresión (Barrick & Breaker, 2007; Sherwood & Henkin, 2016). El control de la expresión génica se produce en la mayoría de los casos a nivel transcripcional (actuando como un factor terminador de la transcripción) y/o post-transcripcional, controlando el inicio de la traducción (Fuchs *et al*., 2007; Serganov & Patel, 2012). Algunos ribointerruptores regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional afectando a la estabilidad o el procesamiento del mRNA (Sherwood & Henkin, 2016).

Los ribointerruptores de cobalamina no solo regulan la biosíntesis y transporte de B_{12} en bacterias, sino también varios genes de rutas dependientes de B_{12} y genes que no tienen ninguna relación con cobalaminas (Johnson *et al*., 2012; Rodionov *et al*., 2003). El análisis comparativo de la región 5' UTR de genes relacionados con cobalaminas en ~100 genomas reveló unos 200 posibles ribointerruptores en 67 genomas bacterianos, y puso de manifiesto la existencia de regiones conservadas y la posible estructura secundaria del aptámero (Vitreschak *et al*., 2003). Se han establecido dos modelos de regulación basados en la adopción de dos estructuras alternativas. El primero y también el más común consiste en la interrupción de la transcripción. Un metabolito afín se une al aptámero y estabiliza su conformación, lo que facilita la formación de una horquilla aguas abajo del dominio de unión seguida de un tramo de poliuridinas (6 o 7 uracilos) que sirve como un terminador de la transcripción (Baker & Perego, 2011; Fox *et al*., 2009). El segundo modelo se basa en la regulación a nivel traduccional, mediante la formación o no de una horquilla que impide el acceso del ribosoma a su sitio de unión (RBS) en el mRNA (Serganov & Patel, 2012; Winkler *et al*., 2002). Se ha descrito también la existencia de un elemento de tipo intensificador que actuaría en ausencia de B_{12} desplegando la horquilla que secuestra el RBS (Ravnum & Andersson, 1997).

Los ribointerruptores dependientes de AdoCbl más estudiados regulan el operon *cob* de *S. typhimurium* (con genes que determinan enzimas implicadas en la síntesis de cobalamina), y el gen *btuB* de *E. coli* y *S. typhimurium* (que determina el transportador de B_{12}) (Nahvi *et al*., 2002, 2004). Aunque los ribointerruptores mejor caracterizados se unen a AdoCbl, se han encontrado algunos que reconocen MeCbl y

AqCbl con una afinidad >500 veces que AdoCbl. Los ribointerruptores de AqCbl se agrupan filogenéticamente en una rama altamente poblada por cianobacterias marinas y metagenomas ambientales de muestras de la superficie del océano, lo que sugiere una adaptación a ambientes en los que cabe esperar una reserva de cobalamina en forma de AqCbl debido a la fotólisis de AdoCbl (Johnson *et al*., 2012; Peselis & Serganov, 2012).

La estructura secundaria de los ribointerruptores dependientes de AdoCbl o de AqCbl presenta un nodo central con cuatro "ramas" (hélices P3–P6) que constituye el aptámero (Figura 13). El otro elemento compartido es una interacción *kissing-loop* (KL) entre el bucle L5 del aptámero y L13 de la plataforma de expresión. Para los ribointerruptores de cobalamina que regulan la traducción, L13 contiene el RBS. La principal diferencia entre los dos tipos de ribointerruptores es la presencia de una gran extensión periférica de P6 en los dependientes de AdoCbl (Nawrocki *et al*., 2015), que está ausente o severamente truncada en la otra clase. Otra extensión periférica entre P1 y P3 define aún más el tipo de ribointerruptor. Una característica única de numerosos ribointerruptores de cobalamina, particularmente aquellos sin la extensión P6, es que la regulación parece lograrse a través de la formación de estructuras terciarias (Johnson *et al*., 2012).

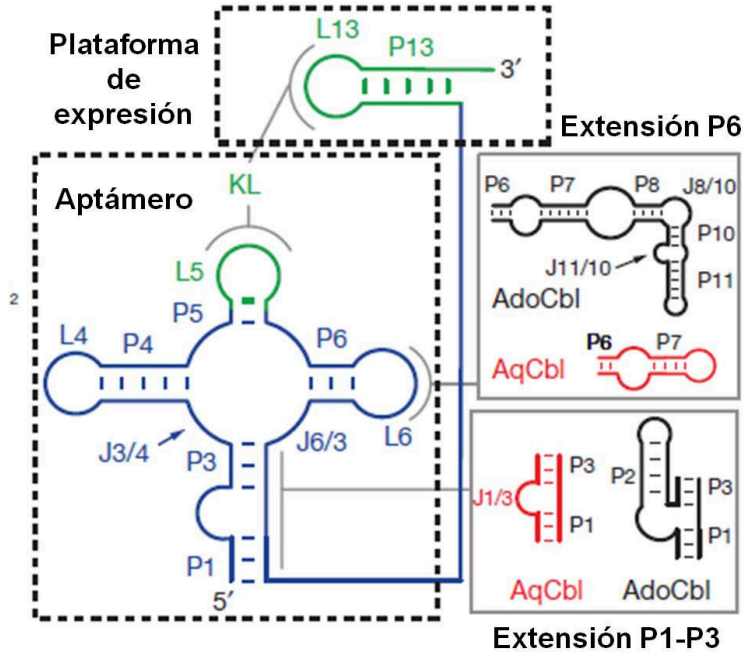


Figura 13. Estructura secundaria de los ribointerruptores de cobalamina. El nodo central conservado se muestra en azul, la interacción KL en verde, las extensiones periféricas en negro (AdoCbl) y rojo (AqCbl). Imagen modificada de Johnson *et al*., (2012).

Se ha descrito la estructura cristalográfica de ambos tipos de ribointerruptores mediante el estudio de dos dependientes de AdoCbl (*St*AdoCbl de *Symbiobacterium thermophilum* y *Tte*AdoCbl de *Thermoanaerobacter tengcongensis*) y uno dependiente de AqCbl (*env8*AqCbl procedente de una muestra metagenómica marina) (Johnson *et al*., 2012; Peselis & Serganov, 2012). La arquitectura global de ambos tipos de ribointerruptores queda definida por la organización común de las hélices en dos apilamientos coaxiales, P1-P3-P6 y P4-P5-P13, unidos mediante un motivo T-loop-T-loop (L4-L6) (Nagaswamy & Fox, 2002) (Figura 14). Las interacciones entre el RNA y la cobalamina son principalmente de tipo van der Waals, con pocos enlaces de hidrógeno directos. En ambas estructuras, la cobalamina se encuentra entre los surcos menores del apilamiento coaxial P3-P6 y la hélice creada por el emparejamiento de bases entre L5 y L13, formando el KL. La selectividad entre cobalaminas se logra mediante diferencias de conformación en J6/3 mediadas por las extensiones periféricas (Figura 14A). El Dmb y un radical aminopropilo interactúan con la cadena principal de ribosa-fosfato de L5 y L13, principalmente a través de contactos van der Waals. Como se observa en la figura 14B, la interfaz KL-cobalamina es casi idéntica entre las dos estructuras a pesar de la baja similitud de secuencia en L5 y L13, lo que indica que el KL también contribuye al reconocimiento específico de B_{12} (Johnson *et al*., 2012; Lussier *et al*., 2015; Peselis & Serganov, 2012). Además del KL, en *btuB* de *E. coli*, el ribointerruptor contiene helices adicionales en la plataforma de expresión que participan en el secuestro del RBS (Lussier *et al*., 2015).

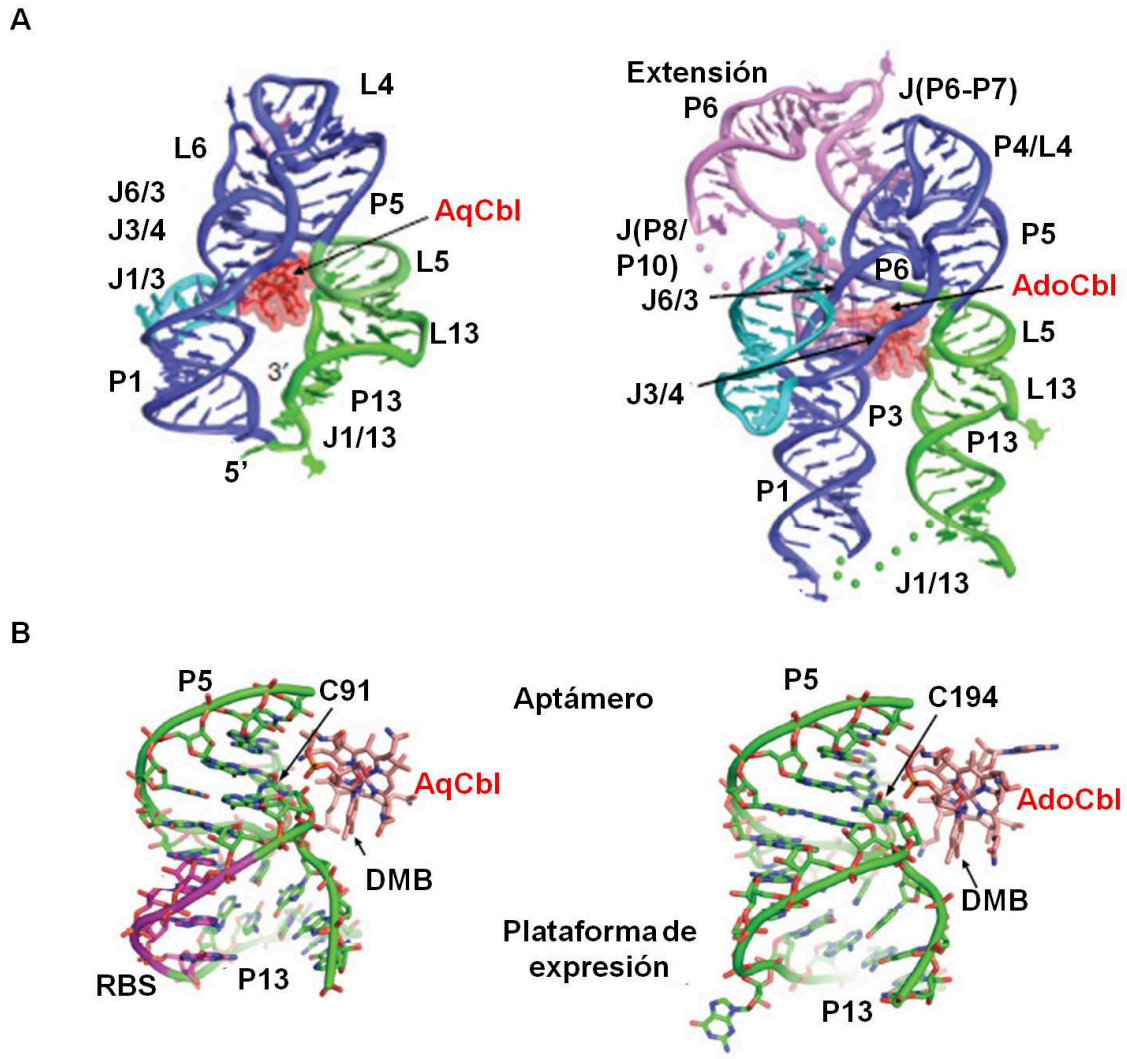


Figura 14. Estructura cristalina de ribointerruptores dependientes de cobalamina. **(A)** Izquierda, estructura del ribointerruptor env8AqCbl; derecha, estructura del ribointerruptor TteAdoCbl; el nodo central se muestra en azul, la interacción KL en verde, las extensiones periféricas en magenta y cian, y la cobalamina en rojo. Las regiones L2, J (P8-P10) y J1/13 están representadas como esferas. **(B)** Vista detallada de la interacción cobalamina-KL para env8AqCbl (izquierda) y TteAdoCbl (derecha). La orientación de la cobalamina es la misma en las dos perspectivas, destacando la interacción del Dmb y del anillo de corrina con el KL. El RBS está resaltado en magenta. Imagen modificada de Johnson *et al.*, (2012).

Aunque por un mecanismo aparentemente distinto al de los ribointerruptores, los niveles de la sintetasa de metionina humana están regulados por B_{12} de una manera dependiente de la región 5' UTR de su propio mRNA. De este modo, se regulan los niveles de homocisteina, que en exceso aumenta el riesgo de enfermedades cardiovasculares y neurológicas. En la región 5' UTR del mRNA de la enzima hay un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), inmediatamente aguas arriba del AUG iniciador, cuya actividad está modulada por B_{12}. En presencia de B_{12},

se activa la traducción del gen haciendo que el mRNA pase a la fracción polisomal. La activación de la traducción no se produce por la unión del cofactor al IRES directamente sino que parece estar mediada por una proteína (Oltean & Banerjee, 2003, 2005).

I.4.2 Regulación de la utilización de etanolamina

En enterobacterias, la AdoCbl participa en el catabolismo de la etanolamina (EA), una valiosa fuente de carbono y/o nitrógeno que contribuye a su patogenicidad. La capacidad de catabolizar EA está determinada por un operón constituido por los genes de utilización de etanolamina (*eut*). La expresión de este operón depende de la presencia simultánea de EA y AdoCbl (Kaval & Garsin, 2018; Roof & Roth, 1989). Los genes *eutB* y *eutC* codifican las dos subunidades de la enzima amonioliasa, responsable de la primera etapa de degradación de EA en acetaldehído y amonio, utilizando AdoCbl como cofactor. En algunas enterobacterias como *S. typhimurium*, la inducción del operón *eut* por EA y AdoCbl requiere la acción de una proteína reguladora positiva, EutR. En ausencia de los inductores, el gen *eutR* se expresa a nivel basal por uno o más promotores constitutivos débiles localizados dentro del operón. En presencia de EA y AdoCbl, se produce un incremento en la actividad de EutR. Aunque EutR es capaz de unirse al DNA en ausencia del inductor, solo unido al inductor EA es capaz de activar la transcripción; y, de alguna forma, AdoCbl favorece la unión de EutR a su promotor (Luzader *et al*., 2013; Roof & Roth, 1992; Sheppard & Roth, 1994).

Al igual que las *Enterobacteriaceae*, muchas bacterias incluidas en el *phylum Firmicute*s, tales como especies de *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Listeria* y *Clostridium*, contienen un locus *eut* (Tsoy *et al*., 2009). Sin embargo, cuando se estudió el operón *eut* en *Enterococcus faecalis*, se observó la falta de un gen regulador similar a *eutR*. En cambio, se encontró un sistema de dos componentes que consiste en un sensor de histidina quinasa, EutW, que activa mediante fosforilación a un regulador de respuesta, EutV, que contiene un sitio de unión al RNA. Se demostró mediante estudios *in vitro* e *in vivo* que EA es el compuesto activador (Fox *et al*., 2009). Además, se descubrió la existencia de un ribointerruptor dependiente de AdoCbl en *E. faecalis* y *Listeria monocytogenes*, en el gen *eutX/rli55*, que actúa como terminador intrínseco de la transcripción. Cuando los niveles de cobalamina son bajos, EutX/Rli55 bloquea la activación de la proteína EutV, al poseer un sitio de unión a la proteína. Por el contrario, en presencia de B_{12}, se interrumpe la transcripción del ribointerruptor produciendo un RNA truncado sin el sitio de unión a EutV, permitiendo

que pueda ser activado en presencia de EA (DebRoy *et al*., 2014; Mellin *et al*., 2014; Mellin & Cossart, 2015).

I.4.3 Regulación de la expresión génica por el antirrepresor AerR

Hasta el descubrimiento de la proteína CarH en *M. xanthus*, no se había descrito ningún mecanismo de regulación de la expresión génica en el que empleara una proteína reguladora capaz de unirse a cobalamina, regulando la transcripción mediante la detección de luz (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011; Pérez-Marín *et al*., 2008). Sin embargo, se ha descrito otro mecanismo de regulación en el que la cobalamina desempeña un papel crucial (Cheng et al., 2014).

En muchas especies de bacterias fototróficas anoxigénicas, la expresión de genes fotosintéticos está estrechamente regulada por los cambios en el equilibrio redox y la intensidad de la luz (Cohen-Bazire *et al*., 1957). Muchas bacterias púrpuras fotosintéticas (no del azufre) bajo condiciones aeróbicas reprimen la expresión de los genes fotosintéticos y crecen como quimiheterotrofos o quimioautotrofos. Se han identificado varios elementos reguladores involucrados en dicho control (Vermeulen & Bauer, 2015). Uno de los mejor estudiados es el represor CrtJ (también denominado PpsR), que actúa como un regulador principal de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis del bacterioclorofilas, hemos y carotenoides, así como proteínas estructurales del complejo fotosintético II (Penfold & Pemberton, 1991, 1994). CrtJ se une en forma de dímero a promotores que contienen dos secuencias palindrómicas en tándem conservadas ($TGTN_{12}ACA$) (Ponnampalam *et al*., 1995; Ponnampalam & Bauer, 1997) y esa unión es dependiente de la oxidación de una cisteína conservada (C420) localizada el motivo de unión al DNA de tipo MerR (Cheng *et al*., 2012; Masuda *et al*., 2002).

Normalmente, el gen *crtJ* está inmediatamente precedido por un gen, *aerR* en *Rhodobacter capsulatus* (comúnmente denominado *ppaA*), que codifica un regulador de la expresión de los genes fotosintéticos. AerR es una proteína pequeña que posee un motivo de unión a Cbl (Ludwig and & Matthews, 1997), a través del cual se une específicamente a AqCbl (Cheng *et al*., 2014; Vermeulen & Bauer, 2015). Carece de un dominio enzimático y, aunque tampoco presenta un dominio de unión a DNA identificable, es capaz de controlar la expresión genes, afectando a la capacidad de unión al DNA de otras proteínas, como CrtJ (Figura 15) (Cheng *et al*., 2014; L. Gomelsky *et al*., 2003; Masuda *et al*., 2008). En la oscuridad, CrtJ (en forma de dímero) se une a dos secuencias palindrómicas situadas en los promotores de los

genes diana, que solapan con los elementos -35 y -10, impidiendo el inicio de la transcripción (Ponnampalam & Bauer, 1997). La luz, al provocar la fotólisis de AdoCbl o MetCbl, produce AqCbl, que se une a AerR produciendo su activación. El complejo AqCbl-AerR es capaz de unirse a CrtJ provocando la desestabilización de su estado oligomérico, la unión al DNA y, por lo tanto, su actividad represora (Cheng *et al*., 2014; Vermeulen & Bauer, 2015). Una singularidad de AerR es que posee dos His, una de las cuales forma parte del motivo de unión a Cbl (His145) y es la responsable del modo de unión *base-off His-on* mencionado anteriormente. La otra histidina, His10, no está conservada en otros homólogos, y parece estar implicada en establecer un enlace de coordinación con el Co tras la liberación del grupo metilo o el grupo 5'd-Ado. Como resultado, se formaría una enlace bis-His (Cheng *et al*., 2014), muy estable, común en el caso de grupos hemo y que solo se ha demostrado en el caso de las cobalaminas para CarH (Jost *et al*., 2015b).

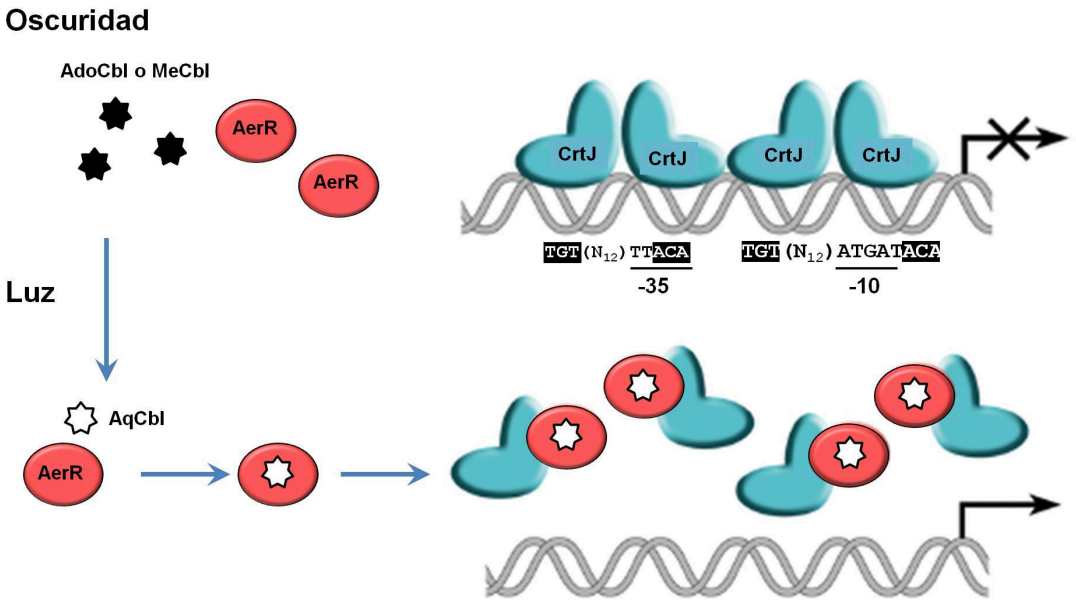


Figura 15. Modelo de regulación de la respuesta a la luz por CrtJ y AerR en *R. capsulatus*. La luz convierte AdoCbl o MeCbl en AqCbl, que es capaz de unirse a AerR; AerR-AqCbl se une a CrtJ y desreprime la expresión de genes fotosintéticos. Imagen modificada de Klug, (2014).

I.5. *Myxococcus xanthus* y la carotenogénesis como respuesta fotoprotectora

I.5.1 Características generales de las mixobacterias

Las mixobacterias son bacterias Gram negativas, no patógenas, aerobias, de forma bacilar (0'7-1'2 µm de ancho y 3-12 µm de largo), que pertenecen a la división δ de las Proteobacterias (Shimkets & Woese, 1992). Basándose en sus características morfológicas y fisiológicas (Reichenbach, 1993) y apoyado por el análisis del rRNA 16S (Shimkets & Woese, 1992; Sproer *et al*., 1999), han sido clasificadas en tres subórdenes: *Sorangineae*, *Cystobacterineae* (que incluye *M. xanthus*, la especie más estudiada), y *Nannocystineae*. Aunque las mixobacterias son prácticamente ubicuas en la naturaleza, generalmente habitan en suelos (pH 5-8) ricos en materia orgánica y vida microbiana; no obstante, también están presentes en arenas, superficies rocosas, agua dulce, ambientes marinos, existiendo especies que puede resistir ambientes extremos (pH, temperatura, pocos nutrientes) (Dawid, 2000; Lizuka *et al*., 1998). *M. xanthus*, objeto de estudio en este trabajo, presenta su tasa máxima de crecimiento cuando se incuba a 33 ºC.

Una característica de las mixobacterias es su ciclo de vida complejo, que comprende dos fases, una vegetativa y otra de desarrollo multicelular (Figura 16) (Kaiser & Dworkin, 2008). En ambas fases es importante el movimiento coordinado de las células. *M. xanthus* carece de flagelos y se mueve utilizando dos sistemas: movimiento individual (movimiento aventurero o A) y movimiento grupal (movimiento social o S), que permite un comportamiento social o cooperativo basado en la existencia de mecanismos de comunicación intercelular (Kaiser & Dworkin, 2008). El comportamiento aventurero impulsa el movimiento de células individuales en los bordes del grupo (enjambre): las células se deslizan lentamente para explorar nuevos entornos, cambian de dirección a través de eventos de inversión y dejan "huellas" que pueden ser seguidas por otras células (Muñoz-Dorado *et al*., 2016). El movimiento social se caracteriza por el movimiento en enjambre de grandes grupos de células y es crucial tanto para la formación de cuerpos fructíferos (Shimkets & Arnold, 1988) como para la depredación cooperativa.

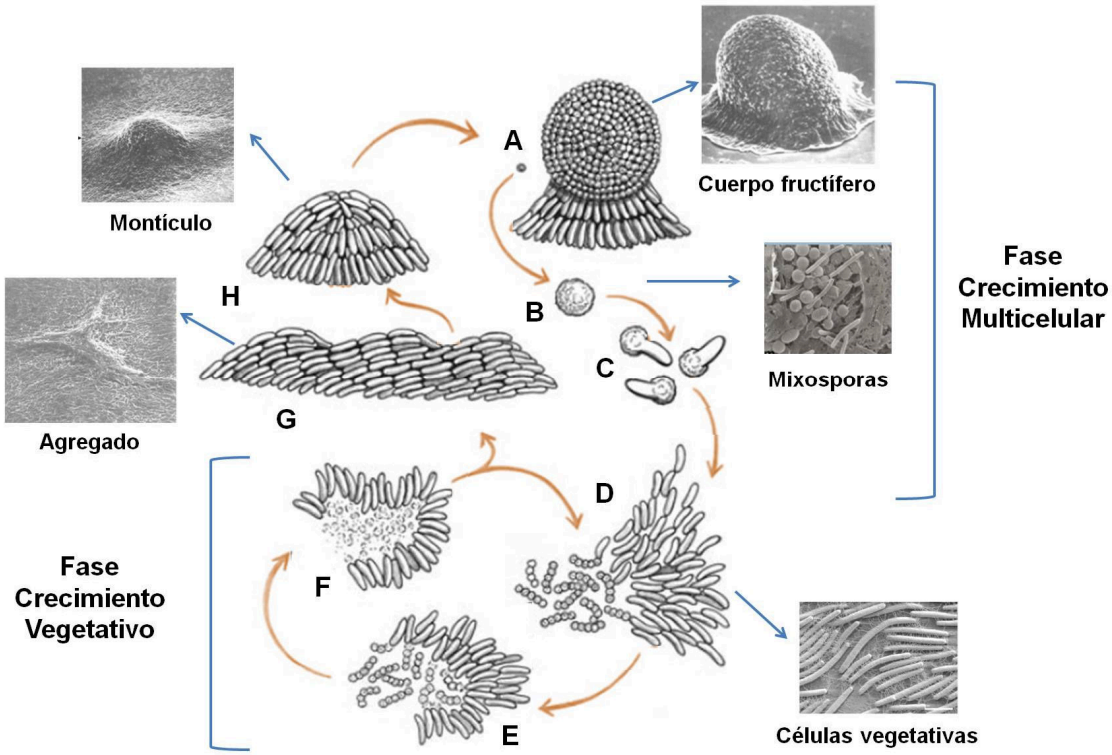


Figura 16. Ciclo de vida de *M. xanthus*. (A) Cuerpo fructífero de *M. xanthus*. Es una estructura esférica de aproximadamente $1x10^5$ células, que contiene esporas resistentes a diversos estreses. **(B-D)** Cuando el cuerpo fructífero se encuentra en un entorno con nutrientes, las mixosporas germinan y dan lugar a miles de células vegetativas. **(D-F)** Cuando los nutrientes o las presas están disponibles, *M. xanthus* desarrolla un comportamiento predador colectivo secretando enzimas al medio para facilitar la lisis y consumo de la presa. En condiciones de escasez de nutrientes, las células de *M. xanthus* se agrupan para dar lugar a un montículo **(G-H)** que acabará formando el cuerpo fructífero. Imagen modificada de Kaiser (2008), Kaiser *et al*., (2010a); Pathak *et al*., (2012).

Los estudios realizados con *M. xanthus* han puesto de manifiesto que el movimiento aventurero y el movimiento social dependen de dos sistemas genéticos independientes denominados A y S, respectivamente (Kaiser *et al*., 2010b; Ueki & Inouye, 2006). El mecanismo preciso del comportamiento aventurero no se conoce del todo aún, existen más de 40 genes implicados (Islam & Mignot, 2015; Beiyan Nan *et al*., 2014). Para explicarlo se han propuesto 2 modelos: ambos dependen de la secreción de un mucílago (formado por polisacáridos y componentes de la membrana externa de la mixobacteria) (Ducret *et al*., 2012). En el primer modelo la fuerza motora deriva de la extrusión de mucílago, a través de estructuras embebidas en el polo posterior de la envoltura celular, que al hidratarse propulsarían a la célula hacia adelante (Wolgemuth *et al*., 2002; Yu & Kaiser, 2007). El segundo modelo se basa en la existencia de complejos motores citoplasmáticos anclados a la membrana que contactan con el citoesqueleto dispuesto de forma helicoidal. Estos complejos motores

se desplazan sobre el citoesqueleto en dirección contraria al movimiento de la célula, generando en su avance una fuerza igual y opuesta en esta hélice. Se ha observado que al llegar a la zona ventral (región en contacto con el sustrato que se encuentra cubierta de mucílago) estos complejos motores se ralentizan, ya que la capa de mucílago opone mayor resistencia al movimiento. Se genera así un "atasco" temporal de complejos motores que ejercen una fuerza propulsora sobre el mucílago que es transmitida al sustrato (B. Nan *et al*., 2013; Beiyan Nan & Zusman, 2011). En el movimiento social intervienen los pili de tipo IV localizados en el polo adelantado (Mignot *et al*., 2005), fibrillas y el lipopolisacárido de la pared celular (Figura 17) (Kaiser *et al*., 2010a; Shimkets & Arnold, 1988; Wall & Kaiser, 1999). La retracción de los pili genera una fuerza de tracción responsable del movimiento celular (Skerker & Berg, 2001; Sun *et al*., 2000). En los enjambres, las células se mueven constantemente, interactúan entre sí e invierten su dirección de forma coordinada. La cordinación de los dos tipos de movilidad se produce mediante una cascada de transducción de señales denominada Frz (proteínas *frizzy*), que constituye un sistema quimiosensor (CSS) consistente en varias vías reguladoras complejas capaces de percibir señales externas y traducirlas en diferentes comportamientos celulares, como la motilidad y el desarrollo (Guzzo *et al*., 2015; Kaiser & Warrick, 2011; Moine *et al*., 2014). El vínculo molecular entre Frz y los sistemas de motilidad requiere de tres proteínas: MglA, MglB y RomR. MglA es una GTPasa, similar a Ras, que necesita GTP para activarse. Una vez unida a GTP, MglA activa los sistemas de motilidad en el polo principal mediante su interacción con AglZ (movimiento aventurero) y FrzS (movimiento social). La localización polar de MglA es el resultado de una regulación combinada: (i) por RomR, que recluta MglA-GTP a los polos; y (ii) por MglB, una proteína de tipo GAP (*GTP hydrolisis activating protein*), que impide la acumulación de MglA al polo celular rezagado (Bulyha *et al*., 2011; Islam & Mignot, 2015). Además del sistema Frz, la motilidad también está regulada por otros CSS (Kirby, 2009; Moine *et al*., 2014), lo que sugiere que la motilidad puede ser quimiotáctica (Zhang *et al*., 2012). Otras evidencias, como que el tratamiento con lípidos atrayentes o compuestos tóxicos que lleva a cambios en los períodos de reversión de la movilidad, respaldan esa hipótesis (Kearns & Shimkets, 1998).

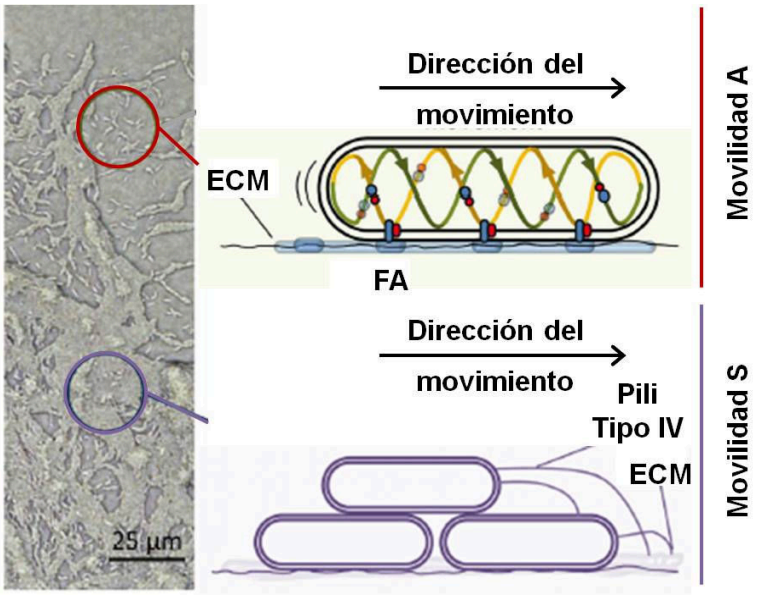


Figura 17. Movimiento aventurero y movimiento social de *M. xanthus*. (Izquierda) Imagen del borde de una colonia de *M. xanthus*. Los círculos representan células con movimiento aventurero (rojo) y células con movimiento social (morado). (Derecha) La secreción de matriz extracelular (ECM) es esencial para los dos tipos de movimiento. Arriba, modelo de movimiento aventurero mediante adhesiones focales (FA) a ECM y un citoesqueleto dispuesto helicoidalmente; abajo, modelo de movimiento social; las células se desplazan mediante interacciones de los pili tipo IV, las fimbrias y el lipopolisacarido de la pared al ECM. Imagen modificada de Muñoz-Dorado *et al*., (2016).

Otro aspecto de interés en el estudio de M. xanthus es su gran versatilidad metabólica. Estudios recientes han revelado la presencia de al menos 24 posibles agrupaciones de genes biosintéticos en *M. xanthus*, que supone un 14,5 % de su gran genoma (9.1 Mb). Comparándolo con el estreptomiceto *Streptomyces coelicolor* (27 agrupaciones, 10.6 % de 8.7 Mb), *M. xanthus* constituye una gran fuente de productos naturales (Bentley *et al*., 2002; Weber *et al*., 2015). Más de 600 compuestos químicos han sido aislados de mixobacterias; curiosamente, la mayoría de ellos son producidos durante la fase de crecimiento exponencial (Findlay, 2016). La producción de estos compuestos se lleva a cabo con diversos fines, siendo uno de los más importantes es la alimentación. *M. xanthus* es una bacteria depredadora que emplea el comportamiento social como estrategia para alimentarse. Al detectar la presencia de bacterias, las mixobacterias que están formando un enjambre actúan como una "manada de lobos", rodeando a la presa y digiriéndola mediante la liberación de metabolitos secundarios (entre ellos antibióticos), proteasas, nucleasas, lipasas y glucanasas (Berleman *et al*., 2014; Findlay, 2016; Keane & Berleman, 2016). El ataque enzimático de manera conjunta es más eficiente, ya que permite alcanzar niveles más altos de enzima y minimizar las pérdidas por difusión (Reichenbach, 1999). Desde un

punto de vista nutricional, *M. xanthus* es una bacteria compleja. Los aminoácidos que consigue de las presas constituyen una excelente fuente de carbono y energía, pero también el acetato, glicerol, varios intermediarios del ciclo de Krebs y, especialmente, el piruvato. La leucina, isoleucina, valina y, en ausencia de la vitamina B_{12}, la metionina, son esenciales para el crecimiento vegetativo aunque estén presentes en el medio otras fuentes de energía, mientras que la falta de fenilalanina o triptófano en el medio de crecimiento es suficiente para desencadenar la formación del cuerpo fructífero (Dworkin, 1963). Los aminoácidos son utilizados para la glucogenogénesis, mediante la vía de Embden-Meyerhof, y como fuente de energía, al ser convertidos en acetyl-CoA para su posterior entrada en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Dworkin, 1962). En cambio, ni las hexosas, ni las pentosas, ni los polisacáridos son utilizados por la bacteria. Que la metionina sea un aminoácido esencial solo en ausencia de B_{12} se debe a la presencia de una sintetasa de metionina endógena dependiente de cobalamina. Dado que *M. xanthus* es incapaz de sintetizar cobalaminas *de novo* (al carecer de la mayoría de los genes implicados en esta ruta bioquímica), es imprescindible la captación exógena de éstas para que la bacteria pueda sintetizar metionina.

Cuando los nutrientes escasean, la población de mixobacterias tiene que decidir entre un ciclo vegetativo con un crecimiento cada vez más lento, y un proceso complejo de desarrollo multicelular único en el mundo procariótico. Dicho proceso depende del intercambio entre células de varias señales (A, B, C, D, E) que desencadenan una compleja red de acciones reguladoras intracelulares y una activación programada de genes específicos. El resultado final es la formación de estructuras multicelulares denominadas cuerpos fructíferos (Kaiser, 2008; Kaiser et al., 2010a; Kroos, 2007; Pathak et al., 2012). En los cuerpos fructíferos, una pequeña fracción de las células se diferencian en formas de resistencia, esféricas e inmóviles, que reciben el nombre de mixosporas, mientras que la mayoría de la población permanecen indiferenciadas y se disponen formando una monocapa de células alrededor y entre los cuerpos fructíferos o se lisan (Dworkin, 1996; O'Connor & Zusman, 1988, 1991). Cuando las condiciones del medio vuelven a ser apropiadas, las mixosporas germinan y dan lugar a células vegetativas móviles metabólicamente activas, reanudándose la fase vegetativa (Elias-Arnanz & Murillo, 1991a, 1991b). La formación de mixosporas permite la supervivencia de las células en condiciones adversas, mientras que la agregación en cuerpos fructíferos asegura que el nuevo ciclo de vida vegetativo se inicia con una población en lugar de con una sola célula.

I.5.2 Carotenoides y la respuesta a la luz

La radiación luminosa genera agentes oxidantes como el oxígeno singlete y otras especies reactivas de oxigeno (ROS), como anión superóxido, peróxido de hidrogeno, y radicales hidroxilo (Ziegelhoffer & Donohue, 2009). Estos agentes son tóxicos para las células debido a que pueden atacar componentes celulares como lípidos de membrana, esteroles, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, nucleótidos, carbohidratos y tioles (Ryter & Tyrrell, 1998). Como respuesta, muchos organismos producen carotenoides, que son pigmentos naturales que se encuentran en los organismos fotosintéticos (bacterias fototróficas y plantas) y no fotosintéticos (bacterias y hongos), constituyendo uno de los grupos de pigmentos más extendidos en la naturaleza. Poseen una coloración desde amarillo al rojo oscuro, característico de flores y frutos (Armstrong, 1997).

En los organismos fotosintéticos, los carotenoides están asociados a proteínas de membrana junto a la bacterioclorofila (Bchl) o la clorofila (Chl) del centro de reacción fotosintético. En los organismos no fotosintéticos, los carotenoides se generan para proteger a la célula del daño fotooxidativo, pudiéndose encontrarlos unidos a la membrana celular, a proteínas del citoplasma o a otras estructuras citoplasmáticas como cristales y fibrillas (Deruere, 1994; Takaichi, 2013). En cualquiera de los casos, los carotenoides actúan como protectores contra moléculas fotosensibles como Bchl o Chl (Glaeser *et al*., 2011), moléculas endógenas fotoexcitables como porfirinas, rodopsinas, quinonas y flavinas, y contra ROS, principalmente el oxígeno singlete (Glaeser *et al*., 2011; Ryter & Tyrrell, 1998).

La estructura básica de los carotenoides está constituida por un esqueleto hidrocarbonado de 40 átomos de carbono. Se distinguen dos tipos de carotenoides: los carotenos, que no contienen oxígeno, y las xantofilas, que contienen grupos oxigenados. La estructura de ambos está a menudo modificada por deshidrogenaciones, condensaciones, ciclaciones y adición de diversos grupos funcionales. El estado de isomerización y el número de dobles enlaces conjugados (de 7 a 13 para un carotenoide de 40 carbonos) de la estructura básica determinan las propiedades de absorción de cada carotenoide (Armstrong & Hearst, 1996; Maresca *et al*., 2008; Sandmann, 2009; Tian & Hua, 2010).

Las colonias y los cuerpos fructíferos de *M. xanthus,* fácilmente expuestos a la luz en su hábitat natural, el suelo, responden a la iluminación (luz azul) sintetizando carotenoides, que evitan la lisis celular (Burchard & Dworkin, 1966; Galbis-Martínez *et*

al., 2012). En la luz, *M. xanthus* acumula mayoritariamente un éster glicosilado de mixobacton, grandes cantidades de fitoeno y cantidades menores de fitoflueno y otros intermediarios de la síntesis de carotenos (Martínez-Laborda *et al*., 1990). El color amarillo de las colonias o cultivos de *M. xanthus* incubados en la oscuridad se debe, sin embargo, a la síntesis de un pigmento hidrosoluble no carotenoide denominado DKxantheno (Meiser *et al*., 2006).

Las etapas iniciales en la ruta de síntesis de carotenoides en *M. xanthus* son similares a las de otros organismos carotenogénicos. El precursor común es una molécula de cinco átomos de carbono, el isopentenil pirofosfato (IPP), que al condensarse con su isómero, el dimetil alil pirofosfato (DMAPP), da lugar al geranil pirofosfato (GPP), de 10 átomos de carbono. La condensación sucesiva de GPP con dos moléculas de IPP origina, en primer lugar, farnesil pirofosfato (FPP) y, finalmente, geranil geranil pirofosfato (GGPP), de 20 átomos de carbono. La condensación de dos moléculas de GGPP da lugar al fitoeno, de 40 átomos de carbono, que es el primer caroteno no coloreado de la ruta (Elías-Arnanz *et al*., 2008). El fitoeno es desaturado cuatro veces produciendo licopeno, que es ciclado en un extremo de la cadena produciendo γ-caroteno. Finalmente, se produce el pigmento mayoritario, éster de mixobacton, a partir de la deshidrogenación, glucosilación y acilación de γ-caroteno (Figura 18) (Elías-Arnanz *et al*., 2008; Iniesta *et al*., 2007, 2008; Sandmann, 2009).

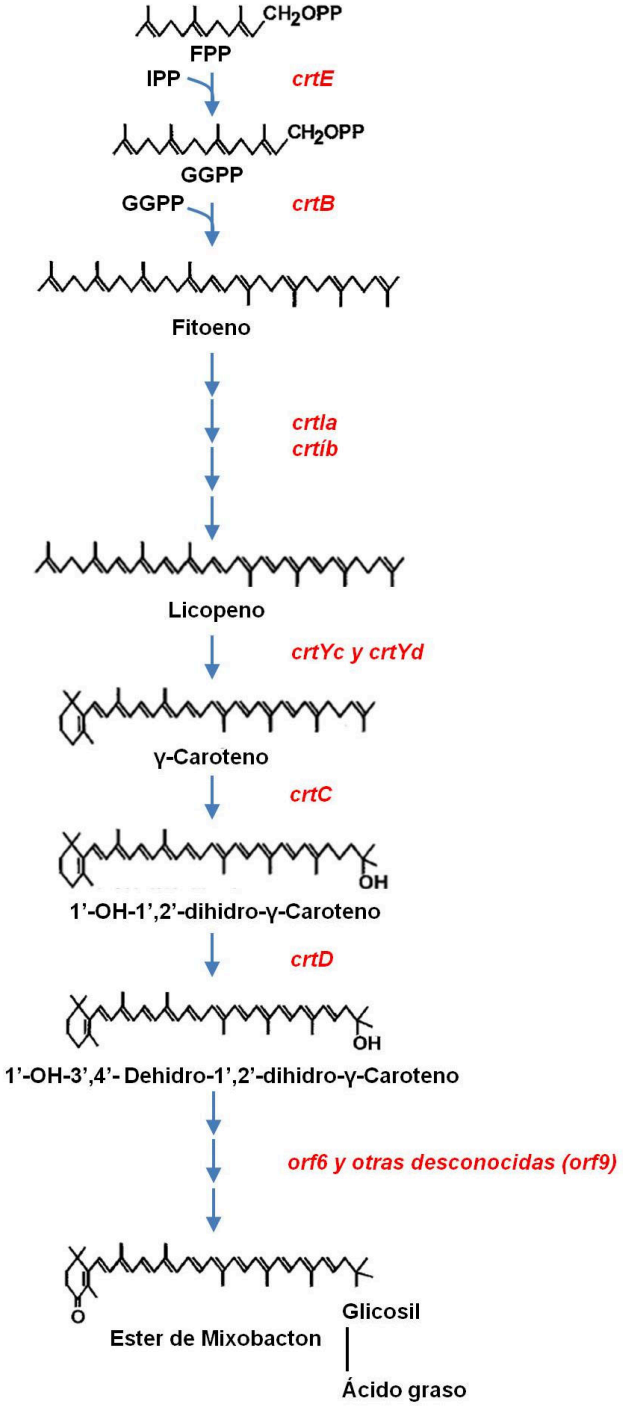


Figura 18. Ruta de síntesis de carotenoides en *M. xanthus* y los genes implicados en cada paso. La función de *orf6* y *orf9* parece estar relacionada con actividades de glicosil- y aciltransferasas, respectivamente. Imagen modificada de Elías-Arnanz *et al.*, (2008).

I.5.3 Análisis genético de la respuesta a la luz: genes estructurales y reguladores

Además de la luz azul (Burchard & Dworkin, 1966), la síntesis de carotenoides se activa también en presencia de cobre en el medio (Moraleda-Muñoz *et al*., 2005). De los dos estímulos conocidos, la estimulación por luz es la que más se ha estudiado. Ello ha permitido desvelar la implicación de complejos circuitos genéticos implicados, en los que participan factores reguladores novedosos, a menudo similares a eucariotas (Elías-Arnanz *et al*., 2008, 2010). El cambio de color, del amarillo al rojo, debido a la acumulación de carotenoides, permite seguir visualmente el proceso y ha facilitado enormemente los estudios (Figura 19).

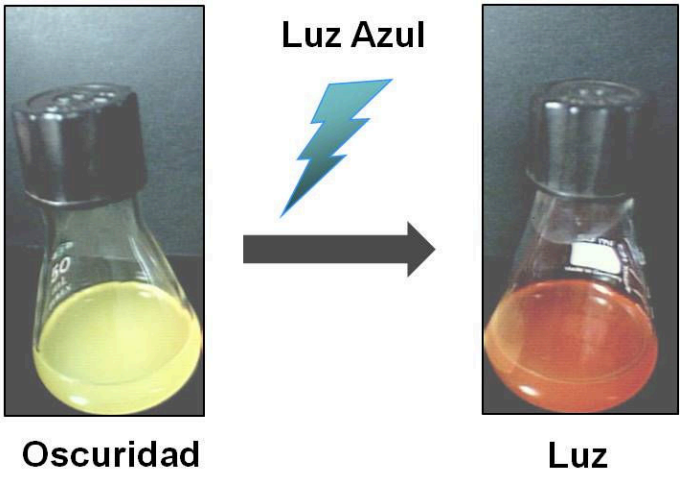


Figura 19. Producción de carotenos en *M. xanthus* en respuesta a la luz azul.

A lo largo de más de 25 años de estudio, principalmente por el grupo en el que se ha realizado este trabajo, se han identificado un buen número de genes, tanto estructurales como reguladores, implicados en esta respuesta, y se han desvelado las interacciones entre ellos y su modo de acción molecular. Dichos genes se encuentran situados en seis loci independientes del genoma de *M. xanthus* (Elías-Arnanz *et al.*, 2008; Elias-Arnanz *et al.*, 2011): los operones reguladores *carQRS* y *carDG,* los genes reguladores *ihfA* y *carF*, el superoperón *carB-carA* (que agrupa genes estructurales y reguladores) y *crtIb*, el único gen estructural que no se encuentra agrupado en el superoperón *carB-carA* (Figura 20).

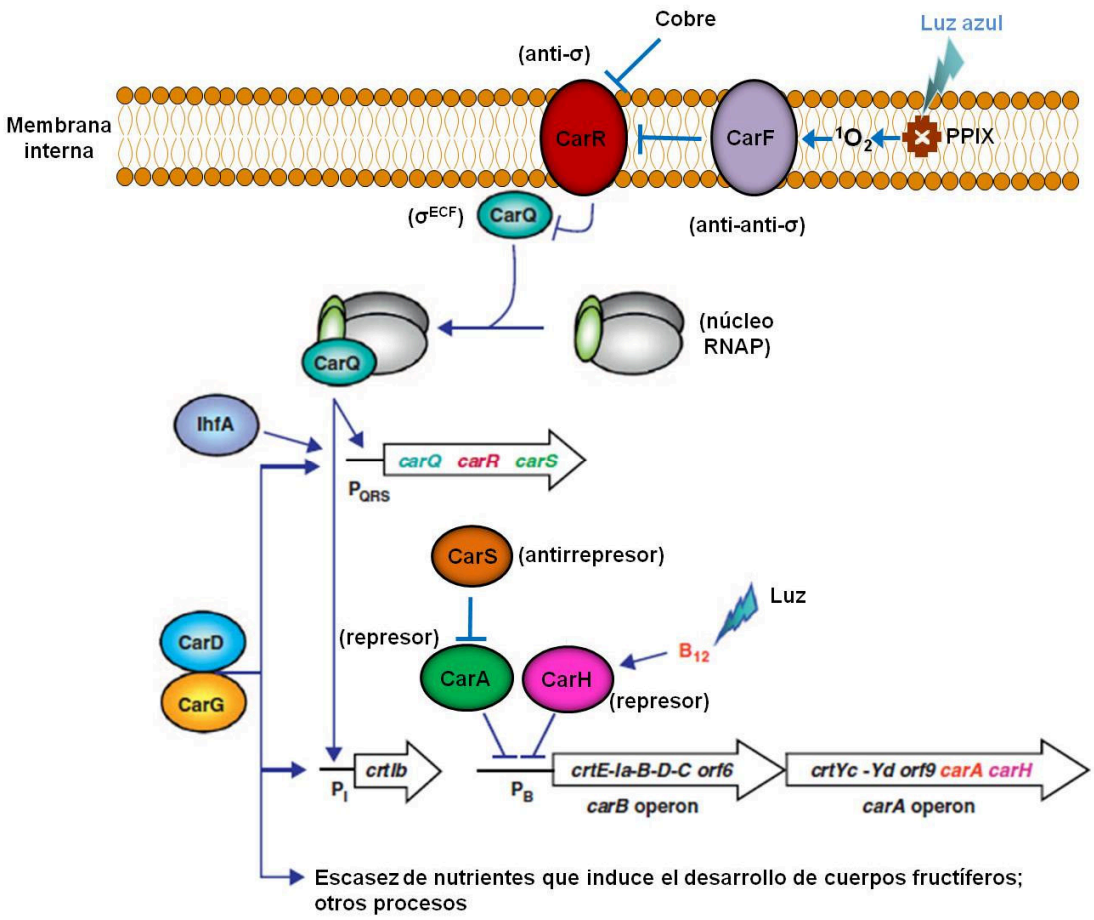


Figura 20. Modelo de regulación de la respuesta a la luz en *M. xanthus*. La luz azul excita a la protoporfirina IX provocando la producción de oxígeno singlete. El oxígeno singlete de alguna manera es percibido por CarF, un factor anti-anti σ, que inactiva a CarR, el factor anti σ de CarQ, un factor σ^{ECF}. Una vez libre, CarQ se une a la RNAP activando los promotores P_{QRS} y P_I, que dirigen la expresión del operon regulador *carQRS* y del gen carotenogénico *crtIb*, respectivamente. Dicha activación requiere del complejo regulador global CarD/CarG e IHF. CarS, un antirrepresor, se une a CarA (proteína represora) permitiendo la activación del promotor P_B, que dirige la expresión fotoinducible de los genes del operón *carB* (*crtE-Ia-B-D-C-orf6*) y *carA* (*crtYc-Yd-orf9-carA-carH)*. Los genes del operón *carA* pueden expresarse de forma independiente de la presencia de luz. La unión de CarH a B_{12}, cofactor fotosensible, es necesaria tanto para su actividad represora de P_B en oscuridad como para su liberación del promotor en la luz sin necesidad de CarS. El cobre puede provocar la inactivación de CarR de forma independiente de CarF y luz. Imagen modificada de Elías-Arnanz *et al*., (2011).

Un operón clave en la respuesta a la luz es el operón *carQRS*, que consta de tres genes acoplados traduccionalmente, cuya transcripción depende de los propios productos génicos CarQ y CarR. En oscuridad, CarQ, un factor σ de los denominados de función extracitoplasmática (σ^{ECF}), se encuentra secuestrado en la membrana por su factor anti-σ, CarR. En la luz, CarF, una proteína también de membrana, de alguna manera participa en la percepción de la señal luminosa (en forma del oxígeno singlete que se genera por fotoexcitación de la protoporfirina IX acumulada en la membrana) y

provoca la inactivación de CarR y la liberación de CarQ. Una vez libre, CarQ se une a la RNAP y activa su propio promotor P_{QRS} y el del gen estructural *ctrlb*, P_I. La activación de P_{QRS} y P_I requiere, además, del complejo CarD/CarG. CarD y sus homólogos son las únicas proteínas procarióticas conocidas con un dominio de unión al DNA (su región C-terminal) típico de los factores arquitectónicos eucarióticos de la familia HMGA (*high mobility group A*). CarD se une a una región específica del DNA, rica en pares AT, situada aguas arriba de la región −35 del promotor P_{QRS}, necesaria para que dicho promotor sea activado por la luz. Además, CarD posee un dominio N-terminal adicional de 180 residuos, que es esencial para la función y que media la interacción consigo misma, con CarG y con la polimerasa de RNA (RNAP) (Elías-Arnanz *et al*., 2010; García-Heras *et al*., 2009, 2013; García-Moreno *et al*., 2010; Padmanabhan *et al*., 2001; Peñalver-Mellado *et al*., 2006). Por otro lado, CarG es una proteína que se requiere en todos los procesos en los que participa CarD, pero no se une directamente al DNA. Su función en el complejo podría ser la de interaccionar con otras proteínas, ya sean factores reguladores específicos o componentes de la maquinaria basal de transcripción (Elías-Arnanz *et al*., 2010; Peñalver-Mellado *et al*., 2006). La activación de P_{QRS} requiere además la proteína IHF (*integration host factor*), un factor arquitectónico implicado en varios procesos tales como el empaquetamiento del cromosoma, la recombinación y la regulación transcripcional (Browning *et al*., 2010).

El resto de genes que codifican las enzimas carotenogénicas se localizan en el locus *carB-carA*, constituido por los operones *carB* y *carA*. El operón *carB* consta de seis genes (*crtE*, *crtIa*, *crtB*, *crtD*, *crtC* y *orf6*) y su expresión está regulada por un promotor fotoinducible, P_B. Los otros dos genes (*crtYc* y *crtYd*) forman parte del operón contiguo, *carA*, que se transcribe en la misma dirección a partir de un promotor (P_A) en la región estructural de *orf6* y, en condiciones de iluminación, también a partir de P_B. Además de *crtYc* y *crtYd*, el operón *carA* incluye los genes *orf9*, *carA* y *carH*. Hasta el momento, se desconoce la función de *orf9*, pero su similitud de secuencia con las aciltransferasas bacterianas hace que sea tentador asignarle un papel en la esterificación de myxobacton (Elías-Arnanz *et al*., 2008). Los genes *carA* y *carH* expresan dos proteínas reguladoras parálogas (Pérez-Marín *et al*., 2008). En ausencia de luz, el represor CarA se une al promotor P_B, bloqueando la transcripción de los genes del superoperón *carB-carA* (López-Rubio *et al*., 2002, 2004). La deleción de *carA* produce, por tanto, síntesis constitutiva de carotenoides, que puede ser corregida por la adición de B_{12} al medio. Este hecho inusual depende de *carH*, situado inmediatamente aguas abajo de *carA* (Pérez-Marín *et al*., 2008). CarA y CarH constan

de un dominio N-terminal similar al dominio de unión al DNA de las proteínas reguladoras MerR, unido por una región conectora o *linker* a un dominio C-terminal que contiene un motivo de unión a B_{12} (Cervantes & Murillo, 2002). Curiosamente, aunque las dos proteínas son capaces de unirse a cobalamina a través de su dominio de unión a B_{12}, solo CarH depende de B_{12} (en su forma AdoCbl) para llevar a cabo su actividad represora y para responder a la luz (Figura 20) (Elías-Arnanz *et al*., 2008, 2011; Ortiz-Guerrero *et al*., 2011; Pérez-Marín *et al*., 2008). CarS, que se produce solo en la luz a partir de la expresión operón *carQRS*, es una proteína pequeña (111 aminoácidos, 12.2 KDa) que actúa como un antirrepresor de CarA compitiendo con el DNA por la unión al dominio N-terminal del represor, a lo que contribuye el carácter acídico de esta proteína y su estructura imitadora del DNA (León *et al*., 2010; López-Rubio, 2005; López-Rubio *et al*., 2002, 2004; Whitworth & Hodgson, 2001).

I.6 Las proteínas represoras CarA y CarH

Aunque la sensibilidad a la luz de AdoCbl y MeCbl se conoce desde hace años, no fue hasta el descubrimiento de CarA y CarH (Cervantes & Murillo, 2002) que se planteó por primera vez la posibilidad de que dicha propiedad pudiera tener una función fisiológica. La sensibilidad a la luz es realmente indeseable en la catálisis enzimática, ya que conduce a la inactivación del cofactor (apartados I.2.1 y I.2.2). El descubrimiento de que B_{12}, específicamente AdoCbl, puede servir como un sensor de luz representó un doble hito: el hallazgo de un nuevo tipo de proteína fotorreceptora y de una nueva faceta de la vitamina B_{12} (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011; Padmanabhan *et al*., 2017).

I.6.1 Arquitectura modular y modo de acción

Como se ha comentado en el apartado anterior, CarA y CarH están compuestas por un dominio N-terminal de unión a DNA, de tipo MerR (Botella *et al*., 1995; Cervantes & Murillo, 2002), y un dominio C-terminal de unión a B_{12} (Cervantes & Murillo, 2002; Díez, Ortiz-Guerrero, Ortega, Elías-Arnanz, Padmanabhan, & García de la Torre, 2013; Ortiz-Guerrero et al., 2011; Pérez-Marín et al., 2008). Las proteínas MerR suelen ser activadores transcripcionales de promotores dependientes de factores σ^{70} que se activan en respuesta a señales de estrés en bacterias, como la exposición a formas reactivas de oxígeno, metales pesados o compuestos citotóxicos (Brown *et al*., 2003). Los miembros de la familia MerR suelen ser dímeros con un dominio N-terminal de unión a DNA, tipo hélice-giro-hélice con dos “alas”, un dominio C-terminal de unión a metales pesados, drogas u otros estreses, y una larga hélice

conectora que también actúa como la “hélice de dimerización” (Figura 21) (Brown *et al*., 2003; Heldwein & Brennan, 2001; Newberry & Brennan, 2004). El empaquetamiento antiparalelo de las dos hélices de dimerización produce un homodímero funcional capaz de unirse a las secuencias operadoras pseudopalindrómicas (Chang *et al*., 2015). A diferencia de los promotores bacterianos canónicos dependientes de σ^{70}, cuyos elementos -10 y -35 están espaciados por 17 ± 1 pb para favorecer una interacción productiva con la RNAP, el promotor *mer* contiene un espaciado más largo (19 ~ 20 pares de bases), que afecta negativamente a la transcripción al desalinearse los dos elementos a los que se une la RNAP (Brown *et al*., 2003).

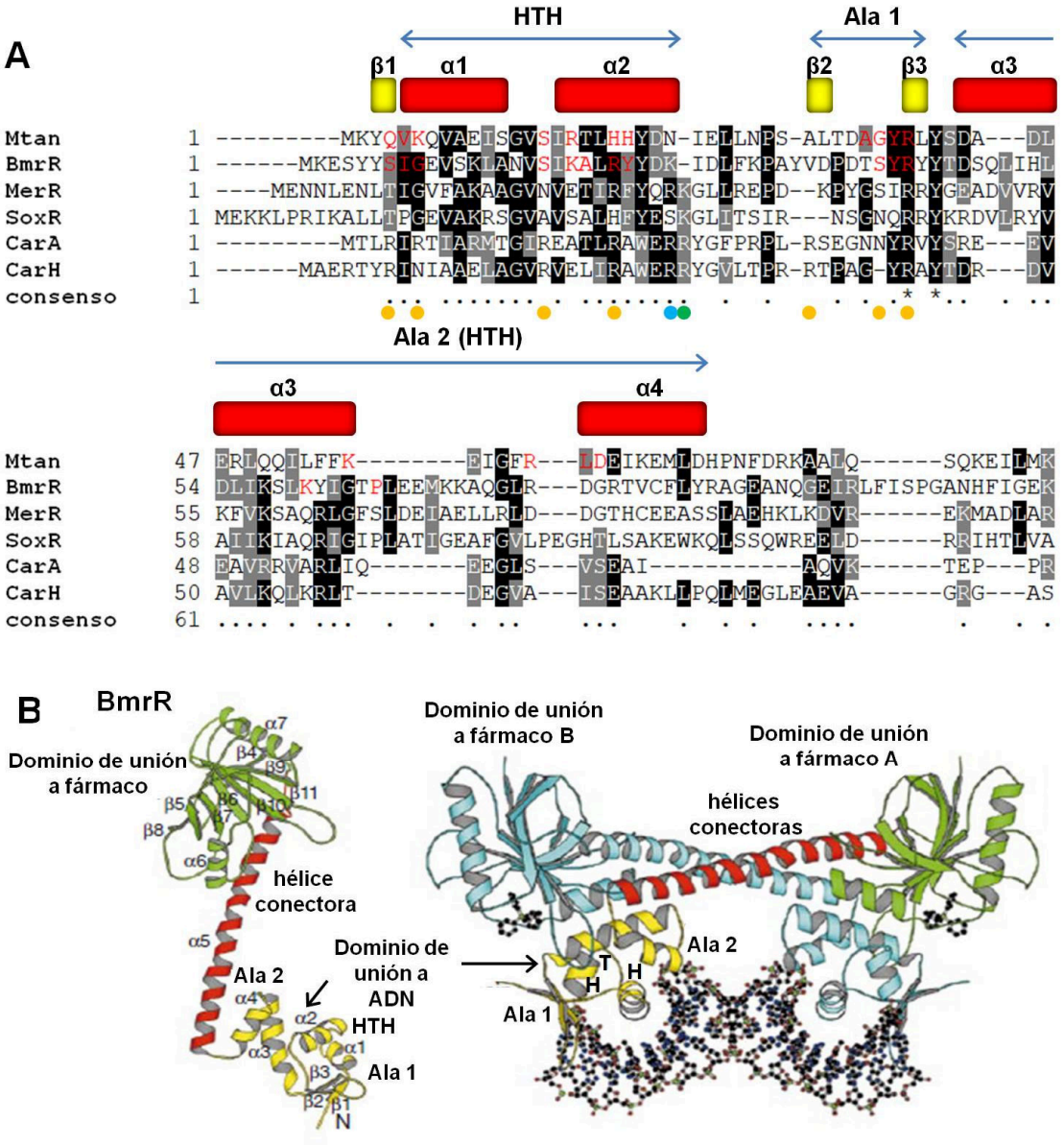


Figura 21. Alineamiento de varias proteínas con dominio de unión al DNA tipo MerR y estructura cristalina de BmrR. (A) Dominio N-terminal de MtanN (P71039) y BmrR (BAA23495.1) de *B. subtilis*, MerR (Q7BT49-1) y SoxR (P0ACS2-1) de *E. coli*, CarA (CAA79964.1) y CarH (CAA79965.2) de *M. xanthus*. Las cajas representan las hélices α (rojo) y las láminas plegadas β (amarillo). El dominio de unión a DNA tipo MerR está compuesto por un motivo hélice-giro-hélice (HTH) y dos alas. Los aminoácidos marcados en rojo están implicados en la interacción con el DNA, según datos cristalográficos. Se muestran con círculos los residuos implicados en la unión de CarA al DNA (naranja), a CarS (azul) o a ambos (verde). En la línea consenso, se muestran los residuos aminoacídicos conservados (.) o idénticos (*) (Navarro-Avilés *et al*., 2007) **(B)** A la izquierda, monómero de una proteína tipo MerR, BmrR. El dominio de unión a fármaco, la hélice conectora y el dominio de unión a DNA se muestran en verde, rojo y amarillo, respectivamente. A la derecha, BmrR se une al DNA formando un dímero gracias a la región conectora, que actúa de hélice de dimerización. Parte B modificada de Heldwein & Brennan, (2001).

Los estudios *in vivo* e *in vitro* con CarA y CarS han llevado al siguiente modelo de acción molecular. En la oscuridad, CarA se une en forma de dímeros a su operador bipartito en el promotor P_B; primero, se une a un sitio palindrómico de alta afinidad (pI) y, después, cooperativamente a un segundo sitio palindrómico de baja afinidad (pII) que solapa con la región -35 del promotor P_B, impidiendo la unión de la RNAP y la expresión del operón *carB* (Figura 22) (López-Rubio, 2005; López-Rubio *et al*., 2002, 2004; Pérez-Marín *et al*., 2004). En la luz, el antirrepresor CarS compite con el operador por la interacción con el dominio de unión al DNA de CarA, impidiendo así su unión al operador. La interacción CarS-CarA se ve favorecida por la mayor afinidad de CarS por CarA (10 nM), en comparación con la de CarA por su sitio de unión (100-200 nM para pI); y por el incremento de la expresión de *carS* en la luz.

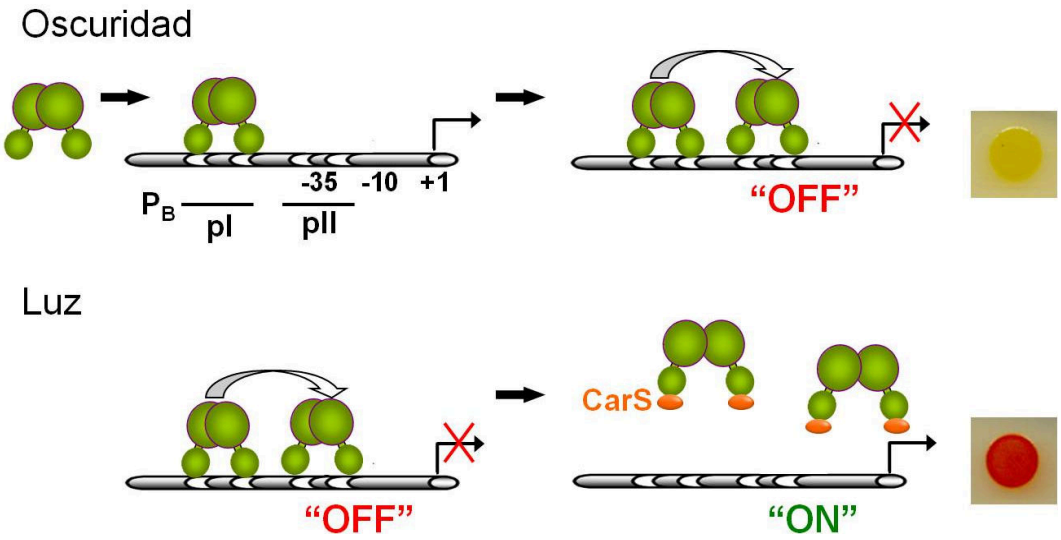


Figura 22. Modelo de regulación de la expresión del operón *carB* por CarA y CarS. En blanco (cajas): las dos mitades de cada palíndrome. CarA bloquea la unión de la RNAP a la región -35 del promotor P_B

.

La estructura tridimensional de CarS reveló que el antirrepresor adopta un plegamiento de tipo barril con 5 hebras β antiparalelas, similar a los dominios SH3 típicamente eucarióticos (que suelen ser dominios de interacción proteína-proteína). CarS presenta un bolsillo hidrofóbico delineado por residuos acídicos que imita la estructura y distribución de cargas del DNA operador y en el que encaja la hélice α2 de CarA, implicada en el reconocimiento del DNA (León *et al*., 2010; Navarro-Avilés *et al*., 2007). La observación de que CarA utiliza un mismo elemento, su hélice α2, para el reconocimiento del DNA y de CarS, unido al hecho de que CarS imita la estructura

del DNA (Figura 23), proporcionó una explicación molecular detallada sobre el mecanismo de represión-antirrepresión que controla la expresión del operón *carB*.

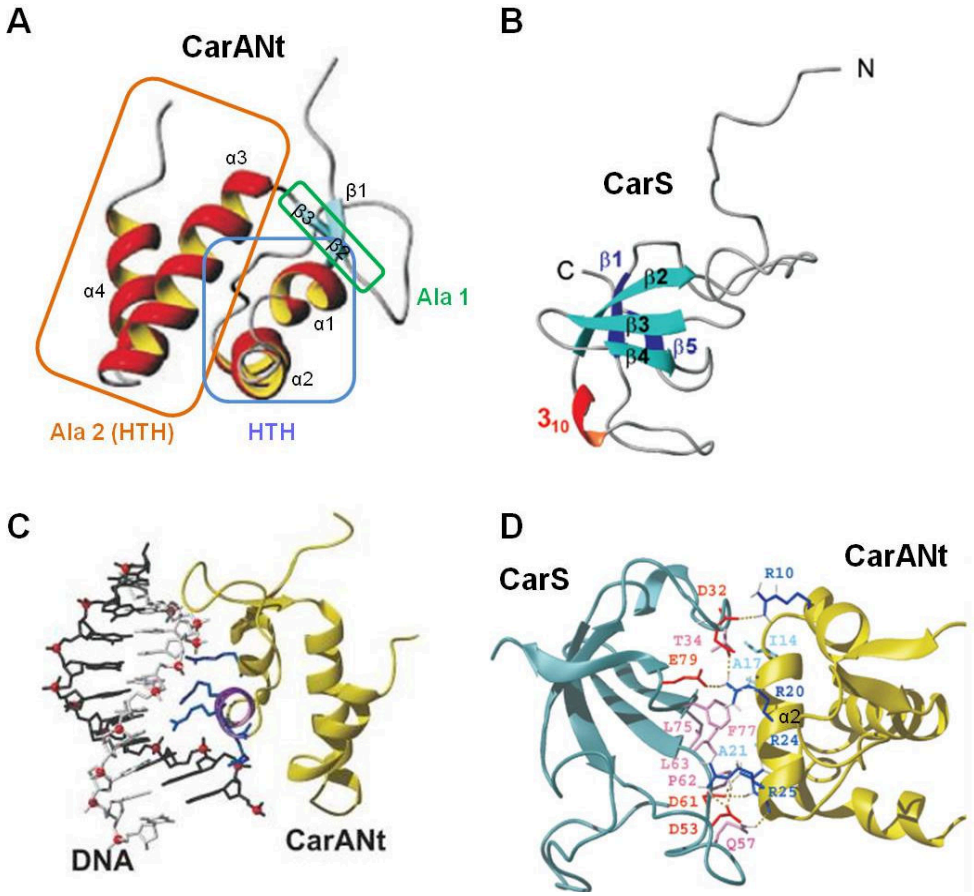


Figura 23. Estructura de CarS y del dominio de unión a DNA de CarA. (A) Estructura del dominio N-terminal de CarA (CarANt) obtenido por RMN. Se observa el motivo HTH (azul), el ala 1 (verde) y ala 2 (naranja), típicos de la famila de proteínas tipo MerR. **(B)** Estructura de CarS1 (una forma truncada de CarS) obtenida por resonancia magnética nuclear (RMN). **(C)** Modelo del complejo formado por CarANt y el DNA operador. **(D)** Modelo del complejo formado por CarANt y CarS. Imágenes modificadas de León *et al*., (2010) y Navarro-Avilés *et al*., (2007).

Cuando CarA y CarH se descubrieron, el análisis de secuencia y la predicción de posibles estructuras secundarias pusieron de manifiesto un parecido inesperado entre su dominio C-terminal y el dominio de unión a MeCbl de la enzima MetH (Cervantes & Murillo, 2002). Aunque con algún cambio conservativo, tanto CarA como CarH presentan el motivo consenso de unión a cobalaminas [DxHxxG-(41)-SxL-(26-28)-GG, donde x representa cualquier aminoácido] típico del modo de unión *base- off His-on* (Figura 24). Sorprendentemente, aunque CarA es capaz de unirse *in vitro* a cobalaminas a través de su dominio C-terminal, no las requiere ni *in vivo* ni *in vitro* para llevar a cabo su función (López-Rubio *et al*., 2002, 2004; Pérez-Marín *et al*.,

2008). No obstante, el dominio C-terminal de CarA favorece la unión al DNA *in vitro* y es imprescindible *in vivo,* ya que la expresión a niveles fisiológicos del dominio N-terminal no es suficiente para restaurar el fenotipo silvestre para la carotenogénesis (Pérez-Marín *et al.*, 2004). Los ensayos de doble híbrido han puesto de manifiesto que el dominio C-terminal media la interacción de CarA consigo misma y que dicha interacción no se ve alterada por la mutación del motivo de unión a cobalaminas (Pérez-Marín *et al.*, 2008). Estos hechos demuestran que la oligomerización de CarA para formar un dímero, aunque independiente de B_{12}, es imprescindible para su función represora *in vivo*.

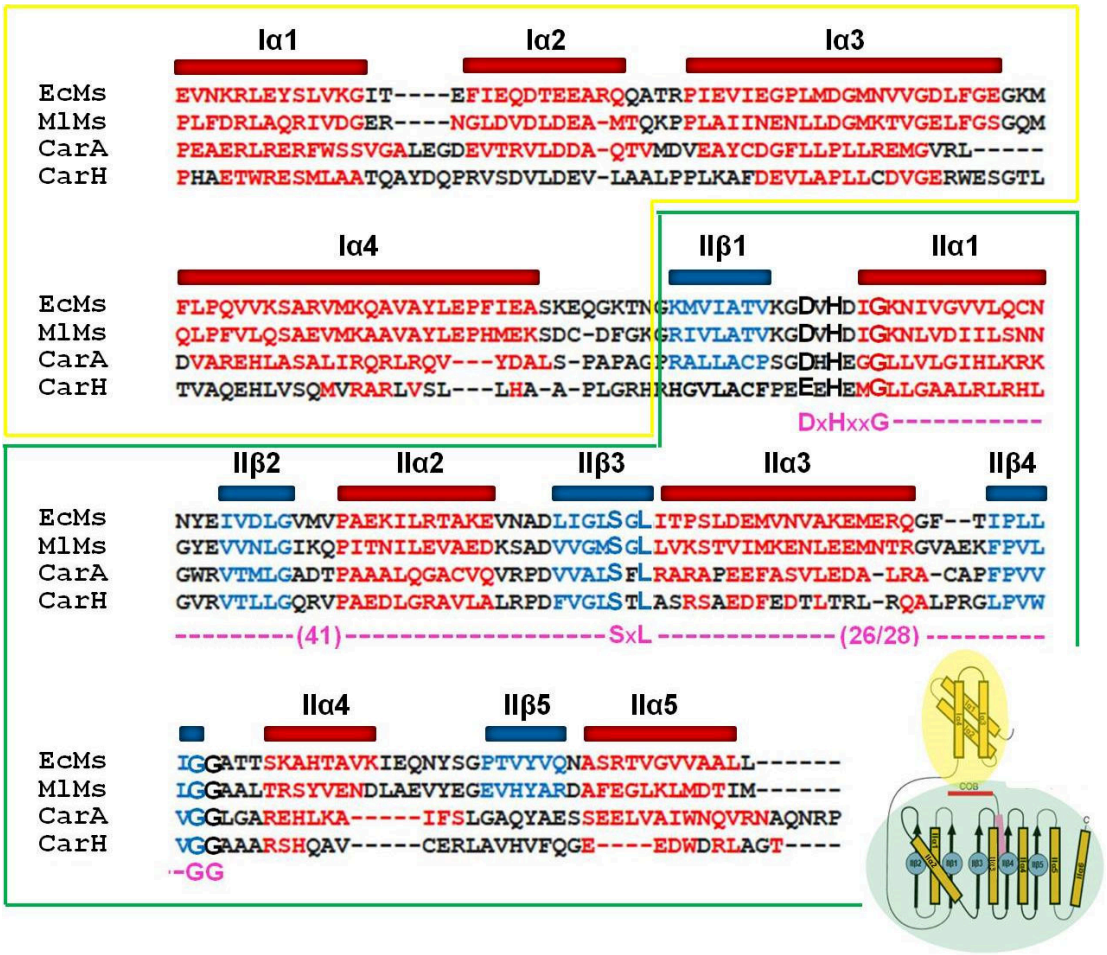


Figura 24. Alineamiento del dominio de unión a cobalamina de las sintetasas de metionina de *E. coli* (P13009) y *Mycobacterium leprae* (Q49775) con el dominio C-terminal de CarA (CAA79964.1) y CarH (CAA79965.2). Se representan en la secuencia las hélices α (rojo) y las láminas β (azul) deducidas de datos cristalográficos (*E. coli*) o del análisis de secuencia. Los recuadros representan el subdominio *helix bundle* (I; amarillo) y el subdominio Rossmann (II; verde). En la esquina inferior derecha se muestra el diagrama topológico de la sintetasa de metionina. El motivo consenso de unión a cobalamina se indica en rosa debajo del alineamiento.

La observación de que no solo la deleción completa de *carH* sino también las mutaciones en el motivo de unión a cobalaminas eliminan la represión de P_B dependiente de B_{12} (en una estirpe carente de CarA) supuso un apoyo adicional a la hipótesis de que, a diferencia de CarA, CarH es un regulador transcripcional que requiere la unión a cobalaminas (Pérez-Marín *et al*., 2008). En un principio, la imposibilidad de purificar CarH en su forma nativa (la proteína es insoluble cuando se expresa en *E. coli*) impidió demostrar experimentalmente *in vitro* su unión a cobalaminas y desvelar cómo dicha unión modula la acción de CarH (Pérez-Marín *et al*., 2008). Estudios posteriores con CarH y con la proteína homóloga a CarH de la bacteria termófila *Thermus thermophilus*, a la que se denominó TtCarH, permitieron descifrar el mecanismo de acción de CarH, la base molecular de su dependencia de B_{12}, y la forma específica de B_{12} utilizada (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011). Que una versión de CarA con el dominio de unión a B_{12} de CarH, o las proteínas quiméricas CTt1 o CTt2 (con el dominio C-terminal de *T. thermophilus* fusionado al dominio de unión al DNA de CarA y CarH, respectivamente) fuesen capaces de rescatar el fenotipo silvestre de una estirpe de *M. xanthus* sin *carA* ni *carH*, solo en presencia de B_{12}, puso de manifiesto que el dominio C-terminal tanto de CarH como de TtCarH es un módulo autónomo necesario y suficiente para conferir la dependencia de B_{12} (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011).

A diferencia de CarH, TtCarH pudo expresarse en su forma soluble y ser purificada, al igual que las quimeras CTt1 y CTt2, con las que se realizaron ensayos de oligomerización y de unión a P_B *in vitro*. Acorde con los datos *in vivo* indicativos de que CarA y CarH se unen a la misma región en P_B (Pérez-Marín *et al*., 2008), los ensayos de unión al DNA *in vitro* mostraron la unión de CTt1 y CTt2 al mismo sitio operador en P_B que CarA, aunque de una manera estrictamente dependiente de la presencia de AdoCbl y la ausencia de iluminación (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011). Que CarH requiere AdoCbl *in vivo* para su función quedó demostrado por la pérdida de su capacidad de reprimir la expresión de P_B en una estirpe de *M. xanthus* incapaz de convertir CNCbl en AdoCbl. La misma dependencia de AdoCbl y la oscuridad mostró TtCarH en su unión al DNA (a una región intergénica del genoma de *T. thermophilus* situada entre el propio *TtcarH* y el gen carotenogénico *crtB* transcrito en la dirección opuesta). Dada la homología del dominio de unión a B_{12} de CarH y TtCarH con el de la sintetasa de metionina, que usa MeCbl como cofactor, la observación de que CarH y TtCarH utilizan AdoCbl, y no MeCbl, fue un hecho completamente inesperado (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011).

Los ensayos del doble híbrido bacteriano con CarH y TtCarH, y los ensayos de cromatografía de exclusión de tamaños con TtCarH, su dominio C-terminal y las quimeras CTt1 y CTt2 sirvieron para demostrar que AdoCbl funciona modulando el estado oligomérico de las proteínas tipo CarH y, con ello, su unión al DNA. Así pues, a diferencia de CarA, que dimeriza por sí misma en luz y oscuridad, y tanto en presencia como en ausencia de B_{12}, CarH y TtCarH son monómeros en su forma apo que, en la oscuridad y presencia de AdoCbl, forman tetrámeros capaces de unirse al DNA y reprimir la expresión génica. La exposición a la luz (UV, azul, verde) de los tetrámeros provoca su desensamblaje a monómeros que se liberan del DNA permitiendo, por tanto, la expresión génica. Curiosamente, dichos monómeros permanecen unidos a la forma fotolisada de la AdoCbl (Figura 25). El descubrimiento del modo de acción de CarH y TtCarH supuso, por tanto, el hallazgo de un nuevo tipo de fotorreceptor, así como de una nueva faceta para la vitamina B_{12}, revisado en Padmanabhan *et al.*, (2017).

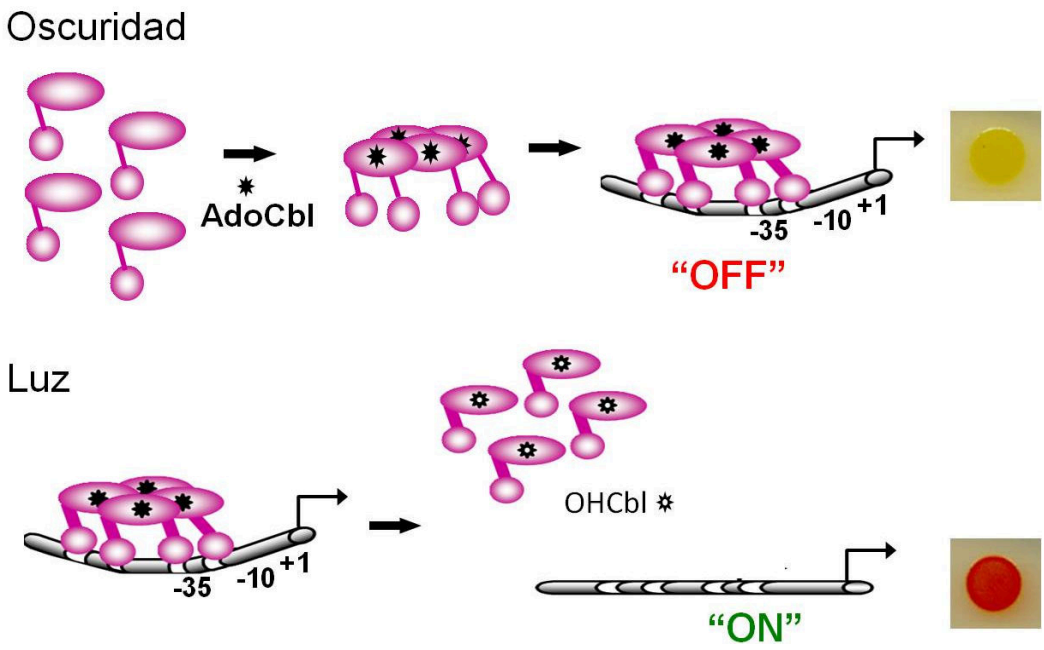


Figura 25. Modelo de regulación de la expresión del operón *carB* por CarH. Se representa esquemáticamente AdoCbl (asterisco negro), OHCbl (asterisco sin relleno) y CarH con sus dos dominios (rosa). A la derecha, colonia de *M. xanthus* que ilustra el cambio de color asociado a la síntesis de carotenos en respuesta a la luz. Imagen modificada de Ortiz-Guerrero *et al.*, (2011).

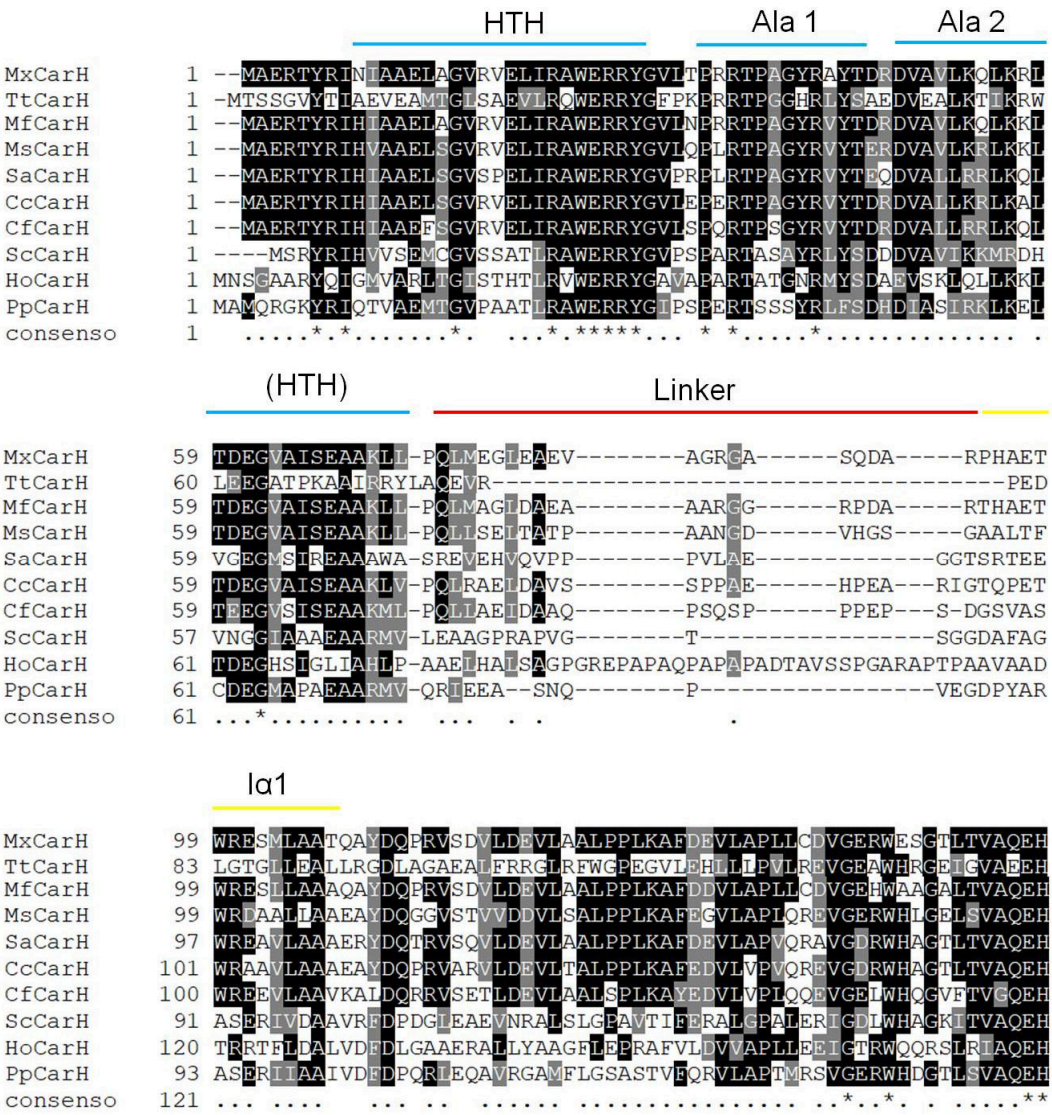
I.6.2 Distribución taxonómica de las proteínas CarA/CarH

Durante un tiempo, CarA y CarH de *M. xanthus* fueron los únicos factores de transcripción conocidos con un dominio de unión a B_{12} fusionado a un dominio de unión al DNA tipo MerR. Esta situación se mantuvo hasta 2005, cuando se publicó un estudio con la bacteria filamentosa Gram positiva *Streptomyces coelicolor*, que produce carotenoides en respuesta a luz azul, al igual que *M. xanthus* (Takano *et al*., 2005). Los genes responsables de la biosíntesis de carotenoides están agrupados en dos operones, *crtEIBV* y *crtYTU*. Dichos operones se encuentran flanqueados por dos genes, que determinan factores de transcripción: (i) un regulador transcripcional de la familia MerR denominado LitR (*light-induced transcription regulator*) y (ii) un factor σ^{ECF}(como CarQ en *M. xanthus*) denominado LitS (Takano, 2016). No se ha identificado, sin embargo, un factor anti-σ que cumpla una función análoga a la de la proteína CarR de *M. xanthus*. Se ha postulado que LitR podría funcionar como un regulador transcripcional con funcionalidad doble: en oscuridad, unido a B_{12} reprimiría la expresión de *litS* y la suya misma, pero en la luz de alguna manera adquiriría una forma activa y favorecería la expresión de *litS* (Takano, 2016). Este modelo difiere del modo de acción de CarA y CarH en cuanto a que LitR sería un regulador positivo del promotor de *litS*, aunque el hipotético rol activador no pudo reproducirse en ensayos de transcripción *in vitro* (Takano *et al*., 2005). Por otro lado, la actividad represora de LitR en oscuridad sí ha sido demostrada *in vivo*, aunque no *in vitro* (Takano *et al*., 2005, 2006).

Como ya se ha comentado, la bacteria termófila *T. thermophilus*, capaz de sintetizar B_{12} *de novo* (a diferencia de *M. xanthus*), presenta la proteína homóloga TtCarH, cuyas propiedades resultaron muy ventajosas para realizar los estudios *in vitro* mencionados en el apartado anterior. Consistente con los datos *in vitro* (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011), los estudios *in vivo* demostraron que TtCarH, en efecto, regula la síntesis de carotenos en *T. thermophilus* de una manera dependiente de B_{12} y luz (Takano *et al*., 2011).

La búsqueda bioinformática de proteínas similares a CarA/CarH permitió identificar más de 600 posibles homólogos de función desconocida, distribuidos en diversos phyla bacterianos (no están presentes en eucariotas), siendo más abundantes en Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Deinococcus-Thermus, Firmicutes, y β- y δ-Proteobacteria (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011; Padmanabhan *et al*., 2017). En la mayoría de las especies, los genes correspondientes están presentes como una única copia que, en consonancia con una posible función de respuesta a la

luz, suelen localizarse en las proximidades de genes carotenogénicos o genes que determinan la fotoliasa de DNA. En el orden Myxococcales, los miembros de los subórdenes Sorangiineae y Nannocystineae tienen solo un posible gen *carH*. Sin embargo, al igual que *M. xanthus*, otras especies del suborden Cystobacterineae, tienen dos genes parálogos en tándem (un posible *carA* seguido de un posible *carH*) (Figuras 26 y 27), así como *carS* y el resto de los genes necesarios en la ruta independiente de B_{12}; la excepción es *Cystobacter fuscus* que, perteneciendo a las Cystobacterineae, presenta una sola copia, más parecida a *carH* que a *carA* (Figura 26) (Pérez-Castaño *et al*., datos no publicados; Padmanabhan *et al*., 2017). Tomado en conjunto con el origen ancestral propuesto para B_{12} (Roth *et al*., 1996), la hipótesis más parsimoniosa es que el gen para un CarH ancestral dependiente de AdoCbl se duplicó en Cystobacterineae y una de las copias divergió funcionalmente dando lugar a CarA. Así pues, en algunas bacterias del suborden Cystobacterineae, coexisten dos mecanismos para responder a un mismo estímulo, la luz. Uno de ellos es independiente de B_{12} y constituye la vía principal de respuesta a la luz; dicha vía, que se dispara a nivel de la membrana, conduce a la activación del operón *carQRS* para producir CarS y neutralizar la represión de P_B por CarA. El otro mecanismo emplea la vitamina B_{12} en su forma AdoCbl que, asociada al represor CarH, actúa como sensor directo de la luz. Es posible que contar con ambas vías confiera una ventaja evolutiva, al garantizar que la respuesta carotenogénica fotoprotectora se mantenga incluso en condiciones de escasez de B_{12}.


HTH
Ala 1
Ala 2
(HTH)
Linker
Iα1
MxCarH
TtCarH
MfCarH
MsCarH
SaCarH
CcCarH
CfCarH
ScCarH
HoCarH
PpCarH
consenso

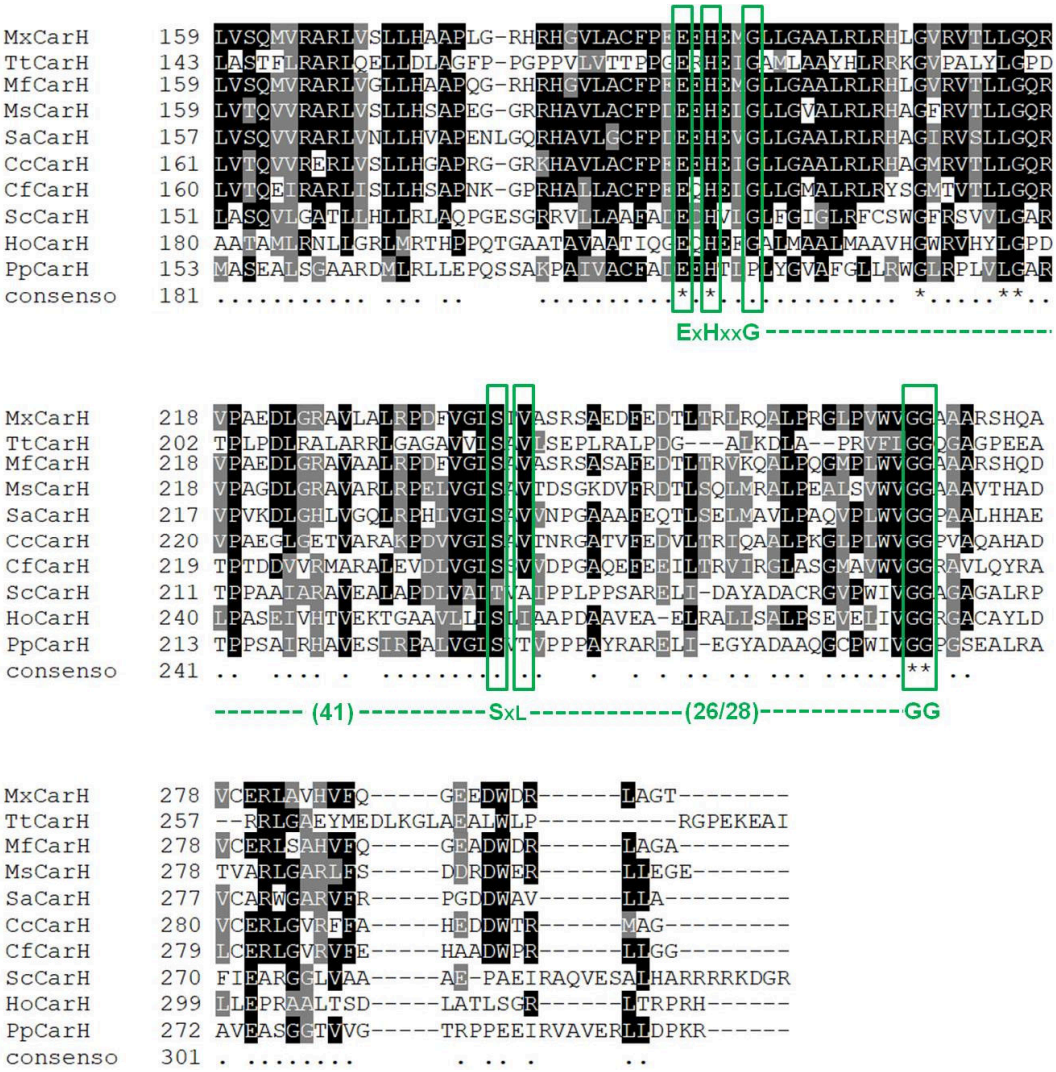


Figura 26. Alineamiento de proteínas tipo CarH: 9 proteínas de mixobacterias y la de *T. thermophilus*. Mx (*M. xanthus*), Tt (*T. thermophilus*), Mf (*Myxococcus fulvus*), Ms (*Myxococcus stipitatus*), Sa (*Stigmatella aurantiaca*), Cc (*Corallococcus coralloides*), Cf (*Cystobacter fuscus*), Sc (*Sorangium cellulosum*), Ho (*Haliangium ochraceum*) y Pp (*Plesiocystis pacifica*). En la última línea se indican las posiciones conservadas (.) o idénticas (*). Se indica el dominio conservado tipo MerR (HTH, Ala 1 y Ala 2) en la región N-terminal, la región conectora (*linker*) y la primera hélice α del dominio de unión a cobalamina. En verde, el motivo de unión a cobalamina típico de sintetasas de metionina, con el cambio conservativo de "DxHxxG" a "ExHxxG".

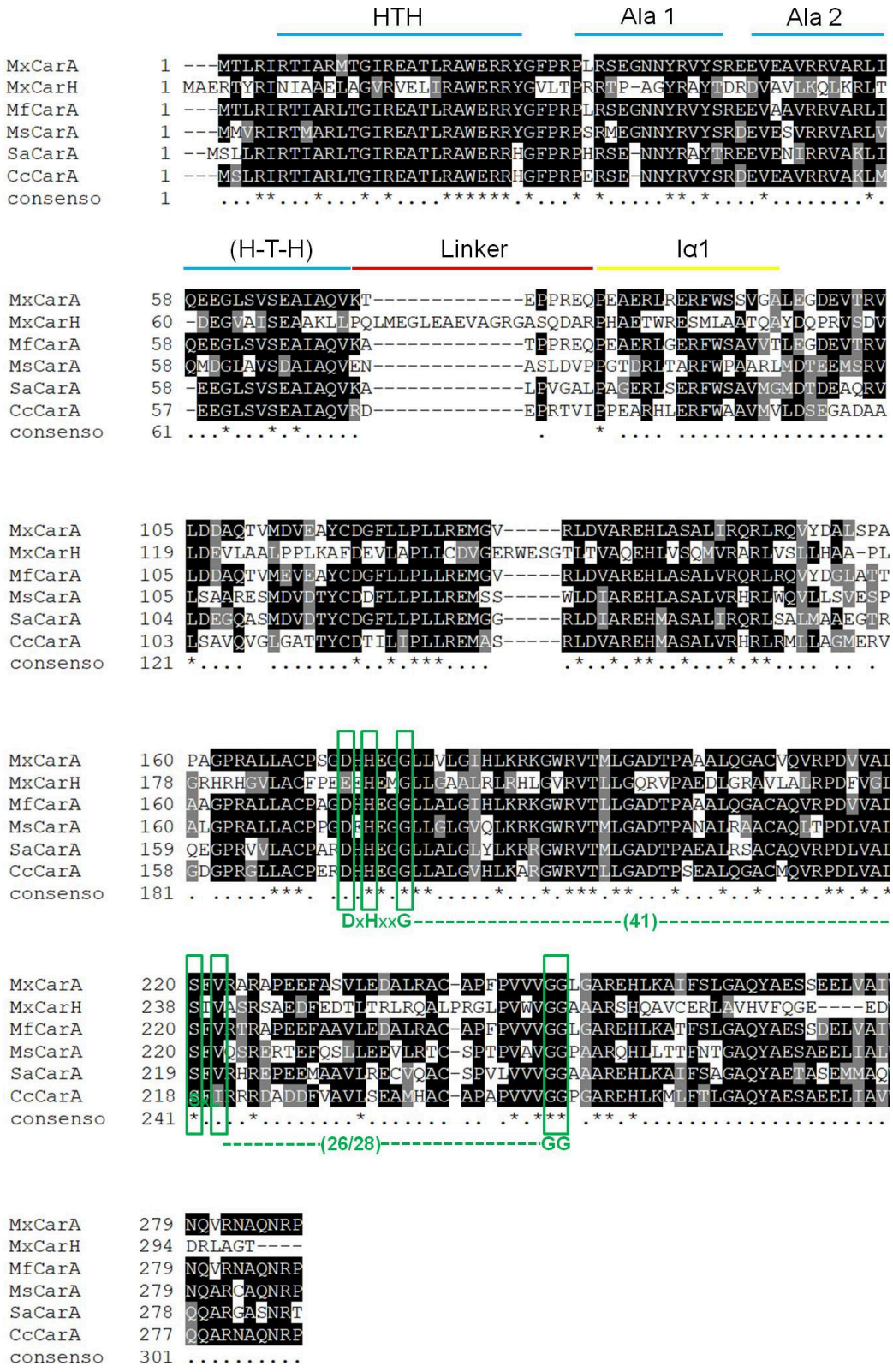


Figura 27. Alineamiento de proteínas tipo CarA de cinco mixobacterias. Mx (*M. xanthus*), Mf (*Myxococcus fulvus*), Ms (*Myxococcus stipitatus*), Sa (*Stigmatella aurantiaca*), Cc (*Corallococcus coralloides*). En la última línea se indican las posiciones conservadas (.) o idénticas (*). Se indica el dominio conservado tipo MerR (HTH, Ala 1 y Ala 2) en la región N-terminal, la región conectora (*linker*) y la primera hélice α del dominio de unión a cobalamina. En verde, el motivo de unión a cobalamina típico de sintetasas de metionina.

I.6.3 Aplicaciones en Optogenética

Los módulos fotorreceptores pueden actuar de manera independiente o formar parte de proteínas más grandes con múltiples dominios, modulando interacciones específicas (con proteínas, DNA, RNA, membranas, moléculas pequeñas) o reacciones enzimáticas (quinasas, diguanilato ciclasas, fosfodiesterasas). El módulo fotosensorial suele ser una unidad autónoma que puede intercambiarse entre diferentes proteínas. Esto permite la combinación de módulos como una estrategia efectiva en la evolución para aumentar la complejidad en la señalización y regulación celular (Bhattacharyya *et al*., 2006). La naturaleza modular ha sido aprovechada para crear fusiones genéticas artificiales entre módulos de fotorreceptores y proteínas de interés. Estas fusiones genéticas artificiales pueden ser utilizadas como herramientas en optogenética, una tecnología que combina métodos genéticos y ópticos para lograr un control rápido y preciso de procesos biológicos (Padmanabhan *et al*., 2017; Shcherbakova *et al*., 2015). Los avances en el campo de la optogenética han dado lugar al desarrollo de aplicaciones en biología celular y neurobiología (Fenno *et al*., 2011; Miesenböck, 2011; K. Zhang & Cui, 2015). La inclusión de CarH entre los fotorreceptores utilizados para este tipo de técnicas amplía el espectro de longitudes de onda hábiles, ya que hasta el momento ninguno de los módulos utilizados era capaz de responder a la luz verde (~545 nm) (Chatelle *et al*., 2018; Kainrath *et al*., 2017)

Una de las aplicaciones de la optogenética es en la regulación de la expresión génica. Tradicionalmente, la actividad génica es modulada mediante el empleo de diferentes fármacos, metabolitos o mensajeros sensibles a quorum. Sin embargo, el uso de la luz para la regulación génica ofrece un control de la expresión con una resolución inigualable en espacio y tiempo (Chatelle *et al*., 2018). La regulación mediante iluminación se basa en la fusión del módulo sensor de luz de los fotorreceptores a módulos celulares reguladores de la transcripción. De esta forma se puede inducir o reprimir la expresión de genes mediante la exposición a longitudes de onda específicas según el cromóforo empleado. El dominio de unión a AdoCbl de CarH ha sido utilizado con éxito en procedimientos de este tipo tanto en cultivos de células animales como vegetales (Chatelle *et al*. 2018) (Figura 28A). Por otro lado, se ha utilizado también para regular la activación de receptores de membrana (receptor del factor de crecimiento fibroblástico) en células en cultivo y embriones de pez cebra (*Danio rerio*) en desarrollo (Kainrath *et al*., 2017) (Figura 28B).

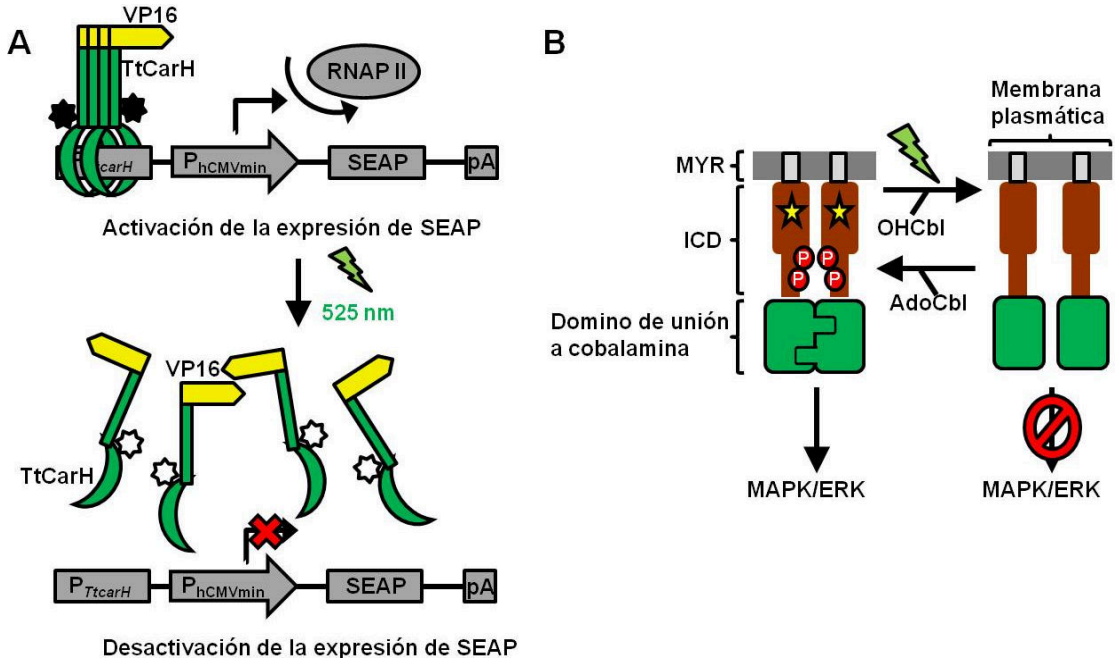


Figura 28. Aplicación del fotorreceptor CarH en la regulación de la expresión génica y la señalización por receptores de membrana. (A) Arriba: en la oscuridad, TtCarH fusionado a la proteína activadora VP16 se une a AdoCbl (asterisco con fondo negro) para formar tetrámeros, que son capaces de unirse a varias copias en tándem del operador de TtCarH. Dicha unión permite la mediación de VP16 para reclutar a la RNAP II, que es capaz de unirse a $P_{hCMVmin}$ para activar la expresión de SEAP (*secreted alkaline phosphatase*). Abajo: la exposición a luz verde produce la fotólisis de AdoCbl (asterisco con fondo blanco) que conlleva la desestabilización del tetrámero de TtCarH-VP16 y produce la desactivación de la expresión de SEAP. Abreviaturas: VP16, factor activador de la expresión génica procedente del virus *Herpes simplex*; P_{TtcarH}, varias copias en tándem del operador de TtCarH; $P_{hCMVmin}$, promotor mínimo derivado de un citomegalovirus humano; SEAP, gen que codifica la fosfatasa alcalina secretada (Chatelle *et al.*, 2018). **(B)** Modo de acción del dominio de unión a cobalamina de *M. xanthus* o *T. thermophilus*, fusionado al dominio citoplasmático de una tirosín quinasa (ICD) cuyo motivo de unión a ligando y dominio transmembranal han sido reemplazados por miristoilación (MYR). En oscuridad, en presencia de AdoCbl los dominios de unión a cobalamina oligomerizan favoreciendo la fosforilación de ICD y la activación de MAPK/ERK. En presencia de luz verde, se fotolisa AdoCbl, lo que produce el desensamblaje de los oligómeros. Esto impide la fosforilación de ICD y la activación de MAPK/ERK. Abreviaturas: MAPK, proteína quinasa activada por mitógeno; ERK, quinasa regulada por señal extracelular (Kainrath *et al.*, 2017).

Una de las aplicaciones más prometedoras basadas en el uso de CarH se ha producido en el área de la tecnología biomédica. Los hidrogeles, conocidos por sus propiedades biomiméticas, son utilizados para diversos fines entre los que se encuentran la administración de fármacos y la terapia con células madre (DeForest & Anseth, 2012; Lee & Mooney, 2001). Los hidrogeles tradicionales formados por polímeros sintéticos o biomoléculas naturales a menudo sirven como andamios pasivos para moléculas. Por lo tanto, no permiten modular su acción para participar en

procesos biológicos, como el desarrollo de células/tejidos. Por ello, cada vez es más importante diseñar hidrogeles dinámicos sensibles a estímulos que puedan acomodar o imitar la complejidad de los sistemas biológicos (Wang *et al*., 2017). El mecanismo de oligomerización del módulo de unión a AdoCbl de CarH hace de sí mismo un elemento útil para el desarrollo de estos materiales dinámicos. Este módulo permite que las proteínas poliméricas se autoensamblen en un hidrogel elástico en presencia de AdoCbl en oscuridad y se desensamblen rápidamente con la exposición a la luz. Esto permite dirigir la liberación de su contenido en el momento y lugar deseados (Wang *et al*., 2017) (Figura 29). Este mecanismo ha sido constatado en la inmovilización y liberación de proteínas (Wei *et al*., 2018) e incluso de células madre (Wang *et al*., 2017) (Figura 29).

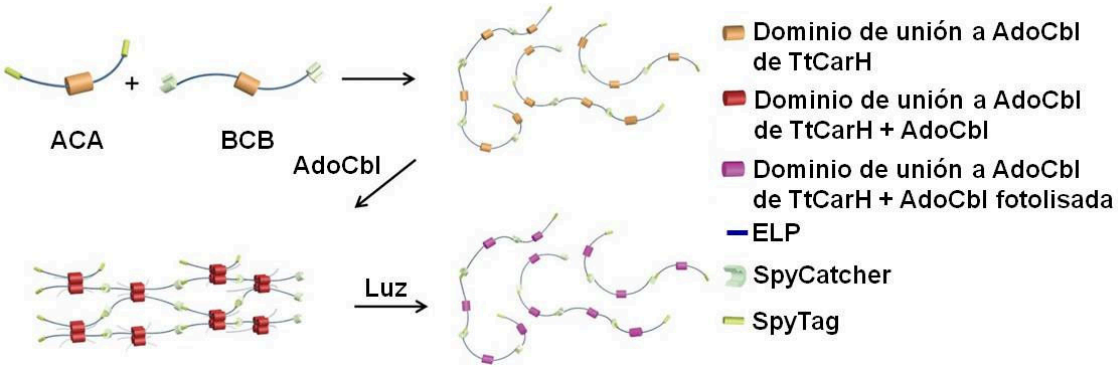


Figura 29. Aplicación de CarH en la elaboración de hidrogeles fotosensibles. Las dos proteínas, ACA y BCB, polimerizan a través de la reacción química del sistema SpyTag-SpyCatcher. En oscuridad, estos polímeros pueden ensamblarse adicionalmente en una red molecular. Esto se produce a través de la tetramerización de los dominios de unión a AdoCbl en presencia de AdoCbl. La exposición a luz verde (522 nm) produce la fotólisis de AdoCbl, la disociación del tetrámero y la liberación del contenido del hidrogel. Abreviaturas: ACA, polipéptido similar a elastina que posee un dominio de unión a AdoCbl de TtCarH y en ambos extremos SpyTag; BCB, polipéptido similar a elastina que posee un dominio de unión a AdoCbl de CarH y en ambos extremos SpyCatcher; ELP, polipéptido similar a elastina. Imagen modificada de Wang *et al*., (2017).

I.7 Objetivos

Con los antecedentes expuestos en los apartados previos, el objetivo global de este trabajo de tesis doctoral ha sido profundizar en los conocimientos del modo de acción de CarH y su dependencia de AdoCbl mediante el análisis de la relación estructura-función. Este objetivo global puede desglosarse en los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar los aminoácidos implicados en la unión específica de CarH de *M. xanthus* y de *T. thermophilus* a AdoCbl.

2. Estudiar el proceso de oligomerización de CarH y su dependencia de AdoCbl, para definir los posibles cambios conformacionales que permiten que se constituya un fotorreceptor funcional y entender la base molecular del uso de AdoCbl como una molécula sensora de luz.

3. Caracterizar el modo de unión de CarH al DNA y la arquitectura del DNA operador.

4. Estudiar el proceso de inactivación del fotorreceptor CarH como consecuencia de su exposición a la luz.

5. Evaluar si el modo de acción de CarH está conservado evolutivamente mediante el estudio de la proteína homóloga de la bacteria *Bacillus megaterium.*

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Estirpes, plásmidos y oligonucleótidos

II.1.1 Estirpes

II.1.1.1 Estirpes de *M. xanthus*

En la Tabla 2 se recogen las estirpes de *M. xanthus* utilizadas en este trabajo, indicando su fenotipo, genotipo y origen. Las generadas en nuestro laboratorio se nombran con las letras MR seguidas de un número de aislamiento (aclaraciones sobre el genotipo de algunas estirpes se incluyen en la sección de Resultados). Dichas estirpes derivan de DK1050, una variante espontánea de DK101 que presenta una coloración amarilla estable en la oscuridad y posee la mutación *pilQ1* que afecta negativamente a la movilidad social (Ruiz-Vazquez & Murillo, 1984).

Para indicar los distintos fenotipos asociados a la carotenogénesis se ha utilizado la siguiente terminología: 1) Car^+, fenotipo silvestre para la inducción por la luz de la síntesis de carotenoides; 2) Car^-, fenotipo debido a mutaciones en genes que participan en dicho proceso (mutaciones *car*) y que provocan ausencia de carotenoides coloreados en cualquier situación; 3) Car^C, fenotipo debido a mutaciones que provocan la síntesis constitutiva de carotenos (independiente de luz); 4) $Car^{(+)}$, fenotipo silvestre para la carotenogénesis en presencia de cobalaminas.

Tabla 2. Estirpes de *M. xanthus* utilizadas en este trabajo

Estirpe	Fenotipo	Descripción o genotipo destacable	Fuente o Referencia
Estirpes de uso básico			
DK1050	Car^+	Silvestre	(Ruiz-Vazquez & Murillo, 1984)
MR1778	Car^C	Δ*carA* Δ*carH* Δ*carS*	(Ortiz-Guerrero *et al*., 2011)
MR2648	Car^C	Δ*carA* Δ*carH* Δ*carS* Δ*pduO*. MR1778 x pMR3425(Δ*pduO*)	Este trabajo
Estirpes empleadas en los ensayos *in vivo* en *M. xanthus* para evaluar, mediante mutagénesis dirigida en CarH, los aminoácidos implicados en el modo de acción de CarH			
MR2622	$Car^{(+)}$	P_{van}-*flag-MxcarH*. MR1778 x pMR4283. Km^R	Este trabajo
MR2639	Car^C	P_{van}- *flag-MxcarH* (W147A). MR1778 x pMR4319. Km^R	Este trabajo
MR2640	$Car^{(+)}$	P_{van}- *flag-MxcarH* (W147F). MR1778 x pMR4320. Km^R	Este trabajo
MR2641	Car^C	P_{van}- *flag-MxcarH* (E157A). MR1778 x pMR4321. Km^R	Este trabajo
MR2643	Car^C	P_{van}- *flag-MxcarH* (E192R). MR1778 x pMR4323. Km^R	Este trabajo

MR2644	$Car^{(+)}$	P_{van}- *flag-MxcarH* (E192R/R217E). MR1778 x pMR4324. Km^R	Este trabajo
MR2645	Car^C	P_{van}- *flag-MxcarH* (P176Q). MR1778 x pMR4325. Km^R	Este trabajo
MR2646	$Car^{(+)}$	P_{van}- *flag-MxcarH* (G178Q). MR1778 x pMR4326. Km^R	Este trabajo
MR2647	$Car^{(+)}$	P_{van}- *flag-MxcarH* (G208Q). MR1778 x pMR4327. Km^R	Este trabajo
MR2732	Car^C	P_{van}- *flag-MxcarH* (R28A). MR1778 x pMR4344. Km^R	Este trabajo
MR2733	Car^C	P_{van}- *flag-MxcarH* (Y29A). MR1778 x pMR4345. Km^R	Este trabajo
MR2734	Car^C	P_{van}- *flag-MxcarH* (Y41A). MR1778 x pMR4346. Km^R	Este trabajo
MR2998	$Car^{(+)}$	P_{van}- *flag-MxcarH*. MR2648 x pMR4370. Km^R	Este trabajo
Estirpes empleadas en los ensayos *in vivo* en *M. xanthus* para evaluar la complementación de CBm en la regulación de la expresión de genes de la carotenogénesis			
MR3131	$Car^{(+)}$	P_{van}-*flag-cbm* en el sitio heterólogo de MR2648. MR2648 x pMR4609. Km^R	Este trabajo
MR3132	Car^C	P_{van}- *flag-cbm* (W143A). MR2648 x pMR4610. Km^R	Este trabajo
MR3133	Car^C	P_{van}-*flag-cbm* (E153A). MR2648 x pMR4611. Km^R	Este trabajo
MR3134	Car^C	P_{van}-*flag-cbm* (E153D). MR2648 x pMR4612. Km^R	Este trabajo
MR3135	Car^C	P_{van}-*flag-cbm* (H154A). MR2648 x pMR4613. Km^R	Este trabajo

P*van*: promotor inducible por vanilato; *flag*: secuencia de nucleótidos que codifica un octapéptido (DYKDDDDK), que es utilizado como etiqueta de proteínas para su detección mediante anticuerpos específicos; Km^R: resistencia a kanamicina; *cbm*: gen que codifica la proteína quimérica CBm formada por el DBD y el *linker* de CarH de *M. xanthus*, y el dominio C-terminal de CarH de *B. megaterium*.

II.1.1.2 Estirpes de *E. coli*

Las estirpes de *E. coli* utilizadas fueron DH5α (Hanahan, 1983), BL21(λDE3) (Novagen), JM109 (Yanisch-perron *et al*., 1985) y BTH101 (Karimova *et al*., 2009). En la Tabla 3 se indica una breve descripción de todas ellas. DH5α y JM109 son deficientes en recombinación (RecA−), propiedad que favorece la estabilidad de los plásmidos y las convierte en hospedadores adecuados en los experimentos de clonación. Además, permiten utilizar el sistema de escrutinio "blanco-azul" para la detección de las colonias portadoras de plásmidos recombinantes. La estirpe BL21(λDE 3) posee en su cromosoma una copia del gen de la polimerasa de RNA del fago T7 ubicado bajo el control del promotor *lacUV5*, activable por el análogo de la lactosa IPTG (isopropil β-D-tiogalactósido). Es además defectiva para la proteasa *lon* y para la proteasa *ompT* de la membrana externa, características que favorecen la expresión y posterior purificación de proteínas. La estirpe BTH101 carece de actividad adenilato ciclasa al presentar una mutación en el gen *cya,* lo que la hace apropiada para los ensayos de doble híbrido bacteriano.

Tabla 3. Estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo

Estirpe	Descripción	Fuente o Referencia
DH5α	ϕ80 *lacZ*ΔM15 Δ*lacU169 recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA relA1*	(Hanahan, 1983)
BL21(DE3)	F^-*ompT hsdS*$_B$ ($r_B^-m_B^-$) *gal dcm* con DE3, un profago λ que lleva el gen de la RNA polimerasa T7	Novagen
JM109	e14–(McrA–) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17* (r_K^- m_K^+) *supE44 relA1* Δ(*lac-proAB*) [F´ *traD36 proAB lacI*qZΔ*M15*]	(Yanisch-perron *et al*., 1985)
BTH101	F^-*cya99I alaD139 galE15 galK16 rpsL hsdR2 mcrA1 mcrB1*	(Karimova *et al*., 2009)

II.1.2 Plásmidos

La Tabla 4 recoge los plásmidos utilizados en este trabajo, indicando sus marcadores seleccionables, utilidad y origen.

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Fuente o Referencia
Plásmidos empleados para la sobreexpresión de proteínas		
pET15b	Vector para la sobreexpresión de proteínas con una cola de Histidinas (H_6) en el extremo N-terminal. Amp^R	Novagen
pETM14	Vector para la sobreexpresión de proteínas con una cola de Histidinas (H_6) y un sitio de corte para Proteasa 3C en el extremo N-terminal. Amp^R	EMBL-AG
Plásmidos para la sobreexpresión de CarH de *T. thermophilus*		
pMR3014	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH. Amp^R	(Ortiz-Guerrero *et al*., 2011)
pMR4117	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH (H132A). Amp^R	Este trabajo
pMR4118	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH (H132E) Amp^R	Este trabajo
pMR4119	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH (H132Q) Amp^R	Este trabajo
pMR4120	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH (W131A). Amp^R	Este trabajo
pMR4121	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH (W131F). Amp^R	Este trabajo

pMR4122	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH (E141A). Amp^R	**Este trabajo**
pMR4123	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH (E141Q). Amp^R	Este trabajo
pMR4124	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH(L143A). Amp^R	Este trabajo
pMR4125	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH(D201R). Amp^R	Este trabajo
pMR4126	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH(D201R, R176D). Amp^R	Este trabajo
pMR4127	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH(D201R, R176E). Amp^R	Este trabajo
pMR4128	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH(G160Q). Amp^R	Este trabajo
pMR4129	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH(G192Q). Amp^R	Este trabajo
pMR4130	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH(G160Q, G192Q). Amp^R	Este trabajo
pMR4339	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH(Q25A). Amp^R	Este trabajo
pMR4340	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH(R29A). Amp^R	Este trabajo
pMR4341	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH(Y30A). Amp^R	Este trabajo
pMR4342	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH(H42A). Amp^R	Este trabajo
pMR4343	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH(R43A). Amp^R	Este trabajo
pMR4445	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH(E141Q). Amp^R	Este trabajo
pMR4564	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtCarH(E141D). Amp^R	Este trabajo
pMR4689	Construcción en pETM14 para sobreexpresar H_6-TtCarH Cter(H118E, H187E). Amp^R	Este trabajo
pMR4690	Construcción en pETM14 para sobreexpresar H_6-TtCarH Cter(H118E, H132E, H187E). Amp^R	Este trabajo
Plásmidos empleados para la sobreexpresión de CarH de *B. megaterium*		
pMR4499	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-BmCarH. Amp^R	Este trabajo
pMR4624	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-BmCarH (W143A). Amp^R	Este trabajo
pMR4625	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-BmCarH (E153A). Amp^R	Este trabajo
pMR4626	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-BmCarH (E153D). Amp^R	Este trabajo

pMR4627	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-BmCarH (H154A). Amp^R	Este trabajo
Plásmidos empleados para la sobreexpresión de proteínas quiméricas		
pMR4710	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-BmLk4, formada por CarH de *B. megaterium* con una deleción de 12 aminoácidos (VGTFEEEGEVDS) de su linker. Amp^R	Este trabajo
pMR4713	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-TtLk16T, formada por TtCarH cuyo *linker* (QEVR) ha sido sustituido por el de BmCarH (ESSTVGTFEEEGEVDS). Amp^R	Este trabajo
pMR4714	Construcción en pET15b para sobreexpresar H_6-BmLkT, formada por CarH de *B. megaterium* cuyo *linker* ha sido sustituido por el de TtCarH. Amp^R	Este trabajo
Plásmidos empleados en los ensayos in vivo en *M. xanthus* para la expresión inducible por vanilato de MxCarH y CBm		
pMR3679	Vector para la expresión de proteínas bajo el control del promotor del vanilato (Pvan). Km^R	(Iniesta *et al*., 2012)
pMR4283	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato de FLAG-MxCarH. Km^R	Este trabajo
pMR4319	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato de FLAG-MxCarH(W147A). Km^R	Este trabajo
pMR4320	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato de FLAG-MxCarH(W147F). Km^R	Este trabajo
pMR4321	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato de FLAG-MxCarH(E157A). Km^R	Este trabajo
pMR4322	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato de FLAG-MxCarH(H158A). Km^R	Este trabajo
pMR4323	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato de FLAG-MxCarH(E192R). Km^R	Este trabajo
pMR4324	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato de FLAG-MxCarH(E192R/R217E). Km^R	Este trabajo
pMR4325	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato de FLAG-MxCarH(P176Q). Km^R	Este trabajo
pMR4326	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato (Pvan) FLAG-MxCarH(G178Q). Km^R	Este trabajo
pMR4327	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato de FLAG-MxCarH(G208Q). Km^R	Este trabajo
pMR4344	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato de FLAG-MxCarH(R28A). Km^R	Este trabajo
pMR4345	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato de FLAG-MxCarH(Y29A). Km^R	Este trabajo
pMR4346	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato de FLAG-MxCarH(Y41A). Km^R	Este trabajo
pMR4609	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato de FLAG-CBm. KmR	Este trabajo

pMR4610	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato de FLAG-CBm(W143A). Km^R	Este trabajo
pMR4611	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato de FLAG-CBm(E153A). Km^R	Este trabajo
pMR4612	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato de FLAG-CBm(E153D). Km^R	Este trabajo
pMR4613	Vector derivado de pMR3679 para la expresión inducible por vanilato de FLAG-CBm(H154A). Km^R	Este trabajo
Plásmidos empleados para ensayos de doble híbrido bacteriano (DHB)		
pUT18C	Vector para la expresión de proteínas fusionadas al extremo C-terminal del fragmento T18 de CyaA. Amp^R	Este trabajo
pKT25	Vector para la expresión de proteínas fusionadas al extremo C-terminal del fragmento T25 de CyaA. Km^R	Este trabajo
pMR3816	pUT18C-*BmcarH*. Amp^R	Este trabajo
pMR3839	pKT25-*BmcarH*. Km^R	Este trabajo
pMR3988	pUT18C-*MxcarA*. Amp^R	Este trabajo
pMR3989	pUT18C-*MxcarH*. Amp^R	Este trabajo
pMR4004	pKT25-*MxcarA*. Km^R	Este trabajo
pMR4005	pKT25-*MxcarH.* Km^R	Este trabajo
pMR4022	pKT25-*MxcarH* (W147A). Km^R	Este trabajo
pMR4023	pUT18C-*MxcarH* (W147A). Amp^R	Este trabajo
pMR4024	pKT25-*MxcarH* (W147F). Km^R	Este trabajo
pMR4025	pUT18C-*MxcarH* (W147F). Amp^R	Este trabajo
pMR4026	pKT25-*MxcarH* (E157A). Km^R	Este trabajo
pMR4027	pUT18C-*MxcarH* (E157A). Amp^R	Este trabajo
pMR4028	pKT25-*MxcarH* (H158A). Km^R	Este trabajo
pMR4029	pUT18C-*MxcarH* (H158A). Amp^R	Este trabajo
pMR4032	pKT25-*MxcarH* (E192R). Km^R	Este trabajo
pMR4033	pUT18C-*MxcarH* (E192R). Amp^R	Este trabajo
pMR4034	pKT25-*MxcarH* (E192R/R217E). Km^R	Este trabajo
pMR4035	pUT18C-*MxcarH* (E192R/R217E). Amp^R	Este trabajo
pMR4238	pUT18C-*MxcarH* (P176Q). Amp^R	Este trabajo
pMR4239	pUT18C-*MxcarH* (G178Q). Amp^R	Este trabajo
pMR4240	pUT18C-*MxcarH* (G208Q). Amp^R	Este trabajo
pMR4241	pKT25-*MxcarH* (P176Q). Km^R	Este trabajo
pMR4242	pKT25-*MxcarH* (G178Q). Km^R	Este trabajo
pMR4243	pKT25-*MxcarH* (G208Q). Km^R	Este trabajo

Amp^R: resistencia a ampicilina; Km^R: resistencia a kanamicina;FLAG: octapéptido (DYKDDDDK), que es utilizado como etiqueta de proteínas para su detección mediante anticuerpos específicos CyaA: adenilato ciclasa de *B. pertussis*.

II.1.3 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se detallan en la tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'->3')	Tm (ºC)	Uso
ProB1(ProB-BamHI)	AAAAGGATCCCCTGCGATCCACGCCTTCATGAG	62	Clonación de P_B
ProB2(ProB-KpnI)	AAAAGGTACCTCCTCCGAAGAACCCGTTCC	59	Clonación de P_B
pTt40-F	CGCAGAGATGTACAAAAGCTTGACAAAACCTATACATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la secuencia operadora de *TtcarH* (Op*TtcarH*) reconocida por TtCarH
pTt40-R	GCAATGTATAGGTTTTGTCAAGCTTTTGTACATCTCTGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la secuencia operadora de *TtcarH* reconocida por TtCarH
pTt40mut1-F	CGCAGAGATGTGTAAAAGCTTGACAAAACCTATACATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut1-R	GCAATGTATAGGTTTTGTCAAGCTTTTACACATCTCTGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut2-F	CGCAGAGATGTACAAAAGCTTGGTAAAACCTATACATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut2-R	GCAATGTATAGGTTTTACCAAGCTTTTGTACATCTCTGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut3-F	CGCAGAGATGTACAAAAGCTTGACAAAACCTATGTATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut3-R	GCAATACATAGGTTTTGTCAAGCTTTTGTACATCTCTGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut4-F	CGCAGAGATGTACAAAAGCTTGGTAAAACCTATGTATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut4-R	GCAATACATAGGTTTTACCAAGCTTTTGTACATCTCTGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut5-F	CGCAGAGATGTGTAAAAGCTTGGTAAAACCTATGTATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut5-R	GCAATACATAGGTTTTACCAAGCTTTTACACATCTCTGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut6-F	CGCAGAGGCGTACAAAAGCTTGACAAAACCTATACATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut6-R	GCAATGTATAGGTTTTGTCAAGCTTTTGTACGCCTCTGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut7-F	CGCAGAGATGTACAAAAGGCTGACAAAACCTATACATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut7-R	GCAATGTATAGGTTTTGTCAGCCTTTTGTACATCTCTGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut8-F	CGCAGAGATGTACAAAAGCTTGACAAAACGCATACATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*

pTt40mut8-R	GCAATGTATGCGTTTTGTCAAGCTTTTGTACATCTCTGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut9-F	CGCAGAGATGTACAAAAGGCTGACAAAACGCATACATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut9-R	GCAATGTATGCGTTTTGTCAGCCTTTTGTACATCTCTGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut10-F	CGCAGAGGCGTACAAAAGGCTGACAAAACGCATACATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut10-R	GCAATGTATGCGTTTTGTCAGCCTTTTGTACGCCTCTGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut11-F	CGCAGAGATGTACAAAAGGCTGACAAAACGCATACATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut11-R	GCAATGTATGCGTTTTGTCAGCCTTTTGTACATCTCTGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut12-F	CGCAGAGGCGTACAAAAGGCTGACAAAACCTATACATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut12-R	GCAATGTATAGGTTTTGTCAGCCTTTTGTACGCCTCTGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut13-F	CGCAGAGGCGTACAAAAGCTTGACAAAACGCATACATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut13-R	GCAATGTATGCGTTTTGTCAAGCTTTTGTACGCCTCTGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut14-F	CGCAGAGATGTACAATTGCTTGACAATTCCTATACATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut14-R	GCAATGTATAGGAATTGTCAAGCAATTGTACATCTCTGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut15-L	CGCATTGATGTACAATTGCTTGACAATTCCTATACATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut15-R	GCAATGTATAGGAATTGTCAAGCAATTGTACATCAATGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut16-L	CGCATTGATGTACAATTGCTTGACAAAACCTATACATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut16-R	GCAATGTATAGGTTTTGTCAAGCAATTGTACATCAATGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut17-L	CGCATTGATGTACAAAAGCTTGACAATTCCTATACATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut17-R	GCAATGTATAGGAATTGTCAAGCTTTTGTACATCAATGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
pTt40mut18-L	CGCATTGATGTACAATTGCTTGACAATTCCTATACATTGC	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*

pTt40mut18-R	GCAATGTATAGGAATTGTCAAGCAATTGTACATC AATGCG	72	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de TtCarH a Op*TtcarH*
prTtCA-EcoRI-L	AAAAGAATTCGTCATGGCTTCCACCTCGGC	58	Clonación de un fragmento de 177 pb que contiene OpTtCarH
prTtCA-PstI-R	AAAACTGCAGGCTTTCCAGTCGGGCTCCATAC	61	Clonación de un fragmento de 177 pb que contiene OpTtCarH
pTtCarH130-L	GCCTCGGGGACTTTTGCCCCGGC	63,9	Clonación de un fragmento de 130 pb que contiene OpTtCarH
pTtCarH130-R	GTCATGGCTTCCACCTCGGCGATG	64,2	Clonación de un fragmento de 130 pb que contiene OpTtCarH
pBmcarH52-FN	AATAGCCTTGAACAAACTCTTTACATAGCATATAC AAATTTTACACACAGGA	75,6	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpBmCarH reconocida por BmCarH
pBmcarH52-RN	TCCTGTGTGTAAAATTTGTATATGCTATGTAAAGA GTTTGTTCAAGGCTATT	75,6	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpBmCarH reconocida por BmCarH
pBmcarH52-FN-DR1*	AATAGCCTTGAGTAAACTCTTTGTATAGCATATGT AAATTTTACGTACAGGA	74,3	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*BmcarH*
pBmcarH52-RN-DR1*	TCCTGTACGTAAAATTTACATATGCTATACAAAGA GTTTACTCAAGGCTATT	74,3	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*BmcarH*
pBmcarH52-FN-DR2*	AATAGCCTTGAACAAACTCTTTGTATAGCATATAC AAATTTTACACACAGGA	75,6	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*BmcarH*
pBmcarH52-RN-DR2*	TCCTGTGTGTAAAATTTGTATATGCTATACAAAGA GTTTGTTCAAGGCTATT	75,6	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*BmcarH*
pBmcarH52-FN-DR3*	AATAGCCTTGAACAAACTCTTTACATAGCATATGT AAATTTTACACACAGGA	75,6	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*BmcarH*
pBmcarH52-RN-DR3*	TCCTGTGTGTAAAATTTACATATGCTATGTAAAGA GTTTGTTCAAGGCTATT	75,6	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*BmcarH*
pBmcarH52-FN-DR4*	AATAGCCTTGAACAAACTCTTTACATAGCATATAC AAATTTTACGTACAGGA	75	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*BmcarH*
pBmcarH52-RN-DR4*	TCCTGTACGTAAAATTTGTATATGCTATGTAAAGA GTTTGTTCAAGGCTATT	75	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*BmcarH*
pBmcarH41-FN	AATAGCCTTGAACAAACTCTTTACATAGCATATAC AAATTT	69,6	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpBmCarH reconocida por BmCarH
pBmcarH41-RN	AAATTTGTATATGCTATGTAAAGAGTTTGTTCAAG GCTATT	69,6	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpBmCarH reconocida por BmCarH
pBmcrtI52-FN	TTTAATAATAAAGATTTGTATAATGTTTGTATAACT ATTGTATAGGGTTAGG	67,8	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpBmcrtI reconocida por BmCarH
pBmcrtI52-RN	CCTAACCCTATACAATAGTTATACAAACATTATAC AAATCTTTATTATTAAA	67,8	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpBmcrtI reconocida por BmCarH
pBmcrtI52-FN-DR1*	TTTAATAATAAAGATTTGTATAATGTTTGTATAACT ATTACATAGGGTTAGG	67,8	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*crtI*
pBmcrtI52-RN-DR1*	CCTAACCCTATGTAATAGTTATACAAACATTATAC AAATCTTTATTATTAAA	67,8	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*crtI*

pBmcrtI52-FN-DR2*	TTTAATAATAAAGATTTGTATAATGTTTACATAACTATTGTATAGGGTTAGG	67,8	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*crtI*
pBmcrtI52-RN-DR2*	CCTAACCCTATACAATAGTTATGTAAACATTATACAAATCTTTATTATTAAA	67,8	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*crtI*
pBmcrtI52-FN-DR3a*	TTTAATAATAAAGATTTACATAATGTTTGTATAACTATTGTATAGGGTTAGG	67,8	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*crtI*
pBmcrtI52-RN-DR3a*	CCTAACCCTATACAATAGTTATACAAACATTATGTAAATCTTTATTATTAAA	67,8	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*crtI*
pBmcrtI52-FN-DR3b*	TTTAATAATAAAGATTAGTATTATGTTTGTATAACTATTGTATAGGGTTAGG	66,5	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*crtI*
pBmcrtI52-RN-DR3b*	CCTAACCCTATACAATAGTTATACAAACATAATACTAATCTTTATTATTAAA	66,5	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*crtI*
pBmcrtI52-FN-DR4a*	TTTAAAAATATAGATTTGTATAATGTTTGTATAACTATTGTATAGGGTTAGG	67,8	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*crtI*
pBmcrtI52-RN-DR4a*	CCTAACCCTATACAATAGTTATACAAACATTATACAAATCTATATTTTTAAA	67,8	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*crtI*
pBmcrtI52-FN-DR4b*	TTTAAAAATATAGAATTGTATAATGTTTGTATAACTATTGTATAGGGTTAGG	67,8	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*crtI*
pBmcrtI52-RN-DR4b*	CCTAACCCTATACAATAGTTATACAAACATTATACAATTCTATATTTTTAAA	67,8	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*crtI*
pBmcrtI52-FN-DR4c*	TTTAAGGGTAGGGCATTGTATAATGTTTGTATAACTATTGTATAGGGTTAGG	74,4	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*crtI*
pBmcrtI52-RN-DR4c*	CCTAACCCTATACAATAGTTATACAAACATTATACAATGCCCTACCCTTAAA	74,4	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la importancia de nucleótidos concretos en la unión de BmCarH a Op*crtI*
pBmcrtI41-FN	AGATTTGTATAATGTTTGTATAACTATTGTATAGGGTTAGG	65,6	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpBmcrtI reconocida por BmCarH
pBmcrtI41-RN	CCTAACCCTATACAATAGTTATACAAACATTATACAAATCT	65,6	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética para la determinación de la secuencia mínima de OpBmcrtI reconocida por BmCarH
PcarHBm-Pst	AAAACTGCAGTTGCCTCTCCGTTTACAAGCT	74,6	Clonación de un fragmento de 170 pb que contiene *OpBmcarH*
PcarHBm-Xba	AAAATCTAGATCGTAACCTCCAACTACTCTT	65	Clonación de un fragmento de 170 pb que contiene *OpBmcarH*
PcrtI1-Bm-Pst	AAAACTGCAGAATGGTTTAGTTATTGGTAAT	75,2	Clonación de un fragmento de 170 pb que contiene *OpBmcrtI*
PcrtI1-Bm-Xba	AAAATCTAGATTAGCCGCTAGTCCTCCTGGACCTG	65,8	Clonación de un fragmento de 170 pb que contiene *OpBmcrtI*

II.2 Medios de crecimiento

II.2.1 Medio rico para *M. xanthus*

- **CTT** (Bretscher & Kaiser, 1978)

Bacto-casitona (Difco)	1 %
Tampón Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM
$MgSO_4$	8 mM
Tampón fosfato (pH 7,6)	1 mM

Antes de la esterilización en autoclave se ajustó el pH a 7,6.

Para la preparación de medio sólido se utilizó Bacto-agar Difco (1,5 %). Para la preparación de agar de cobertera (CTTSA) se utilizó el mismo agar al 0,75 %.

- **CTT + Km**
  CTT más 40 µg/ml de kanamicina.

- **CTT + Vanilato**
  CTT más vanilato, cuya concentración varía según el ensayo.

- **CTT + CNCbl**
  CTT con 1 µg/ml de cianocobalamina.

- **CTT + AdoCbl**
  CTT con 1 µg/ml de adenosilcobalamina.

- **CTT + MeCbl**
  CTT con 1 µg/ml de metilcobalamina.

Las distintas soluciones utilizadas se preparan en agua destilada a las concentraciones indicadas a continuación:

Kanamicina	10 mg/ml
Vanilato	50 mM
Cianocobalamina	10 mg/ml
Metilcobalamina	10 mg/ml
Adenosilcobalamina	10 mg/ml

La solución de vanilato se ajusta a un pH de 7,6 mediante la adición de aproximadamente 250 µl de NaOH 10 N. Las manipulaciones posteriores de las cobalaminas y del vanilato se llevaron a cabo en condiciones de baja iluminación y en viales recubiertos con papel de aluminio para protegerlas de la exposición a la luz y evitar así su fotólisis. Una vez preparadas las soluciones de kanamicina, vanilato y las distintas cobalaminas, se esterilizaron por filtración a través de un filtro Millipore de 0,22 µm de diámetro de poro y se almacenaron a una temperatura de 4 ºC. Estas soluciones se añaden al medio (CTT) una vez esterilizado y enfriado hasta 50 °C.

II.2.2 Medio rico para *E. coli* y *B. megaterium*

- **Luria (LB)** preparado según Miller (1972)

Extracto de levadura	0,5 %
Bacto-triptona	1 %
NaCl	1 %

  Antes de esterilizar en autoclave, se ajustó el pH a 7,2-7,4.

- **LB + Km**

  LB más 40 µg/ml de kanamicina.

- **LB + Amp**

  LB más 100 µg/ml de ampicilina.

- **LB + X-Gal**

  LB más 40 µg/ml de 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-galactósido (X-Gal).

Las soluciones antibióticas se preparan en agua destilada a las concentraciones de 10 mg/ml para kanamicina y 100 mg/ml para ampicilina. La disolución de X-Gal se preparó a una concentración de 20 mg/ml en dimetil-formamida (DMSO) y se conservó protegida de la luz. Todas las soluciones fueron esterilizadas por filtración a través de un filtro Millipore de 0,22 µm de diámetro de poro y almacenadas a una temperatura de 4 ºC para kanamicina y -20 ºC para ampicilina y X-Gal. Estas soluciones se añaden al medio (LB) una vez esterilizado y enfriado hasta 50 °C.

II.3 Condiciones de cultivo

II.3.1 Condiciones de cultivo para *M. xanthus*

En general, los cultivos en medio líquido se realizaron mediante inoculación en un matraz de 50 ml con 10 ml de medio nutritivo CTT. La incubación tuvo lugar en un agitador orbital a 300 rpm y 33 °C. Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas de Petri con medio CTT. La inoculación en medio nutritivo sólido, tras la transformación de *M. xanthus,* se efectuó con ayuda de 2,5-4 ml de agar de cobertera (CTTSA). Las placas de Petri se incubaron a 33 °C.

El crecimiento, salvo que se especifique lo contrario, tuvo lugar en condiciones de oscuridad. Cuando fue necesario, los cultivos de las distintas estirpes (en medio líquido o sólido) se iluminaron con tres tubos fluorescentes de luz blanca de 18-W a una intensidad aproximada de 10 W/m^2.

II.3.2 Condiciones de cultivo para *E. coli* y *B. megaterium*

En general, los cultivos en medio líquido se realizaron mediante inoculación de una colonia en un matraz de 50 ml con 10 ml de medio nutritivo. Para los cultivos a mayor escala, se utilizaron matraces de 5 litros con 1 litro de medio LB. En el caso de volúmenes pequeños, 10 ml, la incubación tuvo lugar en un agitador orbital a 250 rpm y 37 ºC. En el caso de los cultivos de 1 litro de *E. coli*, la incubación se realizó en un agitador orbital de la marca New Brunswick Scientific a 150 rpm. Los cultivos en medio sólido se llevaron a cabo en placas de Petri con medio LB que se incubaron a 37 ºC.

El crecimiento, salvo que se especifique lo contrario, tuvo lugar en condiciones de oscuridad. Cuando fue necesario se iluminaron con tres tubos fluorescentes de luz blanca de 18-W a una intensidad aproximada de 10 W/m^2.

II.4 Tampones y soluciones

II.4.1 Preparación de DNA plasmídico

- **TE (pH 7,0)**
  10 mM Tris-HCl (pH 7,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)

II.4.2 Electroforesis de DNA

- **TAE 1X** (Sambrook & Russell, 2001)

40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA (pH 8,0)

- **TBE 1X** (Sambrook & Russell, 2001)
  45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA (pH 8,0)

- **Tampón de carga 5x**
  Suministrado por Fermentas

- **Marcadores de tamaño 100 pb y 1 Kb**
  Suministrado por ThermoFisher Scientific

II.4.3 Electroforesis de proteínas

- **Tampón de carga/ruptura para geles de poliacrilamida-SDS 1X (SDS-PAGE)**
  50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10 % glicerol, 3 % SDS, 3 % β-mercaptoetanol, 0,3 % azul de bromofenol

- **Tampón de electroforesis para geles de poliacrilamida-SDS**
  50 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1 % SDS

- **Solución de tinción Coomasie**
  PageBlue Protein Staining Solution de ThermoFisher Scientific

- **Geles de poliacrilamida-SDS**
  Preparados según Sambrook & Russell, (2001)

II.4.4 Purificación de proteínas

- **Tampón A**
  150 mM NaCl, 50 mM tampon fosfato (40 mM Na_2HPO_4, 10 mM NaH_2PO_4), pH 7,5

- **Otras soluciones**
  - 2 mM β-mercaptoetanol
  - 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)
  - 1 mM Benzamidina
  - Coctel de inhibidores de proteasas Complete Protease Inhibitor Cocktail-EDTA free de Roche

II.4.5 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

- **Tampón HEPES 5X**
  15 mM HEPES, 4 mM Tris (pH 7,9), 1 mM DTT, glicerol 10 % y 200 ng/µl BSA

- **Tampón DNasa 5x –BSA**
  15 mM HEPES, 4 mM Tris (pH 7,9), 1 mM DTT, 10 mM $MgCl_2$

II.4.6 Ensayos de protección frente a DNasaI, radical hidroxilo y Exonucleasa III

- **Tampón Formamida 5X**
  98 % Formamida (desionizada o Molecular Biology grade), 20 mM EDTA (pH 8,0), 0, 0,05 % xileno cianol, 0,05 % azul de bromofenol, 1 % H_2O

II.4.7 Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos

- **Tampón fosfato salino (PBS)**
  100 mM Na_2HPO_4, 1,8 mM KH_2PO_4, 140 mM NaCl, 3,3 mM KCl, pH 7,5

- **Tampón fosfato salino con Tween (PBS-T)**
  PBS, 0,1 % Tween 20

- **Tampón de equilibrado**
  30 mM Glicina, 48 mM Tris, 0,037 % SDS, 20 % metanol

- **Tampón de transferencia I para el ánodo**
  0,3 M Tris, 10 % metanol, pH 10,4

- **Tampón de transferencia II para el ánodo**
  25 mM Tris, 10 % metanol, pH 10

- **Tampón de transferencia para el cátodo**
  25 M Tris, 40 mM ácido aminocapróico, 20 % metanol, pH 9,4

II.4.8 PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR)

- **Tampón de lisis RNasa free**
  10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1 % SDS

II.4.9 Determinación de la actividad β-galactosidasa

- **Tampón Z** (Kroos & Kaiser, 1987)
  40 mM NaH_2PO_4, 60 mM Na_2HPO_4, 10 mM KCl,1 mM $MgSO_4$

II.4.10 Dicroísmo circular y Fluorometría

- **Tampón KF-fosfato**
  100 mM KF, 7,5 mM tampón fosfato, pH 7,5

- **Tampón KF-fosfato-ANS**
  Tampón KF-fosfato, 20 µM 1-anilino-8 naftaleno sulfonato (ANS).

II.5 Extracción de DNA

Para el aislamiento del DNA cromosómico de *M. xanthus* se utilizó el kit de purificación de DNA genómico de *Wizard*^{TM} (Promega). El aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* se realizó mediante el uso del kit de purificación de DNA plasmídico *IllustraTM* de GE Healthcare o el kit *QIAprep*^{TM} *Spin Miniprep* de QIAGEN.

II.6 Transferencia de DNA

II.6.1 Transferencia de DNA en *E.coli*

La obtención de células competentes de *E. coli* y su transformación se efectuaron según Sambrook & Russell, (2001). La cantidad de DNA utilizada en la transformación varió entre 1 ng y 10 ng. Cuando fue preciso obtener un alto número de transformantes se utilizó la técnica de electroporación descrita por Sambrook & Russell (2001). La electroporación se llevó a cabo utilizando cubetas de electroporación de 1 mm y aplicando los siguientes parámetros: 1,7 kV, 25 µF y 400 Ω.

II.6.2 Transferencia de DNA en *M. xanthus*

Se realizó mediante electroporación siguiendo el procedimiento descrito por Kashefi & Hartzell (1995). Para preparar células competentes para la electroporación (electrocompetentes) de *M. xanthus* se centrifugaron 3 ml de un cultivo, en fase exponencial de crecimiento (DO_{550} = 0,7–1,1), a 16.000 × g durante 2 min. El precipitado celular se lavó tres veces con 1,5 ml de agua bidestilada estéril y se resuspendió finalmente en 40 µl de agua bidestilada. Las células electrocompetentes se mezclaron con el DNA correspondiente (0,5–1 µg de DNA dializado) y la mezcla,

una vez transferida a una cubeta de electroporación de 1 cm, se sometió a un pulso eléctrico con el electroporador Bio-Rad Gene Pulser II (0,65 kV, 25 µF y 400 Ω). Inmediatamente después del pulso eléctrico se añadió 1 ml de CTT a la cubeta, se mezcló bien y se transfirió a un matraz de 50 ml que contenía 5 de CTT. Las células se cultivaron durante 6 horas y se sembraron a distintas diluciones en placas de CTT con el antibiótico al que confiere resistencia el plásmido introducido. Dichas placas se incubaron a 33 °C hasta que aparecieron los transformantes, normalmente a los 5 días de incubación. Las colonias obtenidas se purificaron en placas de CTT con el antibiótico correspondiente. En todos los casos, una vez obtenidos los transformantes, se comprobó la correcta integración del plásmido mediante PCR.

II.7 Tratamiento enzimático del DNA

Los tratamientos enzimáticos más usuales realizados al DNA fueron:

I. **Digestión** con enzimas de restricción (Takara). Los tratamientos se realizaron de acuerdo con las especificaciones del suministrador.

II. **Desfosforilación** de extremos 5´ con *rAPid Alkaline Phosphatase* (Roche) para evitar la autoligación de los vectores. Los tratamientos se realizaron de acuerdo con las especificaciones del suministrador.

III. **Ligación** de fragmentos de DNA. Se realizó en tampón de ligación (con ATP a 1 mM) con una unidad de ligasa T4 de New England Biolabs. La cantidad de DNA en la mezcla varió según el experimento. Las mezclas de ligación se incubaron a 16 °C durante toda la noche o 25 ºC durante 2-3 horas.

II.8 Amplificación del DNA por PCR

Las reacciones de amplificación de DNA por PCR se llevaron a cabo con 15–30 ng de DNA molde, 20 pmoles de oligonucleótidos y una mezcla de los cuatro dNTPs a una concentración de 200 µM cada uno. Debido a la riqueza en pares G+C del DNA de *M. xanthus* y de *T. thermophilus,* a todas las reacciones de amplificación se les añadió DMSO a una concentración final del 5 %. En el caso de *B. megaterium,* al tener un porcentaje de G+C bajo, no fue necesaria la adición de DMSO a la mezcla de amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo con 1,5 unidades de la polimerasa de DNA *Pfu* (Promega).

II.9 Mutagénesis dirigida y obtención de genes quiméricos

Las mutaciones puntuales en el DNA y la generación de genes quiméricos se obtuvieron mediante síntesis génica (GenScript) o mediante la técnica de extensión de productos de PCR solapantes (Ho *et al*., 1989), y posterior clonación en el vector necesario. Tanto para la obtención de mutaciones puntuales como para la obtención de genes quiméricos el proceso seguido fue similar y se muestra esquematizado en la Figura 30. En un primer paso se obtuvieron dos productos mediante PCR, AB y CD, utilizando las parejas de oligos a+b y c+d, respectivamente. Posteriormente, los fragmentos AB y CD se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Pronadisa) y se purificaron con el kit de roche *High Pure*^{TM} *PCR Product Purification*. Una vez purificados, los fragmentos se mezclaron en cantidades equimoleculares y se realizó una segunda etapa de extensión con los oligos de ambos extremos (a y d). El producto resultante se clonó en el vector adecuado en cada caso y se verificó la ausencia de mutaciones adicionales mediante secuenciación del DNA.

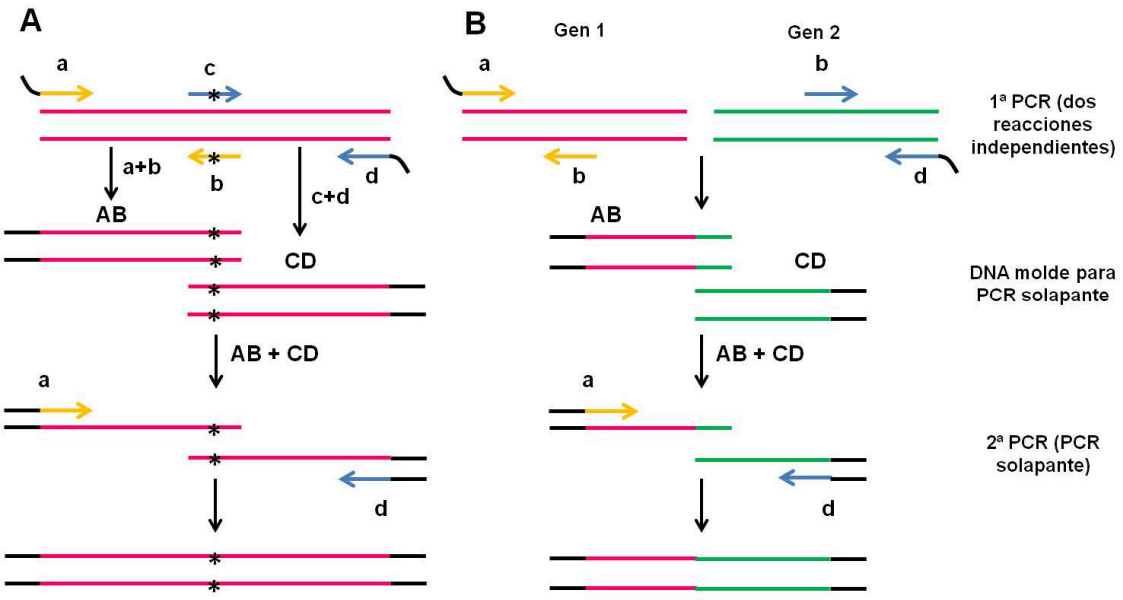


Figura 30. Representación esquemática de la obtención de construcciones génicas por extensión de productos de PCR solapante. (A) Mutagénesis dirigida. Las líneas paralelas rosas representan el gen de interés. Las flechas amarillas representan los cebadores para amplificar AB y las flechas azules representan los cebadores para amplificar CD. Las líneas negras se corresponden con los sitios de corte para enzimas de restricción. Los asteriscos representan las bases mutadas respecto al gen original. **(B)** Obtención de genes quiméricos. El proceso es idéntico al descrito en A, con la excepción de que partimos de dos genes de interés (líneas paralelas verde y rosa).

II.10 Secuenciación del DNA

Los fragmentos de DNA a secuenciar se amplificaron por PCR o se clonaron en un plásmido. Los productos de PCR se purificaron con el kit *High Pure™ PCR Product Purification Kit* de Roche y los plásmidos con el kit *QIAprep™ Spin Miniprep* de QIAGEN. La secuenciación se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Murcia (SACE).

II.11 Técnicas electroforéticas

II.11.1 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa (Pronadisa o Sigma-Aldrich) de distintas concentraciones, preparados en tampón TAE 1X. El DNA se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio o *RealSafe Nucleic Staining Solution* de Promega e iluminación con luz ultravioleta. La purificación de fragmentos de restricción se realizó tras su separación en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Pronadisa). Las porciones de agarosa con el DNA de interés se recortaron del gel con un bisturí y el DNA se purificó con el kit *High Pure™ PCR Product Purification* de Roche.

II.11.2 Electroforesis de DNA en gel de poliacrilamida no desnaturalizante

Este tipo de electroforesis permite analizar cambios en la movilidad electroforética que ocurren cuando una proteína se une a un fragmento de DNA. Para la elaboración de un gel de de 50 ml, al 6 % de poliacrilamida y 1,5 mm de grasor, se utilizaron los siguientes componentes: 10 ml de Acrilamida-bisacrilamida al 30 % (BIO-RAD) y 40 ml TBE 0,5 X. Tras mezclar estos componentes, se filtró la solución y se añadió persulfato amónico 25 % (133 µl) y TEMED (25 µl).

II.11.3 Electroforesis de DNA en gel de poliacrilamida desnaturalizante

Este tipo de electroforesis se utilizó en los ensayos de unión de proteínas al DNA mediante las técnicas de protección frente a DNasa I, radical hidroxilo y Exonucleasa III. Los componentes y volúmenes utilizados para la elaboración de un gel de de 70 ml, al 6 % de poliacrilamida y 0,2 mm fueron los siguientes:

Acrilamida (Sigma)	3,99 g
Bisacrilamida (Sigma)	0,21 g
TBE 10X (Sigma)	7 ml
Urea (Apollo)	33,6 g
Agua bidestilada	hasta 70 ml

Tras mezclar los distintos componentes, se filtró la solución y se añadió persulfato amónico 25 % (186 µl) y TEMED (24,5 µl). El gel se dejó polimerizar al menos 3 horas.

II.11.4 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS

La separación, en función del tamaño, de las proteínas presentes en diferentes muestras se realizó mediante electroforesis en geles verticales de poliacrilamida-SDS, utilizando distintos equipos de Bio-Rad e Invitrogen y siguiendo el método de Laemmli (1970). Los marcadores de tamaño molecular utilizados en geles para tinción con Coomasie son *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* y *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 10 to 250 kDa*, ambos de Thermo Scientific. Para depositar las muestras en los pocillos se utilizó una micropipeta. La electroforesis se realizó a 200 V durante 1-2 horas.

II.12 Expresión y purificación de proteínas fusionadas a colas de histidinas

Para expresar en *E. coli* las proteínas CarH de *T. thermophilus y B. megaterium,* así como sus versiones mutadas, se utilizó el sistema pET de Novagen. Los genes obtenidos por PCR se clonaron en los puntos *Nde*I-*Bam*HI del vector pET15b y los plásmidos resultantes se introdujeron en la estirpe de *E. coli* BL21(DE3). Antes de proceder a la purificación de las proteínas se realizaron pruebas a pequeña escala de cada una de las estirpes resultantes, para establecer las condiciones óptimas de expresión y solubilidad.

Para efectuar la purificación, dos colonias de la estirpe transformada se picaron e inocularon en 10 ml de medio líquido LB+Amp. El cultivo se incubó en agitación a 37 ºC, cuando alcanzó una DO_{600} = 0,6 se diluyó 1:100 en 10 ml (pruebas de expresión y solubilidad) o en 1 litro (purificación) de medio LB+Amp fresco. Una vez diluido se incubó a 37 ºC en agitación. Cuando los cultivos alcanzaron nuevamente una DO_{600} = 0,6 se añadió IPTG (que quedó a una concentración de 80-100 mM) para estimular la expresión del gen correspondiente y se incubaron toda una noche en

agitación a 25 ºC. Las células se recogieron por centrifugación, utilizando un rotor JLA-9.1000 Beckman, a 7.500 g durante 10 minutos a 4 ºC y el precipitado celular se almacenó a -70 ºC. El precipitado se descongeló a 4 ºC y se resuspendió en 30 ml de tampón A, al que se adicionan una tableta de *cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche) y los siguientes compuestos hasta alcanzar una concentración final de 2 mM β-mercaptoetanol, 1 mM de benzamidina, y 1mM de PMSF. La rotura celular se realizó por tratamiento con ultrasonidos con un sonicador automático Labsonic (B. Braun) (pruebas de expresión y solubilidad) o en la prensa *French*™ (purificación). El extracto celular se centrifugó a 20.000 g durante 45 minutos para permitir la separación de la parte soluble de la insoluble. La proteína se purificó a partir de la fracción soluble mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas conteniendo la resina *TALON*™ *metal affinity* (CLONTECH), que consiste en pequeñas bolitas de sefarosa recubiertas de cobalto. Tras pasar la fracción soluble del extracto celular por la columna, se realizaron varios lavados con tampón A. La elución se realizó a pH neutro con 150 mM.imidazol Las fracciones obtenidas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % con SDS (SDS-PAGE). Aquellas fracciones que contenían >95 % de la proteína a purificar, a juzgar por su aspecto en estos geles, se pasaron por una columna de filtración en gel *Hi LoadTM 16/60 Superdex 200 prep grade* para eliminar el imidazol e impurezas. Las muestras de proteínas se concentraron en tubos *Amicon Ultra* (MWCO 35.000 Da), se cuantificaron mediante espectrofotometría y se congelaron a -80ºC con/sin 50 % glicerol.

II.13 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

Los fragmentos de DNA utilizados (170 pb) en los ensayos de EMSA se obtuvieron mediante amplificación por PCR. Uno de los oligonucleótidos usados en la reacción de PCR se marcó previamente en su extremo 5´ con [γ^{32}P]ATP y T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs/Takara). Tras la amplificación, el [γ^{32}P]ATP no incorporado se eliminó mediante centrifugación en columna de Sephadex G-25 (DNA *Grade*, GE Healthcare) y el fragmento de DNA se purificó con el kit *High Pure PCR Product Purification* (Roche). Cuando en los ensayos de EMSA se utilizaron oligonucleótidos, tras el marcaje de uno o de ambos oligonucleótidos complementarios, éstos se hibridaron entre sí. Para ello se preparó una mezcla equimolecular de los dos oligonucleótidos y se introdujo en agua hirviendo durante 2 minutos. A continuación, la mezcla, aún sumergida en el agua en ebullición, se dejó enfriar lentamente hasta 4 ºC durante toda la noche. Una vez hibridados los oligonucleótidos, la mezcla se pasó por una columna de Sephadex G-25.

La reacción de unión se realizó en un volumen de 20 µl que contenía ~1 nM del fragmento de DNA marcado (~10.000 cpm), distintas cantidades de proteína y 1 µg de DNA de salmón en un tampón de reacción que contenía 100 mM KCl, 4 µl de tampón HEPES 5X o tampón DNasa 5x –BSA, suplementado o no con cobalaminas. Las distintas reacciones se incubaron durante 30 minutos a 37 o 65 ºC y, salvo que se indique lo contrario, en oscuridad. Las muestras sometidas a iluminación se expusieron de 15 a 300 segundos a intensidades entre 1 y 10 W/m^2 y a 405, 465, 520 o 660 nm de longitud de onda con matrices de bombillas LED distribuidas sobre una plataforma de 5 cm x 5 cm en un formato 12x12, con iluminación regulable (fabricadas por Cetoni GmbH). Para la iluminación ultravioleta las muestras fueron iluminadas con un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i a longitudes de onda centradas en 360 nm (12 W/m^2) utilizando el bloque de filtros UV-2E/C. Las intensidades luminosas se estimaron utilizando un potenciómetro óptico 1815-C equipado con un detector 818-SL (Newport) en ambos casos.

Mientras se está realizando la incubación de las muestras, un gel de acrilamida no desnaturalizante (6 %) se transfirió a un tanque de electroforesis vertical que contenía tampón TBE 0,5X y se precorrió durante 30 minutos (200 V, 30 mA) a 4 ºC. Tras cargar las muestras se realizó la electroforesis durante 1–2 horas a 4 ºC (200V, 30 mA). Las posiciones de las bandas se detectaron, tras secar el gel, mediante autorradiografía en película Biomax MS de Kodak (en general, 1 o 2 horas de exposición a −70 ºC fueron suficientes) o mediante el uso de una pantalla Imaging Plate BAS-SR 2040 de Fujifilmn adquiriendo la imagen con el escáner *Personal Molecular Imager*^{TM} de Bio-Rad. Las bandas se cuantificaron usando el programa ImageJ (NIH). La cuantificación de las bandas de DNA libre y del complejo proteína-DNA permitió establecer los valores de fracción unida. Mediante el uso del programa SigmaPlot y la ecuación de Hill de tres parámetros se ha calculado la curva ajustada a esos puntos de fracción unida, la constante de disociación aparente (K_D) y el coeficiente de Hill (n).

II.14 Ensayos de protección frente a DNasa I, radical hidroxilo y Exonucleasa III

Las reacciones de unión se realizaron en un volumen de 20 µl y en las mismas condiciones descritas para EMSA, pero usando mayor cantidad de DNA marcado (~80.000 cpm). Las reacciones tuvieron lugar en condiciones de baja intensidad lumínica para evitar la fotólisis de las cobalaminas. Tras la incubación de las

reacciones, a 37 o 65 ºC, se llevó a cabo la digestión del DNA (Figura 31). Las condiciones específicas para cada uno de los ensayos se detallan a continuación:

- **DNasa I:** Se añadieron 5 unidades de DNasa I (Takara). La DNasa I se dejó actuar durante 2 minutos a 37 ºC. Posteriormente, se detuvo la reacción con 2 µl de EDTA a 0,25 M a 4 ºC.

- **Radical hidroxilo:** Se adicionaron 2 µl de 10 mM Fe/20 mM EDTA, 2 µl de 100 mM ácido ascórbico y 2 µl de 0,6 % H_2O_2, para dar lugar a la reacción de Fenton. Esta reacción produce radicales hidroxilo, que son los responsables del corte del DNA (figura 31 D). La reacción de corte se dejo actuar 4 minutos a 25 ºC. La reacción se detuvo con 2 µl de tiourea a 100 mM y 2 µl de EDTA a 0,5 M (Jain & Tullius, 2008).

- **Exonucleasa:** Las reacciones se trataron con 2,5-5 U/µl Exo III 3'→5' exodesoxiribonucleasa (Thermo Fisher Scientific) durante 15 min a 37 °C. La reacción se detuvo con 20 mM EDTA.

Posteriormente, el DNA de cada muestra se precipitó con 90 µl de etanol 100 % frío, 2-3 µl de acetato de sodio 0,3M y 1 µl de tRNA a 1 mg/ml. Las muestras se resuspendieron en ~5 µl de tampón formamida y se incubaron a 95 ºC durante 3 minutos. Mientras se está realizando la incubación de las muestras, un gel de acrilamida desnaturalizante al 6 % se transfirió a un tanque de electroforesis vertical (GIBCO BRL ModelS2 *Sequencing gel electrophoresis apparatus*), que contenía tampón TBE 1X, y se precorrió a potencia constante de 37 W durante 30-45 minutos a temperatura ambiente, hasta que el gel alcanzó una temperatura de 50-60 °C. Finalmente, las muestras cargadas en el gel se sometieron a electroforesis a 37 W durante 2-2,5 horas. Las posiciones de las bandas se detectaron, tras secar el gel, mediante autorradiografía en película Biomax MS de Kodak (en general, 1 día de exposición a −70 ºC fue suficiente) o mediante el uso de una pantalla Imaging Plate BAS-SR 2040 de Fujifilm, adquiriendo la imagen con el escáner *Personal Molecular Imager*^{TM} de Bio-Rad.

Las reacciones de secuenciación química G + A y C + T, utilizadas como marcadores en los experimentos de protección frente a la digestión con DNasa I, se realizaron según el método de Maxam y Gilbert (Ausubel *et al*., 1998).

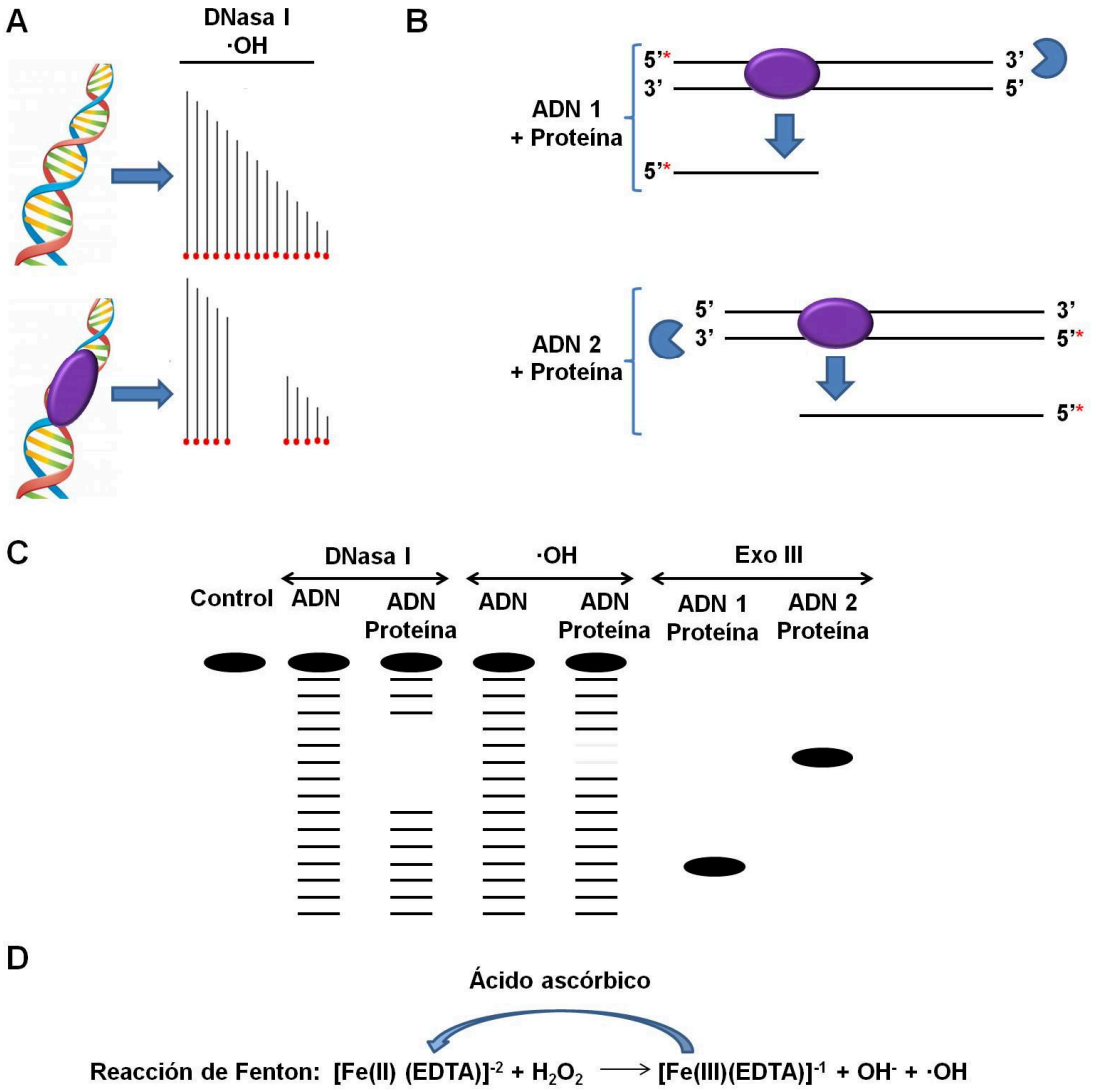


Figura 31. Representación gráfica de los ensayos de protección frente a DNasa I, radical hidroxilo y Exonucleasa III. (A) Esquema del patrón de corte de DNasa I y radical hidroxilo. La proteína unida al DNA (color morado) protege al DNA de la rotura, originando "huecos" en el patrón de bandas obtenido en la electroforesis. **(B)** Esquema de corte de Exo III. La doble hélice de DNA se representa con dos líneas negras. En azul se muestra la enzima Exo III. La unión de la proteína al DNA debe tener lugar en uno de los extremos del DNA, para que el corte en dirección 3'→5' de lugar a fragmentos de diferente tamaño dependiendo de la cadena que esté marcada (asterisco rojo). **(C)** Esquema de la electroforesis de DNasa Í, radical hidroxilo y Exo III. Debido al mayor tamaño de la DNasaI frente a la molécula de radical hidroxilo, los "huecos" en el patrón de bandas son de mayor tamaño. Las bandas mostradas en el ensayo de *footprint* de Exo III se corresponden con el ejemplo mostrado en B. **(D)** Reacción de Fenton que genera radicales hidroxilo altamente reactivos mediante la oxidación del hierro. El ácido ascórbico reduce el hierro para que vuelva a tener lugar la reacción.

II.15 Ensayo de proteólisis limitada por GluC

Las proteínas utilizadas en el ensayo (0,3 µg/µl) se incubaron con AdoCbl (utilizando una concentración 5 veces superior a la de proteína) durante 30 min a 37 ºC en oscuridad. Dicha incubación se realizó en tampón DNasa 1x -BSA. Las muestras se trataron con endopeptidasa GluC (Promega) en una relación 1:50 (v/v) en un volumen total de 150 µl y se incubaron a 30 ºC. Se retiraron alícuotas de 50 µl a 0, 1 y 2 horas de incubación, y se detuvo la reacción mediante la adición de PMSF (hasta alcanzar una concentración de 1 mM). Un volumen de 20 µl de cada alícuota se mezcló con 4 µl de tampón SDS-PAGE 5X, se calentó a 100 ºC durante 5 min, se sometió a electroforesis en geles 12 % Tris-Bis (BioRad) y se tiñó con azul de coomasie para visualizar las bandas. El volumen restante de cada muestra también se sometió a electroforesis con SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de PDVF *Inmobilon P*^{SQ} (Millipore, Bedford, MA) para la secuenciación del extremo N-terminal.

II.16 Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos

La obtención de extractos de células vegetativas de *M. xanthus*, para la detección de proteínas con anticuerpos específicos, se realizó incubando el cultivo hasta una DO_{550} ~0,7. Las células presentes en 1 ml del cultivo se recogieron por centrifugación y se conservaron a -80 ºC. El precipitado celular se descongeló a 4 ºC, se resuspendió en 300 µl de una solución que contenía tampón Z, la mezcla de inhibidores de proteasas a 1X (*cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* de Roche), 1mM de PMSF y 1 mM de benzamidina, y se lisó mediante tratamiento con Cloroformo/SDS (Griffith & Wolf, 2002). La concentración de proteínas en el sobrenadante se midió mediante el método Bradford (Bradford, 1976) y se cargaron de 1 a 6 µg de proteína total (10-20 µl de solución) por carril en geles de poliacrilamida-SDS.

Las proteínas separadas por electroforesis se detectaron con anticuerpos específicos mediante la técnica de *Western* (Burnette, 1981; Towbin *et al*., 1979). Para ello, se transfirieron a una membrana *Inmobilon P*^{SQ} mediante un sistema semiseco, utilizando el equipo *Semi- Dry Electroblotting Unit* de Sigma o el sistema *Trans-Blot® Turbo™ Blotting System* de Biorad. Para seguir visualmente la transferencia se utilizaron los marcadores de tamaño molecular coloreados *Recombinant Proteins Molecular Weight Markers Full- range Rainbow* (GE Healthcare). La transferencia se realizó durante 30 minutos a 25V y 1,0 A (*Trans-Blot® Turbo™ Blotting System).*

Una vez realizada la transferencia, la membrana se sumergió durante 1-2 horas en tampón PBS-T con 5 % de leche desnatada como agente bloqueante. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5-15 minutos en tampón PBS-T. Después, la membrana se incubó durante ~16 horas en presencia de 5-10 µl del anticuerpo primario diluido en 20 ml de PBS-TB. Tras eliminar el exceso de anticuerpo, aplicando tres nuevos lavados con PBS-T, la membrana se incubó durante una hora en una dilución 1:1.000 del anticuerpo secundario (conjugado con peroxidasa de rábano) en 20 ml de PBS-T con 5 % de leche desnatada. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante tres lavados con PBS-T. Los lavados y las incubaciones con los anticuerpos se llevaron a cabo con agitación suave y constante, a temperatura ambiente para periodos cortos (1-2 horas) y a 4 ºC para periodos largos (~16 horas). Para el revelado se utilizó el sistema *ECL Prime* (GE Healthcare). Tras añadir el reactivo que contiene el sustrato quimioluminiscente para la peroxidasa conjugada al anticuerpo, la membrana se expuso a una película *Amersham HyperfilmTM ECL* (GE Healthcare) durante un período de tiempo variable dependiendo del antibiótico utilizado.

II.17 Ensayo de PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR)

Un cultivo de 10 ml LB con la estirpe DSM 32 de *B. megaterium* se incubó durante toda la noche a 37 ºC. A la mañana siguiente se diluyó 1:1000 con LB fresco y se separó en dos matraces con 10 ml. Uno de los cuales se incubó en oscuridad y el otro en luz durante 5 horas hasta alcanzar una DO_{600} de ~0,8. A continuación, se centrifugaron 5 ml de cada cultivo y los pellets se congelaron a -70 ºC. Posteriormente, los pellets fueron resuspendidos en 200 µl de tampón de lisis RNasa free y lisados en un *Mini-beadbeater* (BioSpec). La extracción de RNA se llevó a cabo siguiendo protocolos que emplean Trizol/Cloroformo, precipitación con isopropanol y lavado con etanol al 70 %. Posteriormente, el RNA se trato con *Turbo DNasa I* (Ambion) y se purifico usando el kit *PureLink RNA* (ThermoFisher Scientific). Después, se sometió a electroforesis en gel de agarosa (1 %) y se cuantificó en *NanoDrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific). Mediante la transcriptasa inversa *SuperScript IV* (Thermo Fisher Scientific) se retrotranscribió el RNA extraído (5 µg/20 µl) a cDNA.

El ensayo de RT-qPCR se realizó en un termociclador *StepOne* (Aplied Biosystem) usando muestras que contienen 1 µl de cDNA, 10 µl *SYBR Green Master Mix* (BioRad) y los oligos requeridos en cada caso (400 nM). Estos oligos fueron diseñados usando el programa Primer Express 3.0 para amplificar una región de

~50-150 pb en cada transcrito. Una muestra con un volumen equivalente de RNA se utilizó como control para comprobar la ausencia de DNA contaminante. Las condiciones del programa de PCR fueron las siguientes: 10 minutos a 95 ºC, para activar la *AmpliTaq Gold© DNA polymerase* o la *iTaq™ DNA polymerase* (contenida en la *Master Mix*), seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95 ºC y 30 segundos a 60 ºC. Como referencia (control endógeno) se utilizó el gen *sigA* cuya expresión es constante a lo largo del ciclo celular, lo que permite normalizar el nivel de expresión de las muestras de cada ensayo.

II.18 Ensayo de doble híbrido bacteriano (DHB)

El sistema de doble híbrido bacteriano en *E. coli* (*BATCH, Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System,* de Euromedex) se basa en la reconstitución del dominio catalítico de la ciclasa de adenilato de *Bordetella pertussis*, lo que permite estudiar la interacción entre proteínas. Esta enzima consta de dos fragmentos complementarios, T25 y T18, inactivos cuando están físicamente separados pero activos cuando se fusionan a polipéptidos que interaccionan físicamente. Esta interacción puede seguirse mediante la activación del gen chivato *lacZ* y la consiguiente producción de la enzima β-galactosidasa (Figura 32). Dicha actividad enzimática puede ser analizada tanto cualitativamente (en placas con X-Gal, un sustrato cromogénico de la β-galactosidasa) como cuantitativamente, siguiendo el protocolo descrito en el apartado siguiente. Las regiones codificantes de interés fueron amplificadas por PCR y clonadas en sitios *Xba*I y *Bam*HI de los plásmidos pKT25 y pUT18C. Los plásmidos así obtenidos se introdujeron en la estirpe BTH101 de *E.coli* mediante electroporación.

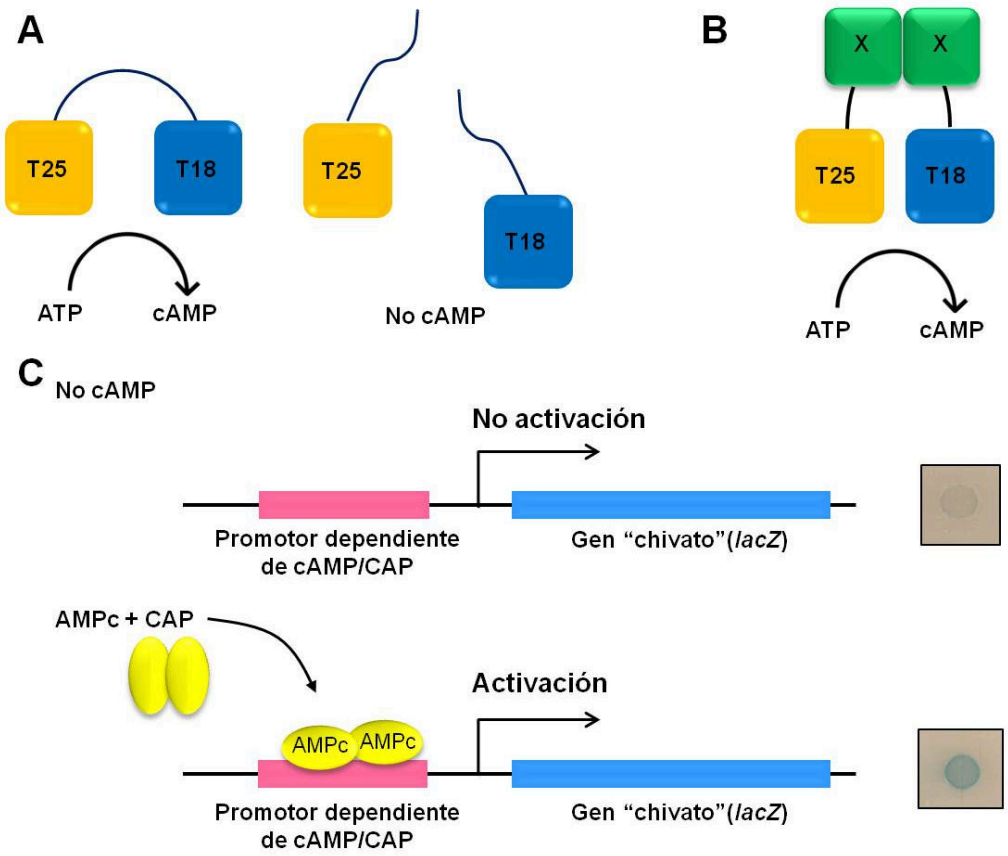


Figura 32. Esquema del sistema de doble híbrido bacteriano basado en la reconstitución funcional de Cya A. **(A)** Las cuadrados (azul y amarillo) representan los fragmentos T25 y T18 de la proteína Cya de *B. pertussis*. **(B)** La interacción física de la proteína hipotética X (cuadrado verde) consigo misma, unida traduccionalmente a los fragmentos T25 y T18, produce la síntesis de cAMP. **(C)** El cAMP se une a la proteína activada por catabolitos (CAP). El complejo cAMP/CAP reconoce promotores específicos, activando la expresión de genes "chivato" como el gen *lacZ*.

II.19 Expresión de β-galactosidasa en *E. coli*

El análisis de la actividad β-galactosidasa se realizó tanto cualitativamente como cuantitativamente. Para la determinación cualitativa se sembraron las estirpes de interés, en forma de gota, en placas de Petri con LB + Xgal o LB + Xgal AdoCbl más los antibióticos correspondientes, y se incubaron a 37 ºC durante 24 horas. Transcurrido el periodo de incubación se observó la intensidad de la coloración de las gotas.

Para cuantificar la actividad β-galactosidasa específica, en el sistema del doble híbrido bacteriano, la estirpe de interés se incubó a 30 ºC en medio LB más los antibióticos correspondientes durante toda la noche. El cultivo se diluyó 20 veces en el

mismo medio y se añadió IPTG hasta 0,5 mM para inducir la expresión de las proteínas híbridas. Este cultivo permaneció a 30 ºC hasta que alcanzó la fase estacionaria (aproximadamente 16 horas). Cuando el cultivo alcanzó la densidad celular deseada se tomaron muestras de 1 ml que se centrifugaron, se resuspendieron en tampón Z y se almacenaron a -70 °C hasta el momento de su análisis. Las muestras se descongelaron a 4 ºC. La rotura de las células se realizó mediante tratamiento con SDS/cloroformo (Griffith & Wolf, 2002). El ensayo de actividad β-galactosidasa se realizó a 33 ºC según Miller (Miller, 1972), empleando 5-50 µl del extracto celular. La concentración de proteínas se midió según Lowry (Lowry *et al*., 1951). Salvo que se indique lo contrario, la actividad β-galactosidasa específica se expresa en nanomoles de o-nitrofenol (generado por rotura enzimática del sustrato ONPG) producido por minuto y miligramo de proteína, de acuerdo con la ecuación:

$$Actividad\ específica = \frac{213\ x\ A_{420}}{t\ x\ ml\ x\ (mg/ml)}$$

Donde 213 es el coeficiente de extinción del σ-nitrofenol y convierte la densidad óptica medida a 420 nm en los ensayos de actividad en nanomoles de σ-nitrofenol producidos; *ml* es el volumen del extracto utilizado en la determinación de la actividad; *mg/ml* es la concentración de proteínas de la muestra; y *t* representa el tiempo de incubación en minutos a 33 ºC antes de detener la reacción.

II.20 Cromatografía de filtración en gel

La cromatografía de filtración en gel se realizó con un equipo de HPLC AKTA y una columna de Superdex200 (GE Life Sciences). Dicha columna se equilibró con una solución de 150 mM NaCl, 50 mM tampón fosfato, pH 7,5, y 2 mM de β-mercaptoetanol. Posteriormente, la columna se calibró con los siguientes estándares de Sigma-Aldrich: aprotinina (6,5 kDa), citocromo C (12,4 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), BSA (66 kDa), alcohol deshidrogenasa de levadura (150 kDa), β-amilasa (200 kDa), azul dextrano (2 MDa, para determinar el volumen de vacío V_0), y AdoCbl (1,35 kDa, para estimar el volumen total). La curva de calibración se obtuvo a partir de la fórmula: log Mr = 7,885 - 0,221Ve, donde Mr es el peso molecular aparente y Ve es el volumen de elución. La proteína (100 µl; 100-300 µM), pura o incubada con cobalaminas a una concentración molar 5 veces superior durante al menos 30 min en oscuridad, se inyectó en la columna. En el caso de tener que iluminar muestras de proteína unida a AdoCbl, estas se irradiaron durante 5 minutos, en tubos de 1,5 ml, con luz verde (520 nm) a intensidades entre 1 y 10 W/m^2 usando bombillas LED (véase Apartado II.13).

El seguimiento de la tasa de elución (0,4 ml/min) se realizó midiendo la absorbancia a 280, 361 y 522 nm. Los valores de Mr correspondientes a los picos obtenidos se determinaron a partir de su Ve. La identidad de las proteínas en los picos de elución se comprobó por SDS-PAGE. El valor de Mr y el error utilizados corresponden, respectivamente, a la media de un mínimo de tres medidas independientes y al SEM (Standard Error of the Mean). La concentración de proteína en los picos fue estimada por el ensayo de *BioRad* y la de AdoCbl por absorbancia a 522 nm.

II.21 Espectroscopía de ultravioleta-visible

Para la determinación de la concentración de proteína y cobalamina, y la obtención de espectros de absorción, se empleó un espectofotómetro (*Agilent Cary 60*) capaz de medir en el espectro ultravioleta-visible. Las medidas se realizaron en cubetas de cuarzo (*Hellma Analytics*) de 1 cm de paso óptico. Cuando fue necesario realizar medidas en ausencia de luz utilizamos cubetas de cuarzo con las paredes laterales recubiertas de un material oscuro. La cuantificación se realizó mediante la fórmula de Lambert-Beer:

$$Absorbancia=\varepsilon*C*l$$

Donde ε es el coeficiente de extinción molar, C la concentración y l el paso óptico (1cm). Para el cálculo de la concentración de cobalamina en solución acuosa mediante absorbancia se utilizaron los siguientes coeficientes de extinción ($M^{-1}cm^{-1}$): 27.500 a 361 nm para CNCbl, 8.200 a 522 nm para AdoCbl y 9.100 a 520 nm para MeCbl. Los espectros de los ensayos de transición oscuridad-luz en BmCarH-AdoCbl se obtuvieron después de un paso previo de iluminación con luz verde (520 nm) durante un tiempo que varió dependiendo del ensayo.

Para determinar la afinidad (mediante el cálculo de K_D) de BmCarH y el mutante BmCarH H154A por AdoCbl se ha utilizado la diferencia de absorbancia (ΔA) entre la proteína unida a AdoCbl y AdCbl libre a ~560 nm siguiendo el protocolo establecido en Kutta *et al*., (2015). Se registraron los espectros de UV-vis para muestras con una concentración fija de 5 µM AdoCbl ([L]) y una concentración variable de apoproteína, 0-30 µM ([P]). El cálculo de ΔA permitió establecer el valor de la máxima ΔA con todo la AdoCbl unida a proteína (ΔAmax). Se representó gráficamente la concentración ([P]) frente a la ΔA. El ajuste de la curva y la K_D se determinaron usando la siguiente ecuación en el programa SigmaPlot (Systat Software, Inc):

$$\Delta A=\Delta A_{\max}\frac{([\mathrm{P}]+[\mathrm{L}]+K_{\mathrm{D}})-\sqrt{([\mathrm{P}]+[\mathrm{L}]+K_{\mathrm{D}})^2-4[\mathrm{P}][\mathrm{L}]}}{2[\mathrm{L}]}$$

II.22 Espectrometría de masas

En la determinación del peso molecular de las proteínas se uso la técnica HPLC-ESI-TOF-MS (*High Performance Liquid Chromatography-Elestrospray Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry*). Para la filtración en gel se utilizó la columna Discovery BioWide Pore C5. La muestra se inyecta en la columna y se eluye en un gradiente de acetonitrilo. El pico mayoritario detectado por UV-Vis (210-280 nm) se analizó mediante una conexión a un espectrómetro de masas tipo MSD TOF de Agilent Technologies a través de una fuente de ionización tipo ESI. El espectro de masas extraído del mismo se sometió a un algoritmo matemático, llamado deconvolución, que asocia picos m/z distintos cuya propiedad común es el peso molecular pero con diferente estado de carga. Como estándar se utilizó anhidrasa carbónica (29.020 Da) de Sigma-Aldrich, que posee un tamaño similar al de las muestras problema. Los análisis se realizaron por duplicado.

II.23 Dicroísmo circular

Este ensayo se realizó con el espectrómetro π*-180 de Applied Photophysics, calibrado con ácido d-10-canforsulfónico, acoplado a un baño que regula la temperatura del ensayo. En la preparación de las muestras, de proteína y AdoCbl, se utilizó el tampón KF-fosfato, que no interfiere en las medidas. En los ensayos de dicroísmo circular de ultravioleta lejano (190-260 nm) se utilizó una concentración de 2,5-5 µM de proteína, 12,5-25 µM de AdoCbl y cubetas de un 1 mm de paso de luz. En los ensayos de dicroísmo circular de ultravioleta cercano (250-260 nm) se utilizó una concentración de 25-30 µM de proteína, 125-150 µM de AdoCbl y cubetas con un paso de luz de 1 cm. La proteína y AdoCbl se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente antes de la realización del ensayo. Las medidas se realizaron cada 0,2 nm a 25 ºC. El contenido en hélices se estimó mediante la elipticidad media por residuo a θ 222 nm ($[\theta]_{222}$ en $degcm^2\ dmol^{-1}$) usando 895 para un 0 % de hélices y -37750 ($1-3/N_r$) para un 100 %. N_r es el número de residuos (Rohl & Baldwin, 1997). Se realizó el experimento tres veces para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

II.24 Fluorometría

En la determinación de las medidas de fluorescencia se utilizó el instrumento Horiba Jobin-Yvon Spex Fluorolog-3 fluorimeter. En la preparación de las muestras de proteína y AdoCbl se utilizó el tampón KF-fosfato. Las mediciones se llevaron a cabo, a 25 ºC, usando una cubeta con 1 cm de paso óptico. Se llevaron a cabo dos tipos de ensayos de fluorescencia:

- **Fluorometría proteica intrínseca:** Para analizar el espectro de absorción del triptófano (300-400 nm) se utilizó una longitud de onda de excitación de 280 nm, obteniendo un espectro de emisión de 300-460 nm. Como control se utilizó la proteína desnaturalizada con 6M cloruro de guanidinio.

- **Fluorometría proteica mediante interacción con 1-anilino-naftaleno-8-sulfonato (ANS):** A todas las muestras se les adicionó ANS a una concentración final de 20 µM. Después de un periodo de incubación de 30 min, las muestras se expusieron a una longitud de onda de excitación de 370 nm y se obtuvo el espectro de emisión de 400-650 nm.

Ambos experimentos fueron repetidos 3 veces para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

II.25 Análisis bioinformático

Para el desarrollo del presente trabajo de tesis doctoral ha sido necesaria la utilización de diversos recursos bioinformáticos. Para la búsqueda de las secuencias promotoras de los genes diana de CarH se utilizó el programa Artemis (Rutherford *et al*., 2000). Para para la búsqueda de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de CarH y proteínas relacionadas se utilizaron las siguientes bases de datos:

- JGI-IMG/G (*Joint Genome Institut-Integrated Microbal Genomes/Microbiomes*, https://img.jgi.doe.gov/)
- NCBI (*National Centre of Biotechnology Information*, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
- Uniprot (*Universal Protein resource*, https://www.uniprot.org/)

El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo utilizando la herramienta Clustal Omega de EBI (*European Bioinformatics Institute*, https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). El programa BoxShade se usó con objeto

de resaltar las secuencias alineadas que eran idénticas o equivalentes (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html). El análisis de la estructura secundaria de las proteínas en base a su la secuencia de aminoácidos se realizó utilizando el programa PSIPRED de UCL (*University College of London*, http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/).

III. RESULTADOS

III.1 El fotorreceptor CarH: relación estructura-función

El contenido incluido en este apartado ha sido publicado en parte en el artículo "Structural basis for gene regulation by a B_{12}-dependent photoreceptor" publicado por Marco Jost, Jesús Fernández-Zapata *et al*., en *Nature* (2015), 526, doi: 10.1038/nature14950. Los estudios estructurales mediante cristalografía de rayos X fueron realizados por Marco Jost en el laboratorio dirigido por la Prof. Catherine L. Drennan, Department of Chemistry & Department of Biology, Howard Hughes Medical Institute, Massachusetts Institute of Technology.

Desde hace años, una de las líneas de investigación del grupo en el que se ha desarrollado esta tesis ha sido el estudio del modo de acción de las proteínas reguladoras parálogas CarA y CarH. Ambas proteínas están implicadas en la respuesta a la luz de *M. xanthus* y ejercen su acción reguladora uniéndose al promotor P_B en la oscuridad y reprimiendo la expresión de los genes implicados en la síntesis de carotenoides que se encuentran agrupados en el operón *carB*. Como se comentó en la Introducción, las dos proteínas se asemejan en secuencia (35 % de identidad) y arquitectura de dominios. Así pues, ambas proteínas están constituidas por dos dominios, unidos por un pequeño *linker*: (i) un dominio N-terminal de unión al DNA, similar al motivo hélice-giro-hélice "alado" (HTH-Ala1-Ala2) de los factores transcripcionales de la familia MerR (Cervantes & Murillo, 2002; Pérez-Marín *et al*., 2004, 2008); y un dominio C-terminal similar al dominio de unión a MeCbl de la sintetasa de metionina (Drennan *et al*., 1994) (Figura 33, página siguiente).

Los estudios genéticos, bioquímicos, biofísicos y estructurales (en colaboración con el Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC) realizados por el grupo de investigación han permitido descifrar el modo de acción de CarA y la base molecular de la antirrepresión ejercida por CarS (León *et al*., 2010; López-Rubio *et al*., 2002, 2004; Navarro-Avilés *et al*., 2007; Pérez-Marín *et al*., 2004). De dichos estudios deriva que CarA, en la oscuridad, se une en forma de dímero a través de su hélice α2 (hélice de reconocimiento) al DNA operador en el promotor P_B. Primero se une a un sitio palindrómico de alta afinidad (pI), y después cooperativamente a un segundo sitio palindrómico de baja afinidad (pII) (Figura 22). En la luz, el antirrepresor CarS, que imita la estructura del DNA, secuestra a CarA permitiendo la expresión de los genes del operón *carB*. Aunque *in vitro* CarA es capaz de unirse a B_{12}, CarA no requiere la vitamina para ejercer su función represora sobre P_B (Pérez-Marín *et al*., 2008).

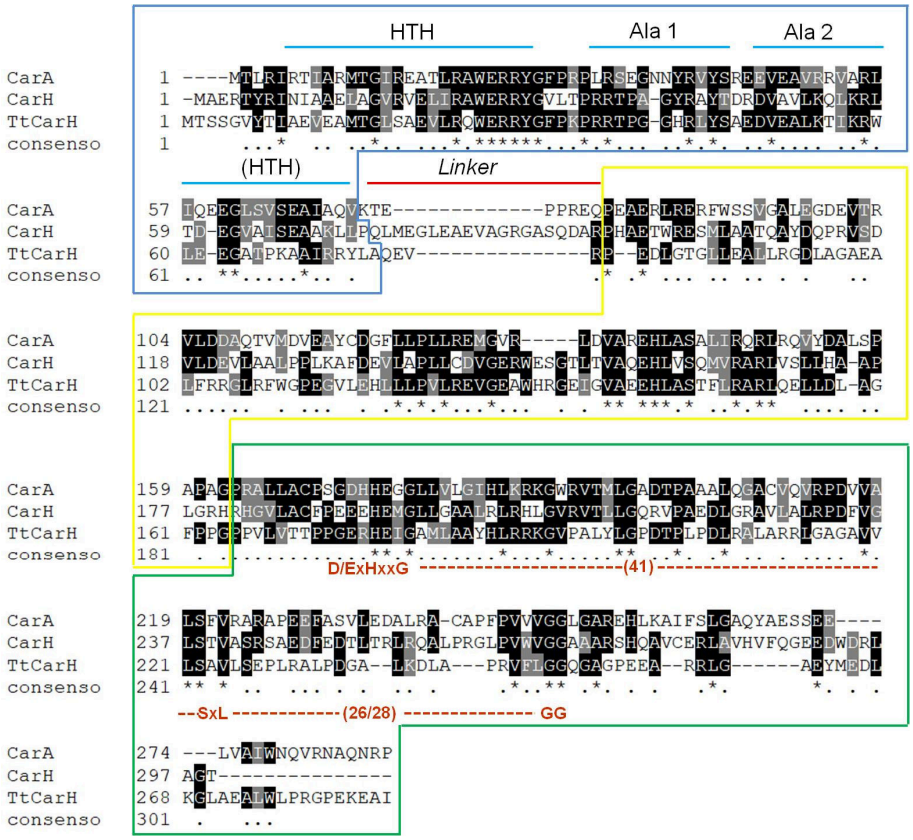


Figura 33. Alineamiento de las secuencias de CarA y CarH de *M. xanthus*, y CarH de *T. thermophilus*. El domino N-terminal de unión a DNA tipo MerR, en el que se indican los elementos HTH, Ala 1 y Ala 2, aparece recuadrado en azul. En el dominio C-terminal se distinguen sus dos subdominios: el subdominio formado por el haz de hélices alfa aparece recuadrado en amarillo y el subdominio tipo Rossmann aparece recuadrado en verde. El motivo conservado de unión a cobalamina se muestra en naranja (Drennan *et al.*, 1994). Sombreados en negro se indican los residuos idénticos (*) y en gris los residuos conservados (.).

Por otro lado, los estudios genéticos demostraron que CarH, a diferencia de CarA, es completamente dependiente de la presencia de B_{12} para ejercer su acción represora; sin embargo, la imposibilidad de purificar CarH en su forma nativa impidió, en su momento, estudiar *in vitro* su modo de acción molecular, la base de su dependencia de cobalamina, y la forma concreta de B_{12} requerida para su función (Pérez-Marín *et al.*, 2008). La presencia de una proteína homóloga a CarH en *T. thermophilus*, TtCarH (Figura 26), que pudo purificarse en su forma activa, permitió desentrañar su modo de acción molecular y descubrir que CarH/TtCarH es un nuevo tipo de fotorreceptor que utiliza la vitamina B_{12}, en su forma AdoCbl, para percibir la luz (Díez, Ortiz-Guerrero, Ortega, Elías-Arnanz, Padmanabhan, & García De La Torre, 2013; Ortiz-Guerrero et al., 2011). El modelo que deriva de dichos estudios (Figura 25) es que CarH/TtCarH, que es un monómero en su forma apo, en la oscuridad y presencia de AdoCbl se convierte en un tetrámero capaz de unirse al DNA operador y

reprimir la transcripción. La luz (azul, verde o ultravioleta) provoca la fotólisis de la AdoCbl, provocando la disociación del tetrámero, su liberación del promotor y permitiendo el inicio de la transcripción. En este trabajo se ha profundizado en el estudio de esta novedosa familia de fotorreceptores bacterianos y de la nueva faceta de la AdoCbl descubierta por el grupo de investigación. Este apartado se centra en los estudios sobre la relación estructura-función de CarH que han permitido dilucidar cómo un cofactor enzimático, AdoCbl, se convierte en una molécula sensora de luz, y cómo un módulo enzimático que se une a MeCbl se convierte en un módulo fotorreceptor que se une a AdoCbl.

III.1.1 Modo de oligomerización y unión a AdoCbl

En este trabajo, los ensayos *in vivo* se han realizado en *M. xanthus* con la proteína CarH de *M. xanthus*, y los estudios *in vitro* se han realizado con la proteína TtCarH de *T. thermophilus*. Aunque las dos proteínas controlan la síntesis de carotenos en respuesta a la luz (a la vez que su propia expresión) de una manera dependiente de AdoCbl y luz, lo hacen de manera diferente.

En *M. xanthus*, CarH actúa sobre un promotor (P_B) que regula tanto la expresión de los genes carotenogénicos como la suya propia. En *T. thermophilus*, TtCarH actúa sobre su propio promotor, P_{TtcarH}, reprimiendo su expresión y la de LdrP, un activador transcripcional del promotor responsable (P_{crt}) de la expresión del gen carotenogénico *crtB* y del gen de la fotoliasa, que se transcriben en dirección opuesta (Figura 34A) (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011; Takano *et al*., 2011). *In vitro*, en ensayos de retraso en gel (EMSA) realizados en la oscuridad, se observó la unión de TtCarH a la región entre *crtB* y *TtcarH* de una manera dependiente de AdoCbl y, como cabría esperar, teniendo en cuenta que procede de una bacteria termófila, la unión fue más eficaz a 65 ºC que a 30 ºC (Figura 34B).

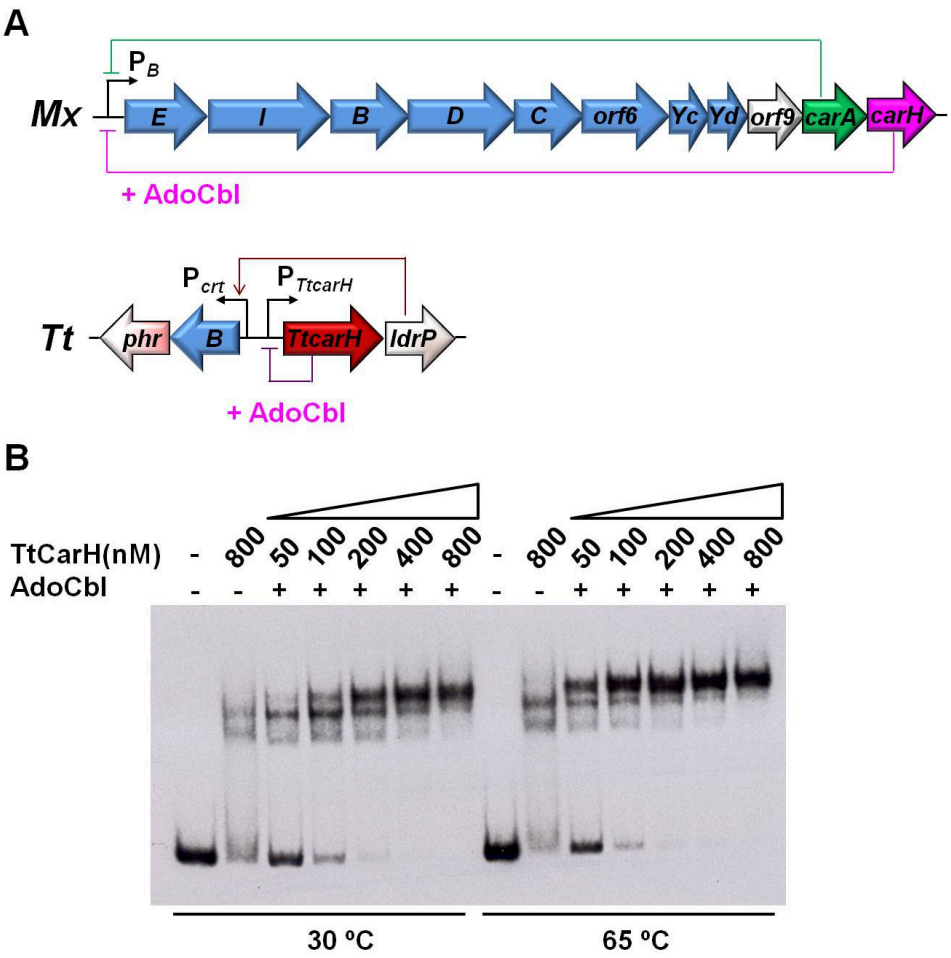


Figura 34. Unión de TtCarH a su región operadora. **(A)** Contexto genómico de los genes *carH* de *M. xanthus* y *T. thermophilus* y su modo de regulación. Los genes representados con las flechas azules son genes carotenogénicos. *crtB*, sintetasa de fitoeno; *phr*, fotoliasa; *ldrP*, regulador transcripcional de la familia FNR/Ampc. Imagen modificada de Padmanabhan *et al*., (2017). **(B)** EMSA con el fragmento de 177 pb de *T. thermophilus* que incluye la región intergénica entre *crtB* y *TtcarH* con concentraciones crecientes (50-800 nM) de TtCarH y un exceso de cinco veces de AdoCbl; las reacciones se incubaron a 30 ºC o 65 ºC durante 30 min, antes de realizar la electroforesis.

Cuando las reacciones se expusieron a la luz, a longitudes de onda a las que absorbe AdoCbl, se observó la desaparición de la banda retrasada (Figura 35).

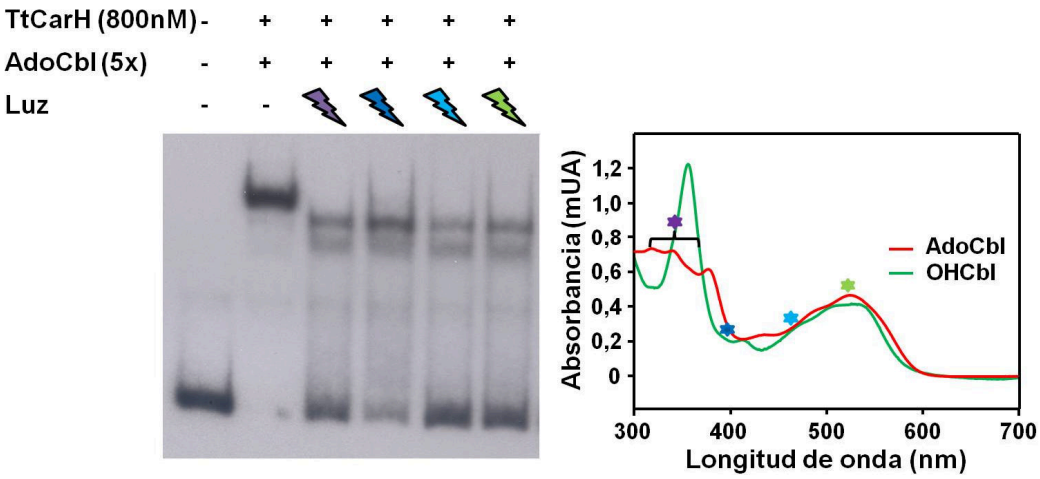


Figura 35. EMSA con TtCarH expuesta a luces de diferente longitud de onda. A la izquierda se muestra la radiografía del gel en el que se analizaron las muestras iluminadas durante 5 min tras la incubación con AdoCbl (30 min). Los rayos de colores indican el tipo de luz: violeta (UV, 340-380 nm), azul oscuro (405 nm), azul claro (465nm) y verde (522 nm). A la derecha se muestra el espectro de absorción de AdoCbl (300 a 700 nm), indicando mediante asteriscos la longitud de onda utilizada en el experimento de unión al DNA mostrado a la izquierda.

III.1.1.1 El protómero de TtCarH: dominios y unión a AdoCbl

La determinación de la estructura cristalográfica de TtCarH en sus tres formas funcionalmente activas (la del tetrámero en la oscuridad, libre o unido al DNA, y la de la forma fotolisada) realizada por Marco Jost en el grupo de la Prof. Drennan, junto con el análisis funcional detallado llevado a cabo en este trabajo, han permitido entender con un alto grado de resolución cómo funciona el fotorreceptor CarH (Jost *et al.*, 2015b). La estructura del tetrámero unido a AdoCbl confirmó (Figura 36A) que cada protómero está constituido por: (i) un dominio N-terminal (DBD) estructuralmente muy similar al dominio de unión al DNA de CarA y de las proteínas de tipo MerR; (ii) un *linker* flexible; (iii) un dominio C-terminal de unión a AdoCbl. Dicho dominio C-terminal, a su vez, está compuesto por dos subdominios: un haz de 4 hélices α y un subdominio tipo Rossmann de unión a cobalamina. Lo sorprendente es que, en lugar de parecerse al módulo de unión a B_{12} de enzimas dependientes de AdoCbl, se asemeja estructuralmente al dominio de unión a MeCbl de la sintetasa de metionina (MetH) (Figura 36B).

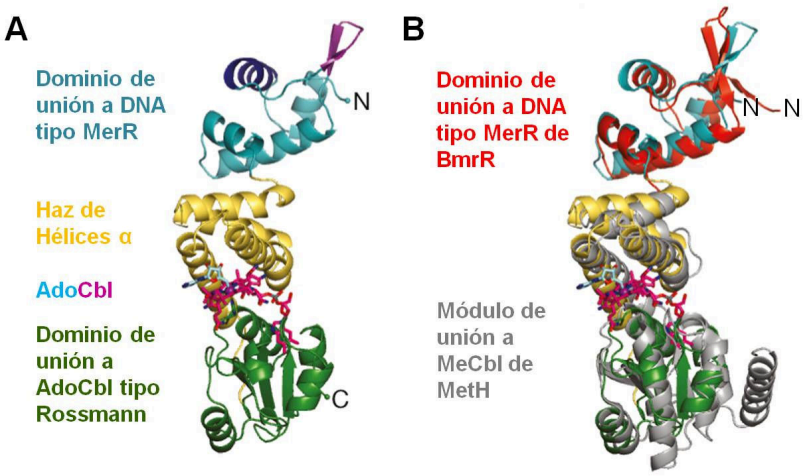


Figura 36. Estructura del protómero de TtCarH y comparación con BmrR y MetH. (A) Protómero de TtCarH coloreado por dominios (código de acceso Protein Data Bank, PDB: 5C8D). **(B)** Superposición del protómero de CarH, coloreado como en A, con el domino de unión a DNA tipo MerR de la proteína BmrR (PDB, 1EXJ) y con el módulo de unión a MeCbl de MetH (PDB, 1BTM). Imagen modificada de Jost, *et al*., (2015b).

Al igual que en MetH, la cobalamina está como en un "sándwich" entre el haz de hélices alfa, que interacciona con el grupo 5'-dAdo, y el subdominio tipo Rossmann, que se une a la cara inferior de la AdoCbl, de tal manera que la His177 desplaza al sustituyente axial inferior Dmb, mediante el modo de unión *base-off His-on* (Figura 37). Para poder alojar el grupo 5'-dAdo, considerablemente más grande que el grupo metilo de la MeCbl, en la estructura se ha producido un importante desplazamiento (2,5 Å) del haz de hélices α que ensancha la cavidad sobre la cara superior de la cobalamina. Además, cuatro cambios aminoacídicos en TtCarH respecto a MetH (Figura 37) favorecen el encaje del grupo 5'-dAdo, al generar: una cavidad más grande (Leu715→Val138), interacciones por puentes de hidrógeno (Leu715→Glu141) y un ambiente más polar (Val719→His142, Phe718→Trp131). La cadena lateral del W131 se sitúa al lado del grupo 5'-dAdo (y no encima, como ocurre con la F708 en MetH), de tal manera que el grupo 5'-dAdo actúa como el "tope de una puerta" (contra el que "choca" el W131) manteniendo el protómero en una conformación erecta. En las posiciones equivalentes, CarH de *M. xanthus* (y los homólogos de muchas otras especies bacterianas) presentan también el W separado por 9 residuos del E y H, lo que sugiere que dichos residuos deben jugar un papel importante para la función (Figura 26, 37C) (véase siguiente apartado).

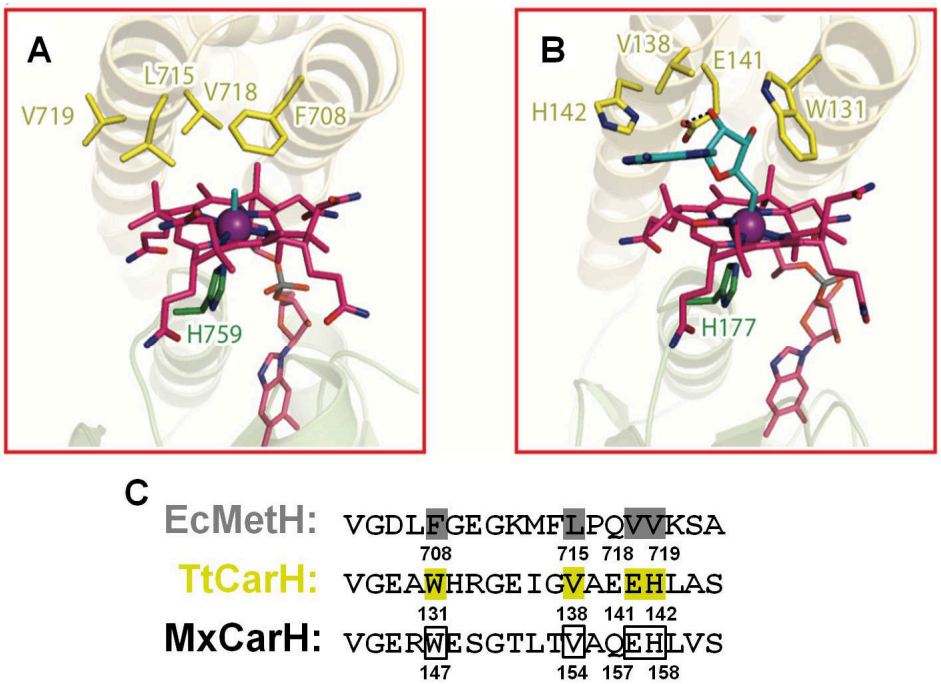


Figura 37. Comparación de los contactos con el sustituyente axial superior de la cobalamina en MetH y CarH. (A) MetH unida a MeCbl. En rosa, los carbonos de la Cbl; en púrpura, el Co; en azul, el grupo metilo; en verde, la His759 responsable del modo *base-off His-on*. **(B)** TtCarH unida a AdoCbl. Los cambios de aminoácidos facilitan la acomodación del grupo 5'-dAdo. En rosa, los carbonos de la Cbl; en púrpura, el Co; en azul, el grupo 5´-dAdo; en verde, la His177 responsable del modo *base-off His-on*. **(C)** Alineamiento de los aminoácidos implicados en la unión al sustituyente axial superior de la cobalamina en CarH de *T. thermophilus* y *M. xanthus,* y MetH de *E. coli* (modificada de Padmanabhan *et al*., 2017).

III.1.1.2 El tetrámero de TtCarH: dímero de dímeros con disposición "cabeza-cola"

La estructura cristalina de TtCarH unida a AdoCbl confirmó la formación de tetrámeros, que previamente habían sido observados mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y ultracentrifugación analítica (Díez, Ortiz-Guerrero, Ortega, Elías-Arnanz, Padmanabhan, & García De La Torre, 2013; Ortiz-Guerrero et al., 2011). El núcleo del tetrámero, del que sobresalen los cuatro DBDs, está formado por los cuatro dominios sensores de luz (Figura 38). El aspecto más destacado es que el tetrámero está constituido por dos dímeros con una conformación "cabeza-cola" muy inusual.

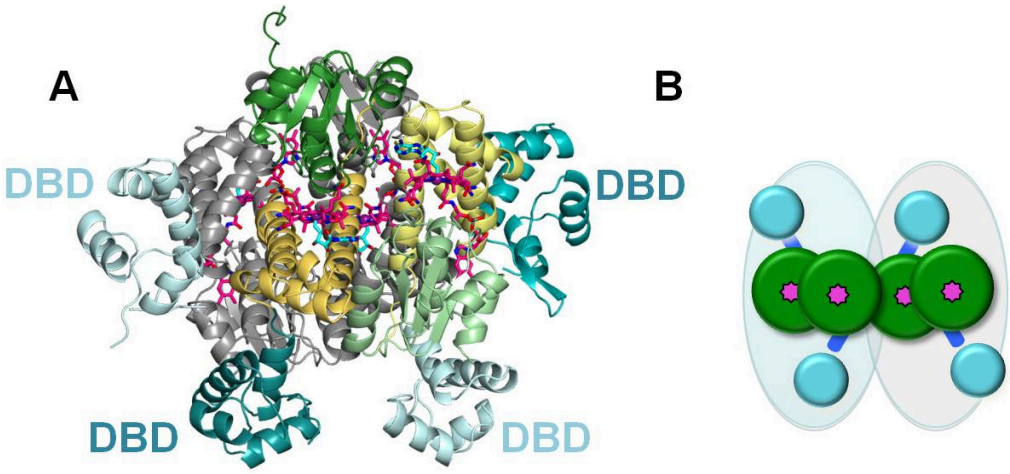


Figura 38. Estructura del tetrámero de TtCarH. (A) Estructura cristalográfica del tetrámero de TtCarH, que revela cómo los dominios de unión a DNA se posicionan en la superficie de la proteína. **(B)** Representación esquemática del tetrámero, como dos dímeros "cabeza-cola", con los dominios sensores de luz en verde (la AdoCbl se representa con los asteriscos rosas) y los dominios de unión a DNA en cian (Jost *et al*., 2015b).

En la constitución del dímero "cabeza-cola" participan residuos situados cerca de la superficie de dimerización (H142, D201 y R176), AdoCbl y, de forma indirecta, los aminoácidos que contactan con 5'-dAdo (W131, V138, E141 y H142) (Figura 39A). Entre los aminoácidos situados en la superficie de dimerización destacan R176 y D201, que establecen una interacción iónica entre sí (R176 de un protómero interacciona con D201 del otro protómero, y viceversa) (Figura 39A). Curiosamente, en las secuencias de TtCarH y CarH de *M. xanthus* se ha producido un cambio compensatorio en dichos residuos (Figura 39B), lo que apoya la noción de que deben ser importantes para la función.

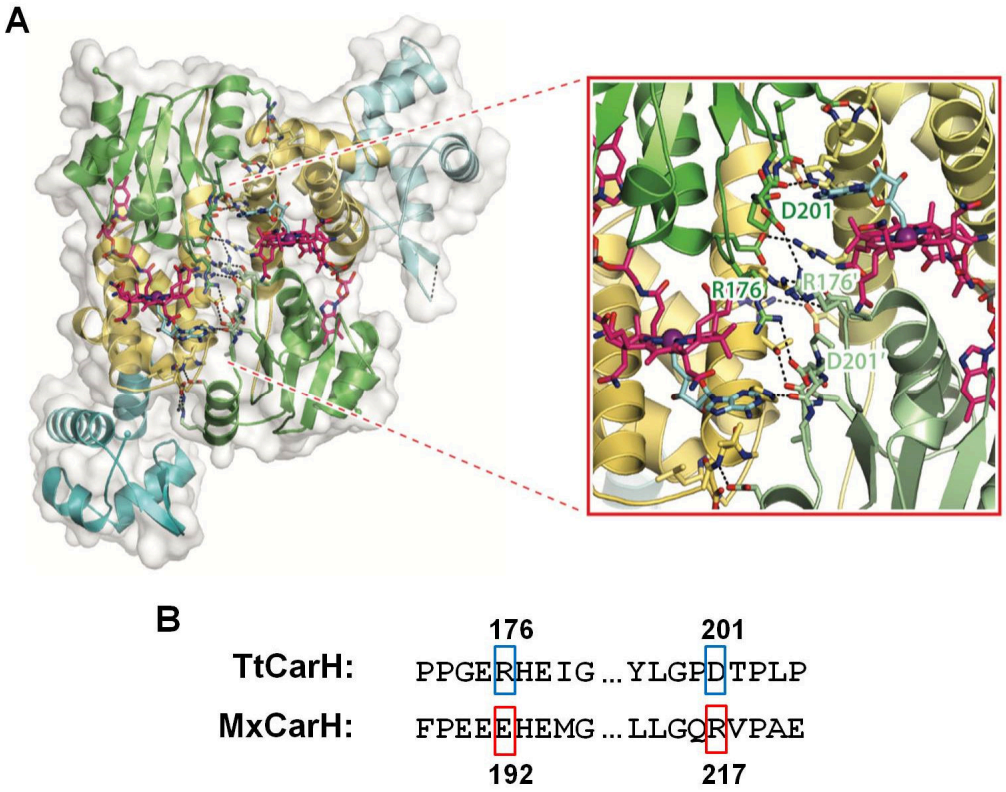


Figura 39. El dímero con una disposición "cabeza-cola". (A) Estructura del dímero "cabeza-cola". En verde y amarillo, los subdominios Rossmann y el haz de hélices α de un protómero; en verde y amarillo apagados, el protómero adyacente. En dos tonos de azul, los dos DBDs. A la derecha se muestra una vista ampliada de la superficie de interacción, destacando los aminoácidos R176 y D201. D201 de un protómero interacciona con el grupo 5'-dAdo de AdoCbl y R176 del protómero adyacente, y viceversa. **(B)** Alineamiento de la secuencia de TtCarH y CarH de *M. xanthus* (MxCarH) mostrando el cambio compensatorio (modificada de Padmanabhan *et al*., 2017).

III.1.1.3 Análisis funcional de los aminoácidos implicados en la unión a AdoCbl y/o en la oligomerización según los datos estructurales

Para confirmar la importancia funcional de los residuos conservados implicados en la interacción con el grupo 5´-dAdo, W131, E141 y H142, se mutó cada uno de ellos a alanina (un aminoácido pequeño, no polar y sin carga). Además, se realizó la mutación conservativa del W131 por fenilalanina, que es el aminóacido aromático que ocupa la posición equivalente en MetH (Figura 37). Por otro lado, para estudiar la importancia de los dos aminoácidos R176 y D201, que establecen una interacción iónica en la interfaz del dímero, se realizó la mutación simple de D201 a arginina (D201R), así como las mutaciones dobles compensatorias R176D/D201R y R176E/201R, para simular lo que ocurre en *M. xanthus*. Los genes para las versiones mutadas se clonaron en pET15b para su sobreexpresión en *E. coli* y su posterior

purificación como proteínas de fusión a una cola de histidinas (todas las proteínas mutadas se expresaron bien y fueron solubles).

Para analizar la capacidad de las versiones mutadas de unirse a AdoCbl y sufrir o no el cambio de monómero a tetrámero se comparó su comportamiento en ensayos de SEC con el de la proteína TtCarH silvestre (WT). En la oscuridad, las formas apo (sin cofactor) de las proteínas mutadas se comportaron como monómeros, al igual que la versión WT (peso molecular aparente M_r de ~39 kDa, comparado con el peso molecular calculado de 33,2 kDa para el monómero, incluyendo la cola de histidinas) (Figura 40A y D). En presencia de AdoCbl, las mutaciones no conservativas W131A y E141A en el sitio de unión al grupo 5'-dAdo provocaron un defecto notable en la formación del tetrámero (Figura 40B, panel superior), acompañado de una disminución en la capacidad de unión a AdoCbl (Figura 40B, panel inferior). Más drástico aún fue el efecto de las mutaciones H142A y D201R, que afectan a residuos situados cerca de la interfaz de dimerización (H142 también cerca del grupo5'-dAdo), que provocaron la desaparición del tetrámero y la falta de unión a AdoCbl (Figura 40B y E). La versión con la mutación conservativa W131F mostró perfiles de elución y unión a AdoCbl similares a la proteína WT, por lo que la sustitución de un aminoácido aromático por otro se tolera mejor. Según la estructura cristalográfica, cabría esperar que la interacción entre R176 y D201, alterada por la mutación D201R, se viese recuperada al realizar una segunda mutación compensatoria. Acorde con ello, las dos versiones con la mutación doble, R176D/D201R y R176E/D201R, fueron capaces de unir AdoCbl y formar tetrámeros (Figura 40E). Cuando las muestras con AdoCbl se trataron con luz antes de realizar el ensayo SEC, todos los mutantes eluyeron como monómeros unidos a cobalamina, incluso H142A y D201R, lo que indica que aunque no se unen a AdoCbl sí son capaces de unirse a la forma fotolisada.

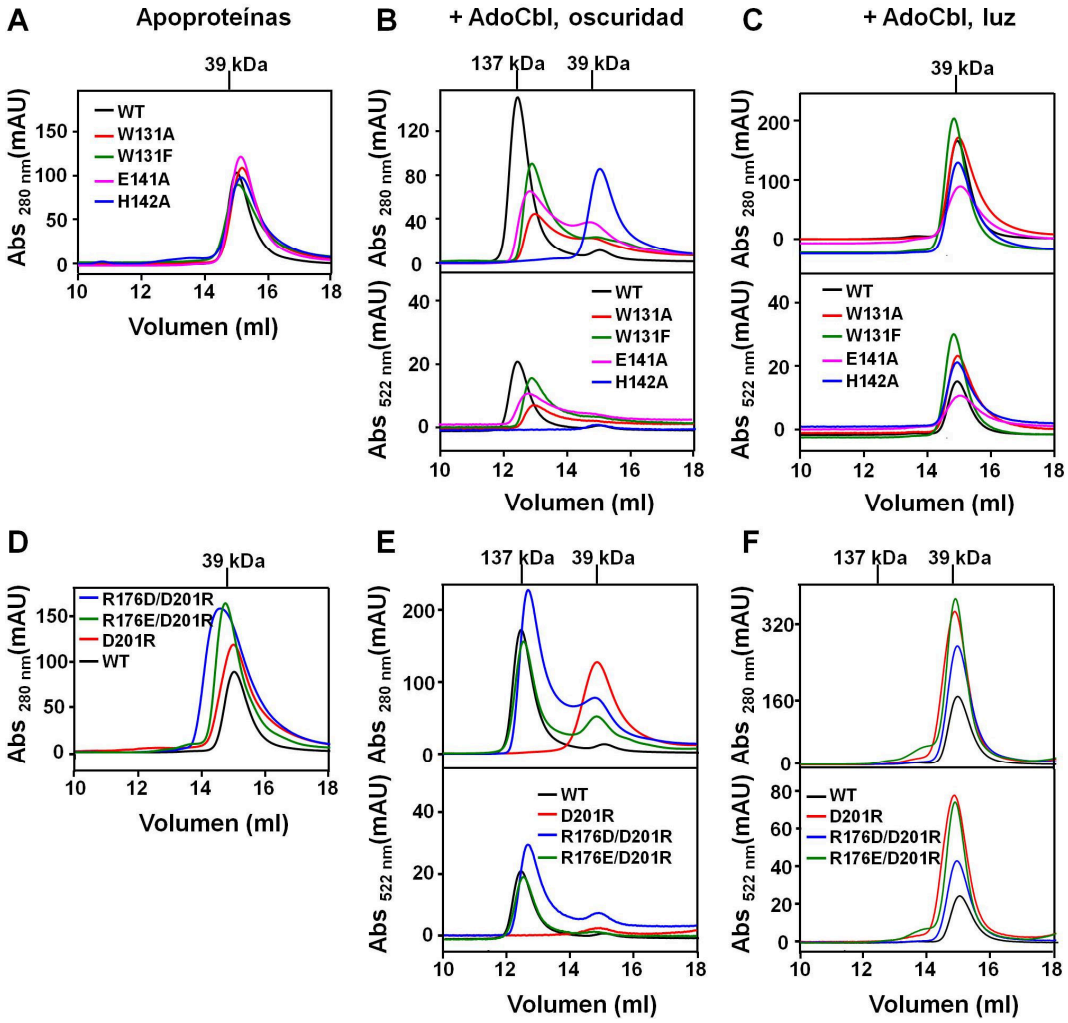


Figura 40. Análisis por SEC de los mutantes de TtCarH. Los ensayos se realizaron en una columna analítica Superdex 200. Para el cálculo del peso molecular aparente, M_r, se utilizó el punto máximo de cada pico. La elución de los picos fue monitorizada mediante la absorbancia a 280 nm y 522 nm para la proteína y la Cbl, respectivamente. Se indica el tamaño para el monómero (39 kDa) y el tetrámero (137 kDa). Arriba, perfiles de SEC de los residuos que interaccionan con 5'-dAdo: **(A)** sin cofactor, **(B)** en presencia de AdoCbl y oscuridad, **(C)** en presencia de AdoCbl y luz. Abajo, perfiles de SEC de los residuos implicados en la formación de los dímeros cabeza-cola: **(D)** sin cofactor, **(E)** en presencia de AdoCbl y oscuridad, **(F)** en presencia de AdoCbl y luz.

En la interfaz dímero-dímero destacan dos glicinas, G160 y G192, situadas de tal forma que G160 del protómero de un dímero queda enfrentada a G192 del protómero del dímero adyacente, y viceversa (Figura 41A). Dado que la glicina es un aminoácido polar, no cargado y de pequeño tamaño, su sustitución por un aminoácido como la glutamina, de características similares pero de mayor tamaño, podría afectar a la oligomerización. Para comprobarlo, se generaron las versiones mutadas G160Q y G192Q y se analizaron en SEC. Como cabía esperar, las formas apo eluyeron como monómeros (Figura 41B). En la oscuridad y presencia de AdoCbl, las proteínas

mutadas eluyeron unidas a AdoCbl (Figura 41C, panel inferior) y como dímeros (Figura 41C, panel superior), una forma que nunca se observa con la proteína WT o con los otros mutantes analizados. Tras exposición a la luz de las muestras en presencia de AdoCbl, las versiones G160Q y G192Q eluyeron como monómeros unidos a Cbl (Figura 41D), al igual que la proteína silvestre y las otras versiones mutadas analizadas previamente. Así pues, estos resultados indican que las glicinas en las posiciones 160 y 192, probablemente por el pequeño tamaño de su cadena lateral, son importantes para la formación del tetrámero.

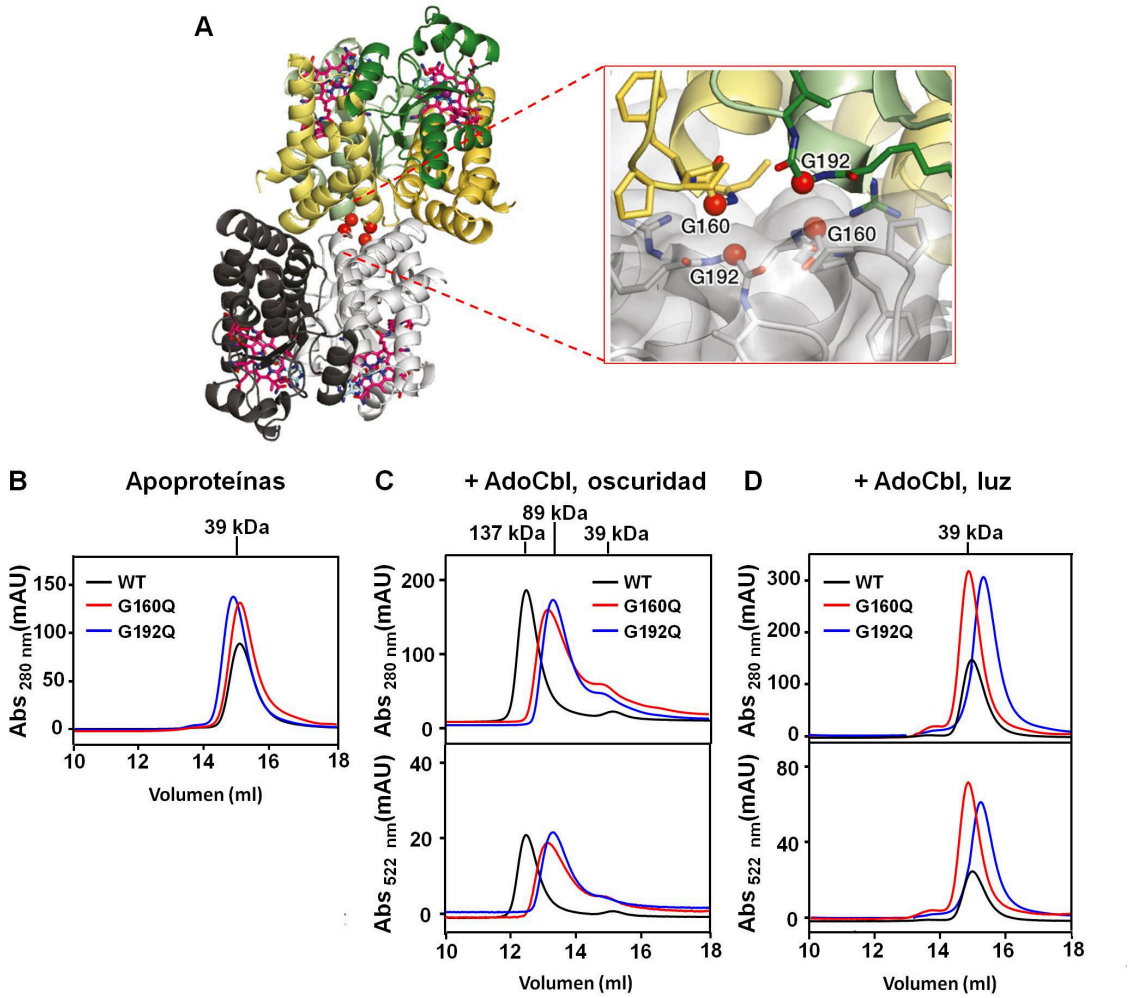


Figura 41. Análisis por SEC de los mutantes G160Q y G192Q de TtCarH. (A) A la izquierda, núcleo del tetrámero de TtCarH (dominios de unión a AdoCbl, sin los DBDs). El dímero de arriba está coloreado en verde y amarillo, y el de abajo en negro y gris. G160 y G192 están representadas como esferas rojas. A la derecha, vista ampliada de la interfaz dímero-dímero, destacando las G160 y G192 procedentes de los protómeros de dos dímeros diferentes. Imagen modificada de Jost *et al*., (2015b). Abajo, perfiles de elución en SEC de las proteínas indicadas en las condiciones indicadas. La elución de los picos fue monitorizada mediante la absorbancia a 280 nm y 522 nm, para la proteína y Cbl, respectivamente. Se indican los tamaños para el monómero (39 kDa), dímero (89 kDa) y tetrámero (137 kDa). **(B)** sin cofactor, **(C)** en presencia de AdoCbl y oscuridad, **(D)** en presencia de AdoCbl y luz.

Dado que TtCarH se une al DNA en forma de tetrámeros, cabría esperar que dicha capacidad se viese afectada en aquellos mutantes que muestran defectos en su oligomerización. Para comprobarlo, se realizaron ensayos EMSA en las condiciones establecidas previamente para TtCarH WT (véase Figura 34). Como puede observarse en la Figura 42, los resultados obtenidos en EMSA correlacionaron bien con los datos de SEC ya presentados. Las mutaciones H142A y D201R fueron las que afectaron de forma más drástica la unión al DNA, provocando la aparición de una buena parte de la señal en forma de DNA libre. También se vio significativamente afectada la unión al DNA de la versión W131A, que dio lugar a una señal tenue distribuida a lo largo del carril, más que a una banda definida en la parte alta del gel. El mutante E141A, que muestra algo disminuida la capacidad de formar tetrámeros en SEC, también vio levemente disminuida su capacidad de formar la banda retrasada en EMSA. Por otro lado, el mutante W131F, que forma tetrámeros con una eficacia similar a la proteína WT, también mostró un comportamiento en EMSA muy similar al WT. También acorde con los datos de SEC, los dobles mutantes D201R/R176D y D201R/R176E se mostraron significativamente menos afectados en la unión al DNA que el mutante sencillo D201R. Por último, las versiones mutadas G160Q y G192Q fueron capaces de unirse al DNA, aunque lo hicieron formando una banda de movilidad electroforética mayor, consistente con su estado oligomérico en forma de dímeros y no tetrámeros. Así pues, en su conjunto, estos resultados refuerzan las conclusiones sobre la arquitectura del tetrámero derivadas del análisis cristalográfico y demuestran que esta arquitectura es crucial para la unión eficaz al DNA.

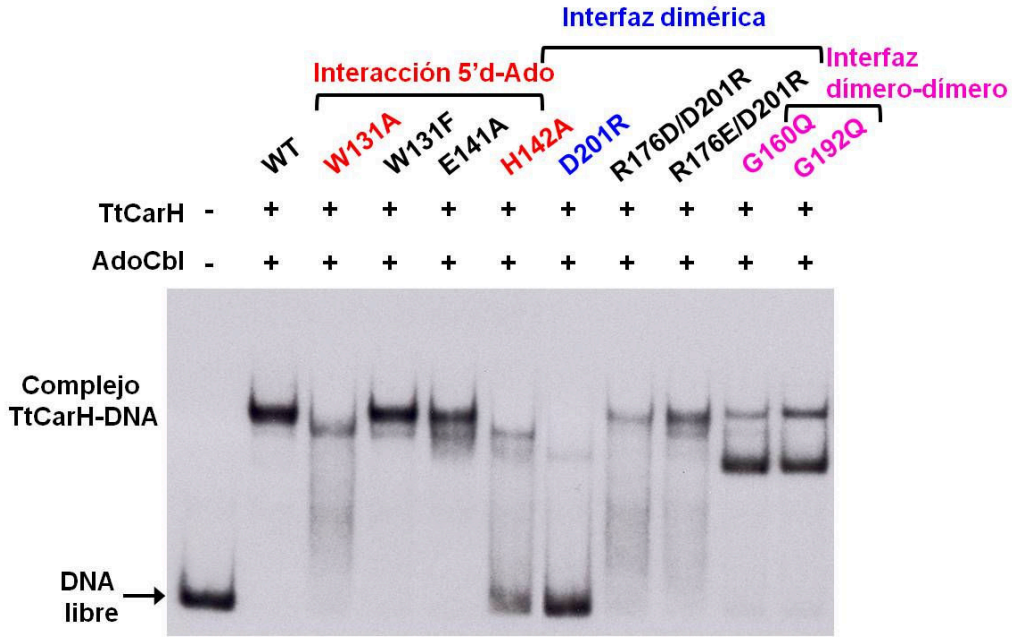


Figura 42. Caracterización de los mutantes afectados en el estado oligomérico mediante EMSA. Se evaluó la capacidad de unión al DNA de la proteína silvestre y los mutantes (800 nM) después de una incubación con AdoCbl (4 µM) durante 30 min a 65 ºC. Se agrupan los aminoácidos según función: rojo, interacción con el grupo 5'-dAdo; azul, interfaz dimérica; rosa, interfaz dímero-dímero. Las mutaciones con efectos más drásticos han sido coloreadas según su grupo de pertenencia. Como sonda de DNA se utilizó el fragmento que contiene la región promotora de *TtcarH*.

Para cuantificar las diferencias, se comparó, en relación con la proteína WT, la afinidad por el DNA de las versiones mutadas (exceptuando H142A, D201R y R176D/D201R) y su cooperatividad. Con cada una de las proteínas se realizaron ensayos de EMSA con concentraciones crecientes de proteína, para poder observar una transición paulatina entre DNA libre y en complejo con TtCarH. Usando el programa ImageJ se cuantificó la fracción de DNA unida a proteína y mediante la ecuación de Hill se pudo determinar: la K_D, constante de disociación en equilibrio aparente, que equivale a la mitad de la concentración máxima de proteína requerida para que no haya DNA libre; el coeficiente de Hill (n), que indica si la unión al DNA por parte de los DBDs de TtCarH es cooperativa (>1); y la fracción unida máxima (α), que tiene que estar en torno a 1. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros de unión al DNA de las versiones mutadas de TtCarH

Proteína	K_D (nM)	(*n*)	α	Unión a DNA	HPLC
WT	67 ± 2	5.1 ± 0.7	0.97 ± 0.03	++++	++++
W131A	216 ± 21	2.82 ± 0.46	0.98 ± 0.07	+	+
W131F	114 ± 5	5.0 ± 0.9	1.01 ± 0.06	+++	+++
E141A	167 ± 3	5.1 ± 0.6	0.92 ± 0.03	++	++
H142A	nd (>800nM)			-	-
D201R	nd (>800nM)			-	-
R176D/D201R	nd			++	+++
R176E/D201R	218 ± 33	1.7 ± 0.25	1.09 ± 0.10	++	+++
G160Q	111 ± 18	3.0 ± 0.2	0.94 ± 0.02	$++^{d}$	$++^{d}$
G192Q	253 ± 17	2.5 ± 0.3	0.87 ± 0.04	$++^{d}$	$++^{d}$

*d, corresponde a un estado de dímero.

Los parámetros que se obtuvieron indican que la unión al DNA de las versiones mutadas, al igual que la de la proteína WT, es cooperativa (n>1). En este sentido, cabe destacar el valor inferior que mostraron las versiones G160Q y G192Q, explicable por su condición de dímeros. La menor cooperatividad de G160Q y G192Q se manifiesta en una pendiente de la recta más relajada, así como en un valor de K_D más alto que la proteína WT, lo que refleja una menor afinidad por el DNA (Figura 43). Estos resultados refuerzan la importancia de la arquitectura correcta del tetrámero para la unión al DNA.

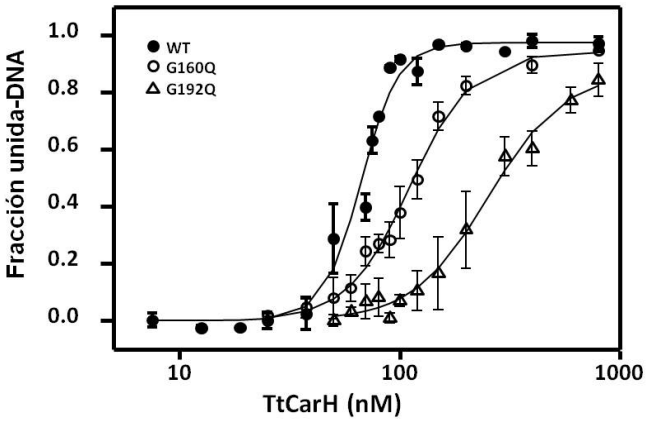


Figura 43. Gráfica utilizada para el cálculo de la afinidad por el DNA de la proteína WT y los mutantes G160Q y G192Q. Se representa la fracción unida al DNA (eje de ordenadas) frente a la concentración de proteína en escala logarítmica (eje de abscisas). Los datos representados se corresponden con la media de tres a cinco experimentos. Para cada valor de concentración se muestra su error estándar.

Que los residuos analizados en TtCarH estén conservados en la proteína CarH de *M. xanthus* o aparezcan como cambios compensatorios (Figura 44A) apunta a su importancia generalizada en la familia proteica y refuerza la noción de que ambas proteínas presentan un modo de acción común. Puesto que, de momento, no se ha podido purificar CarH de *M. xanthus*, para corroborar la importancia funcional de dichos residuos se llevaron a cabo ensayos de doble híbrido bacteriano (DBH) en *E. coli* y de complementación *in vivo* en *M. xanthus* con varias versiones mutadas. En los ensayos de DHB, las mutaciones W147A, E157A, H158A y E192R provocaron la falta de interacción CarH-CarH en la oscuridad y presencia de B_{12}. Sin embargo, la mutación conservativa W147F y las mutaciones compensatorias E192R/R217E no afectaron a la interacción (Figura 44B y C). Un caso particular es el de las glicinas cuyas mutaciones afectan a la formación del tetrámero de TtCarH y provocan la aparición de dímeros. Como se observa en el alineamiento (Figura 44A), la G160 de TtCarH se corresponde con la P176 de CarH, un cambio no necesariamente conservativo. No obstante, hay una glicina cercana, G178, que podría ser el equivalente funcional de la G160 de TtCarH. Mientras que las mutaciones P176Q y G208Q sí provocaron un descenso notable en la interacción, la mutación G178Q solo tuvo un efecto leve, lo que apunta a un papel importante de P176 y G208 pero no de G178.

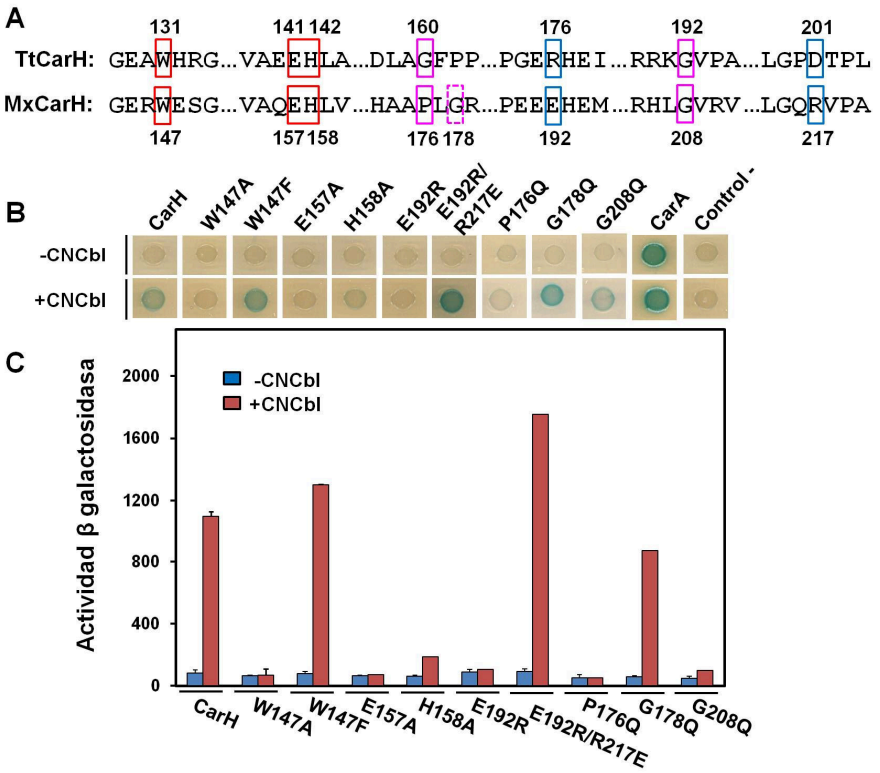


Figura 44. Análisis mediante DHB del efecto de mutaciones en los aminoácidos conservados en CarH de *M. xanthus* (MxCarH) en el dominio de unión a B_{12} y las superficies de interacción monómero-monómero y dímero-dímero. (A) Alineamiento de los aminoácidos conservados en TtCarH y MxCarH. **(B)** Gotas de células de los distintos mutantes incubadas en placas de X-Gal del ensayo de DHB en presencia y ausencia de CNCbl. Se utilizó como control positivo a CarH y como control independiente de Cbl a CarA. Como control negativo se empleó cada una de las proteínas fusionada a T18 o T25 enfrentada a un plásmido de T18 o T25 vacío. En este caso se usó pUT18C-CarH enfrentado a pKT25-vacío. **(C)** Medida de la actividad β galactosidasa de los mutantes de CarH mostrados en B.

Los ensayos de complementación, para analizar el efecto *in vivo* de las mutaciones en CarH sobre la carotenogénesis, se realizaron en una estirpe de *M. xanthus* (MR1778) portadora de la triple deleción Δ*carA* Δ*carH* Δ*carS*. Las distintas versiones mutadas de *carH*, fusionadas a la etiqueta FLAG (para poder analizar la expresión de las proteínas con anticuerpos comerciales anti-FLAG), se clonaron en un plásmido (pMR3679) bajo el control de un promotor inducible por vanilato. Los plásmidos resultantes se introdujeron en MR1778 por electroporación y se seleccionaron los transformantes derivados de la integración por recombinación homóloga en un sitio heterólogo (Figura 45A). Una vez obtenidas las estirpes de *M. xanthus*, se realizaron los ensayos de complementación siguiendo el esquema de la Figura 45B.

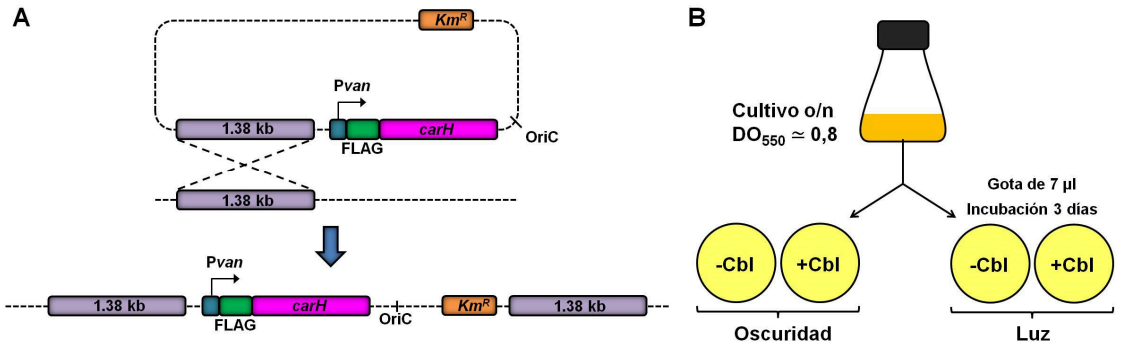


Figura 45. Ensayos de complementación en *M. xanthus*. (A) Representación esquemática del plásmido utilizado (pMR3679) para la clonación de *carH* silvestre y mutado, y su posterior introducción en *M. xanthus*. Abreviaturas: 1,38 kb: región de 1,38 kb para la integración genómica del plásmido por recombinación homóloga en un sitio heterólogo. P_{van}: promotor inducible por vanilato. FLAG: etiqueta que se expresa fusionada al extremo N-terminal de CarH. OriC: origen de replicación para *E. coli*. Km^R: gen de resistencia a kanamicina. **(B)** Protocolo utilizado para los ensayos de complementación en *M. xanthus*. A partir de un cultivo crecido en medio CTT líquido hasta DO_{550}≃0,8, se depositaron gotas en medio CTT sólido en ausencia o presencia de CNCbl y diferentes concentraciones de vanilato, y se incubaron en oscuridad o luz.

El análisis de complementación se realizó en medio sólido CTT suplementado o no con CNCbl (*M. xanthus* no sintetiza AdoCbl *de novo* pero es capaz de incorporar CNCbl del medio y convertirla en AdoCbl) y concentraciones crecientes de vanilato (Figura 46). En ausencia de vanilato y/o CNCbl, todas las estirpes mostraron el fenotipo naranja en la oscuridad (indicativo de síntesis de carotenos constitutiva, debido a la falta de represión de P_B) y rojo en la luz (debido a que en estas condiciones se expresa también *crtIb*) (datos no mostrados). En la oscuridad y en presencia de CNCbl, la estirpe que expresa la versión silvestre (WT) de CarH mostró la coloración amarilla típica indicativa de represión de P_B, incluso a la concentración más baja (5 µM) de vanilato, a diferencia de la coloración anaranjada del control negativo (MR1778). Las versiones mutadas W147A, E157A y H158A, que afectan a residuos que en TtCarH están implicados en la interacción con el grupo 5'-dAdo, fueron incapaces de reprimir la síntesis de carotenoides a cualquiera de las concentraciones de vanilato analizadas, a pesar de que el análisis mediante *Western blot* reveló que se expresan correctamente (Figura 46). Sin embargo, la versión con la mutación conservativa W147F sí fue capaz de reprimir, aunque a concentraciones más altas de vanilato que la proteína WT. Por otro lado, mientras que la versión con la mutación E192R, que afecta al residuo equivalente a D201 en TtCarH (implicado en la formación del dímero) fue completamente inactiva (aunque estable), el doble mutante E192R/R217E se mostró casi tan funcional como la proteína WT. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que las diferencias entre CarH y TtCarH en las dos

posiciones en cuestión obedecen a una sustitución compensatoria ocurrida en la evolución de dichas proteínas. En cuanto a los posibles residuos en la interfaz dímero-dímero, la versión P176Q fue incapaz de reprimir a cualquiera de las concentraciones de vanilato, y G178Q se mostró defectuosa pero solo a las concentraciones más bajas (5 y 10 µM). Sin embargo, G208Q, que en el ensayo de DHB mostró una interacción consigo misma disminuida, mostró una actividad represora similar a la de la proteína WT. Así pues, la pequeña fracción de proteína dimérica que cabría esperar que se produzca parece suficiente para reprimir, al menos en el rango de concentraciones de vanilato analizadas.

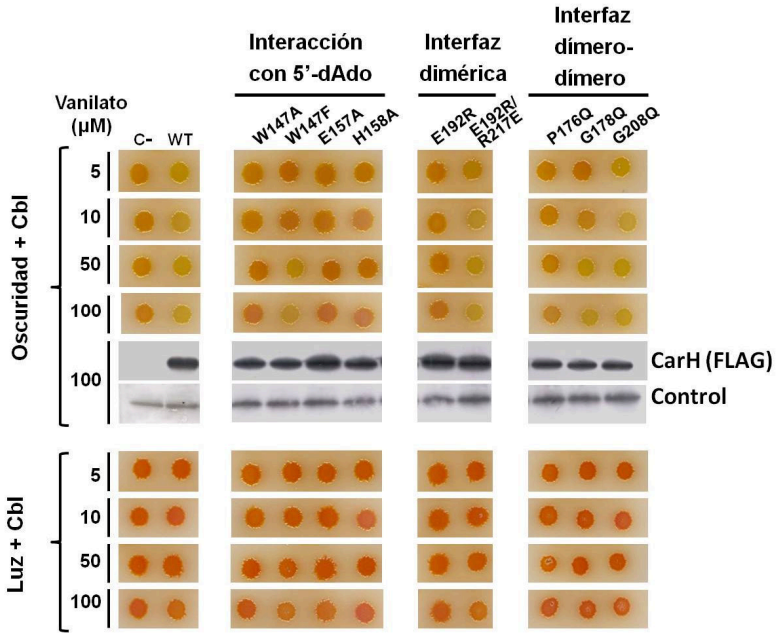


Figura 46. Ensayos de complementación en *M. xanthus* con las versiones mutadas en el dominio de unión a B_{12} y en las superficies de interacción monómero-monómero y dímero-dímero de CarH. El protocolo utilizado para el análisis del fenotipo para la carotenogénesis es el que aparece en la Figura 45B. Para la realización del ensayo de *Western blot* mostrado, se recogieron muestras de todas las estirpes crecidas en la oscuridad en presencia de Cbl y 100 µM de vanilato. Para detectar CarH y sus versiones mutadas, todas ellas expresadas con una etiqueta FLAG en su extremo N-terminal, se utilizaron anticuerpos comerciales anti-FLAG; como control de carga, se detectó la proteína CdnL con anticuerpos policlonales anti-CdnL. C-: control negativo, que se corresponde con la estirpe Δ*carA* Δ*carH* y Δ*carS*.

En conjunto, los resultados obtenidos *in vivo* con CarH correlacionan bien con los obtenidos *in vitro* con TtCarH, lo que corrobora la importancia funcional de dichos residuos y la existencia de un modo de acción común.

III.1.2 Unión de TtCarH al DNA operador

Las proteínas de la familia CarH/CarA se unen a la región operadora de los genes que regulan a través de un DBD similar al de las proteínas reguladoras de tipo MerR que, típicamente, se unen a regiones pseudo-palindrómicas (Brown *et al*., 2003). Como se ha comentado anteriormente, los estudios realizados *in vitro* con CarA de *M. xanthus* permitieron establecer que dicha proteína represora se une a un operador bipartito constituido por un palíndrome perfecto (pI) y un pseudo-palíndrome (pII) (Figura 47) (López-Rubio *et al*., 2002; Pérez-Marín *et al*., 2004). A falta de CarH, los estudios *in vitro* con la quimera CTt2 (constituida por el dominio DBD de CarH y el dominio de unión a AdoCbl de TtCarH), que sí pudo purificarse y que *in vivo* se comporta como CarH, revelaron la unión al mismo sitio que CarA aunque con alguna modificación que podría sugerir diferencias en el modo de unión (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011). En un análisis inicial de la región promotora de *TtcarH* se identificaron dos sitios que, por similitud con el operador de CarA en *M. xanthus*, podrían equivaler a pI y pII de P_B. Sin embargo, los ensayos de *footprint* con DNasa I y los ensayos EMSA con oligonucleótidos y versiones truncadas sugirieron un sitio de unión más pequeño para TtCarH, de unos 30 nucleótidos (posiciones -47 a -18, en relación al sitio de inicio de la transcripción, TSS, de *TtcarH*), que no incluía pI completo (Figura 47) (Jost *et al*., 2015b; Ortiz-Guerrero, 2013; Ortiz-Guerrero *et al*., 2011).

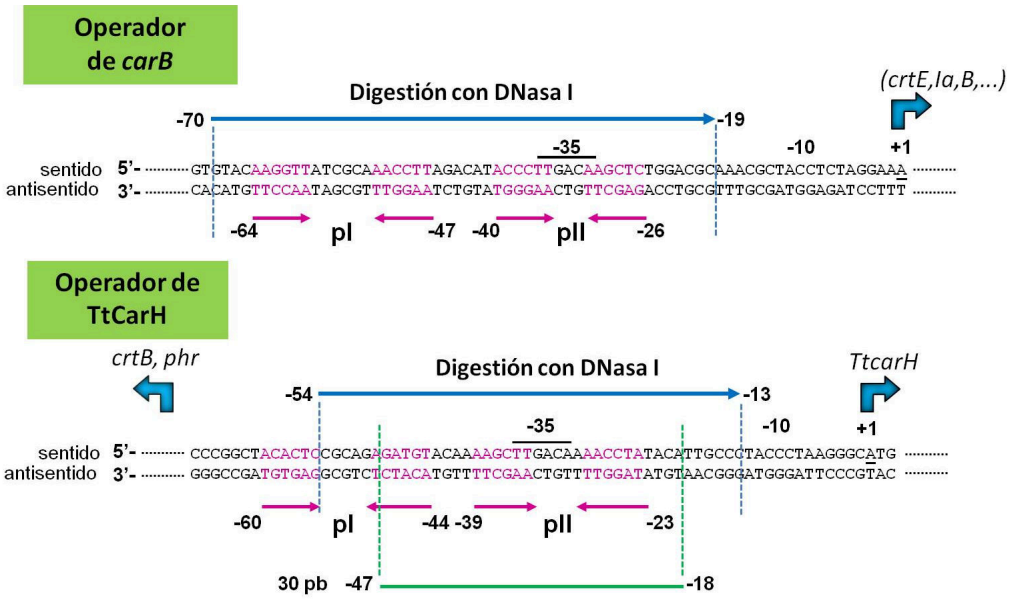


Figura 47. Comparación del operador de CarA con el posible operador de TtCarH. La flecha azul indica la zona protegida de la digestión con DNasa I en la cadena con sentido. En magenta: los cuatro segmentos del operador bipartito de CarA y, por similitud, en *T. thermophilus*. En verde se indica la extensión del oligonucleótido de ~30 pb que parece ser suficiente para la unión de TtCarH. Las posiciones se han numerado en relación al sitio de inicio de la transcripción (TSS). Se indica la posición de los elementos -35 y -10 del promotor P_B y del promotor P_{TtcarH}.

III.1.2.1 Descubrimiento del modo de unión de TtCarH al DNA

La determinación de la estructura cristalina (3,89 Å) de TtCarH en complejo con un oligonucleótido de 26 pb (-47 a -22) reveló un modo de unión al DNA completamente inesperado (Figura 48) (Jost *et al*., 2015b). Sorprendentemente, TtCarH utiliza solo tres de sus cuatro DBDs para unirse al DNA y, además, en vez de a secuencias palindrómicas, se une a tres repeticiones directas (DR1, DR2 y DR3) en tándem, de 11 pb cada una, con la secuencia consenso (A/G)A(G/C)(A/C)T(A/G/T)(T/G)ACA(A/T) (Figura 48A y C). El cuarto DBD se encuentra desordenado y no es visible mediante densidad electrónica. En general, la arquitectura del tetrámero es la misma antes y después de la unión al DNA, excepto por la reorientación de los DBDs, que se disponen de modo paralelo, de tal manera que cada hélice de reconocimiento contacta (a través del surco mayor del DNA) con un tramo de 6 pb (Figura 48A). Un dímero "cabeza-cola" del tetrámero se une a DR1 y DR3, y el otro dímero se une a través de uno de sus dos DBDs a la región -35 (TTGACA) del promotor, situada en la repetición central DR2 (Figura 48A y B). El bloqueo de la región -35 por TtCarH explicaría su acción reguladora negativa, al impedir su reconocimiento por la RNAP asociada al factor mayoritario σ^A/σ^{70}.

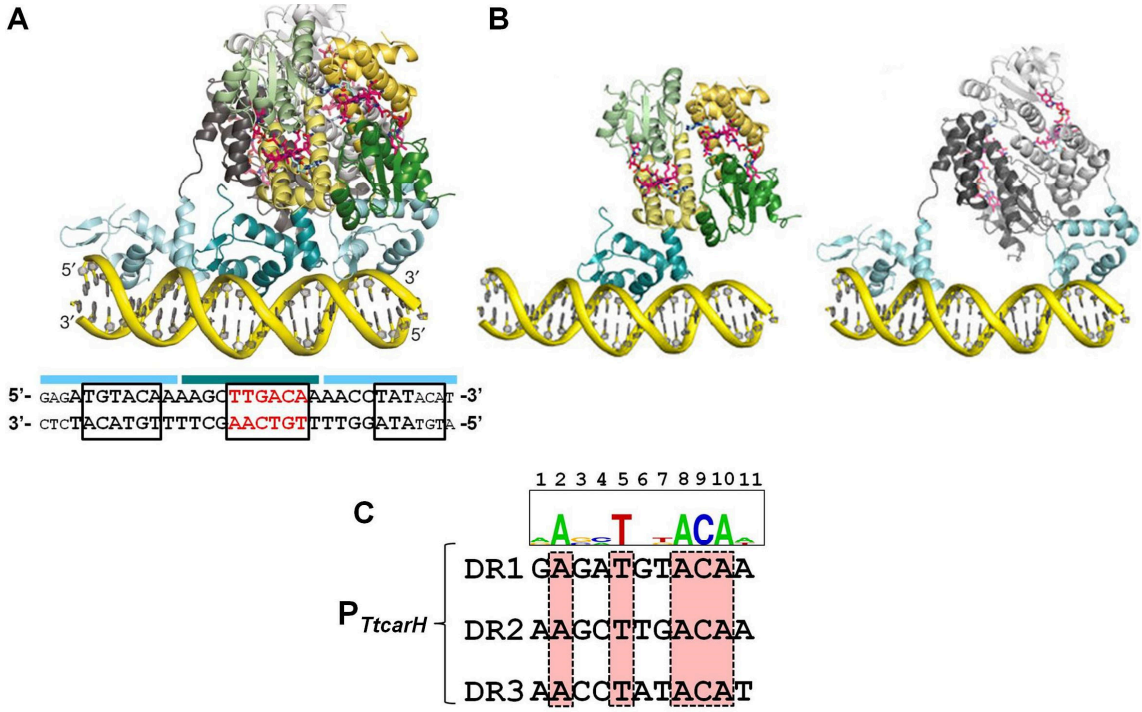


Figura 48. Unión de TtCarH al DNA. (A) Tetrámero de TtCarH unido a un fragmento de DNA de 26 pb (amarillo). En la proteína, se muestran en colores amarillo y verde el haz de hélices alfa y el dominio tipo Rossmann de un dímero, mientras que el dímero adyacente se muestra en gris. AdoCbl se representa en magenta, y los dominios de unión a DNA en cian. Cada uno de los 3 DBDs implicados en la unión al operador se representa con una intensidad distinta de color. (B) Implicación de cada dímero "cabeza-cola" en las DRs. **(C)** Alineamiento de las tres DRs de 11 pb presentes en P_{TtcarH}. Las posiciones conservadas se muestran resaltadas con recuadros rojos según la secuencia logo (Jost *et al*., 2015b; Padmanabhan *et al*., 2017).

Con el propósito de corroborar el inusual modo de unión al DNA de TtCarH se realizaron ensayos de *footprint* con DNasa I y con radicales hidroxilo. Ambos ensayos permiten observar las regiones del DNA protegidas por la unión de una proteína, pero el *footprint* con radicales hidroxilo permite determinarlo con una resolución mayor (a nivel de nucleótido). En los ensayos de *footprint* con radicales hidroxilo, usando un fragmento de DNA más largo (130 pb) que el empleado en la obtención de los cristales (26 pb), se observó en ambas cadenas la aparición de tres zonas protegidas equidistantes, de 4 pb cada una, que se encuentran englobadas en la región protegida de la digestión por DNasa I (Figura 49A). Dichas zonas se corresponden con las posiciones de contacto de las "alas" de los DBDs tipo MerR, que se unen al surco menor del DNA (Figura 49B). Que se observasen solo tres tramos protegidos de la rotura por radicales hidroxilo, y no cuatro, confirma que el modo de unión de TtCarH revelado por la estructura no es un artefacto de la cristalización y que, en efecto, TtCarH se une al DNA operador usando solo tres de los cuatro DBDs.

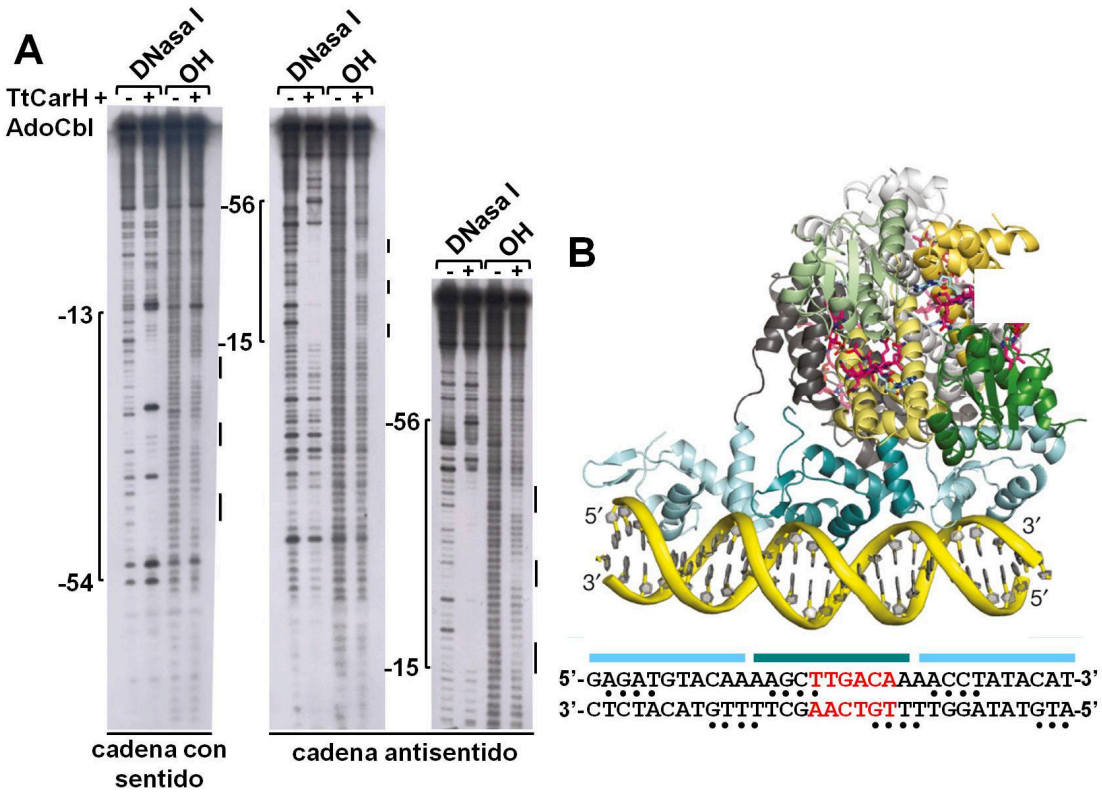


Figura 49. Análisis de la unión de TtCarH al DNA mediante ensayos de *footprint*. (A) Ensayos de *footprint* con DNasa I y radicales hidroxilo (OH) con TtCarH (800 nm) y AdoCbl (4 µM) en las dos cadenas del fragmento (130 pb) P_{TtcarH}. Las zonas protegidas están marcadas con líneas negras para radicales hidroxilo y con corchetes para DNasa I. La cadena antisentido de la derecha se sometió a electroforesis durante más tiempo para facilitar el visionado de las zonas protegidas. Las posiciones de las regiones protegidas se determinaron usando como marcadores de tamaño las bandas resultantes de la secuenciación química A+G del mismo fragmento. **(B)** Debajo del complejo TtCarH-DNA se indican, mediante asteriscos sobre la secuencia de las tres DRs, las posiciones protegidas del ataque por radicales hidroxilo. En la secuencia, en rojo, se marca la región -35 del promotor (Jost *et al*., 2015b).

Para estudiar el papel de las bases conservadas en el DNA operador y determinar si se requieren las tres DRs para la unión eficaz de TtCarH al DNA, se realizaron ensayos de EMSA con oligonucleótidos de 40 pb mutados en una sola de de las tres DRs, en dos DRs o en las tres DRs a la vez. En total, se analizaron 18 versiones mutadas (Mut1-Mut18; Figura 50A) portadoras del cambio de: AC por GT (posición 8/9); (A/C)T a GC (posición 4/5); y (A/G)A) a TT (posición 1/2). Los cambios en las posiciones 8/9 o 4/5 en una sola DR produjeron una pequeña disminución de la afinidad, manifestada por una bajada en la intensidad de la banda del complejo TtCarH-DNA y la aparición de una pequeña cantidad de DNA libre (Mut1-3 y 8-10, Figura 50B). Sin embargo, las mutaciones en esas mismas posiciones pero en dos o en las tres DRs sí tuvieron un efecto drástico en la unión al DNA (Mut4-7 y 11-14, Figura 50B). Por el contrario, las mutaciones en dos DRs o en las tres en las

posiciones 1/2, con las que no interacciona TtCarH específicamente, tuvieron un efecto menos acusado (Mut15-18, Figura 50B). Estos resultados confirman la importancia de las bases conservadas en la formación del complejo, en particular las de las posiciones 4/5 y 8/9, y de las tres DRs para que se produzca una unión óptima de TtCarH a su operador.

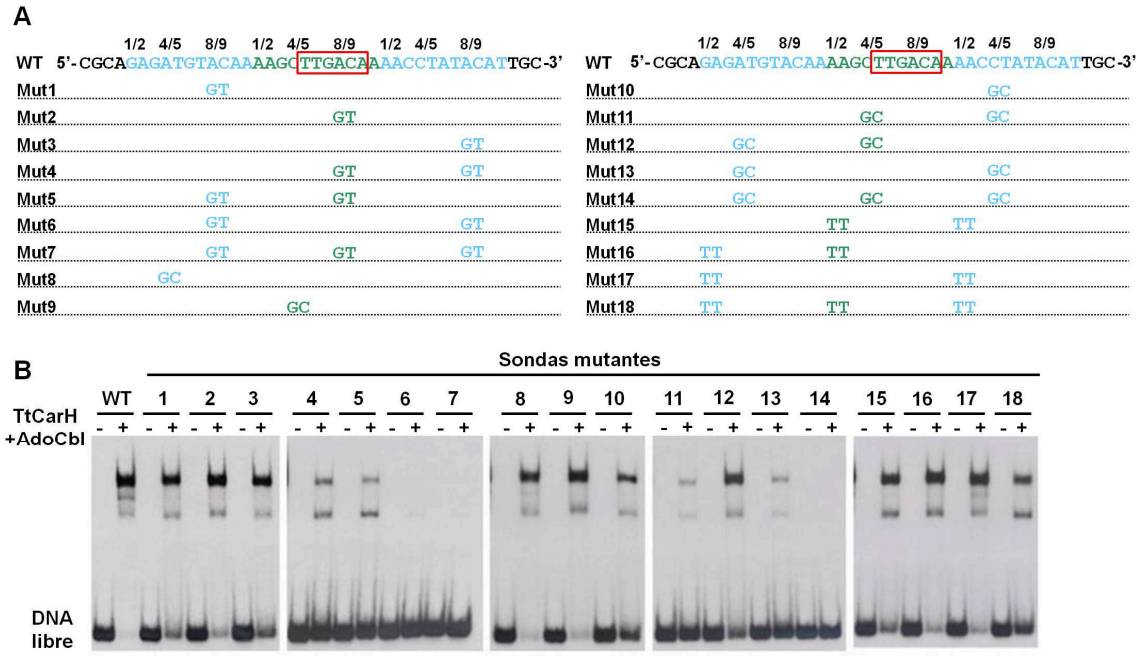


Figura 50. Análisis de la unión de TtCarH a oligonucleótidos mutados. (A) Secuencia del operador silvestre (WT) con las tres repeticiones de 11 pb coloreadas en cian (externas) y verde oscuro (central). El recuadro rojo delimita el elemento -35. En las sondas mutadas (Mut) solo se representan los nucleótidos mutados, coloreados según la repetición afectada. **(B)** Ensayos de EMSA con TtCarH (800 nM) en presencia de AdoCbl (4 µM) y cada uno de los oligonucleótidos de 40 pb mutados.

III.1.2.2 Análisis funcional de los aminoácidos implicados en la unión al DNA según los datos estructurales

En el complejo TtCarH-DNA, cada uno de los DBDs forma puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas con el esqueleto de fosfatos a través del esqueleto peptídico y las cadenas laterales de W26, Y30, R37, R43 y K67 (Figura 51). Cada dominio inserta la H42 del "ala" en el surco menor del DNA. Además, las cadenas laterales de Q25, R28 y R29 establecen puentes de hidrógeno específicos con el tramo de 6 pb en el surco mayor reconocido por la hélice de reconocimiento de cada DBD (Figura 51A, B).

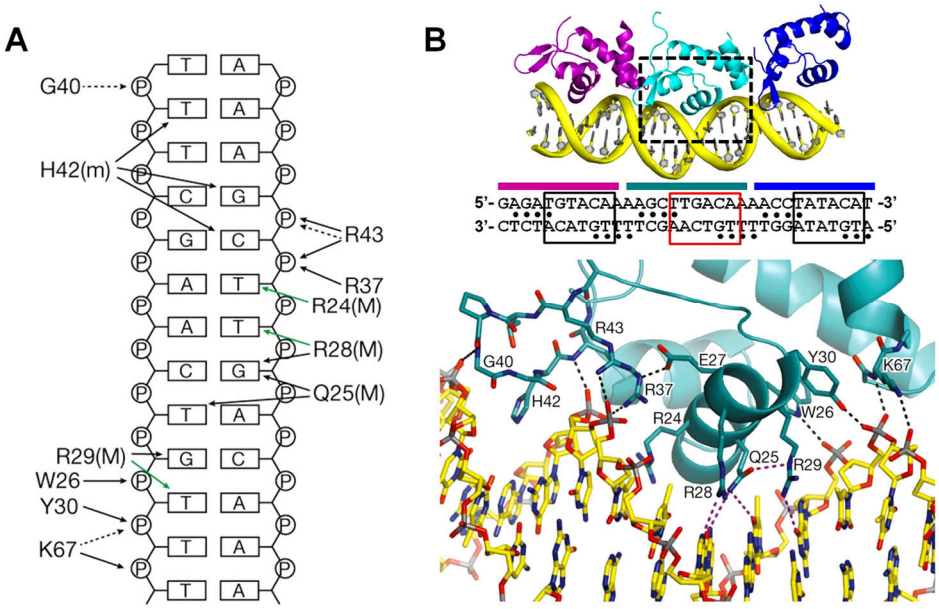


Figura 51. Interacciones entre TtCarH y su operador. (A) Esquema de las interacciones de TtCarH-DNA para el DBD central. Flechas negras: puentes de hidrógeno/interacciones electroestáticas; flechas verdes: interacciones de van der Waals; líneas sólidas: contactos de las cadenas laterales de las proteínas; línea discontinua: contactos de la cadena principal; (M), contactos con el surco mayor del DNA; (m) contactos con el surco menor del DNA. **(B)** Arriba, unión de los DBDs de TtCarH al DNA. Las tres repeticiones están delimitadas por líneas gruesas de color violeta, verde oscuro y azul. Los recuadros muestran las 6 pb a las que se une la hélice de reconocimiento de cada DBD; el recuadro rojo coincide con el elemento – 35 del promotor. El recuadro de línea discontinua indica la zona con resolución aumentada en la parte inferior, correspondiente al DBD central (cian) unido al DNA (amarillo). Los enlaces por puentes de hidrógeno e interacciones iónicas al esqueleto de fosfatos se representan con líneas negras discontinuas. Los contactos con las bases del DNA se muestran en púrpura (Jost *et al*., 2015b)

Para confirmar el modo de unión al DNA por parte de TtCarH se generaron las versiones mutadas Q25A, R29A, Y30A, que afectan a residuos en la hélice de reconocimiento, y H42A y R43A, que afectan a residuos en una de las “alas” (Figura 52A). En los ensayos de SEC no se observan diferencias significativas en el comportamiento de los mutantes en comparación con la proteína silvestre en ninguna de las condiciones probadas (Figura 52B). Por lo tanto, las mutaciones en el DBD no afectan a la formación del tetrámero, ni a su posterior disociación al ser expuesto a la luz.

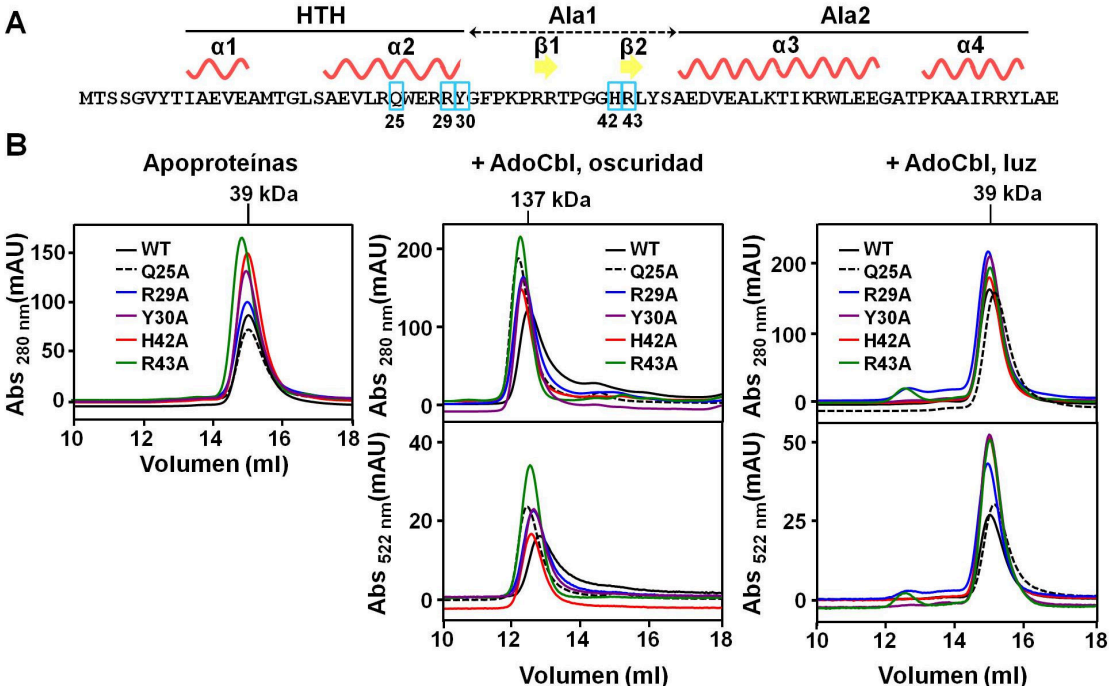
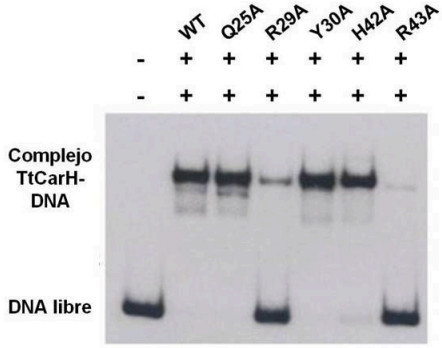


Figura 52. Unión a AdoCbl y oligomerización de los mutantes que afectan al DBD de TtCarH. (A) Secuencia aminoacídica del DBD de TtCarH y estructuras secundarias que lo forman: hélices α (espiral roja) y láminas β (flecha amarilla). Los residuos mutados se muestran recuadrados en azul. **(B)** Ensayo de SEC de los mutantes indicados. A la izquierda, aproproteinas en oscuridad; centro, proteínas con AdoCbl en oscuridad; y derecha, proteínas con AdoCbl expuestas a la luz. La elución de los picos fue monitorizada mediante la absorbancia a 280 nm y 522 nm para proteína y Cbl, respectivamente. Se indica el tamaño para el monómero (39 kDa) y tetrámero (137 kDa).

Una vez examinada la capacidad de formar tetrámeros, se realizaron ensayos de EMSA para comprobar si las mutaciones afectan a la interacción con el DNA. Los mutantes R29A y R43A mostraron un defecto severo en la unión al DNA, mientras que el mutante Q25A apenas se vio afectado en EMSA, mostrando una afinidad similar al silvestre (Figura 53). Estos resultados confirman que R29 y R43 juegan un papel clave en la unión al DNA, y apuntan a que Q25 contribuye a la especificidad por el DNA, más que a la afinidad. Finalmente, las dos mutaciones restantes, H42A e Y30A, provocaron una disminución en la afinidad, lo que sugiere que su papel en la interacción con el DNA, aunque importante, no es esencial (Figura 53).

A



B

	K_D (nM)	(n)	α
WT	67 ± 2	5,1 ± 0,7	0,97 ± 0,003
Q25A	65 ± 3	7,6 ± 2,6	0,81 ± 0,05
R29A	nd (>800 nM)		
Y30A	127 ± 9	3,0 ± 0,6	0,98 ± 0,06
H42A	172 ± 17	2,6 ± 0,4	0,96 ± 0,06
R43A	nd (> 800 nM)		

Figura 53. Unión al DNA de los mutantes que afectan al DBD de TtCarH. (A) Ensayo EMSA con los mutantes de TtCarH indicados (800 nM) en presencia de AdoCbl (4 μM); las reacciones se incubaron en oscuridad a 65ºC durante 30 min. **(B)** Valores de afinidad por el DNA de los mutantes indicados, calculados usando la ecuación de Hill.

La mayoría de los aminoácidos analizados en el DBD de TtCarH también están conservados en la proteína homóloga de *M. xanthus* (Figura 54A). Una excepción es Q25, cuya mutación a alanina en TtCarH no tuvo efecto y que, precisamente, es una alanina en CarH. En un trabajo previo del grupo ya se demostró que R42, correspondiente a R43 en TtCarH, es esencial para la represión de la carotenogénesis en la oscuridad (Pérez-Marín *et al*., 2008). Para analizar el papel de R28, Y29 e Y41, se generaron versiones con dichos residuos mutados a alanina y con ellas se realizaron pruebas de complementación en la estirpe Δ*carA* Δ*carH* Δ*carS* de *M. xanthus*, siguiendo el mismo protocolo descrito previamente para el análisis de las mutaciones en el dominio de unión a B_{12} (Figura 45). Las estirpes con cualquiera de las tres versiones mutadas fueron incapaces de reprimir la síntesis de carotenoides a cualquiera de las concentraciones de vanilato analizadas, mostrando la misma coloración anaranjada en la oscuridad y roja en la luz que la estirpe recipiente usada como control negativo (Figura 54B). Dado que la falta de complementación no se debe a una falta de expresión de las versiones mutadas, los resultados sugieren que los aminoácidos analizados en CarH son importantes para la unión al DNA y que, por lo tanto, el modo de unión al DNA de TtCarH está conservado en CarH.

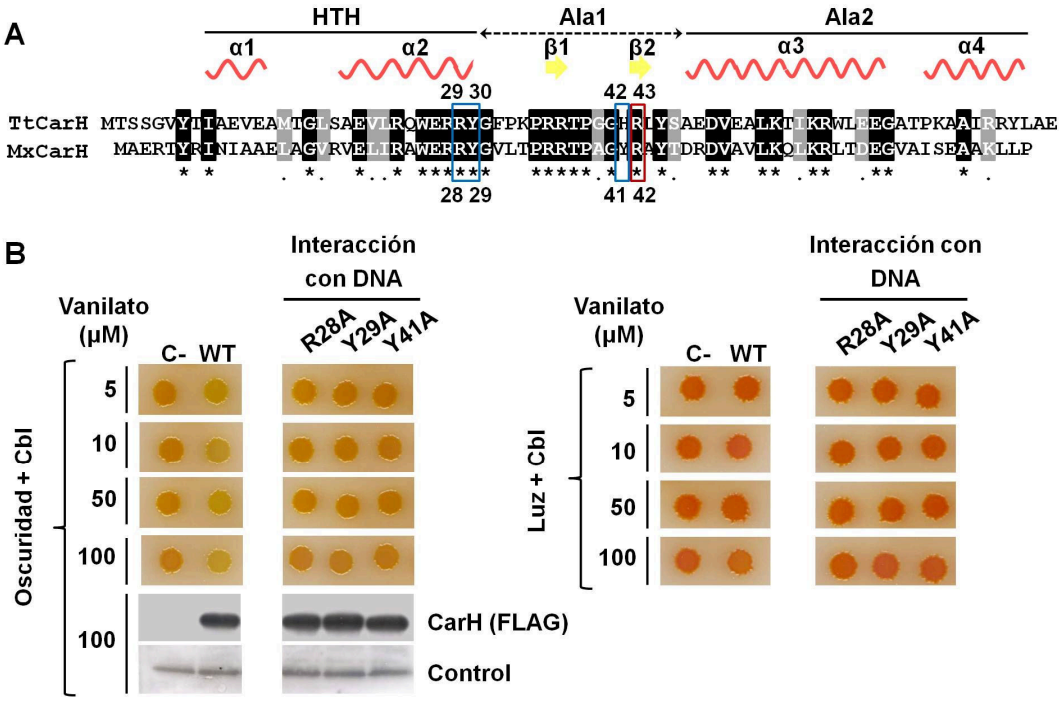


Figura 54. Efecto en *M. xanthus* de las mutaciones en aminoácidos del DBD de CarH. (A) Alineamiento de la secuencia del DBD de *T. thermophilus* y *M. xanthus*. Se muestran las estructuras secundarias: hélices α (espiral roja) y láminas β (flecha amarilla). En la última línea se muestran las posiciones conservadas (.) o idénticas (*). Los residuos mutados en este trabajo se muestran con recuadros azules; con el recuadro rojo se indica la posición 42 mutada en Pérez-Marín *et al*., (2008). **(B)** El protocolo utilizado para el análisis del fenotipo para la carotenogénesis es el que aparece en la Figura 45B. Para la realización del ensayo de *Western blot* mostrado, se recogieron muestras de todas las estirpes crecidas en la oscuridad en presencia de Cbl y 100 μM de vanilato. Para detectar CarH y sus versiones mutadas, todas ellas expresadas con una etiqueta FLAG en su extremo N-terminal, se utilizaron anticuerpos comerciales anti-FLAG; como control de carga, se detectó la proteína CdnL con anticuerpos policlonales anti-CdnL. C-: control negativo, que se corresponde con la estirpe Δ*carA* Δ*carH* Δ*carS*.

III.1.3. La luz desencadena el movimiento del haz de hélices α y la formación de un enlace bis-His

Como ya se ha comentado, la fotólisis de la AdoCbl provoca el desmantelamiento del tetrámero de CarH/TtCarH a monómeros, que permanecen unidos a la Cbl fotolisada (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011) de una forma muy estable, pues el intercambio con AdoCbl fresca para la regeneración del fotorreceptor es un proceso muy poco eficaz (Ortiz-Guerrero, 2013). El estudio de la fotoquímica de TtCarH con técnicas de espectroscopía ultrarrápida (Kutta *et al*., 2015) y la identificación del producto de la fotólisis (Jost, *et al*., 2015c) pusieron de manifiesto una ruta fotoquímica sin precedentes, independiente de la formación de radicales propia de la AdoCbl libre. Así, en vez de liberarse el ligando axial superior de la AdoCbl como un radical 5´-dAdo

que podría dañar el DNA, se libera como una molécula inocua, no reactiva (4´,5´-anhidroadenosina), de tal manera que TtCarH salvaguarda el uso de AdoCbl como molecula sensora de luz (Jost, *et al*., 2015c).

III.1.3.1 Estructura del monómero fotolisado

La determinación de la estructura (2,65 Å) del monómero tras la fotólisis reveló la base molecular del desensamblaje del tetrámero en la luz y de la aparente irreversibilidad del fotorreceptor. En la estructura no se observaron cambios conformacionales significativos en el dominio sensor de luz. Sin embargo, sí se observó un desplazamiento de más de 8 Å del haz de hélices α respecto al dominio de unión a Cbl (Figura 55A), que altera la interfaz del dímero "cabeza-cola" y promueve, por tanto, la disociación del tetrámero y la consecuente liberación del DNA.

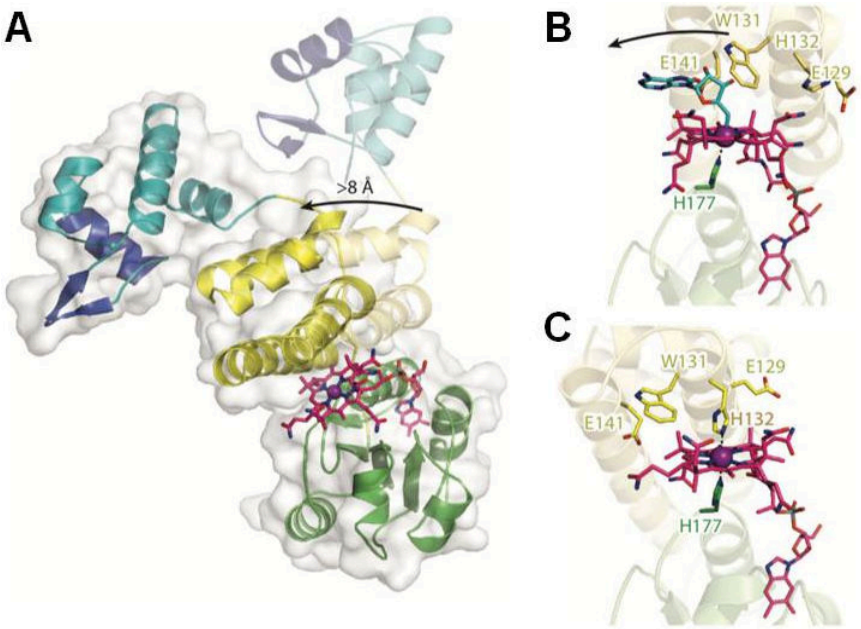


Figura 55. La luz induce cambios conformacionales en TtCarH. (A) Estructura de la forma fotolisada indicando con la flecha el cambio conformacional a una estructura "doblada" que se produce en la luz a partir de la estructura "estirada" del protómero de TtCarH en la oscuridad (transparente en la figura). El haz de hélices α se muestra en amarillo, el dominio de unión a Cbl en verde, y el DBD en azul. La Cbl está coloreada en rosa, con el Co en púrpura. **(B)** Vista ampliada del sitio de unión a AdoCbl de TtCarH que permite apreciar el papel del grupo 5'-dAdo (cian) de la AdoCbl como "tope de puerta" que impide el movimiento del W131. **(C)** Vista ampliada del sitio de unión a AdoCbl de TtCarH una vez liberado el grupo 5'-dAdo por la fotólisis. La cavidad que queda es rellenada por el desplazamiento del haz de hélices α, de tal forma que la H132 acaba como ligando axial superior del Co, formando un enlace bis-His (Padmanabhan *et al*., 2017).

En la oscuridad, el protómero de CarH mantiene una disposición “estirada o erecta” debido a que el grupo 5’-dAdo “choca” contra el W131 e impide el movimiento del haz de hélices α (Figura 55B). La fotólisis de la AdoCbl genera un hueco en la cavidad que aloja al grupo 5’-dAdo, lo que permite el desplazamiento del haz de hélices α para ocupar dicho espacio, generando una conformación “doblada” del protómero (Figura 55A). Como consecuencia, la His132 acaba posicionándose sobre la cara superior de la Cbl como ligando axial superior del cobalto (Figura 55C). El enlace bis-His (H132-Co-H177) resultante es común en proteínas que se unen al grupo hemo, pero hasta el momento nunca se había observado con una proteína de unión a Cbl. Es sabido que este tipo de enlaces son extremadamente fuertes, lo que podría explicar la dificultad observada previamente para intercambiar la Cbl fotolisada con AdoCbl. De ser así, cabría esperar que la mutación H132A resultase en una versión de TtCarH más susceptible al intercambio. Por otro lado, si la H132 está implicada de alguna manera en la respuesta a la luz, la versión mutada podría mostrarse más insensible a la luz e incapaz de sufrir el cambio a monómero fotolisado. Para comprobarlo, se generó dicha versión y se comparó su comportamiento con el de la versión silvestre (WT). Como puede observarse en la Figura 56 (A y B), la exposición a la luz produjo la aparición de monómeros en el mutante H132A de manera similar al WT, por lo que no parece que la H132 y la ligación bis-His se requieran para responder normalmente a la luz y provocar el desensamblaje del tetrámero.

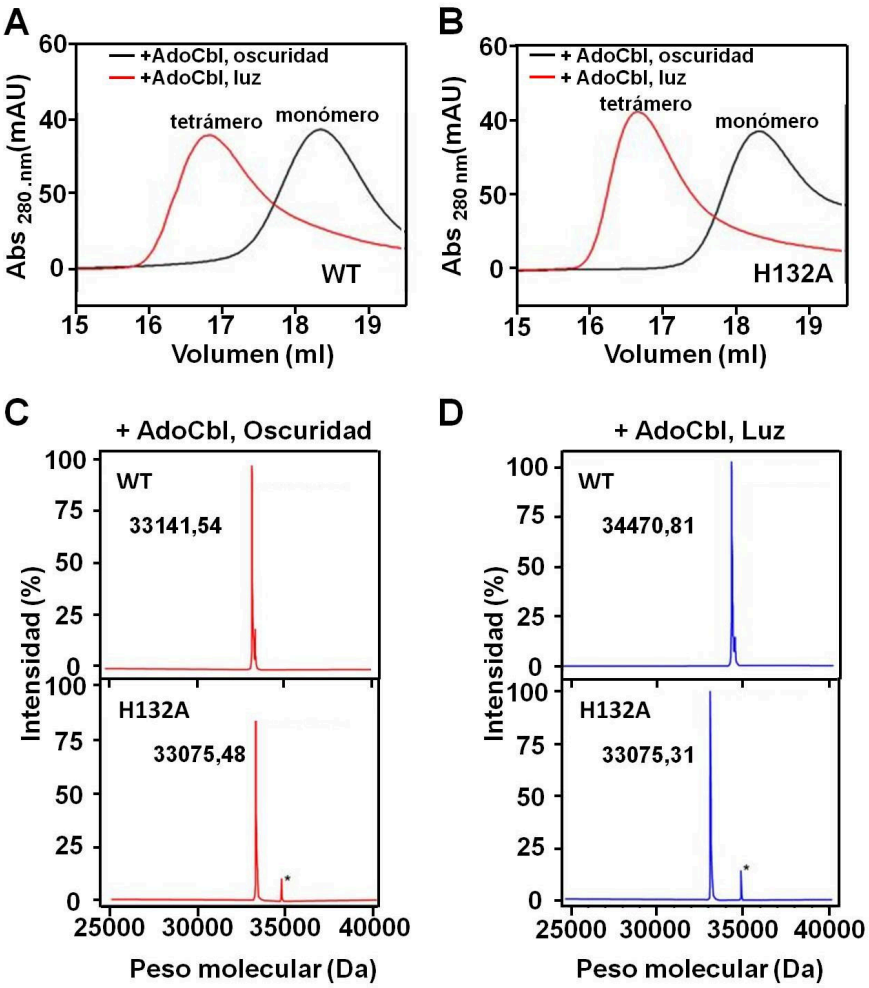


Figura 56. La mutación H132A facilita la disociación de la Cbl después de la fotólisis. (A) Ensayos de SEC (columna Superose 6 10/300 GL) en oscuridad y luz con TtCarH WT, previamente incubada con AdoCbl. **(B)** Ensayo de SEC con el mutante H132A, igual que en A. **(C)** Ensayo de espectrometría de masas ESI-TOF de TtCarH WT y H132A incubados con AdoCbl en oscuridad. **(D)** Ensayo de espectrometría de masas ESI-TOF de TtCarH WT y H132A después de la exposición a la luz de muestras previamente incubadas con AdoCbl en oscuridad. En **C y D,** las muestras se sometieron a HPLC de fase reversa asociado a espectrometría de masas ESI-TOF (*electrospray ionization-time of flight*). Los números indican el peso molecular estimado. Los picos marcados con un asterisco se corresponden con impurezas no identificadas presentes en las muestras. Imagen modificada de Jost, *et al.*, (2015b).

III.1.3.2 Análisis funcional de la histidina implicada en la formación del enlace bis-His

Para determinar su posible papel en la retención de la cobalamina fotolisada, muestras de TtCarH WT y H132A, previamente incubadas con AdoCbl y expuestas a a luz, se utilizaron para llevar a cabo un experimento de espectrometría de masas ESI-TOF (técnica que proporciona el peso molecular de manera muy precisa). Las versiones silvestre y mutada, previamente incubadas con AdoCbl en la oscuridad,

mostraron el peso molecular correspondiente al monómero en su forma apo (lo que indica que la AdoCbl, como cabría esperar, se disocia durante el fuerte tratamiento al que se someten las muestras) (Figura 56C). Sin embargo, la proteína WT iluminada, pero no la versión H132A, mostró un peso molecular 1329 Da mayor al de la forma apo. Que la masa adicional coincida precisamente con el peso molecular de la AdoCbl fotolisada pone de manifiesto la formación en la luz de un aducto muy estable entre Cbl y la proteína WT, que no se forma si la H132 no está presente (Figura 56D). Así pues, estos resultados refuerzan la observación derivada de estructura sobre la formación de un enlace atípico bis-His en el monómero fotolisado, en el que participa la H132.

La formación por la proteína TtCarH WT de un complejo fuerte y estable con la la AdoCbl fotolisada lleva asociada la incapacidad de sustituirla por AdoCbl intacta para poder regenerar el tetrámero (Ortiz-Guerrero, 2013). Para comprobar si, como cabría esperar, dicho intercambio se ve facilitado en el mutante H132A, se realizaron ensayos de EMSA. En efecto, comparada con la proteína WT, la versión mutada sí fue capaz de llevar a cabo el intercambio por AdoCbl de la forma fotolisada, a juzgar por la reaparición de la banda retrasada en la parte más alta del gel (Figura 57).

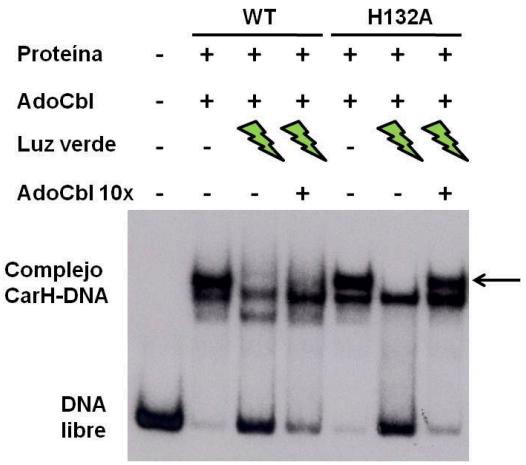


Figura 57. La ligación bis-His impide el intercambio de la Cbl en TtCarH. Ensayo de EMSA con 200 nM de proteína incubada previamente con AdoCbl 5x (1 µM) durante 30 min a 30 ºC. Las muestras fueron iluminadas con luz verde (520 nm) durante 5 min y con una intensidad de 10 W/m^2. Después de la iluminación las muestras fueron incubadas con AdoCbl 10x durante 30 min a 30 ºC. La flecha negra indica la banda más retrasada.

La retención de la Cbl por la ligación bis-His podría ser beneficiosa para su conservación y reutilización *in vivo*, pues se trata de un compuesto energéticamente muy costoso de sintetizar. Sin embargo, la H132 está conservada en algunos homólogos de CarH pero en otros aparece sustituida por aminoácidos tan dispares como Ala, Glu o Gln (Figura 58A). Para comprobar si el cambio de H132 por E, el aminoácido en la posición equivalente en CarH de *M. xanthus* o de *Bacillus megaterium*, objeto de estudio también de este trabajo, tiene el mismo efecto que el cambio H132A ya analizado, se generó la versión mutada H132E. Los estudios de SEC revelaron que la formación de los tetrámeros en la oscuridad y los monómeros unidos a Cbl en la luz no se vio alterada por dicha mutación (Figura 58B y C). Al igual que con el mutante H132A, se llevó a cabo un ensayo de espectrometría de masas ESI-TOF con el mutante H132E. Como se observa en la Figura 58D, se obtuvo el mismo peso molecular (33133 Da, correspondiente a la forma apo) para las muestras previamente incubadas con AdoCbl en oscuridad y mantenidas en oscuridad o expuestas a la luz. Parece, por tanto, que el cambio de His132 por E, al igual que el cambio por A, provoca que la Cbl no quede fuertemente retenida en la forma fotolisada.

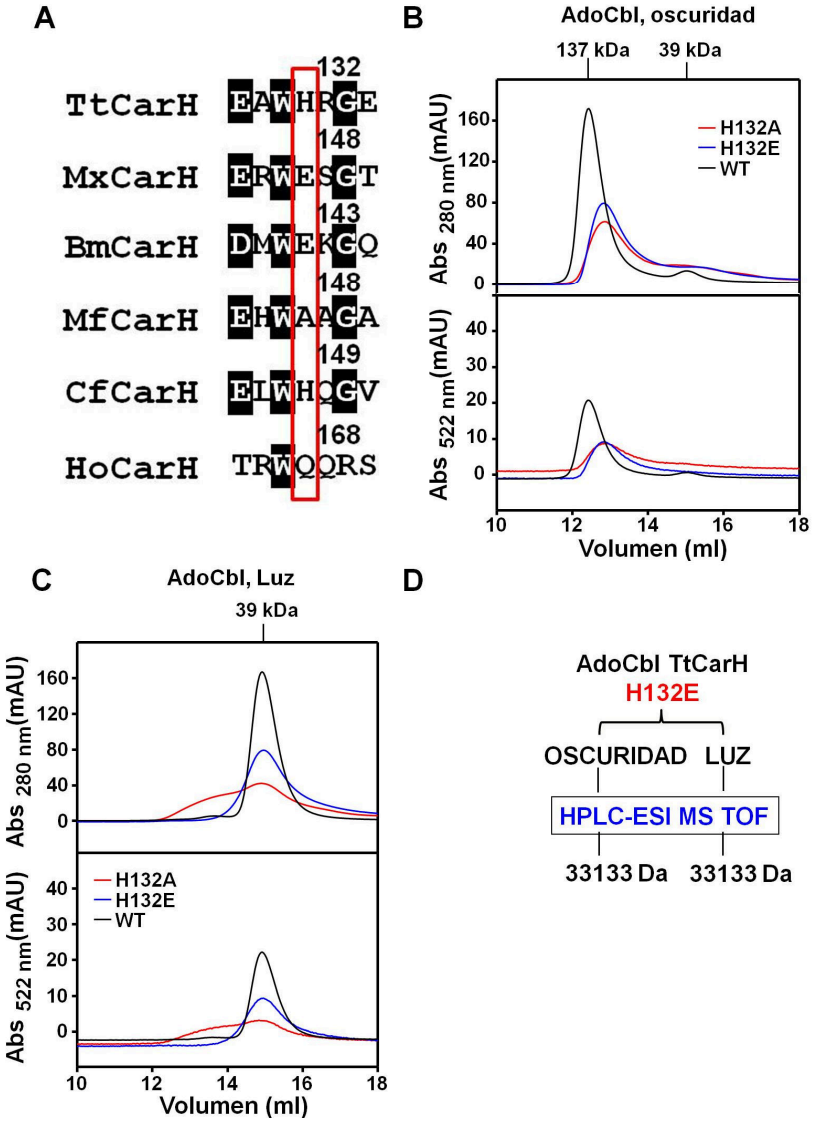


Figura 58. Análisis espectrofotométrico del mutante H132. (A) Alineamiento de la secuencia alrededor de His132 de TtCarH con otras proteínas homólogas. Abreviaturas: Mx, *M. xanthus*; Bm, *B megaterium*; Mf, *M. fulvus*; Ho, *H. ochraceum*. **(B)** Ensayo de SEC con las proteínas previamente incubadas con AdoCbl en oscuridad. La elución de los picos fue monitorizada mediante la absorbancia a 280 nm y 522 nm, para proteína y Cbl, respectivamente; igual para C. **(C)** Ensayo de SEC después de exponer a luz verde las muestras previamente incubadas con Cbl en oscuridad. **(D)** Análisis del efecto de la luz en TtCarH H132E mediante espectrometría de masas ESI-TOF. Las muestras en oscuridad y luz, previamente incubadas con AdoCbl en la oscuridad, se sometieron a HPLC de fase reversa acoplado a un espectrómetro de masas ESI-TOF. Los números indican el peso molecular observado.

III.2 Caracterización del modo de acción de la proteína CarH de *Bacillus megaterium*

El contenido incluido en este apartado deriva del artículo "Plasticity in oligomerization, operator architecture, and DNA binding in the mode of action of a bacterial B_{12}-based photoreceptor" por Jesús Fernández-Zapata *et al*., en *Journal of Biological Chemistry* (en prensa). Los análisis computacionales han sido realizados en colaboración con el grupo dirigido por el Prof. Modesto Orozco, IRB, Barcelona.

Para determinar si los cambios en el estado oligomérico dependientes de AdoCbl y luz, el inusual modo de unión al DNA y la fotoquímica establecida para TtCarH son aplicables a otros homólogos de CarH, es necesario abordar el estudio de otros miembros de esta nueva familia de fotorreceptores. Además de con CarA y CarH de *M. xanthus* (a las que se hará referencia como MxCarA y MxCarH, respectivamente, en este apartado), el grupo de investigación está realizando estudios con las proteínas homólogas de varias otras mixobacterias que, como se comentó en la Introducción, presentan un posible *carA* y *carH*, como *M. xanthus*, o solo un posible *carH*, como *T. thermophilus*. Ya que tanto *T. thermophilus* como las mixobacterias son bacterias Gram negativas, para ampliar el análisis de los miembros de la familia más allá de este grupo de bacterias, en esta tesis se ha abordado el estudio de una proteína homóloga a CarH de una bacteria Gram positiva. Para ello, se eligió *Bacillus megaterium* (estirpe DSM 32), que pertenece al *phylum Firmicute*s, en el que muchas especies (aunque no *Bacillus subtilis*) presentan homólogos a *carH* (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011; Padmanabhan *et al*., 2017); a la proteína homóloga de *B. megaterium* la denominamos BmCarH, para diferenciarla de TtCarH y de MxCarH. Al igual que *T. thermophilus*, y a diferencia de *M. xanthus*, *B. megaterium* es capaz de sintetizar B_{12} *de novo*. Por otro lado, aunque *B. megaterium* presenta genes carotenogénicos, estos se encuentran situados en un locus distinto a *BmcarH*. No obstante, acorde con una regulación por la luz de la síntesis de carotenos, la estirpe DSM 32 manifestó un cambio de color, de blanquecino a amarillento, cuando se cultivó en presencia de luz (Figura 59).

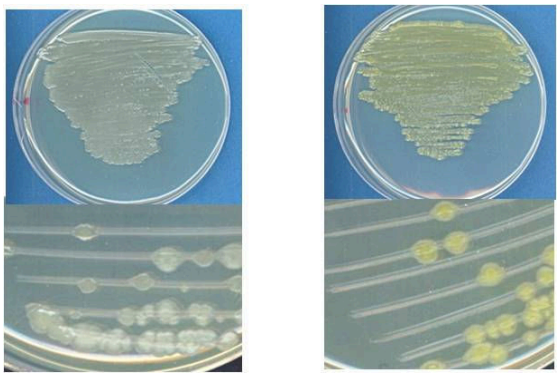


Figura 59. Cambio de color asociado a la exposición a la luz de la estirpe DSM 32 de *B. megaterium*. A la izquierda, placas y colonias incubadas en oscuridad. A la derecha, placas y colonias incubadas en luz.

Durante el transcurso de este trabajo se produjo la publicación de un artículo sobre el homólogo a CarH de la estirpe QM B1551 de *B. megaterium*, al que se denominó LitR (*light-induced transcription regulator*; en adelante, BmCarH) (Takano *et al*., 2015). En dicho artículo, se demuestra que BmCarH de la estirpe QM B1551, que es idéntico a BmCarH de la estirpe DSM 32 excepto en tres aminoácidos (Figura 60A), regula la expresión de manera dependiente de AdoCbl y luz de su propio promotor, (P_{BmcarH}) y del promotor de los genes carotenogénicos *crtI1-2-B* (P_{crtI}) (Figura 60B). Los autores proponen que dicha regulación está mediada por la unión de BmCarH a una pseudo-repetición invertida de 28 pb (Figura 60C) (Takano *et al*., 2015). Sin embargo, como se demuestra más adelante en este trabajo, BmCarH se une a una región de mayor tamaño que la propuesta por Takano *et al*., (2015), y a DRs de 11 pb (en vez de a palíndromes), al igual que TtCarH, aunque mostrando una plasticidad inesperada.

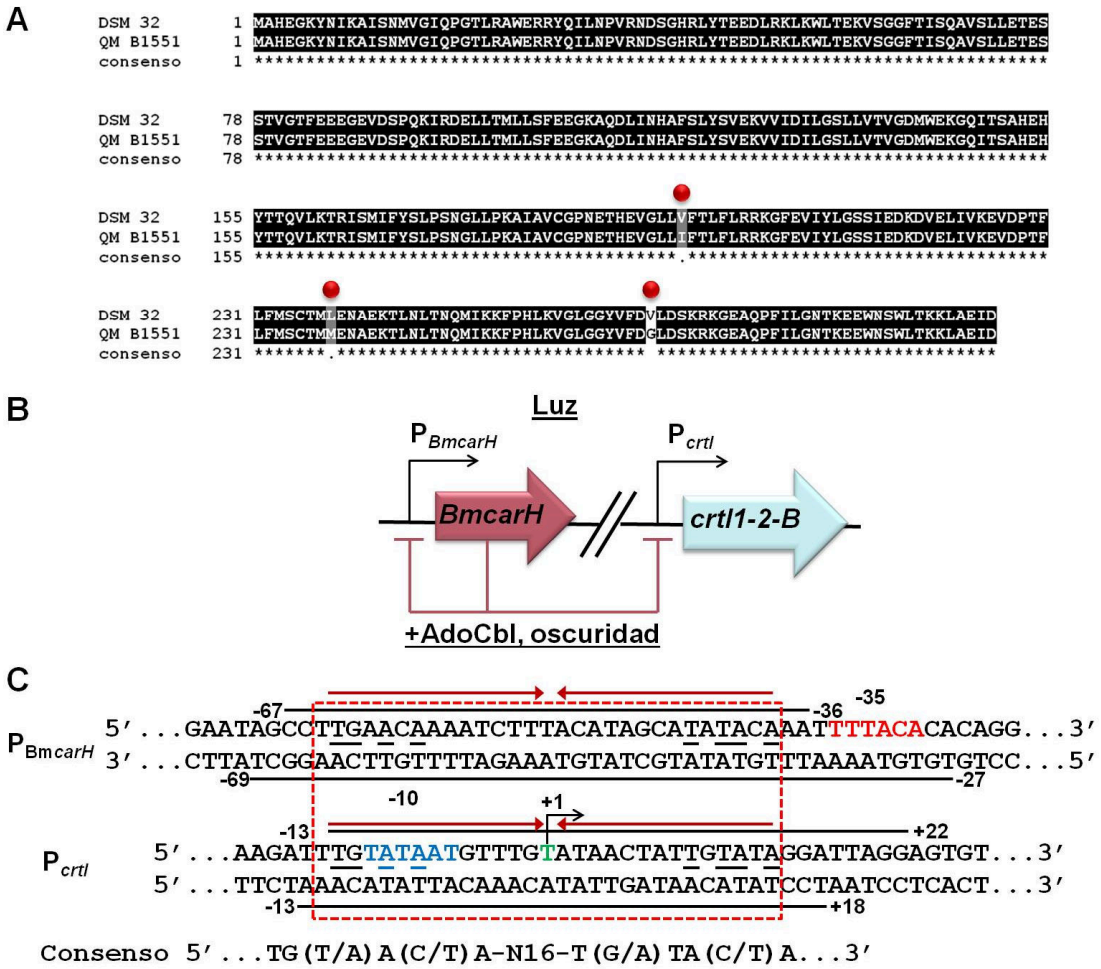


Figura 60. Regulación de la expresión génica por BmCarH. (A) Alineamiento de la secuencia aminoacídica de BmCarH de las estirpes DSM 32 y QM B1551. En negro: los residuos idénticos (*); en gris: los residuos conservados (.). **(B)** Modelo de regulación de la expresión de *BmcarH* y *crtI1-2-B* por BmCarH. **(C)** Región operadora propuesta por Takano *et al*., (2015) para la unión de BmCarH en P_{BmcarH} y P_{crtI}. En rojo: la región -35; en azul: la región -10; en verde: el sitio de inicio de la transcripción. Las líneas negras muestran la zona protegida de la digestión por DNasa I según Takano *et al*., (2015). Recuadrada por una línea roja discontinua se indica la secuencia consenso propuesta, mostrándose subrayadas las posiciones conservadas. Las flechas rojas muestran las teóricas secuencias palindrómicas. Imagen modificada de Takano *et al*., (2015).

Un aspecto interesante del trabajo realizado por Takano *et al*., (2015) fue la observación de que BmCarH, a diferencia de TtCarH, es ya un aparente tetrámero en la forma apo, que continúa siendo un tetrámero en la oscuridad en presencia de AdoCbl, y se convierte en un dímero cuando se expone a la luz. Sin embargo, un punto llamativo de dicho estudio fue que el espectro de absorción en el rango ultravioleta-visible (UV-vis) de la AdoCbl unida a BmCarH resultó ser el mismo en oscuridad que en luz (Takano *et al*., 2015). Estos datos contravienen las propiedades espectroscópicas conocidas para la AdoCbl libre (Rury *et al*., 2015), o unida a TtCarH (Jost *et al*., 2015b; Kutta *et al*., 2015; Ortiz-Guerrero *et al*., 2011) y, como se

demuestra en este trabajo, probablemente se deben a la exposición inadvertida a la luz de las muestras presumiblemente “en la oscuridad”. A continuación, se describen los experimentos realizados en este trabajo que han permitido corroborar ciertos aspectos del modo de acción de BmCarH descritos por Takano *et al*., (2015), corregir otros, y aportar nuevos descubrimientos sobre el mecanismo molecular utilizado por BmCarH.

III.2.1 Conservación en BmCarH de los motivos de unión al DNA y a AdoCbl de TtCarH

La proteína BmCarH, cuya estructura tridimensional no ha sido determinada, presenta una estructura secundaria similar a la predicha para TtCarH (Figura 61) que, a su vez, coincide bien con los elementos de estructura secundaria observados en la estructura cristalográfica de TtCarH.

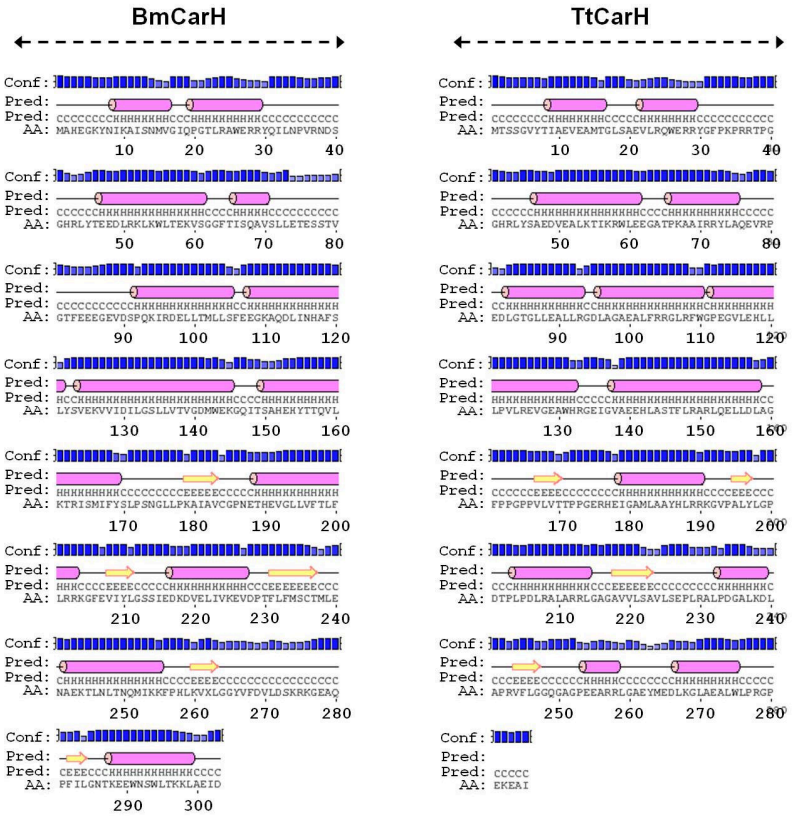


Figura 61. Estructura secundaria predicha para BmCarH en comparación con TtCarH. Predicción realizada usando PSIPRED. "AA" indica la secuencia de aminoácidos; "Pred", la estructura secundaria predicha. Las regiones sin estructura se marcan como "C" o con línea continua; las láminas ß, con una "E" o mediante flechas amarillas; las hélices, con "H" o barras rosas. "Conf" indica el nivel de confianza (barra azul) de la predicción para cada aminoácido.

El alineamiento con otros miembros de la familia (Figura 62) indica que BmCarH presenta el motivo conservado R-x-WE-x-RY-x6-R-x5-R-x-Y en el DBD, que ha sido implicado en la interacción con el DNA en el complejo TtCarH-DNA (Jost, *et al*., 2015b) o en el complejo entre el DBD de CarA y el DNA (Navarro-Avilés *et al*., 2007), sugiriendo que la unión al DNA es probable que se produzca de forma similar. BmCarH además presenta el motivo de unión a AdoCbl, W-x9-EH-x32-39-E-x-H-xx-G-x41-S-x-R/V-x(22-30)-GG, descrito como la seña de identidad de los módulos sensores de luz que se unen AdoCbl (Padmanabhan *et al*., 2017). En dicho motivo, la parte W-x(9)-EH interacciona con el grupo 5'-dAdo de la AdoCbl y participa activamente en la disociación del tetrámero después de la exposición a la luz. El resto, E-x-H-xx-G-x41-S-x-V-x(22-30)-GG, se corresponde con el motivo canónico de unión a Cbl descrito inicialmente para MetH (Drennan *et al*., 1994). Curiosamente, entre los residuos que en TtCarH (o MxCarH) están implicados en la oligomerización, R176 y D201 para la formación de los dímeros con disposición "cabeza-cola", y Gly160 y Gly192 para el ensamblaje del tetrámero, solo se conserva la Gly192 como Gly205 en BmCarH (Figura 62). La falta de estos aminoácidos podría estar involucrada en las diferencias en la oligomerización entre BmCarH y TtCarH.

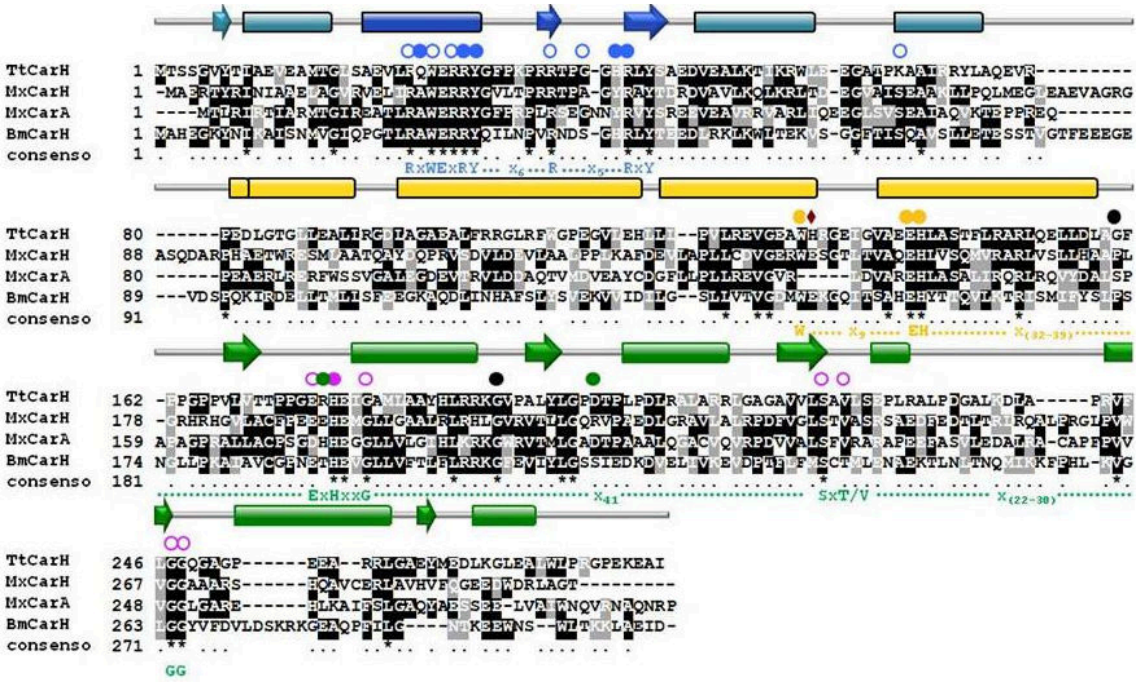


Figura 62. BmCarH conserva los motivos implicados en la unión al DNA y a AdoCbl. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de TtCarH, MxCarH, MxCarA y BmCarH (código de acceso en NCBI: WP_011174503, CAA79965, CA79964 y AJI20494, respectivamente). En negro: residuos idénticos (*); en gris: residuos conservados (.). La estructura secundaria se corresponde con la descrita para TtCarH. Los círculos representan residuos (con el interior coloreado han sido examinados mediante mutación) implicados en contactos con DNA (azul), 5'-dAdo (amarillo), en el desplazamiento del Dmb tipo *base-off His on* (magenta), en la interfaz del dímero (verde) y tetrámero (negro). BmCarH no conserva la H132 de TtCarH (rombo marrón). Se muestran los siguientes motivos conservados: de unión al DNA (azul), de interacción con el grupo 5'-dAdo (amarillo) y unión a Cbl descrito para la MetH (verde) (Drennan *et al*., 1994).

III.2.2 Oligomerización y unión al DNA de BmCarH

Al igual que TtCarH, BmCarH se pudo expresar y purificar en su forma activa a partir de la fracción soluble. Así, una primera aproximación para estudiar la oligomerización de BmCarH fue la realización de ensayos de SEC. Previamente, se confirmó por espectrometría de masas que el peso molecular de la proteína purificada coincidía con el calculado a partir de su secuencia (36,3 kDa). La versión apoproteica de BmCarH (apoBmCarH) eluyó con un peso molecular aparente, *M*r, de 109 kDa, más cercano al tetrámero, que al monómero observado para TtCarH en las mismas condiciones (Figura 63A y B). Por otro lado, unida a AdoCbl en la oscuridad presentó un *M*r de 138 kDa, compatible con el tetrámero, pero en la luz presentó un *M*r de 78 kDa, que correspondería a un dímero, en vez de al monómero observado para TtCarH (Figura 63A y B). Estos resultados confirman, por tanto, los estados oligoméricos descritos para BmCarH por Takano *et al*., (2015). La cuantificación de la concentración

de proteína (método de Bradford) y de Cbl (absorbancia UV-vis) a partir de los picos recolectados en los ensayos de SEC permitió determinar una estequiometría de unión BmCarH-AdoCbl de 1:1, como en el caso de TtCarH. Como se muestra en la Figura 63C, BmCarH también puede unirse a MeCbl, pero ello provoca la formación de dímeros no solo en la luz sino también en la oscuridad.

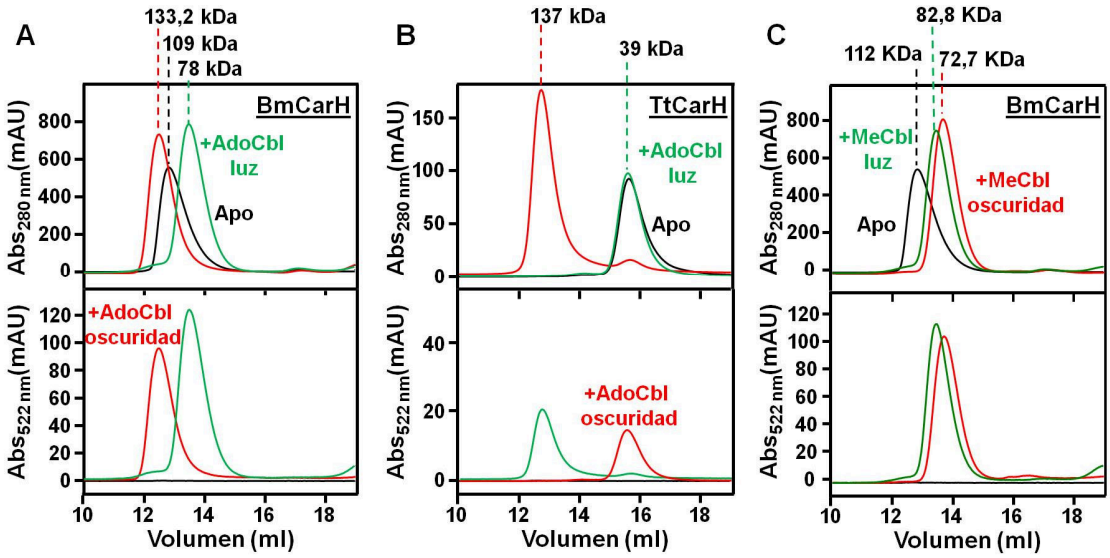


Figura 63. Comparación del comportamiento en SEC de BmCarH y TtCarH en diferentes condiciones. Ensayos de SEC (columna analítica Superdex200): con la forma Apo (línea negra), con AdoCbl en oscuridad (línea roja) y después de 5 min de exposición a luz verde (520 nm) con una intensidad de 10 W/m^2 (línea verde). **(A)** BmCarH. **(B)** TtCarH. **(C)** BmCarH con MeCbl como Cbl. Los valores de *M*r se muestran en la parte superior de las gráficas. La elución de los picos fue monitorizada mediante la absorbancia a 280 nm y 522 nm para la proteína y Cbl, respectivamente.

A diferencia de los datos publicados por Takano *et al*., (2015), los espectros de absorción en el rango UV-vis obtenidos en este trabajo mostraron diferencias claras entre el espectro de BmCarH-AdoCbl en la oscuridad y tras la exposición a la luz, consistentes con los cambios descritos entre ambas condiciones para la AdoCbl en solución (Ludwig & Matthews, 1997) y unida a TtCarH (Jost *et al*., 2015b; Ortiz-Guerrero *et al*., 2011) (Figura 64A y B). Más aún, mediante la iluminación progresiva de BmCarH-AdoCbl a distintos tiempos, pudo observarse la fotoconversión de la forma en oscuridad a la forma en la luz (Figura 64C), coincidiendo los puntos isosbésticos con los descritos para TtCarH-AdoCbl (Kutta *et al*., 2015). Para estudiar la oligomerización de BmCarH también *in vivo*, se llevó a cabo un ensayo de DHB en *E. coli*, utilizando como controles MxCarA y MxCarH. En consonancia con los datos de SEC *in vitro*, la proteína BmCarH mostró una interacción independiente de AdoCbl y

luz *in vivo*, al igual que MxCarA, y a diferencia de TtCarH y MxCarH (Figura 64D) (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011).

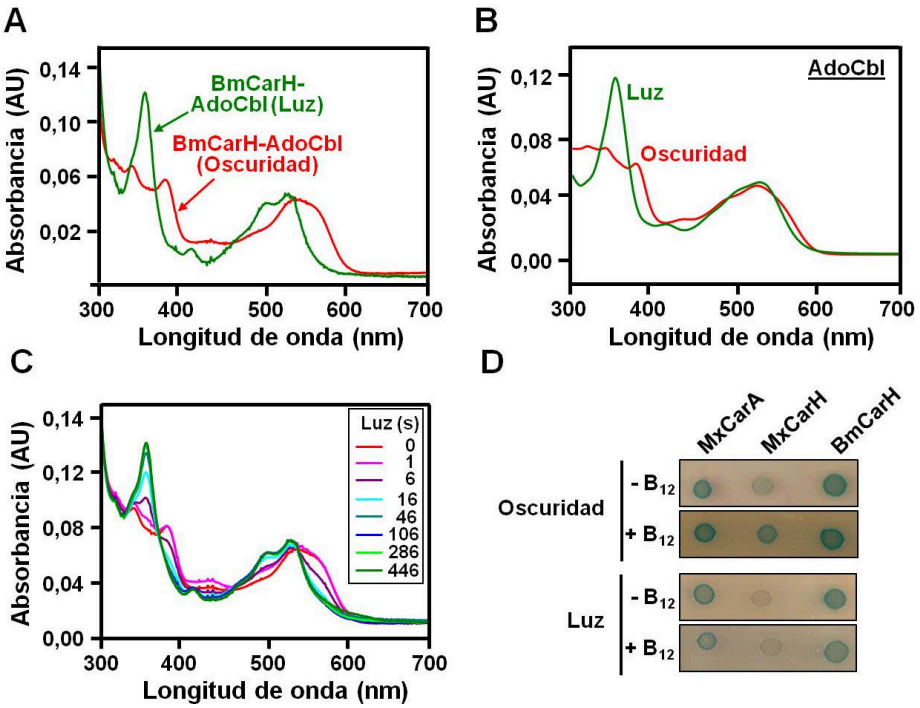


Figura 64. Espectros de absorción de UV-visible de BmCarH y oligomerización de BmCarH *in vivo*. Espectro de absorción de AdoCbl en oscuridad (línea roja) y después de 5 min de iluminación con luz verde (línea verde), unida a BmCarH **(A)** o libre **(B)**. **(C)** Fotoconversión de AdoCbl unida a BmCarH iluminada con luz verde (520 nm) a diferentes tiempos (s: segundos) **(D)** Ensayo de DHB en *E. coli* con células que expresan BmCaH fusionadas a T25 y T18. Como control se utilizó MxCarH y MxCarA. Se sembraron gotas de 7 µl en placas con X-Gal en presencia o ausencia de vitamina B_{12} y fueron incubadas tanto en oscuridad como en luz. El color azul indica interacción.

Para estudiar el modo de unión de BmCarH a P_{BmcarH} y P_{crtI}, en primer lugar se realizaron ensayos de EMSA utilizando fragmentos de 170 pb como sondas. En los fragmentos correspondientes a ambos promotores, solo se observó la aparición de una banda retrasada definida en presencia de AdoCbl. Los resultados de este trabajo indican que BmCarH se une con mayor afinidad a P_{crtI} que a P_{BmcarH}, ya que con P_{BmcarH} fue necesario añadir una concentración 5 veces mayor de BmCarH para obtener una banda retrasada de la misma intensidad que con P_{crtI} (Figura 65A). La exposición a luz de longitudes de onda a las que absorbe AdoCbl (ultravioleta, azul y verde, pero no roja) provocó la desaparición de la banda retrasada (Figura 65B). Estos resultados indican que, aunque BmCarH forma un dímero en la luz, y no un monómero como TtCarH, el dímero fotolisado no es capaz de unirse al DNA. Tampoco fue capaz de hacerlo el dímero que se genera por la unión de BmCarH a MeCbl (Figura 65C).

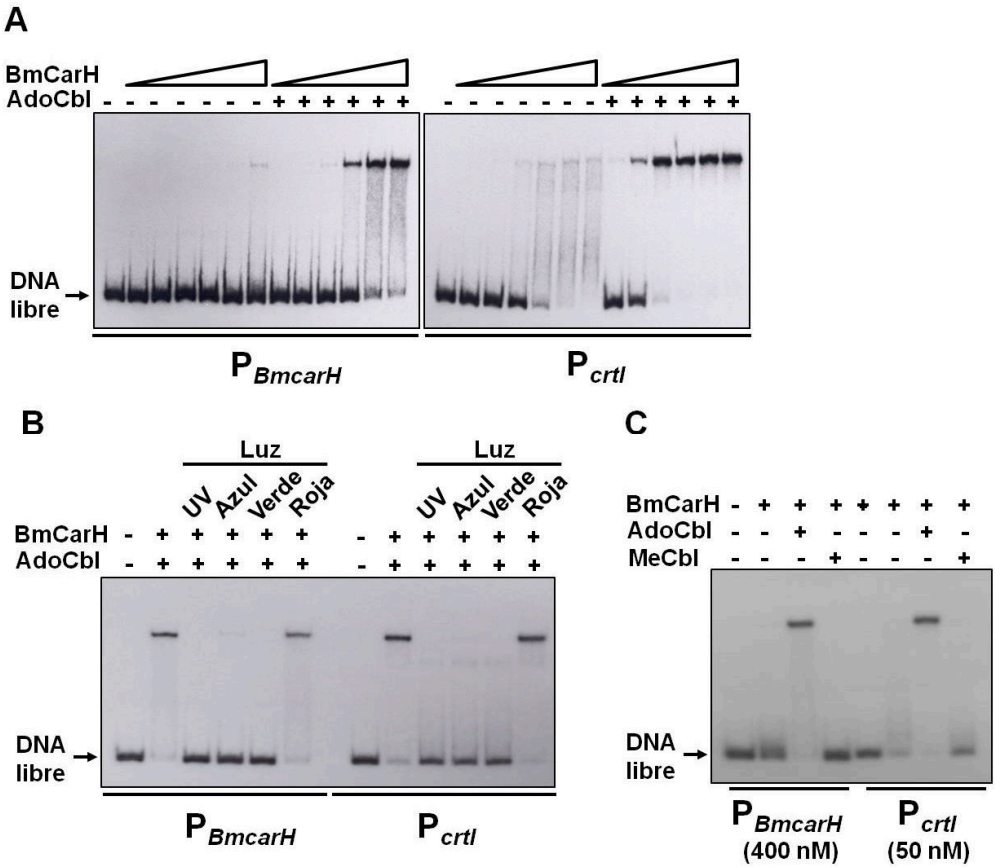


Figura 65. Análisis mediante EMSA de la unión *in vitro* de BmCarH a P_{BmcarH} y P_{crtI}. (A) EMSA en oscuridad usando fragmentos de 170 pb de las regiones promotoras P_{BmcarH} y P_{crtI}. Se utilizaron concentraciones crecientes de BmCarH (12,5; 25; 50; 100; 200; 400 nM) con o sin AdoCbl (a una concentración cinco veces superior a la de proteína) e incubadas a 37 ºC durante 30 min. **(B)** EMSA para evaluar el efecto de la luz UV (360 nm), azul (405 nm), verde (520 nm) y roja (660 nm) en la unión de BmCarH a P_{BmcarH} (400 nM de proteína) y P_{crtI} (50 nM de proteína). Las muestras fueron incubadas a 37 ºC durante 30 min con AdoCbl (a una concentración cinco veces superior a la de proteína) en oscuridad y, posteriormente, iluminadas durante 5 min. **(C)** EMSA en oscuridad para comparar el efecto de MeCbl con el de AdoCbl. Se indican las concentraciones de BmCarH utilizadas.

III.2.3 ApoBmCarH es un glóbulo fundido

Resulta sorprendente que BmCarH, en ausencia de AdoCbl, sea capaz de formar un aparente tetrámero que, sin embargo, es incapaz de unirse al DNA. Aparte de los residuos no conservados, una posible explicación a este comportamiento podría derivar de diferencias estructurales entre apoBmCarH y BmCarH unida a AdoCbl. Para determinarlo, se llevaron a cabo estudios de dicroísmo circular (CD) y espectroscopía de fluorescencia con apoBmCarH y BmCarH unida a AdoCbl, tanto en oscuridad como en luz. Los ensayos de CD en el ultravioleta lejano (CD-UV lejano, 180-250 nm) permiten diferenciar las principales estructuras secundarias presentes en las proteínas (hélices α, lámina paralela y antiparalela β, giros β e incluso regiones desorganizadas)

(Kelly *et al*., 2005). El espectro de BmCarH en cualquiera de sus formas mostró valores mínimos a 208 y 222 nm, consistente con la presencia de un contenido significativo de hélices α (Schmid, 1997) (Figura 66). La elipticidad molar media por residuo a 222 nm ($[\theta]_{222}$ en $degcm^2\ dmol^{-1}$), que está correlacionada con el contenido en hélices α (Rohl & Baldwin, 1997), fue -15,300 (~42%) para BmCarH-AdoCbl en oscuridad y expuesta a la luz, y algo más baja para apoBmCarH (-11,600; ~33 %).

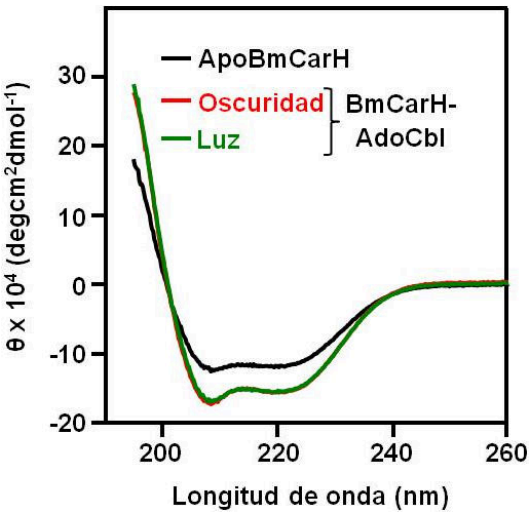


Figura 66. Ensayo de dicroísmo circular en el UV lejano con BmCarH. Se utilizó una concentración de 3-4 µM de apoBmCarH (línea negra), incubada con AdoCbl (15-20 µM) en oscuridad (línea roja) o después de ser expuesta a luz verde (línea verde).

Los ensayos de CD UV-cercano (250-320 nm) se basan en la absorción específica en regiones del espectro por las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos, principalmente el Trp (BmCarH posee cinco aminoácidos Trp). Si la proteína se encuentra bien plegada, el espectro correspondiente está bien definido y muestra una estructura fina. El complejo BmCarH-AdoCbl, en oscuridad y expuesto a luz, dio lugar a un espectro de absorción típico de proteínas bien plegadas (con las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos bien orientadas); la forma apoBmCarH, sin embargo, mostró un espectro peor definido, lo que refleja una conformación poco compacta (Figura 67 A) (Baldwin & Rose, 2013).

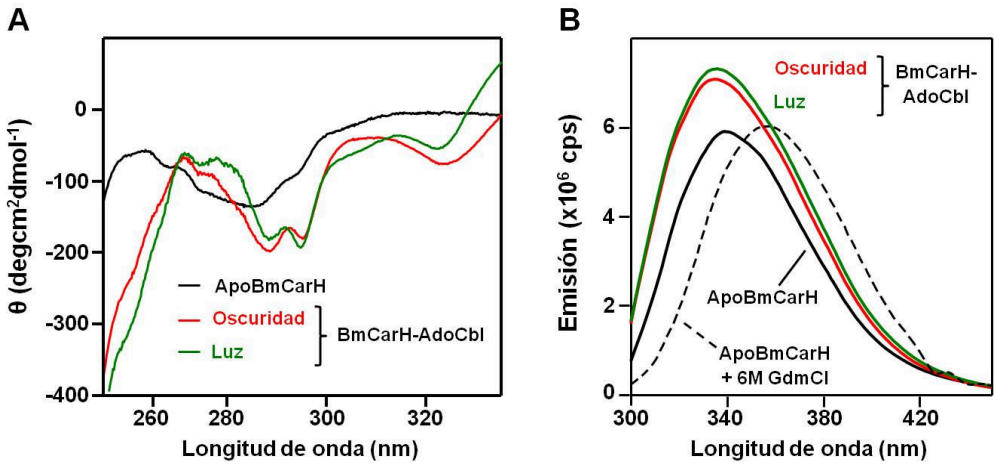


Figura 67. Ensayos de dicroísmo circular en el UV cercano y espectroscopía de fluorescencia intrínseca de Trp. (A) Espectros de CD UV-cercano con apoBmCarH (16 µM, línea negra), y BmCarH-AdoCbl (27 µM) en oscuridad (línea roja) y después de ser expuesta a luz verde (522 nm) durante 5 min (línea verde). **(B)** Espectro de emisión de fluorescencia intrínseca de Trp (excitación a 290 nm) de 2 µM de apoBmCarH, BmCarH-AdoCbl oscuridad y luz, y apoBmCarH en 6 M de cloruro de guanidinio.

La estructura terciaria de BmCarH se evaluó también mediante el análisis de la fluorescencia intrínseca del triptófano. La forma apo y holoproteica de BmCarH en la oscuridad o en la luz mostraron un máximo de emisión de fluorescencia a 337 ± 2 nm, comparado con el máximo de emisión a 356 nm observado para apoBmCarH desnaturalizada en presencia de 6 M de cloruro de guanidinio. Además del desplazamiento de la emisión máxima, la forma desnaturalizada mostró una bajada en la intensidad (20%) en relación a la holoproteína (Figura 67B). Por lo tanto, los resultados indican que los Trp de BmCarH están protegidos del solvente en las tres formas nativas (Schmid, 1997).

Los resultados de los ensayos anteriores sugieren que, en comparación con las formas unidas a Cbl, apoBmCarH presenta una estructura menos compacta. Dicha estructura podría corresponder a un glóbulo fundido, que es una forma altamente dinámica, con una estructura secundaria similar a la nativa pero con un núcleo proteico más laxo y accesible al solvente (Baldwin & Rose, 2013). El ensayo clásico para demostrar el estado de glóbulo fundido se basa en su fuerte afinidad por el compuesto 1-anilino-naftaleno-8-sulfonato (ANS), debido a que ANS puede acceder con mayor facilidad al núcleo hidrofóbico en el glóbulo fundido que en la proteína nativa (Goto & Fink, 1989; Semisotnov *et al*., 1991). Como consecuencia de la unión, se produce un aumento significativo en la fluorescencia del ANS y un desplazamiento hacia la región azul del espectro. En comparación con el espectro de emisión de ANS, con un máximo a 527 nm, los espectros de emisión de ANS en presencia de BmCarH-AdoCbl en

oscuridad y luz mostraron valores máximos a 482 nm y 489 nm, respectivamente, y un ligero incremento en la intensidad (30 %). Con apoBmCarH se produjo, además del desplazamiento del máximo de emisión a 481 nm, un incremento del 500% en la intensidad (Figura 68A). ApoBmCarH es, por tanto, un glóbulo fundido oligomérico, con una estructura diferente a la del tetrámero unido a AdoCbl, lo que podría explicar su incapacidad para unirse al DNA.

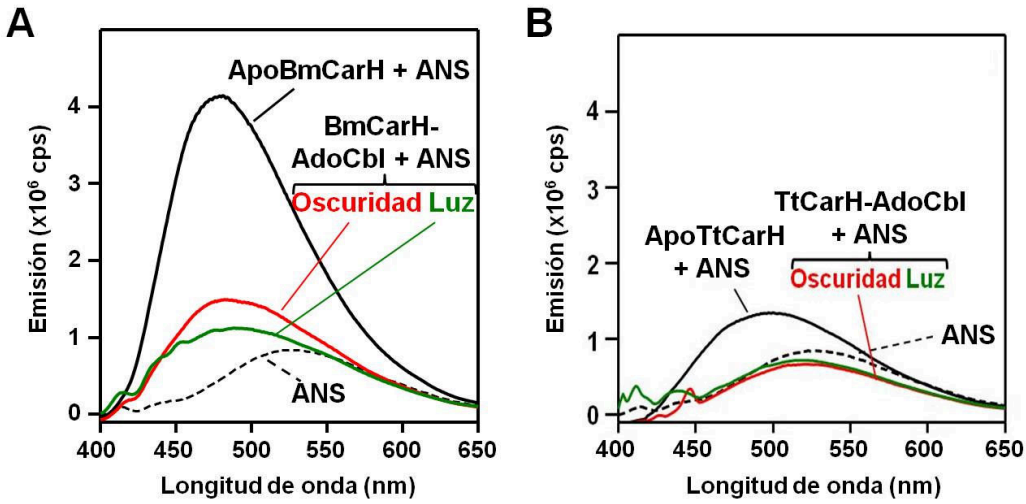


Figura 68. Ensayo de fluorescencia con ANS y BmCarH o TtCarH. (A) Se muestran los espectros de emisión (400-650 nm, excitación a 370 nm) de 20 µM de ANS sin proteína (línea discontinua) y en presencia de 2 µM de apoBmCarH (línea negra) y BmCarH-AdoCbl en oscuridad (línea roja) o expuesta a la luz verde (520 nm; línea verde) durante 5 min. **(B)** Como A, pero con TtCarH.

En comparación, la forma apoproteica de TtCarH (monómero), cuya estructura a alta resolución se desconoce, produjo una señal mucho menos intensa que apoBmCarH, con un incremento <60% respecto a la fluorescencia del ANS sin proteína o con proteína unida a AdoCbl, lo que pone de manifiesto una menor naturaleza de glóbulo fundido (Figura 68B).

III.2.4 Importancia funcional del motivo W-x(9)-EH en BmCarH

Como se demostró en los apartados III.1.1.1 y III.1.1.3, el motivo W-x(9)-EH es crucial para la interacción de TtCarH con AdoCbl y, por tanto, también para la formación del tetrámero y la unión al DNA. Puesto que dicho motivo está conservado en BmCarH (Figuras 62 y 69A), a pesar de que la unión a AdoCbl no va asociada a un cambio de monómero a tetrámero, se analizó el efecto de las mutaciones a alanina de cada uno de los tres residuos equivalentes (W143, E153, H154); además, se analizó la

mutación de E153 a aspártico, un cambio conservativo que no está presente en ninguno de los homólogos a CarH y cuyo efecto no se había analizado previamente.

Un primer ensayo de CD UV-lejano con las proteínas mutantes mostró un espectro similar al de la proteína silvestre. Sin embargo, la adición de AdoCbl no produjo cambios significativos, a diferencia del WT (Figura 69B). Los ensayos con ANS de las proteínas mutantes en su forma apo indicaron el estado de glóbulo fundido previamente observado con apoBmCarH WT. Sin embargo, la adición de AdoCbl solo produjo un descenso en la emisión de fluorescencia para el mutante H154A que, por tanto, constituye el único de los cuatro mutantes capaz de adoptar la forma completamente plegada (Figura 69C).

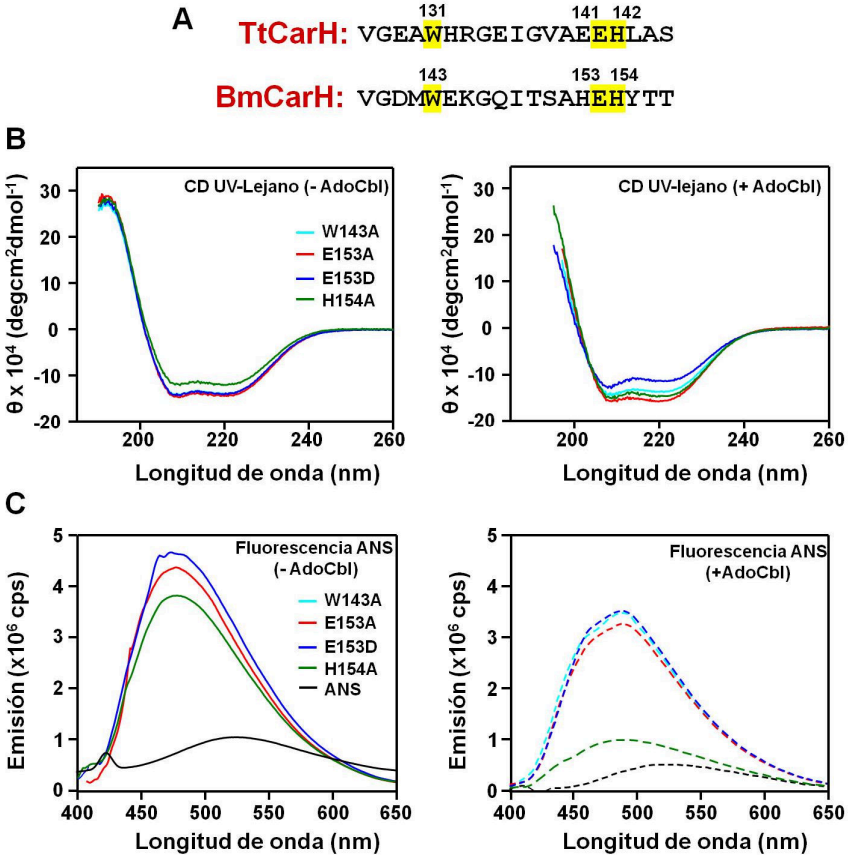


Figura 69. Análisis de los mutantes de BmCarH en ausencia y presencia de AdoCbl usando CD UV-lejano y espectroscopía de fluorescencia con ANS. (A) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de TtCarH y BmCarH que incluye a los residuos que interaccionan con el grupo 5'-dAdo. **(B)** Espectros de CD UV-lejano con 3-4 μM de las versiones mutadas W143A, E153A, E153D, y H154A en ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de AdoCbl (15-20 μM). **(C)** Espectros de la emisión de fluorescencia (excitación a 370 nm) de 2 μM de ANS sin proteína o en presencia de 2 μM de cada una de las versiones mutadas de BmCarH, sin AdoCbl (izquierda) o en presencia de 10 μM de AdoCbl (derecha).

La incapacidad de estos mutantes para adquirir un plegamiento correcto podría estar relacionada con un defecto en la unión a AdoCbl. Mediante SEC se observó que, en ausencia de AdoCbl, todos los mutantes presentaron el mismo *M*r de 109 kDa que la proteína WT (Figura 70A). Sin embargo, en presencia de AdoCbl, solo el mutante H154A eluyó con un *M*r de 138 kDa y asociado a AdoCbl, como la proteína WT; los otros mutantes no mostraron nada de unión a AdoCbl, lo que explica que su perfil de elución coincida con el de la forma apo (Figura 70B). Curiosamente, tras la exposición a la luz se recuperó la unión a Cbl, observándose la aparición de dímeros con todos los mutantes (78 kDa) (Figura 70C), confirmando así la importancia de los residuos mutados para el reconocimiento específico de la AdoCbl no fotolisada. Que la mutación conservativa E153D provoque la falta de unión a AdoCbl revela la importancia de que haya necesariamente un glutámico en el motivo W-x(9)-EH. Quizás se deba a que la cadena lateral más corta del aspártico no permita la formación del puente de hidrógeno con la ribosa del grupo 5´-dAdo que sí forma el glutámico en la estructura de TtCarH.

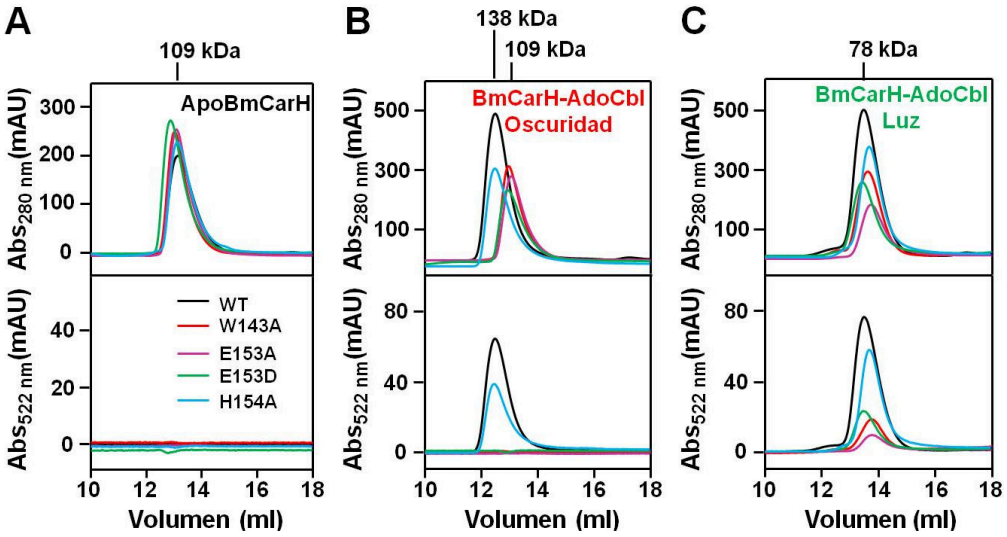


Figura 70. Ensayos de SEC con los mutantes en el motivo W-x(9)-EH de BmCarH. Se utilizó una columna analítica Superdex200 con los mutantes de BmCarH indicados y la proteína silvestre (WT). La elución de los picos fue monitorizada mediante la absorbancia a 280 nm y 522 nm, para proteína y Cbl, respectivamente. **(A)** Forma apo. **(B)** BmCarH-AdoCbl en oscuridad. **(C)** BmCarH-AdoCbl tras la iluminación durante 5 min con luz verde (520 nm) a una intensidad de 10 W/m^2.

Si bien el mutante H154A no pareció mostrar un comportamiento anómalo en los ensayos SEC, el análisis más detallado de su unión a AdoCbl puso de manifiesto un defecto significativo en su afinidad. Para dicho análisis, se explotaron las diferencias conocidas entre el espectro de absorción de AdoCbl libre o unida a TtCarH (Kutta *et al*., 2015). El análisis de la transición entre estos dos estados puso de

manifiesto una afinidad del mutante H154A de BmCarH por AdoCbl (K_D~850 nM) unas cuatro veces inferior a la de BmCarH silvestre (K_D~210 nM) (Figura 71). Por lo tanto, la H154 también es importante en la unión a AdoCbl, aunque no de forma tan crítica como en TtCarH, en el que la mutación equivalente (H142A) impidió completamente la formación de tetrámeros, la unión a AdoCbl y al DNA.

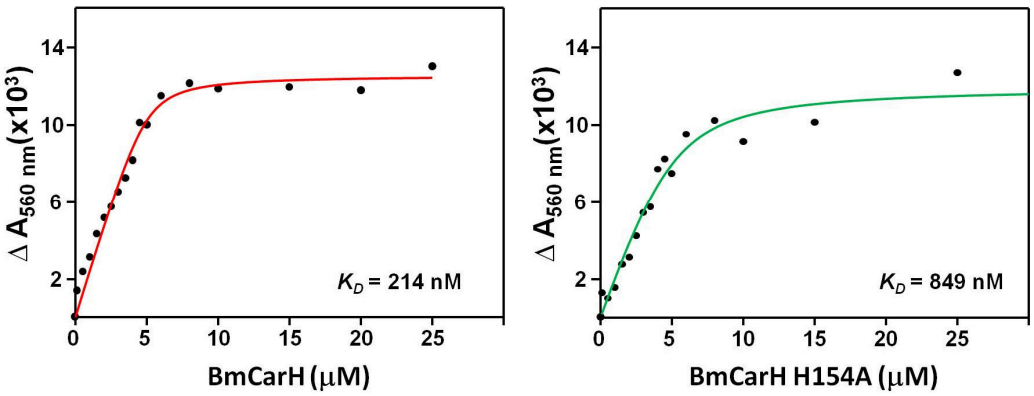


Figura 71. Ensayos de afinidad de BmCarH (izquierda) y del mutante H154A (derecha) por AdoCbl mediante espectroscopía UV-vis. Se analizaron las diferencias en los espectros de absorción a 560 nm para muestras con una concentración fija de AdoCbl (5 μM) y concentraciones crecientes de proteína (0,1-25 μM). Se indica el valor medio de K_D de tres ensayos.

Dado que la unión de BmCarH a AdoCbl es necesaria para que se produzca la unión al DNA, a continuación de realizaron ensayos de EMSA para analizar la unión de los mutantes a P_{BmcarH} y P_{crtI}. Así, los mutantes de BmCarH que no fueron capaces de unirse a AdoCbl (W143A, E153A y E153D) tampoco fueron capaces de unirse al DNA para generar una banda retrasada definida, a ninguna de las concentraciones de proteína utilizadas (Figura 72). Acorde con su menor afinidad por AdoCbl, el mutante H154A mostró también una unión defectuosa a cualquiera de los dos fragmentos y concentraciones de proteínas ensayadas. Estos resultados corroboran la importancia del motivo W-x(9)-E para la función de BmCarH.

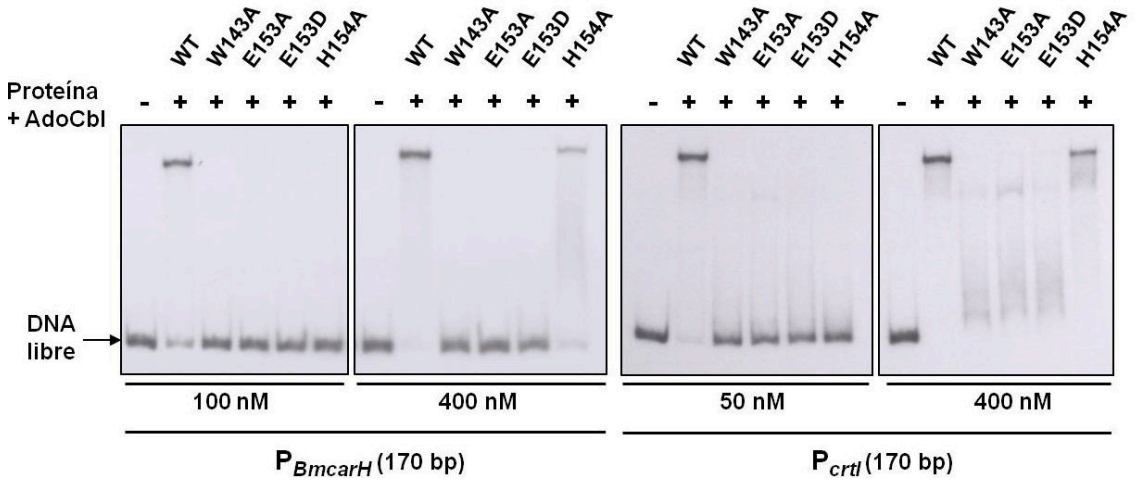


Figura 72. Análisis de la unión a P_{BmcarH} y P_{crtI} de los mutantes en el motivo de unión a AdoCbl. Ensayo de EMSA con BmCarH y AdoCbl (concentración cinco veces superior a la de proteína) incubada a 37 ºC durante 30 min. En la parte inferior de las autorradiografías se indican las concentraciones de proteína utilizadas.

El análisis del efecto de las mutaciones en BmCarH se realizó utilizando *M. xanthus* como sistema heterólogo y la misma estrategia seguida previamente para estudiar el efecto de las mutaciones en MxCarH, con la salvedad de que la estirpe recipiente fue MR2648. Dicha estirpe, además de presentar las deleciones Δ*carA* Δ*carH* Δ*carS*, presenta también la deleción de *pduo*, que determina la adenosiltransferasa responsable de añadir el grupo adenosilo a la AdoCbl. Por ello, para el estudio del efecto de las mutaciones ha de añadirse específicamente AdoCbl al medio. Dado que BmCarH no es capaz de unirse *in vitro* a la región operadora de P*B*, los ensayos de complementación se realizaron con una quimera formada por el DBD, la región conectora de MxCarH y el dominio C-terminal sensor de luz de BmCarH (Figura 73A) que sí es capaz de unirse a P*B*, CBm (Figura 73B).

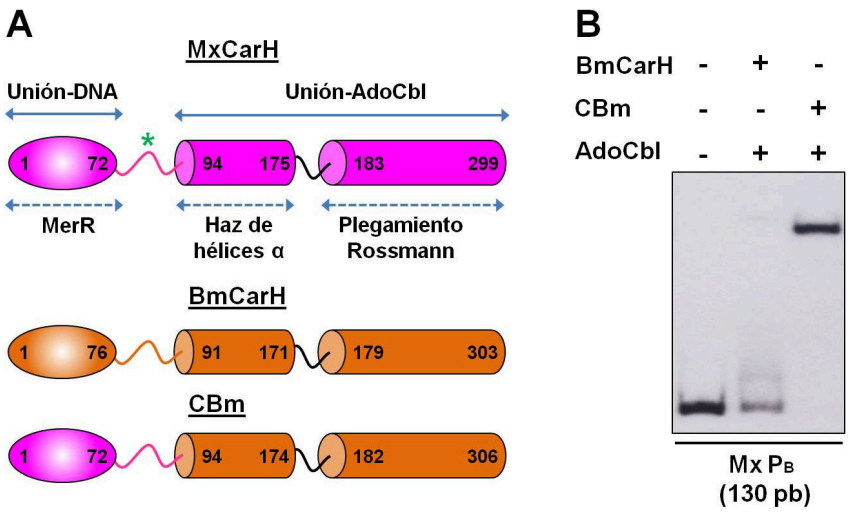


Figura 73. Análisis de la unión de la proteína quimérica CBm al promotor P_B de *M. xanthus*. (A) Esquema de la arquitectura de la quimera CBm. **(B)** Ensayo de EMSA para analizar la unión de BmCarH y CBm (400 nM) en presencia de AdoCbl (2 μM) a un fragmento del promotor P_B de 130 pb que contiene el operador de MxCarH; las reacciones se incubaron a 37 ºC en la oscuridad durante 30 min.

Como cabía esperar del comportamiento *in vitro* de la quimera CBm, su expresión en *M. xanthus* bajo el control del promotor inducible por vanilato y en presencia de AdoCbl restauró la represión de la carotenogénesis en oscuridad (Figura 74A). Por el contrario, ninguno de los mutantes (incluido H154A) fue capaz de complementar la falta de MxCarH, a pesar de que las proteínas se expresaron de manera estable en *M. xanthus* (Figura 74B). Así pues, tanto los ensayos *in vitro* como *in vivo* ponen de manifiesto la importancia del motivo W-x(9)-EH para el correcto funcionamiento de BmCarH.

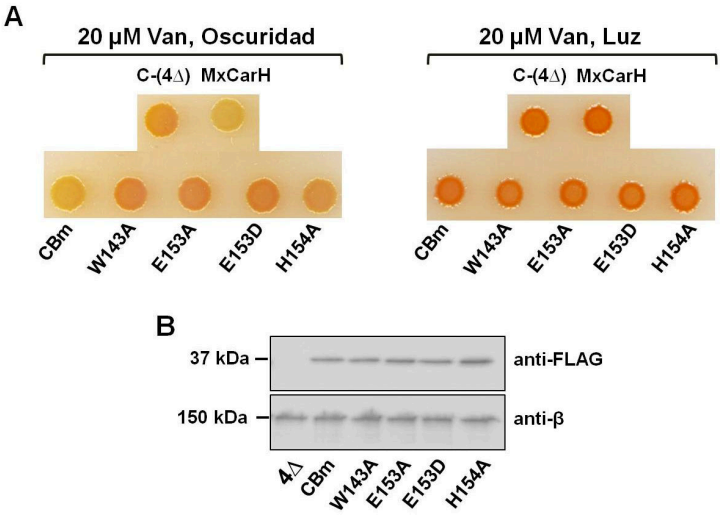


Figura 74. Ensayos de complementación en *M. xanthus* para evaluar *in vivo* el efecto de las mutaciones en el motivo de unión a AdoCbl de BmCarH. **(A)** Análisis del fenotipo (color) de la estirpe MR2648 sin (control negativo "C-4Δ") o con el gen que determina CBm, o los mutantes W143A, E153A, E153D o H154A. Como control positivo se empleó MR2648 que expresa MxCarH. Todas las construcciones poseen el gen de interés con la etiqueta FLAG en el extremo 5´ bajo el control de un promotor inducible por vanilato. Las placas de CTT sólido suplementado con AdoCbl (1 µM) y vanilato (20 µM) fueron inoculadas con gotas (10 µl) de cada una de las estirpes e incubadas a 33 ºC en oscuridad o en luz. **(B)** *Western blot* de extractos celulares de las estirpes de *M. xanthus* que expresan CBm y sus versiones mutadas crecidas en oscuridad hasta $D.O._{550}$=0,7 en CTT líquido con 1 µM de AdoCbl y 20 µM de vanilato. Para la detección de Cbm y sus mutantes se utilizaron anticuerpos anti-FLAG; como control de carga se utilizaron anticuerpos que reconocen la subunidad β de la RNAP.

Como se comentó en el apartado III.1.3.2, un hallazgo inesperado en la estructura del monómero fotolisado de TtCarH fue la observación de un enlace bis-His con el Co, en el que participa, además de la H177 del subdominio Rossmann, la H132 que se encuentra adyacente al W (W131) del motivo W-x(9)-EH. Dicha histidina es fundamental para que, como consecuencia del enlace bis-His, la Cbl resultante de la fotólisis quede fuertemente retenida en el monómero de TtCarH. Sin embargo, dicha histidina no está conservada en muchos homologos, entre los que se encuentra BmCarH, que presenta un glutámico (E144) en su lugar (al igual que MxCarH; Figura 58A). Con TtCarH ya se demostró que el cambio de la H132 por E se traduce en que la Cbl no quede fuertemente retenida en la forma fotolisada, por lo que cabría esperar que tampoco se retenga en BmCarH. Para comprobarlo, se realizaron ensayos mediante espectrometría de masas y EMSA. Como puede observarse en la Figura 75A, BmCarH unida a AdoCbl mostró el mismo tamaño (36296 Da) en la oscuridad que tras la exposición a la luz, a diferencia de TtCarH que en la luz muestra un incremento de tamaño de 1329 Da correspondiente a la cobalamina fotolisada (Figura 56). Acorde con esta observación, en los ensayos EMSA con BmCarH tras la fotólisis

pudo recuperarse, mediante simple adición de AdoCbl intacta, la banda retrasada característica de la unión del tetrámero activo (Figura 75B). Así pues, BmCarH no es capaz de retener la cobalamina una vez fotolisada, lo que permite que el fotorreceptor se regenere por reemplazamiento de Cbl por AdoCbl.

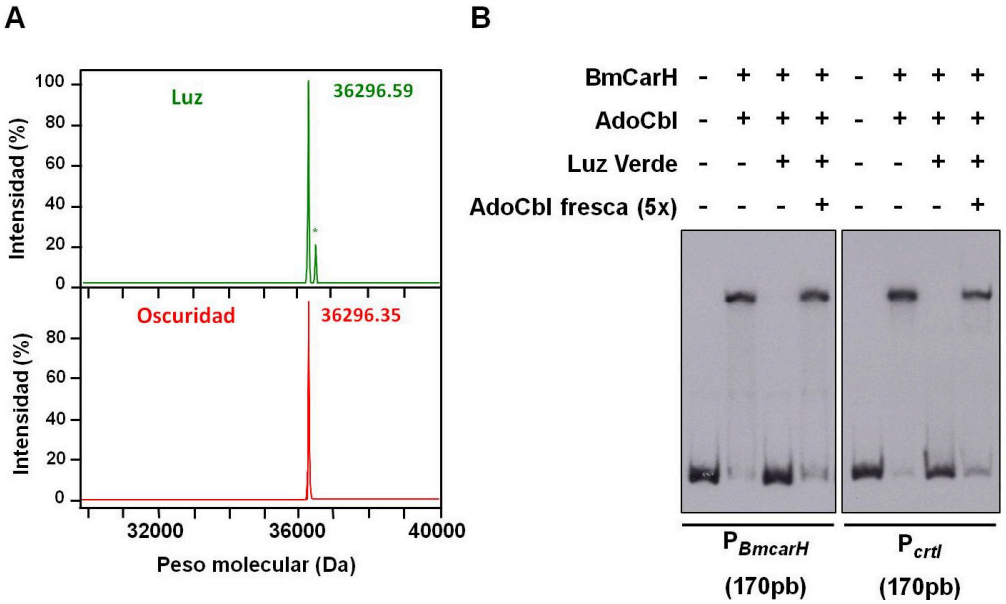


Figura 75. BmCarH no retiene la Cbl tras la fotólisis y es capaz de intercambiarla por AdoCbl intacta. (A) Ensayo de espectrometría de masas ESI-TOF de BmCarH-AdoCbl en oscuridad (abajo) y después de la exposición a luz verde (520 nm) durante 5 min (arriba). **(B)** Ensayo de EMSA con BmCarH (400 nM) y con los fragmentos P_{BmcarH} y P_{crtI} de 170 pb. Se muestra cómo, después de la exposición a luz verde (520 nm), la unión al DNA se restaura cuando se adiciona AdoCbl en oscuridad.

III.2.5 Los operadores de BmCarH: mayor tamaño pero conservación del diseño y modo de unión

Como se mostró en el apartado III.1.2.1, TtCarH utiliza tres de sus cuatro DBDs para unirse a un operador constituido por tres DRs en tándem, de 11 pb cada una, con la secuencia 5'-nAnnTnnACAn-3' (n es cualquier nucleótido). Mientras que la mutación de la A en posición 2 tuvo poco efecto en la unión de la TtCarH al DNA, sí lo tuvieron las mutaciones de las posiciones conservadas en el motivo 5'-TnnACAn-3' (la mutación de T o AC en dos DRs eliminó la unión al DNA). Ello se explica porque, en cada repetición, la T conservada y la secuencia complementaria de ACA (TGT), presentes en el surco mayor del DNA, son reconocidas por la hélice de reconocimiento (α2) de un DBD de TtCarH. Además, recuérdese que la DR central incluye el elemento -35 (TTGACA) del promotor P_{TtcarH}, por lo que la unión de TtCarH supone un impedimento estérico para la holoenzima RNAP-σ^A y el inicio de la transcripción.

En otro estudio con BmCarH, como se comentó al inicio del apartado III.2, se había propuesto su unión tanto en P_{BmcarH} como en P_{crtI} a un palíndrome imperfecto de 28 pb compuesto por dos secuencias consenso de 6 pb, separadas entre sí por 16 pb (Takano *et al*., 2015). Sin embargo, la inspección manual de la secuencia en torno a las regiones promotoras en este trabajo permitió identificar varias repeticiones directas de 11 pb en tándem con el motivo 5'-TnnACAn-3': cuatro (DR1-DR4) en la cadena con sentido para P_{BmcarH}, con DR4 solapando con el elemento -35 del promotor; y tres (DR1-DR3) en la cadena antisentido para P_{crtI}, con DR3 solapando con el elemento -10 del promotor (Figura 76).

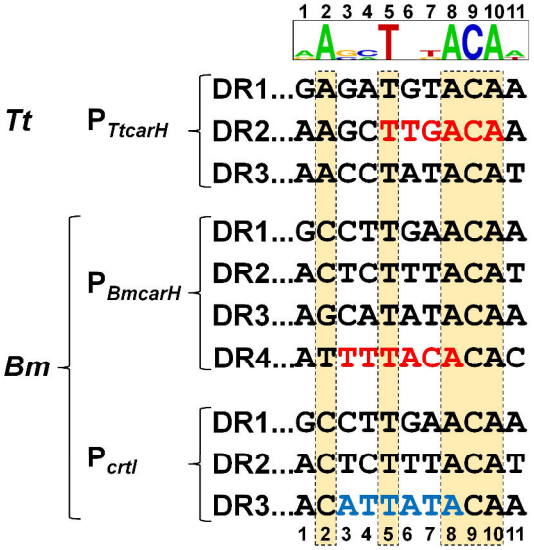


Figura 76. Alineamiento de las tres repeticiones directas de 11 pb en tándem del operador de TtCarH (*Tt*) y las repeticiones directas identificadas mediante análisis de la secuencia en P_{BmcarH} y P_{crtI}. Los nucleótidos conservados T y ACA del motivo TnnACA se muestran recuadrados en naranja. Las posiciones de los nucleótidos se encuentran numeradas. Se indican los elementos -35 (en rojo) y -10 (en azul) en los promotores. En la parte superior se indica la secuencia logo correspondiente a las tres repeticiones del operador de TtCarH.

Para determinar si BmCarH se une a las secuencias pseudopalindrómicas propuestas por Takano *et al*., (2015) o, como cabría esperar, a las DRs identificadas en este trabajo, se realizaron ensayos de *footprint* con DNasa I, radicales hidroxilo y exonucleasa III (Exo III). En el caso de P_{BmcarH}, los ensayos con DNasa I produjeron un *footprint* de ~50 pb, casi dos veces más grande que el presentado por Takano *et al*., (2015), y que abarca las repeticiones DR1-DR4 (Figura 77A, B). Curiosamente, el mismo ensayo con P_{crtI} produjo también un *footprint* de ~50 pb, abarcando no solo DR1-DR3 sino también una zona extra de 10 pb, protegida más tenuemente, aguas abajo de DR3 (Figura 77A, B). Esta región extra posee una secuencia TnnTTA, que guarda similitud con la secuencia conservada TnnACA; por ello, la consideramos una

pseudo-repetición a la que denominamos dr4. En ambos promotores, se observaron sitios hipersensibles a la digestión con DNasa I, que normalmente indican una curvatura local del DNA hacia el surco mayor (Craig *et al*., 1995) pero en la cadena con sentido para P_{BmcarH} y en la antisentido para P_{crtI} (Figura 77A). Ello sugiere la unión de BmCarH a caras opuestas del DNA, acorde con la orientación opuesta de las DRs en los dos promotores.

En los ensayos con radicales hidroxilo, la unión de BmCarH dio lugar a la aparición, en las dos cadenas de ambos promotores, de 4 sitios protegidos de 3 pb, situados en la parte 5´ de cada repetición y distanciados entre sí una vuelta de hélice. Estos resultados se asemejan a los obtenidos con TtCarH en su operador, excepto por la observación en el caso de BmCarH de cuatro sitios protegidos, y no tres, lo que sugiere la unión de BmCarH a las cuatro repeticiones. Que BmCarH se une a DR1-DR4 en P_{BmcarH} y a DR1-dr4 en P_{crtI} se vio corroborado por los ensayos con Exo III, que permiten delimitar el sitio de unión de una proteína mediante el análisis de las posiciones en las que dicha proteína bloquea el avance en dirección 3'-5' de la exonucleasa. La unión de BmCarH a P_{BmcarH} bloqueó el progreso de la enzima en las posiciones -19 y -71 (52 pb) en la cadena con sentido y antisentido, respectivamente (numeración respecto al TSS) (Figura 77C), que coincide con la región delimitada en el *footprint* con DNasa I. En P_{crtI}, mientras que la unión de BmCarH detuvo la acción de Exo III en la posición +24 en la cadena con sentido, en la cadena antisentido se observaron dos bandas, una más intensa en la posición -19 y otra más tenue en la posición -28 y (Figura 77C). El DNA comprendido entre esas posiciones se corresponde, precisamente, con la pseudo-repetición dr4. Es probable que la unión a dr4 sea más débil y, por eso, Exo III es capaz de adentrarse hasta la posición -19.

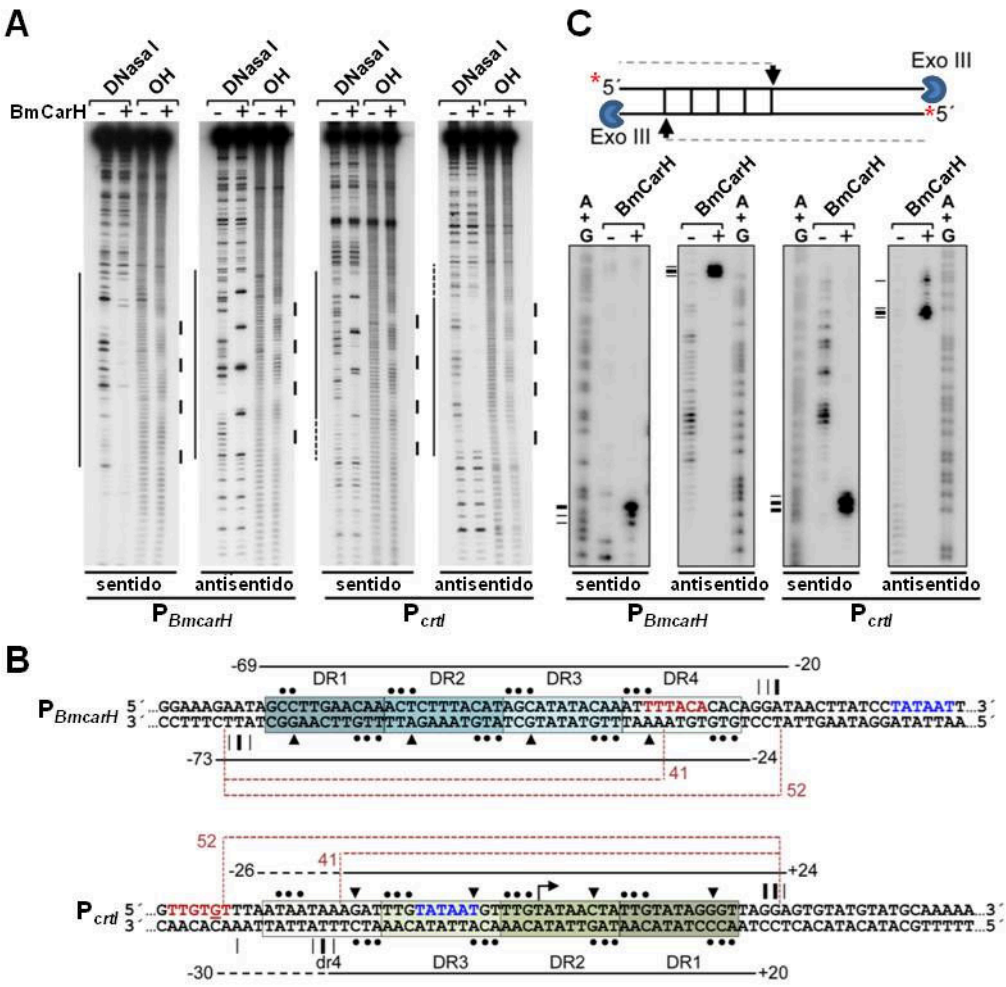


Figura 77. Análisis de la unión de BmCarH a las regiones promotoras P_{BmcarH} y P_{crtI} mediante técnicas de *footprint*. (A) Ensayo de *footprint* de DNasa I y radicales hidroxilo en oscuridad con BmCarH-AdoCbl (400 nM-2 µM), en la cadena con sentido y antisentido de un fragmento de 170 pb de P_{BmcarH} y $P_{crtI.}$ Las zonas protegidas, mapeadas usando la reacción de secuenciación química (A +G) corrida en paralelo al *footprint*, están indicadas mediante líneas a la izquierda (DNasa I) y derecha (radical hidroxilo). **(B)** Secuencia de DNA de los operadores P_{BmcarH} y P_{crtI} donde se esquematizan los resultados obtenidos en los ensayos de *footprint* para las dos cadenas (con sentido, arriba; antisentido, abajo). Las líneas continuas horizontales muestran la zona protegida por *footprint* con DNasa I (unión débil como línea discontinua) con los límites protegidos numerados en referencia al TSS. Los triángulos y los puntos indican las hipersensibilidades y los nucleótidos protegidos del ataque por los radicales hidroxilos, respectivamente. Las posiciones donde se detiene la enzima Exo III se muestran mediante líneas verticales. Cada repetición directa (DR) se muestra sombreada con una tonalidad distinta. Se indican los elementos -35 (en rojo) y -10 (en azul) en los promotores. Las líneas discontinuas marrones indican la secuencia de los fragmentos de 52 pb y 41 pb utilizados en la Figura 78. **(C)** Resultados de los ensayos de *footprint* con Exo III con BmCarH-AdoCbl (400 nM-2 µM) unida a P_{BmcarH} y P_{crtI}. En la parte superior se muestra un esquema de la posición donde se detiene la enzima Exo III según la cadena marcada con P^{32} en el extremo 5' (asterisco rojo). Los fragmentos obtenidos después de la acción de Exo III fueron mapeados usando la reacción de secuenciación química (A +G) corrida en paralelo al *footprint*.

Mediante EMSA se confirmó la unión de BmCarH a oligonucleótidos de 52 pb correspondientes a las regiones protegidas (44 pb de DR1-DR4 [dr4] más 4 pb a ambos lados) en los ensayos de *footprint* con P_{BmcarH} y P_{crtI} (Figura 78A). Puesto que BmCarH se unió igual a dichos oligonucleótidos que a los fragmentos de 170 pb, se usaron los oligonucleótidos para determinar la afinidad de BmCarH por los dos operadores. La constante de disociación (K_D) (Figura 78B) fue de 96±3 nM para P_{BmcarH} y 26±1nM para P_{crtI}, y en ambos casos la unión fue cooperativa (coeficiente de Hill >1; 3,3±0,3 para P_{BmcarH} y 2,39±0,2 para P_{crtI}). Mientras que la falta de DR4 (fragmento de 41 pb, Figura 78A) en P_{BmcarH} eliminó por completo la unión, la falta de dr4 en P_{crtI} (Figura 78A) produjo solo una leve bajada en la unión, acorde con la menor afinidad de BmCarH por la pseudo-repetición dr4.

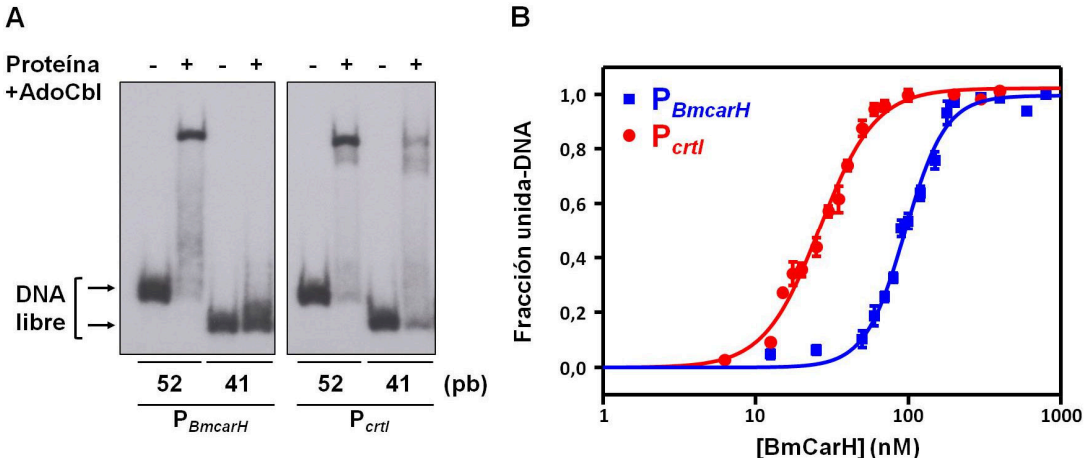


Figura 78. Unión de BmCarH a oligonucleótidos correspondientes a la región operadora de P_{BmcarH} y P_{crtI}. (A) Ensayo de EMSA con oligonucleótidos de 52 y 41 pb correspondientes a los operadores de BmCarH en P_{BmcarH} y P_{crtI}. Se utilizó BmCarH con una concentración de 400 nM para P_{BmcarH} y 50 nM para P_{crtI}, y AdoCbl con una concentración molar cinco veces superior a la de proteína. **(B)** Determinación de la afinidad de BmCarH por P_{BmcarH} (azul) y P_{crtI} (rojo) mediante la titulación de ensayos de EMSA con oligonucleótidos de 52 pb. El ajuste de la línea de regresión se calculó mediante la ecuación de Hill, que permite determinar la constante de disociación (K_D) y el coeficiente de Hill. Se muestra el valor medio y el error estándar de tres ensayos de EMSA.

Para evaluar el papel de las bases conservadas en el motivo 5'-TnnACAn-3' se diseñaron sondas con mutaciones específicas. En concreto, se sustituyó el par de bases conservadas AC por GT de manera individual en cada repetición (Figura 79A). Mediante EMSA se observó que una única mutación en cualquiera de las DRs de P_{BmcarH} fue suficiente para eliminar la formación del complejo BmCarH-P_{BmcarH}, a diferencia de P_{TtcarH} donde se necesitan al menos dos repeticiones mutadas para que la unión de TtCarH se vea afectada (Figura 79B). Al igual que en P_{BmcarH}, mutaciones individuales de AC a GT en DR1, DR2 o DR3 de P_{crtI} provocaron la falta de unión de

BmCarH (Figura 79C). Dado que en dr4 no están conservadas las bases AC, se mutaron la T y la última A del motivo 5'-TnnACAn-3' que sí están conservadas (dr4*[a]). Estas sustituciones no afectaron a la unión al DNA, a diferencia del efecto de una mutación similar en DR3 (DR3*[b]; Figura 79A, C), y tampoco lo hizo una mutación adicional en la A (a T) en la primera posición de la repetición (dr4*[b]). La contribución de dr4 podría estar relacionada con su riqueza en pares AT, todavía mayor que la de las otras repeticiones. Por ello, se probó el efecto de hacerla más rica en GC (dr4*[c]; usando para ello la secuencia del segmento inmediatamente aguas debajo de DR3 en P_{TtcarH}). Este cambio sí provocó una disminución en la unión de BmCarH a P_{crtI}, equivalente al observado cuando se elimina dr4 (Figura 79A, C). Por lo tanto, se vuelve a poner de manifiesto cómo BmCarH conserva el mismo diseño en sus operadores diana que el operador de TtCarH.

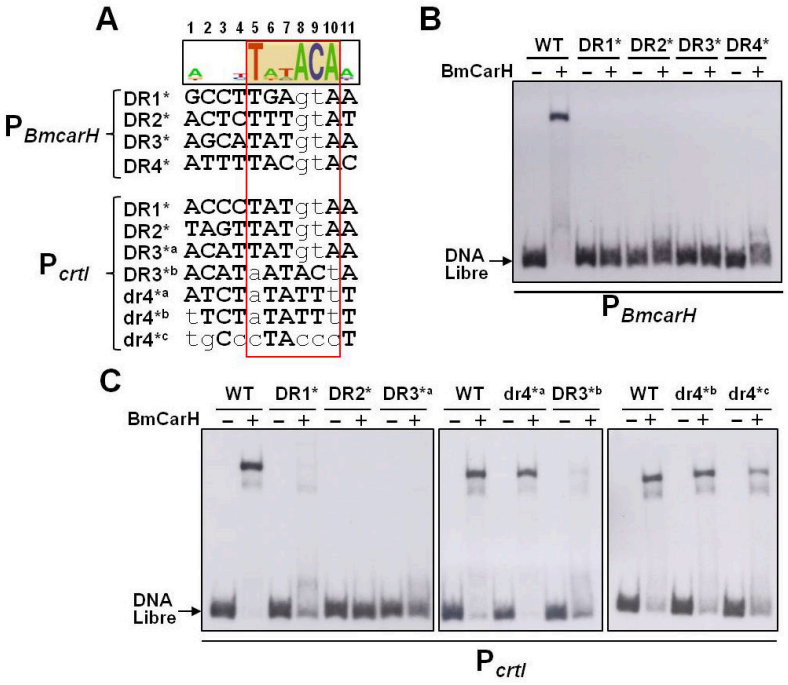


Figura 79. Análisis de la unión de BmCarH a las repeticiones directas en P_{BmcarH} y P_{crtI}. **(A)** Alineamiento de las DRs para la unión de BmCarH en P_{BmcarH} y P_{crtI}. En minúscula, las mutaciones examinadas en B-C. La secuencia logo (con las posiciones numeradas) está basada en las 4 DRs de P_{BmcarH} y las 3 DRs de P_{crtI}. El motivo TnnACA se muestra sombreado en naranja. **(B)** Ensayos de EMSA con BmCarH para examinar la unión a P_{BmcarH} 52 pb mutado. **(C)** Ensayos de EMSA con BmCarH para examinar la unión a P_{crtI} 52 pb mutado. En los retrasos mostrados en B y C se utilizó una concentración de 400 nM y 50 nM, respectivamente, con AdoCbl con una concentración molar cinco veces superior.

En conjunto, los resultados de los análisis mostrados en este apartado apyan la idea que BmCarH se une a operadores con el mismo diseño que el de TtCarH, es decir, constituidos por DRs de 11 pb en tándem que presentan el motivo 5'-TnnACAn-3'. Sin embargo, los operadores de BmCarH son más grandes que el de TtCarH, por la presencia adicional de una DR o de una pseudo-repetición, lo que sugiere que BmCarH utiliza sus cuatro DBDs para unirse al DNA, y no solo tres como TtCarH.

III.2.6 Análisis de la unión de BmCarH al operador de TtCarH y viceversa

Para determinar si BmCarH, cuyos operadores naturales están constituidos por cuatro DRs (o tres DRs y una pseudorepetición) es capaz de unirse al operador de TtCarH, o viceversa, se realizaron ensayos *in vitro*. En EMSA, BmCarH fue capaz de unirse a P_{TtCarH}, y TtCarH a los operadores de BmCarH (Figura 80A). En los ensayos con DNasa I, BmCarH produjo un *footprint* de ~41 pb en P_{TtcarH} muy similar al que se observa con TtCarH (Figura 80B, C), a diferencia del *footprint* de ~50 pb generado por BmCarH en sus operadores naturales. En los ensayos con Exo III y P_{TtcarH} también se observaron resultados muy similares para BmCarH y TtCarH (Figura 80C, D), consistentes con la unión de las dos proteínas solo a tres repeticiones.

Por otro lado, en los ensayos con DNasa I y P_{BmCarH}, TtCarH generó una buena protección de DR1-DR3 (~41 pb) pero débil de DR4, en comparación con el *footprint* fuerte de ~50 pb producido por BmCarH (Figura 80B, C). Acorde con estos resultados, los ensayos con Exo III produjeron un patron de bandas consistente con la unión fuerte de TtCarH a DR1-DR3, y débil a DR2-DR4 (Figura 80C, D). Así pues, BmCarH puede unirse a solo tres DRs, como en el operador de TtCarH, o cuatro DRs, como en sus operadores naturales. Por el contrario, TtCarH continúa uniéndose a tres DRs aunque haya cuatro disponibles, mostrando además una preferencia por DR1-DR3, lo que sugiere que existen determinantes posicionales cuya naturaleza está por resolver. Así pues, BmCarH presenta una plasticidad en su unión al DNA que no presenta TtCarH.

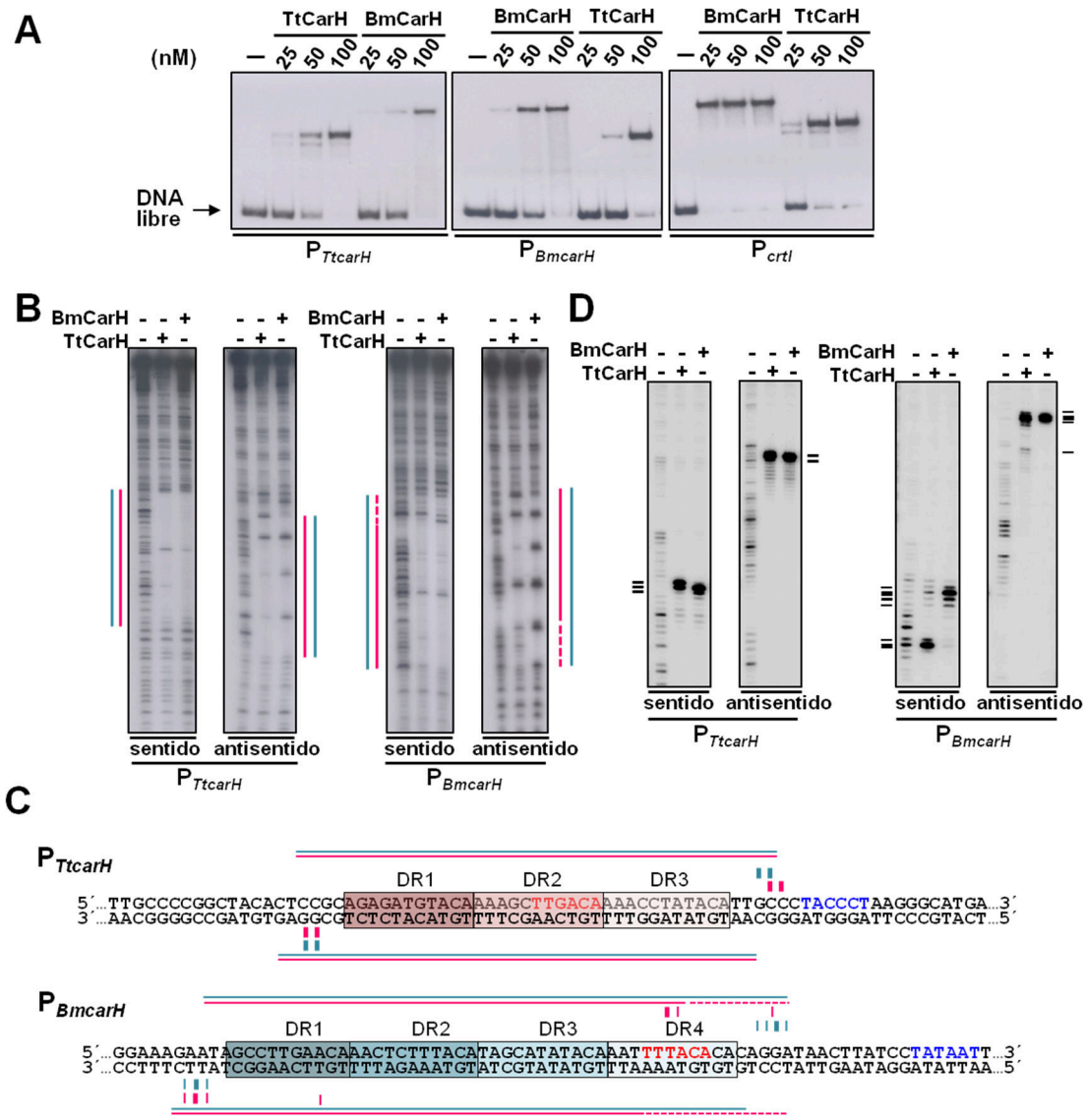


Figura 80. Unión de BmCarH al operador de TtCarH, y de TtCarH a los operadores de BmCarH. (A) Ensayos de EMSA con los fragmentos de P_{TtcarH}, P_{BmcarH} y P_{crtI} de 170 pb, y las proteínas BmCarH y TtCarH. Las diferencias en las posiciones de las bandas retrasadas pueden deberse a diferencias en tamaño, carga y forma de TtCarH y BmCarH. **(B)** *Footprints* de DNasa I en P_{TtcarH} y P_{BmcarH} producidos por la unión de TtCarH o BmCarH (400 nM). La zona protegida está representada con líneas de color cian (BmCarH) y rosa (TtCarH). **(C)** Secuencia de DNA que muestra las regiones operadoras de P_{TtcarH} y P_{BmcarH}; se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de *footprint* para las dos cadenas (con sentido, arriba; antisentido, abajo). Las líneas continuas horizontales muestran la zona protegida por *footprint* con DNasa I (línea discontinua representa unión débil). Las posiciones donde se detiene Exo III se muestran mediante líneas verticales (su grosor es proporcional a la intensidad de la banda). Cada DR se muestra sombreada. Se indican los elementos -35 (en rojo) y -10 (en azul) en los promotores. **(D)** *Footprints* con Exo III de la unión de BmCarH o TtCarH (400 nM) a P_{TtcarH} y P_{BmcarH}. Las líneas horizontales muestran las posiciones donde se detiene Exo III.

III.2.7 Intercambio del *linker* de BmCarH y TtCarH, y su efecto en la unión al DNA operador

Una diferencia entre BmCarH y TtCarH, que podría estar relacionada con la mayor plasticidad de BmCarH en su unión al DNA, radica en la longitud y composición aminoacídica de *linker* que une el DBD N-terminal con el dominio sensor de luz. Considerando las predicciones de estructuras secundarias y la estructura cristalográfica de TtCarH, el *linker* de TtCarH estaría formado por cuatro residuos (QEVR, residuos 76-79), mientras que el de BmCarH se correspondería con una región más larga, de 16 aminoácidos (ESSTVGTFEEEGEVDS, residuos 76-91), y muy acídica. En ambos casos, no se predice ninguna estructura definida para estas regiones (Figura 61) y, al menos para TtCarH, la estructura confirmó dicha predicción.

Los análisis de simulación mediante dinámica molecular realizados en colaboración con el grupo dirigido por el Prof. Modesto Orozco (IRB-UB) apuntan a que, en efecto, BmCarH puede unirse a una cuarta repetición por tener el *linker* más largo, y TtCarH no puede hacerlo por la corta longitud de su *linker*. Para examinar experimentalmente los efectos de la región conectora en la unión al DNA, se generaron versiones de BmCarH con su *linker* sustituido por el de TtCarH (BmLkT) o reducido para tener su mismo tamaño (BmLk4; Figura 81A). Desgraciadamente, los cambios realizados provocaron que ambas proteínas precipiten, lo que impidió realizar ensayos con ellas. No obstante, estos resultados sirvieron para poner de manifiesto que el *linker* no es un mero conector cuya composición o longitud no tiene relevancia. Al igual que con BmCarH, se diseñó una quimera de TtCarH, denominada TtLkB, con el *linker* de BmCarH (Figura 81A). Dicha proteína se comportó en solución como TtCarH, siendo capaz de formar tetrámeros en oscuridad y presencia de AdoCbl, y monómeros en la luz o en su forma apo (Figura 81B). Sorprendentemente, al evaluar la unión a P_{TtcarH} y P_{BmcarH} mediante EMSA se observó que TtLkB no es capaz de unirse a ninguno los dos fragmentos de DNA (Figura 81C). Una posible explicación a este comportamiento, derivada de los análisis de simulación realizados por el grupo del Prof. Modesto Orozco, es que las argininas R28, R37 y R43, que forman parte del DBD e interaccionan con el DNA, sean secuestradas en TtLkB por la región conectora altamente ácida (pI 3.4) de BmCarH. Dichas interacciones, como cabría esperar, no se observan en las simulaciones con BmCarH (Fernández *et al*, 2018).

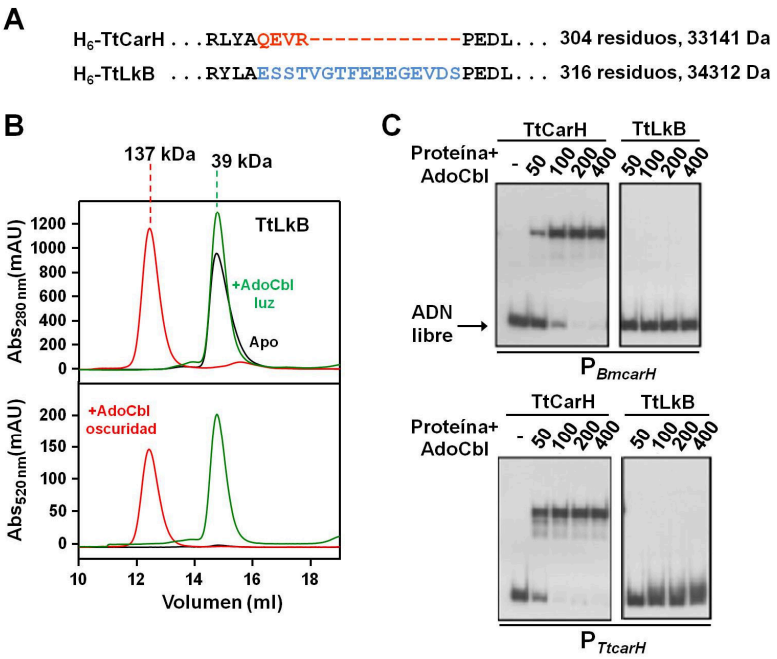


Figura 81. Efecto de la sustitución de la región conectora entre TtCarH y BmCarH. (A) *Linker* de: TtCarH (rojo), TtLkB (azul). Se indica el número de aminoácidos y el peso molecular estimado de TtCarH y TtLkB. **(B)** Ensayo de SEC (columna analítica Superdex200) con TtLkB, en la forma apo, y unida a AdoCbl en oscuridad o después de ser expuesta a luz verde (520 nm) durante 5 min. La elución de los picos fue monitorizada mediante la absorbancia a 280 nm y 522 nm, para proteína y Cbl, respectivamente. Se indica el *M*r para el monómero, 39 kDa, y para el tetrámero, 137 kDa. **(C)** Ensayo de EMSA para analizar la unión de TtLkB a P_{TtcarH} y P_{BmcarH}.

Para confirmar experimentalmente los datos de las simulaciones se llevó a cabo un ensayo de proteólisis limitada con la endoproteinasa GluC de *Staphylococcus aureus,* que corta preferentemente enlaces peptídicos en la parte C-terminal de un residuo de glutámico que se encuentre accesible. En BmCarH y TtLkB hay un total de 29 y 34 glutámicos, respectivamente, distribuidos a lo largo de la proteína, pero cabe esperar que muchos de ellos se encuentren en regiones estructuradas y protegidos del corte por GluC. De producirse un corte en el *linker*, debido a su naturaleza poco estructurada, se observarían dos fragmentos de distinto tamaño: el DBD N-terminal (12 kDa) y el dominio C-terminal sensor de luz (25 kDa). Así, se comparó el patrón de corte con GluC de BmCarH y de TtLkB. Como se observa en la Figura 82, el tratamiento con GluC de BmCarH sí produjo los dos fragmentos esperados; sin embargo, no se observó la proteólisis cuando se aplicó el mismo tratamiento a TtLkB. Estos resultados refuerzan la idea de que TtLkB no se une al DNA debido a que residuos importantes para la unión al DNA (R28, R37 y R43) se encuentran secuestrados por una interacción con el *linker* acídico de BmCarH, que se manifiesta en la protección observada frente el corte con GluC. Así pues, la longitud y

composición del *linker*, y el contexto en el que se encuentra, son determinantes importantes en la función de CarH.

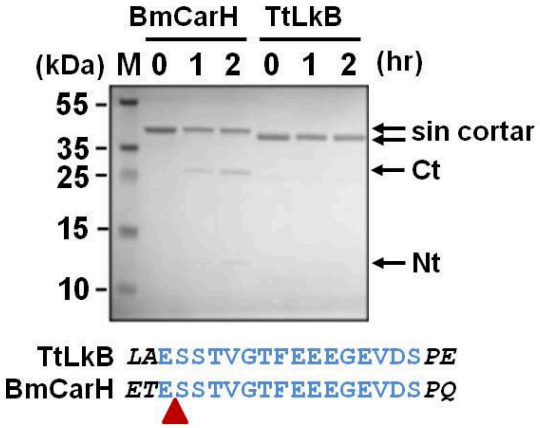


Figura 82. Análisis comparativo de la proteólisis de BmCarH y TtLkB con GluC. Arriba, digestión de BmCarH y TtLkB por GluC. Se indica el tiempo de duración del tratamiento (horas). Las proteínas no cortadas tienen un tamaño de 34,6 kDa (TtLkB) y 36,3 kDa (BmCarH). Los productos de la proteólisis se corresponden con fragmentos de 12 kDa (N-terminal, Nt) y 25 kDa (C-terminal, Ct), confirmados por secuenciación N-terminal. M: marcadores de tamaño. Abajo se muestra la secuencia de la región conectora de ambas proteínas (azul) con la posición donde se produce el corte en BmCarH marcada con un triángulo rojo (identificado por secuenciación N-terminal).

IV. DISCUSIÓN

IV.1 Mecanismo de acción de TtCarH

Los fotorreceptores son proteínas implicadas en la detección de la luz que, además de participar en múltiples funciones biológicas, cumplen un papel importante en la respuesta al daño fotooxidativo (Ziegelhoffer & Donohue, 2009). Una de dichas respuestas de protección frente a la luz es la producción de carotenoides, como se observa en el caso de las bacterias objeto de estudio de este trabajo de Tesis Doctoral: *M. xanthus*, *T. thermophilus* y *B. megaterium*. El trabajo durante más de 20 años de nuestro grupo de investigación ha permitido revelar que la producción de carotenoides en respuesta a la luz depende de, al menos, diez genes estructurales y nueve reguladores (*carF*, *carR*, *carQ*, *carS*, *ihfA*, *carD*, *carG*, *carA* y *carH*). La mayoría de los genes estructurales se encuentran agrupados en el operón *carB* y su expresión está regulada negativamente por las proteínas CarA y CarH, que al unirse a la región operadora del promotor P_B impiden el acceso a éste de la RNAP. P_B está además regulado positivamente por CarS, un antirrepresor que solo está presente en la célula en condiciones de iluminación.

Como ya se ha mencionado en el apartado I.6, CarA y CarH son proteínas parálogas (35% identidad, 49% similitud) codificadas por los dos últimos genes del operón *carA*. Ambas proteínas tienen una asociación de dominios muy similar, pero un modo de acción diferente. La proteína CarA oligomeriza en forma de dímero de manera independiente de AdoCbl y se une a la región operadora de P_B a través de dos secuencias palindrómicas, por las que muestra diferente afinidad (López-Rubio *et al*., 2002, 2004; Pérez-Marín *et al*., 2008), de manera similar a como ocurre en los factores de transcripción de tipo MerR (Brown *et al*., 2003; Cheng *et al*., 2012). CarH, sin embargo, muestra una dependencia absoluta de AdoCbl: solo en presencia de AdoCbl, CarH es capaz de formar tetrámeros en oscuridad (Díez *et al*., 2013) y de unirse al DNA bloqueando el elemento - 35 del promotor P_B. La luz provoca la ruptura del enlace Co-C de AdoCbl produciendo la disociación del tetrámero, la liberación del promotor y permitiendo así el inicio de la transcripción (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011). La presencia en *M. xanthus* de dos proteínas, CarA y CarH, cuya diana es el mismo DNA operador, permite a la bacteria utilizar dos vías para responder a la luz: una vía principal compleja e independiente de AdoCbl, que en última instancia depende de CarA, y otra vía de respuesta más rápida y dependiente de AdoCbl, que depende exclusivamente de CarH (Figura 83).

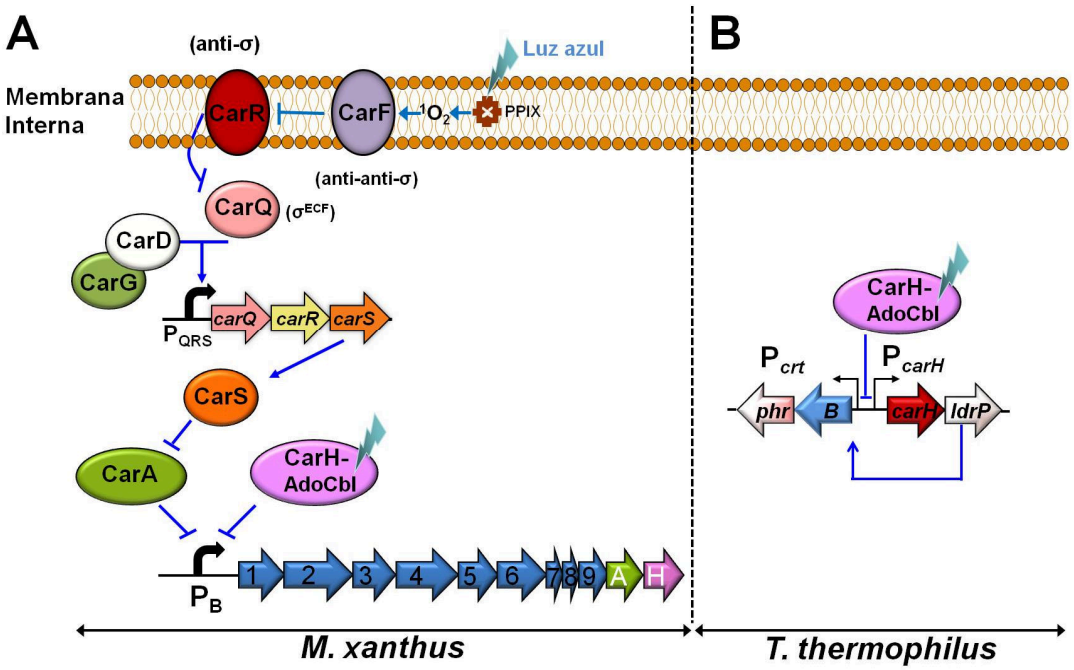


Figura 83. Regulación de la síntesis de carotenoides en *M. xanthus* y *T. thermophilus*. **(A)** Modelo de regulación de la respuesta a la luz en *M. xanthus*, que muestra las dos vías de detección de la señal luminosa; 1-9: genes estructurales para la síntesis de carotenos. **(B)** Modelo de regulación mediado por TtCarH. *crtB* (sintetasa de fitoeno), *phr* (fotoliasa) y *ldrP* (regulador transcripcional de la familia FNR/AmpC). Imagen modificada de Elias-Arnanz, *et al*. (2011).

Que CarH actúe como un factor transcripcional modulando la expresión génica y a su vez esté regulado directamente por la luz permitió concluir que CarH es un novedoso fotorreceptor que utiliza AdoCbl como cromóforo. Además, que los fotorreceptores de tipo CarH estén presentes en cientos de genomas bacterianos sugiere que se trata, de hecho, de una nueva familia de fotorreceptores. Entre las bacterias que presentan proteínas de tipo CarH se incluyen tanto especies capaces de sintetizar AdoCbl como otras que necesitan captarla del medio (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011; Padmanabhan *et al*., 2017). A diferencia de *M. xanthus,* la mayoría de las otras bacterias solo presentan una copia, que se parece más a CarH que a CarA, lo que sugiere un modo de acción similar al descrito para CarH. Tal es el caso de TtCarH (Figura 83) y BmCarH, que han sido objeto de estudio en este trabajo.

IV.1.1 Dependencia de AdoCbl en la oligomerización de TtCarH

Los datos de las estructuras cristalinas de los diferentes estados funcionalmente relevantes de TtCarH y los análisis mutacionales basados en ellos han proporcionado una información detallada de la arquitectura y los cambios conformacionales dependientes de la luz en CarH. En oscuridad, TtCarH unido a

AdoCbl constituye un tetrámero formado por dos dímeros, cada uno con una sorprendente disposición “cabeza-cola” de los dos monómeros. El dominio N-terminal de cada monómero (incluida la hélice α de reconocimiento del DNA) coincide estructuralmente y a nivel de secuencia con el DBD de hélice alada encontrado en CarA (Navarro-Avilés *et al*., 2007) y en los factores de transcripción de tipo MerR (Chang *et al*., 2015; Heldwein & Brennan, 2001). Sin embargo, TtCarH emplea un modo de unión al DNA distinto al de las proteínas MerR, como se discutirá con más detalle en el siguiente apartado. Sorprendentemente, el módulo C-terminal de unión a AdoCbl es estructuralmente más similar al dominio de unión a MeCbl de MetH (Drennan *et al*., 1994) que a cualquier otra proteína de unión a AdoCbl conocida. Al igual que en MetH, el dominio C-terminal de TtCarH está formado por un subdominio del tipo haz de hélices α, que entra en contacto con la cara superior de la AdoCbl, seguido de otro subdominio tipo Rossmann que se une a la cara inferior de la AdoCbl en el modo base-off His-on, utilizando la His conservada del motivo de unión a B_{12}, Glu/Asp-x-His.

El papel de AdoCbl en CarH difiere de sus otros dos papeles conocidos, el de cofactor enzimático (donde la escisión homolítica reversible del enlace Co-C produce un radical 5’-dAdo empleado para la catálisis; Schwartz & Frey, 2007)) y el de modulador de la expresión génica a través de ribointerruptores (Johnson et al., 2012; Nahvi et al., 2002, 2004; Peselis & Serganov, 2012). El uso de AdoCbl como cromóforo no tiene precedentes biológicos. AdoCbl es estructural y fotoquímicamente distinta de otros cromóforos de fotorreceptores conocidos como tetrapirroles (Burgie & Vierstra, 2014), flavinas (Conrad *et al*., 2015; Herrou & Crosson, 2011; Losi & Gärtner, 2008), retinal (Palczewski, 2012), equinona (Kish *et al*., 2015) o las cadenas laterales del Trp (Jenkins, 2014). En el caso de AdoCbl, la exposición a la luz conduce a un cambio irreversible (la rotura del enlace covalente Co-C), mucho más drástico que la transferencia de electrones inducida por la luz o las isomerizaciones *cis-trans* propias de otros cromóforos. En cualquier caso, la energía procedente de la luz se aprovecha en última instancia para impulsar un cambio conformacional a gran escala en el módulo proteico del fotorreceptor.

Como ya se ha mencionado, la unión a AdoCbl de CarH se establece a través del dominio C-terminal de la proteína. Este dominio se asemeja al módulo de unión a Cbl de MetH, una enzima que utiliza MeCbl para la transferencia de un grupo metilo a la homocisteína generando tetrahidrofolato y metionina (Matthews *et al*., 2009). La proteína MetH posiciona el residuo Phe708 sobre el grupo metilo de la Cbl, que actúa como una “caperuza” que la protege de la fotolisis (Jarrett *et al*., 1996). En CarH, la

unión a AdoCbl implica un cambio significativo en el tamaño del sustituyente coaxial superior de la Cbl. El alineamiento de la secuencia aminoacídica de MetH y TtCarH puso de manifiesto una serie de diferencias en los residuos implicados en la interacción con Cbl (MetH→TtCarH): Phe708→W131, L715→V138, V718→E141 y V719→H141 (Figura 37). Estos cambios tienen como consecuencia la formación de una cavidad de mayor tamaño en TtCarH que en MetH, un entorno más polar y el establecimiento de un enlace por puentes de hidrógeno entre Glu141 y la ribosa del grupo Ado. Además, en CarH la cadena lateral más grande del Trp está al lado del grupo Ado en contacto con su ribosa, a diferencia de la correspondiente Phe en MetH (Figura 37B). La estructura cristalográfica de TtCarH-AdoCbl permite observar que, si bien la longitud del enlace Co-C de AdoCbl en CarH (2,2 Å) es similar a la que aparece en la forma libre de AdoCbl o en enzimas dependientes de AdoCbl en estado de reposo (sin sustrato), la orientación relativa del grupo Ado es diferente. Así, AdoCbl es capaz de adaptar su conformación según la proteína a la que esté unida y es probable que ello esté relacionado con su reactividad química (Figura 84A) (Berkovitch *et al*., 2004; Dowling *et al*., 2012; Jost *et al*., 2015a; Jost *et al*., 2015b; Wolthers *et al*., 2010). Los residuos Trp, Glu y His que forman el motivo W-x(9)-EH están conservados en los homólogos de CarH, y la mutación de cualquiera de ellos perjudica la unión a AdoCbl, la oligomerización y la unión al DNA. Resulta curioso que CarA de *M. xanthus*, que se une a AdoCbl aunque no la requiera para su oligomerización y función (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011), retenga el Glu y la His, pero carezca del Trp y de otros cuatro residuos adyacentes (Figura 84B).

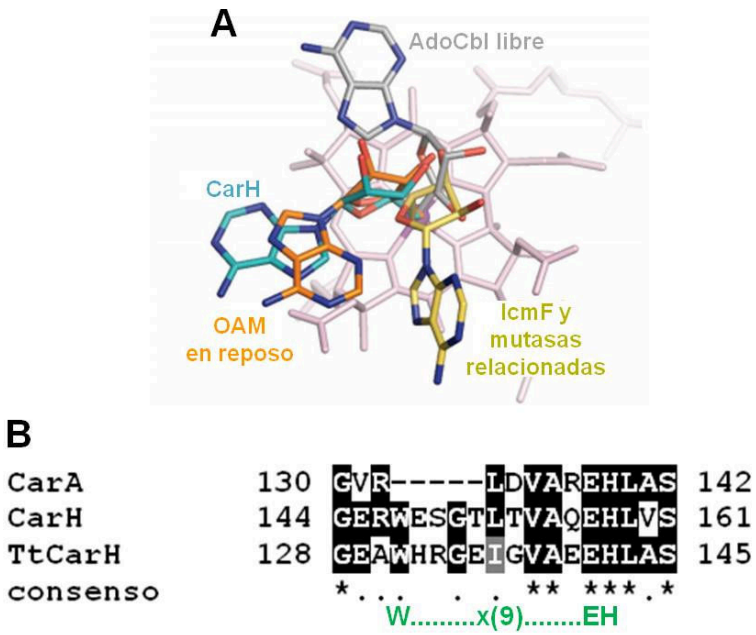


Figura 84. Comparación de la conformación de AdoCbl unida a TtCarH en oscuridad y unida a otras enzimas dependientes de AdoCbl. (A) Comparación de la orientación del grupo 5'-dAdo en CarH, en AdoCbl libre, y en dos enzimas dependientes de AdoCbl cuyas estructuras han sido resueltas unidas al cofactor: IcmF (PDB: 4XC6) y mutasas relacionadas, y OAM en reposo (PDB: 3KP1). (Padmanabhan *et al*., 2017). **(B)** Alineamiento del fragmento de la secuencia de CarA y CarH de *M. xanthus*, y de CarH de *T. therrmophilus* que contiene el motivo W-x(9)-EH.

Un aspecto importante a considerar es el contexto proteico del dominio de unión a Cbl: el módulo de unión a Cbl de MetH forma parte de una enzima multidominio de 136 kDa que cataliza tres reacciones diferentes de transferencia de metilos, lo que conlleva una reordenación de sus dominios (Bandarian *et al*., 2003); por el contrario, nuestro dominio de interés se ensambla en un tetrámero que es lo suficientemente estable como para ocluir el elemento -35 de su promotor diana. Por lo tanto, se puede concluir como este módulo ha sido reutilizado, pasando de ser un transportador de grupos metilo en metabolismo primario a convertirse en un modulador del estado de oligomerización sensible a la luz.

La presencia del grupo Ado mantiene al protómero unido a AdoCbl en una conformación "erecta", que permite que el haz de hélices α de un monómero contacte con el subdominio tipo Rossmann de otro monómero para formar un dímero cabeza-cola. La interfaz del dímero "cabeza-cola" es extensa, con más de 20 puentes de hidrógeno e interacciones iónicas, algunos de los cuales involucran al grupo Ado. La formación del dímero cabeza-cola se puede considerar como un estado intermedio en el proceso de oligomerización. Los tetrámeros se forman por la unión de dos dímeros, pero el ensamblaje del tetrámero a partir de monómeros tras la adición de AdoCbl es

tan rápido y favorable que los dímeros se detectan solo si la interfaz dímero-dímero se interrumpe por mutación de los aminoácidos implicados en la tetramerización. Los aminoácidos que intervienen en la formación de enlaces en las superficies de interacción monómero-monómero y dímero-dímero no están muy conservados, pero las interacciones clave sí parecen mantenerse. Por ejemplo, una de las interacciones cruciales para la dimerización de TtCarH es la formación de un enlace entre la R176 de un monómero y el D201 del monómero adyacente. El homólogo de CarH en *M. xanthus* mantiene conservados la mayoría de residuos importantes descritos para TtCarH, pero en el caso del Asp y la Arg se ha producido un cambio compensatorio, de tal forma que CarH posee un Glu (E192) en lugar de una Arg y una Arg (R217) en lugar de un Asp. La pérdida de función *in vivo* cuando se lleva a cabo la mutación simple E192R y su posterior recuperación con la mutación doble E192R/R217E, y la conservación de la pareja formada por un residuo acídico y otro básico (E o D/R) en la mayoría de los homólogos a CarH de otras mixobacterias (Figura 85) apunta a una función similar de ambos residuos en el establecimiento de una interacción iónica para la formación del dímero. Un caso curioso es el homólogo de *C. fuscus*, que presenta la pareja Q/R y el de *H. ochraceum* que presenta la combinación Q/D. Al menos en CfCarH, que ha podido ser purificada en nuestro grupo de investigación, esta diferencia podría estar relacionada con diferencias en su estado oligomérico en relación a TtCarH o MxCarH. Nuestros datos apuntan a que, como BmCarH, que tampoco conserva el tándem E o D/R (en su lugar presenta T/S; Figura 62), CfCarH es ya un oligómero (aunque, en este caso, probablemente un dímero) en ausencia de AdoCbl. No obstante, al igual que BmCarH, requiere la presencia de AdoCbl para unirse al DNA, aparentemente porque se forma un oligómero de mayor orden, que cuando se ilumina vuelve a una forma dimérica.

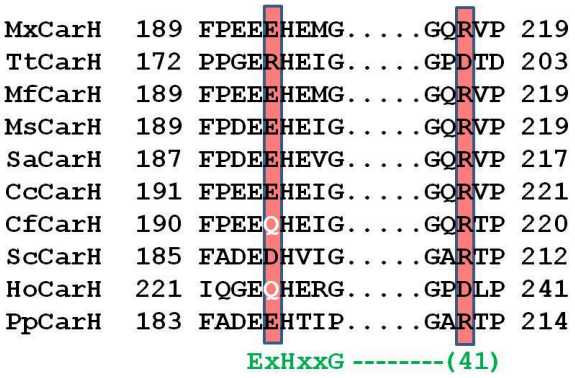


Figura 85. Conservación de la pareja de residuos implicados en la formación de dímeros en las proteínas CarH de mixobacterias. Abreviaturas no usadas previamente: Mf (*Myxococcus fulvus*, NCBI: AEI62761), Ms (*Myxococcus stipitatus*, NCBI: AGC42263.1), Sa (*Stigmatella aurantiaca*, NCBI: ADO74827.1), Cc (*Corallococcus coralloides*, NCBI: AFE08265.1), Cf (*Cystobacter fuscus*, uniprot: D187_009315), Sc (*Sorangium cellulosum*, NCBI: CAN90736.1), Ho (*Haliangium ochraceum,* NCBI: ACY14758.1) y Pp (*Plesiocystis pacifica,* ZP_01911070). En verde se muestra parte del motivo de unión a Cbl (Drennan *et al*., 1994). Sombreado en rojo se muestran los residuos implicados en la dimerización. En blanco el residuo de glutamina presente en *C. fuscus* y *H. ochraceum*.

Como se ha comentado, el tetrámero de TtCarH se forma a partir del "encaje" de dos dímeros cabeza-cola a través de una interfaz dimérica. Formando parte de esa superficie de interacción se ha observado cómo la mutación simple de dos glicinas, G160 y G192 en TtCarH da lugar a una proteína dimérica que es capaz de unirse al DNA. La arquitectura de TtCarH como un tetrámero formado por dos dímeros de cabeza cola tiene como consecuencia que los DBDs vecinos estén alejados entre sí (Figura 38). Se conocen muy pocas estructuras de factores de transcripción con este tipo de ensamblaje. Una de ellas es la proteína GabR de *Bacillus subtilis*, que funciona como un regulador del metabolismo del ácido γ-aminobutírico, GABA, una importante fuente de nitrógeno y carbono para muchas bacterias. GabR es un factor de transcripción perteneciente a la familia de proteínas GntR, formado por un dominio N-terminal tipo MerR (H-T-H con un "ala") conectado por un *linker* largo y flexible de 29 residuos a un dominio C-terminal homólogo a las aminotransferasas tipo I (AT). Este dominio AT se une a fosfato de piridoxal (PLP, denominado también coenzima B_6) (Alzyoud *et al*., 2016; Edayathumangalam *et al*., 2013). Con PLP y GABA, dos dominios AT se agrupan en una disposición cabeza-cola para formar un dímero de GabR estable (Edayathumangalam *et al*., 2013) (Figura 86A). No se conoce la estructura del complejo GabR-DNA, pero se ha propuesto que un dímero de GabR se une con una afinidad muy alta (K_D=~1 nM) a la región promotora del operón *gabTD* (que engloba dos enzimas implicadas en la síntesis de glutamato a partir de GABA) y activa su transcripción (Figura 86B). La región promotora de este operón presenta dos

repeticiones directas de la secuencia ATACCA separadas por un espaciador rico en AT de 29 pb, que se curvaría para favorecer la unión de GabR y que incluye la región -35 del promotor (Al-zyoud et al., 2016; Edayathumangalam et al., 2013; Park et al., 2017) (Figura 86B). El modo de unión al DNA de CarH, sin embargo, es muy distinto.

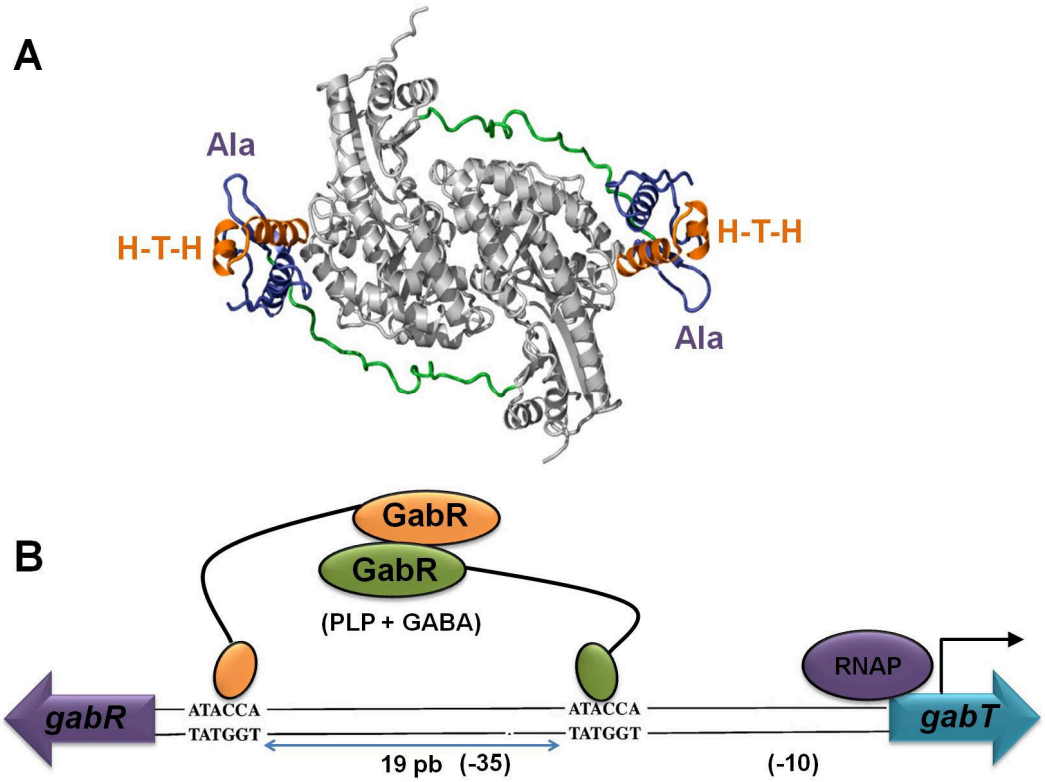


Figura 86. Estructura cristalográfica de GabR y su modo de unión al DNA. (A) Homodímero de GabR con la disposición cabeza-cola. Los dominios AT se muestran en gris, y la larga región conectora en verde. El dominio tipo MerR se muestra en azul violáceo ("ala") y naranja (H-T-H). Imagen modificada de Edayathumangalam *et al*., (2013) PDB: 4N0B. **(B)** Modelo para la regulación transcripcional de los promotores de *gabR* y *gabT*. El homodímero de GabR se representa con un monómero en color naranja y el otro en color verde. El óvalo más grande representa el dominio AT y el óvalo más pequeño representa el dominio de hélice "alada". Se muestran las dos repeticiones directas separadas por 19 pb, y los elementos -10 y -35. Imagen modificada de Edayathumangalam *et al*., (2013).

IV.1.2 Modo de unión del represor TtCarH a su operador

Al igual que el dominio sensor de luz, el dominio de unión a DNA de CarH también ha sido "reutilizado". El DBD de CarH se parece a factores de transcripción de tipo MerR, tales como MerR, BmrR o SoxR, que funcionan como activadores/represores transcripcionales en presencia de metales pesados u otros estreses y cuyas estructuras unidas al DNA han sido determinadas (Brown *et al*., 2003; Heldwein & Brennan, 2001; Watanabe *et al*., 2008). Las proteínas de tipo MerR se unen como dímeros al DNA (a una secuencia pseudopalindrómica) y lo distorsionan, desalineando los elementos -35 y -10 del promotor e impidiendo la

activación transcripcional (Brown *et al*., 2003) (Figura 87A). Por el contrario, el tetrámero de CarH utiliza tres de sus cuatro dominios de unión al DNA para unirse a tres DRs de 11 pb dispuestas en tándem. La estructura del núcleo de TtCarH, que engloba los cuatro dominios sensores de luz, no cambia si la proteína está o no unida al DNA. Son los DBDs de CarH los que se reorientan para poder unirse a las tres DRs adyacentes (Figura 87B). Este modo único de unión al DNA racionaliza la arquitectura del tetrámero con dos dímeros cabeza-cola, que es inusual para los factores de transcripción, permitiendo que los DBDs se organicen de forma paralela y se unan de forma cooperativa a las DRs (Figura 87B). Dos de los tres DBDs (los que se unen a las DRs de los extremos) pertenecen a un mismo dímero cabeza-cola y el restante DBD al otro dímero, lo que constituye una particularidad más del modo de acción de CarH. La unión se ve favorecida por la flexibilidad del *linker*, pues en la estructura del complejo con el DNA, el *linker* del monómero que se une a DR1 está casi completamente extendido (Figura 87B).

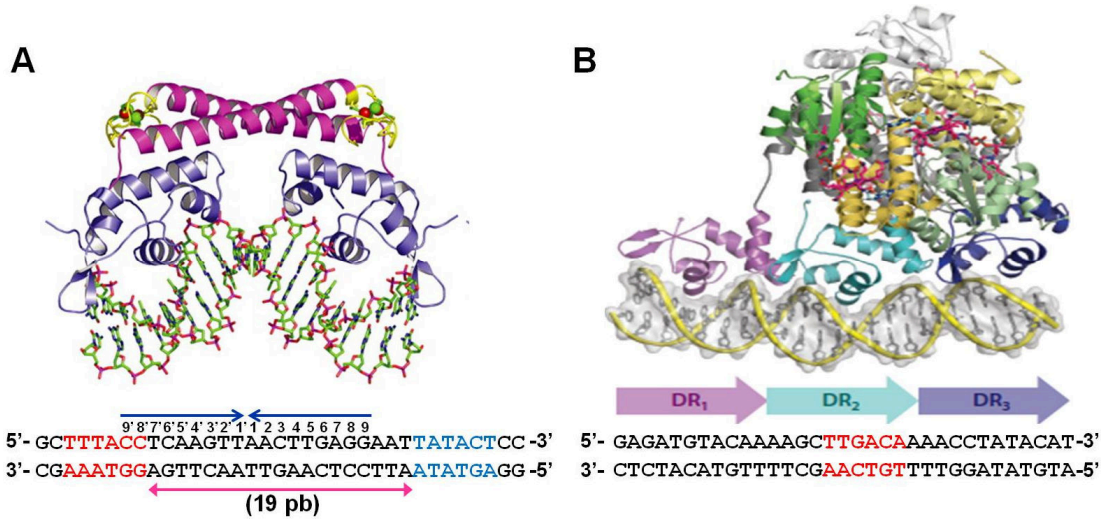


Figura 87. Comparación del modo de unión al DNA de SoxR y TtCarH. (A) Estructura del complejo SoxR-promotor de *soxS*. El dominio de unión al DNA, la hélice de dimerización y el dominio de unión al grupo Fe-S se muestran en azul, magenta y amarillo, respectivamente. La flecha magenta marca el DNA espaciador de 19 pb, y las flechas azules muestran la región palindrómica (numerada) donde se sitúan los dos sitios de unión de SoxR (código acceso PDB: 2ZH6) (Watanabe *et al*., 2008). **(B)** Estructura cristalina del tetrámero de TtCarH en complejo con la región operadora de P_{TtcarH} (PDB: 5C8E). Los cuatro DBDs se muestran de colores púrpura, cian, gris y azul oscuro. Los DBDs reorientan su posición para unirse al DNA a través de tres DRs (representadas esquemáticamente y coloreadas según el DBD al que se unen) (Padmanabhan *et al*., 2017). En rojo se indica la región -35 y, en azul, la región -10.

La unión óptima de CarH al DNA requiere de la formación de un tetrámero y, de hecho, los mutantes que solo forman dímeros se unen al DNA con una afinidad y cooperatividad reducida, mientras que los monómeros inducidos por la luz lo hacen débilmente. En la unión al DNA se producen numerosos enlaces por puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas que posicionan la hélice de reconocimiento

del motivo H-T-H de cada DBD en el surco mayor y la horquilla β del "ala" en el surco menor. La hélice de reconocimiento se corresponde con la hélice α2 del dominio H-T-H descrito para proteínas de la familia MerR (Brown *et al*., 2003), y contiene el motivo RxWERRY descrito para CarA (León *et al*., 2010), CarH y sus homólogos. Los datos de la estructura cristalográfica del complejo TtCarH-DNA han permitido establecer una secuencia consenso, AnnTnnACAn (Figura 88A), que ha sido confirmada mediante análisis mutacional del operador. La mutación en las posiciones 4/5 o 8/9 en dos repeticiones o en las tres repeticiones, pero no en una sola, elimina la unión de CarH. Por el contrario, la adenina en posición 1 no parece contribuir de manera significativa a la unión de la proteína. La estructura del complejo muestra cómo las posiciones menos conservadas también contribuyen a la unión al DNA (Figura 51).

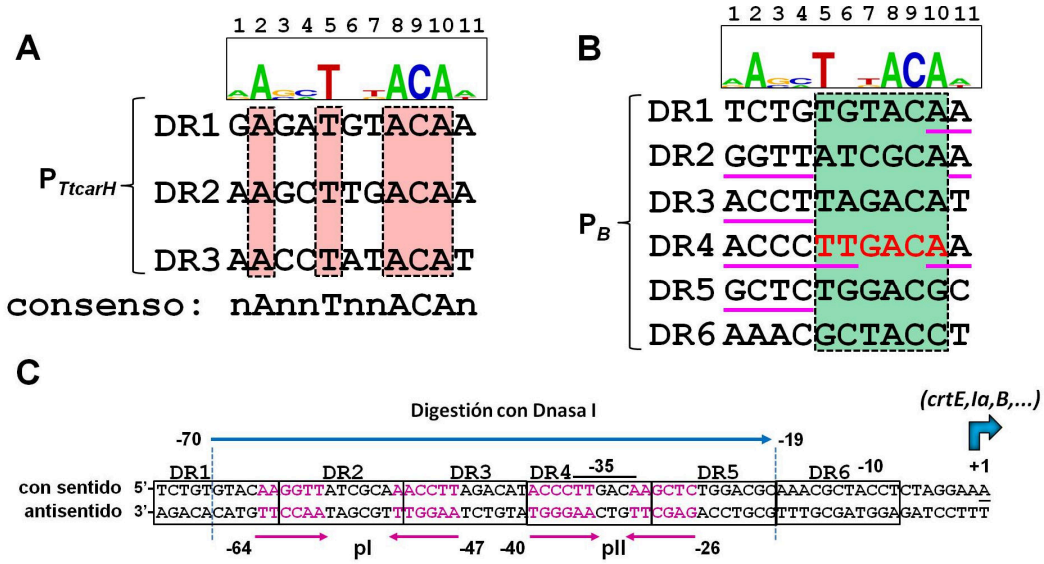


Figura 88. Análisis del operador P_B de *M. xanthus* en relación al modo de unión de TtCarH. (A) Alineamiento de las tres DRs de 11 pb presentes en P_{TtcarH}. Las posiciones conservadas se muestran resaltadas con recuadros rojos según la secuencia logo. **(B)** Alineamiento de las seis hipotéticas DRs de 11 pb presentes en P_B identificadas por su similitud con el operador en P_{TtcarH}; enmarcado en verde aparecen las posiciones que estarían en contacto con la hélice de reconocimiento, con la región -35 resaltada en rojo. **(C)** Secuencia del promotor P_B en la que se muestra la zona improntada por QTt2 y CarA en la cadena con sentido (flecha azul). En magenta, los cuatro segmentos del operador bipartito de CarA constituido por dos palíndromes (pI y pII). Las seis posibles DRs se muestran delimitadas mediante rectángulos. La numeración de la secuencia se hace en referencia al TSS. Se indica la posición de los elementos -35 y -10.

Los estudios previos del grupo sugieren un operador bipartito para CarA, constituido por dos palíndromes (Figura 88B y C). Aunque no se ha podido determinar con exactitud el sitio de unión de MxCarH, por la imposibilidad de purificarla en su forma activa, los estudios *in vitro* con la quimera CTt2 (constituida por el dominio de unión al DNA de MxCarH y el dominio C-terminal de TtCarH) sugieren la unión de

MxCarH a una región de ~50 pb, que solapa con el operador de CarA (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011). El análisis de la secuencia de dicha región ha puesto de manifiesto la presencia de hasta seis repeticiones similares a las del operador de TtCarH (Figura 88B y C), a las que es probable que se una MxCarH. Como ocurre con el operador de TtCarH, una de dichas repeticiones solapa con la región -35 del promotor. Cabe esperar, por tanto, que la unión de MxCarH a su operador impida la expresión de P_B por impedimento estérico, mediante el bloqueo a la unión de la RNAP. Futuros estudios ayudarán a establecer el número real de repeticiones y DBDs requeridos para la unión de MxCarH al DNA.

IV.1.3 Desrepresión por movimiento del haz de hélices α en TtCarH provocado por la luz

La acción de la luz promueve el desmantelamiento a monómeros de los oligómeros de CarH (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011). Este suceso es clave para la liberación de CarH de la región operadora del promotor sujeto a represión. La estructura cristalográfica del monómero de TtCarH-AdoCbl resultante de la exposición a la luz reveló de qué modo la Cbl queda atrapada en el fotorrecetor inactivo tras la fotólisis y proporcionó información molecular sobre cómo la luz desencadena el desensamblaje del tetrámero. En la oscuridad, el grupo Ado funciona como un “tope de puerta” para el Trp131 (del motivo W-x(9)-E-H). Esta interacción mantiene el protómero de CarH en la conformación “erecta” que es necesaria para ensamblar el dímero de cabeza-cola y, por tanto, el tetrámero. Una vez que el grupo 5’-dAdo se disocia al exponerse a la luz, el Trp131 se desplaza hacia el hueco generado, dando lugar a un cambio drástico (> 8 A °) del haz de hélices α con respecto al dominio Rossmann. Este desplazamiento distorsiona el contacto entre las superficies de los monómeros, provocando el colapso del tetrámero y la pérdida de la unión al DNA (Figura 55).

El desplazamiento del haz de hélices α no solo recoloca el Trp131 sino también la His adyacente (His132), que termina convirtiéndose en el ligando axial superior del Co en sustitución del grupo 5’-dAdo, formando un enlace bis-His muy estable. La determinación de la estructura de TtCarH fotolisada proporcionó la primera identificación de un enlace bis-His en el que está implicada la Cbl. La estabilidad del enlace bis-His explica la dificultad para intercambiar la Cbl atrapada tras la fotólisis con AdoCbl fresca (Jost *et al*., 2015b; Kutta *et al*., 2015). En general, las Cbl son biológicamente muy caras de sintetizar, por lo que su “secuestro” en el fotorreceptor

fotolisado podría servir como estrategia para facilitar su recuperación y reutilización *in vivo*, aunque los detalles del proceso de recuperación no se conocen todavía. La otra His implicada (ligando coaxial inferior) forma parte del dominio canónico de unión a Cbl y está muy conservada en las proteínas CarH, ya que es esencial para su funcionalidad (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011). Por el contrario, la His situada como ligando coaxial superior no es estrictamente necesaria para la unión a AdoCbl, el ensamblaje del tetrámero o su desensamblaje inducido por la luz. Esto quizá pueda explicar por qué esta His solo se conserva en bacterias termófilas y en algunos homólogos de CarH pero no en todos (por ejemplo, es Glu en CarH de *M. xanthus* y *B. megaterium*) (Figura 89). Recientemente, se ha descrito una proteína reguladora de la expresión de genes fotosintéticos denominada AerR, presente en muchas bacterias fototróficas anoxigénicas. En la proteína AerR se ha propuesto la existencia de un enlace bis-His semejante a CarH, pero la His que actúa como ligando coaxial superior no está conservada ni se sitúa en un dominio de haz de hélices α (Cheng *et al*., 2012; Vermeulen & Bauer, 2015).

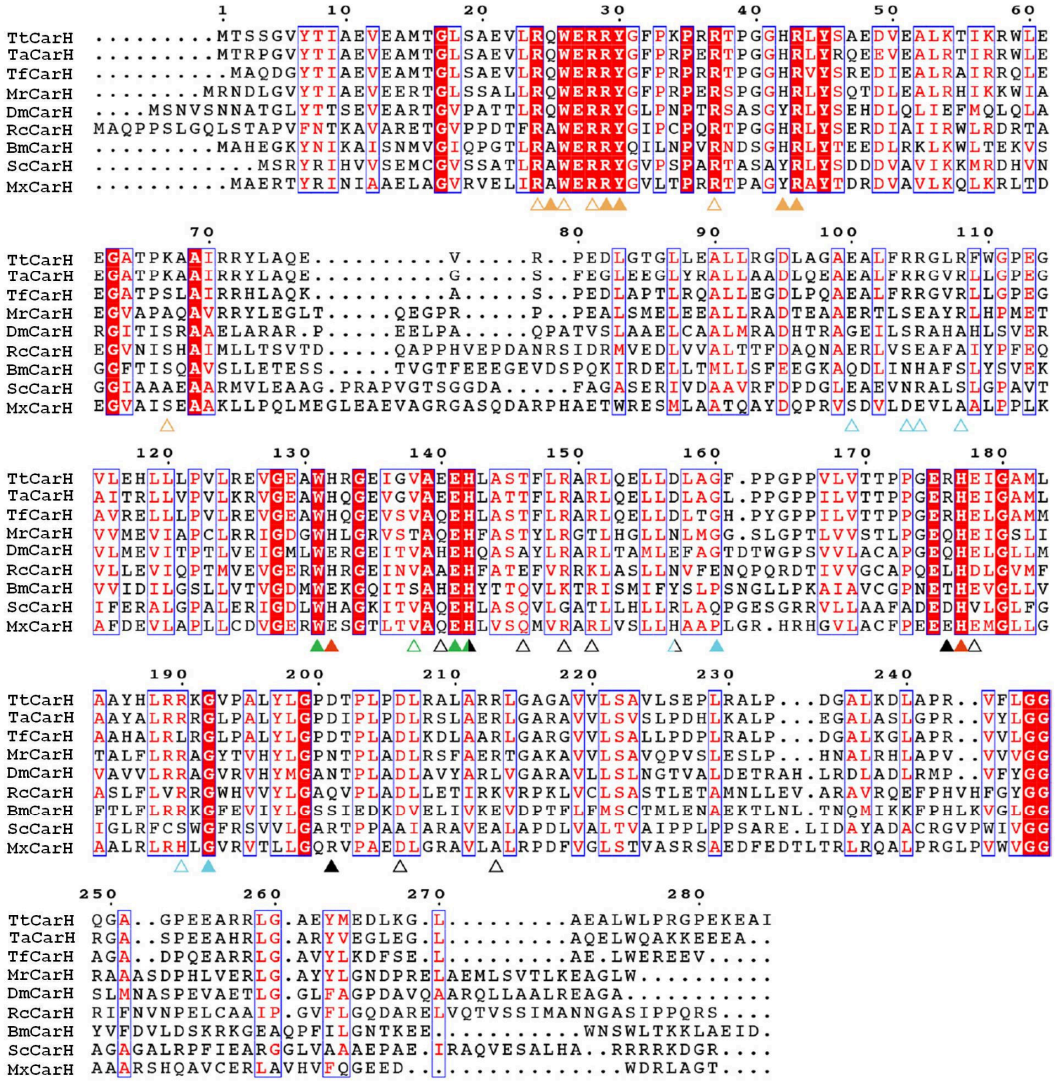


Figura 89. Alineamiento de secuencias de CarH de diferentes especies bacterianas. Los residuos idénticos se muestran con letras de color blanco y con fondo rojo, y los similares, con letras de color rojo. Los triángulos muestran las posiciones funcionalmente importantes (el interior coloreado indica residuos analizados por mutagénesis). La coloración de estos triángulos indica: en naranja, puentes de hidrógeno/interacciones iónicas con el DNA; en verde, contactos con el grupo 5'-dAdo; en rojo, histidinas coordinadas con la Cbl; en negro, puentes de hidrógeno/interacciones iónicas en la interfaz dimérica; en cian, puentes de hidrógeno/interacciones iónicas entre los residuos equivalentes a G160 y G192 en la interfaz dímero-dímero. Los residuos implicados en más de un tipo de interacción están coloreados mitad/mitad. El alineamiento ha sido generado usando ESPript. Abreviaturas CarH: Tt, *T. thermophilus* (Código NCBI: WP_011174503); Ta, *Thermus aquaticus* (NCBI: ALJ91091.1); Tf, *Thermus filiformis* (JGI: GENE ID 2641992675); Mr, *Meiothermus ruber* (NCBI: ADD27153.1); Dm, *Deinococcus maricopensis* (NCBI: ADV68112.1); Rm, *Roseiflexus castenholzii* (NCBI: ABU57845.1); Bm, *Bacillus megaterium* (NCBI:AJI20494); Sc, *S. cellulosum* (NCBI: CAN90736.1); Mx, *M. xanthus* (NCBI: CAA79965).

La fotólisis de AdoCbl libre genera un radical 5'-desoxiadenosilo (Ado•) y cob(II)alamina, que posteriormente dan lugar a una serie de productos: en presencia de oxígeno se produce 5-peroxiadenosina, adenosina-5-aldehído, y cantidades menores de adenosina y adenina; y en ausencia de oxígeno se produce 5-desoxi-5,8-cicloadenosina (Hogenkamp, 1963, 1966; Jarrett *et al.*, 1996). Las enzimas

dependientes de AdoCbl, a través de la ruptura homolítica del enlace Co-C, aprovechan la generación del radical Ado• para llevar a cabo su acción enzimática. Para evitar la formación de especies reactivas del oxígeno, que pueden producir daño celular, la generación de este radical Ado• se produce en un ambiente controlado (Banerjee & Ragsdale, 2003). Precisamente por esto, resulta paradójico pensar que CarH en presencia de luz produzca un radical que dañe a la célula, cuando precisamente su principal función es proteger a la célula de este tipo de radicales nocivos.

Recientemente, se ha demostrado que CarH no produce el radical Ado• y en su lugar genera una molécula no reactiva, 4', 5'-anhidroadenosina, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Jost *et al*., 2015c) (Figura 90). El hecho de que se produzca un compuesto neutro, en lugar del radical Ado•, permite sugerir que CarH altera la fotoquímica de AdoCbl para que no se genere el radical reactivo Ado• (Figura 90).

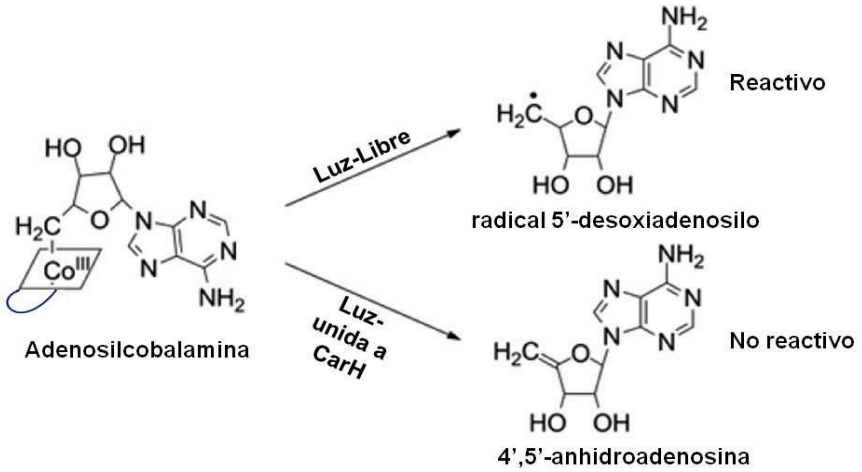


Figura 90. Esquema de la fotólisis de AdoCbl libre o unida a CarH. La ruptura del enlace Co-C, mediante la exposición a la luz, en AdoCbl libre genera el radical 5'-desoxiadenosilo. Sin embargo, cuando AdoCbl está unida a CarH genera 4',5'-anhidroadenosina. Imagen modificada de Jost *et al*., (2015c).

La alteración por CarH de la fotoquímica de AdoCbl debe estar relacionada con su modo de unión a la proteína. En este sentido, CarH podría ejercer un efecto "jaula" impidiendo la difusión de los productos generados después de la escisión fotolítica del enlace Co-C, como se ha observado en MetH y en la enzima glutamato mutasa dependiente de AdoCbl (Jarrett *et al*., 1996; Sension *et al*., 2004, 2005). Otro aspecto a tener en cuenta es la contribución de los aminoácidos presentes en CarH a su fotoquímica. La falta de conservación de His132 (cuya cadena lateral ocupa la cara

superior de B_{12} después de la fotólisis) de TtCarH en otros homólogos y la observación de que su mutación no afecta a la respuesta a la luz sugiere que dicho residuo no ejerce un papel clave en la fotoquímica. Cabe pensar, más bien, en un papel de los residuos que forman parte del motivo W-x(9)-EH y que orientan al grupo Ado de manera diferente a la observada habitualmente en enzimas dependientes de AdoCbl o en AdoCbl libre (Figura 84B). Estudios futuros con técnicas espectroscópicas ultrarrápidas y simulaciones computacionales permitirán profundizar en la base molecular de la particular fotoquímica de CarH.

IV.2 Modo de acción de BmCarH

Los estudios de alta resolución estructural y mutacional con TtCarH han revelado muchas facetas únicas sobre este fotorreceptor y han proporcionado información fundamental sobre su unión a AdoCbl, su estructura cuaternaria, el diseño del operador y el modo de unión al DNA. El análisis de la conservación del modo de acción de CarH en otros homólogos permite incrementar nuestros conocimientos sobre el comportamiento y evolución de esta nueva familia de fotorreceptores. Además, es relevante para su uso como herramienta en optogenética y en otras aplicaciones (Chatelle *et al*., 2018; Kainrath *et al*., 2017; Wang *et al*., 2017) (véase apartado I.6.3).

Aunque los miembros de la familia de proteínas CarH están ampliamente distribuidos en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Ortiz-Guerrero *et al*., 2011; Padmanabhan *et al*., 2017), los estudios sobre CarH se habían limitado a bacterias Gram negativas. Sin embargo, los estudios realizados en este trabajo y los llevados a cabo por Takano *et al*. (2015) con el homólogo de CarH de *B. megaterium* han revelado aspectos que difieren de Tt/MxCarH y que ponen de manifiesto una plasticidad inesperada. El fotorreceptor CarH reprime en oscuridad la expresión de genes carotenogénicos (*crt*) que habitualmente forman parte del mismo operón o flanquean al gen *carH*, de tal forma que la unión a una única región operadora es suficiente para ejercer su función represora. En cambio, en *B. megaterium* los genes *crt* están separados de *carH,* constituyendo el primer ejemplo estudiado en el que CarH se une a dos promotores no ligados. Además, al comparar el comportamiento oligomérico de TtCarH y BmCarH también se han observado diferencias. En TtCarH, la unión a AdoCbl provoca la transición de monómero a tetrámero funcional, que la exposición a la luz convierte de nuevo en un monómero (Figura 91A). En BmCarH, sin embargo, la forma sin cobalamina parece comportarse como un tetrámero inactivo

que, tras la unión a AdoCbl, se convierte en funcional; y la exposición a la luz provoca la aparición de dímeros (Fernández-Zapata *et al.*, en prensa; Takano *et al.*, 2015)(Figura 91B).

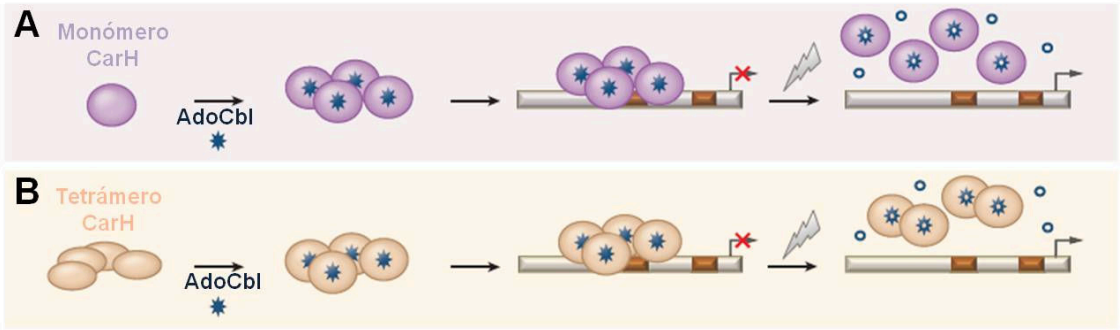


Figura 91. Modo de acción y estados oligoméricos de TtCarH/MxCarH y BmCarH. (A) CarH de *M. xanthus*/*T. thermophilus*. ApoCarH es un monómero, y la unión a AdoCbl (asterisco azul relleno) promueve la formación de un tetrámero. La unión al DNA bloquea el elemento -35 e impide el inicio de la transcripción. La luz provoca la disociación del tetrámero vía fotólisis de AdoCbl dando lugar a Cbl (asteriscos vacíos) y 4',5'-anhidroadenosina (círculos vacíos), lo que permite el acceso de la RNAP y el inicio de la transcripción. **(B)** CarH de *B. megaterium*. ApoCarH es un tetrámero incapaz de unirse al DNA. La unión a AdoCbl promueve la unión al operador, que solapa con la región -35 o -10. La luz desmantela los tetrámeros para formar dímeros que, al no poder unirse al DNA, permiten el inicio de la transcripción (Padmanabhan *et al.*, 2017).

IV.2.1 Formación del tetrámero y papel de la AdoCbl en BmCarH

En su forma apo, la proteína BmCarH es ya un tetrámero aparente, aunque incapaz de unirse al DNA. La comparación de la secuencia de aminoácidos y la estructura secundaria de BmCarH y TtCarH muestra la conservación de los motivos críticos presentes en las proteínas CarH. También se ha observado una composición de hélices α/lámina β que permite sugerir una asociación de dominios idéntica. Sin embargo, en los ensayos de dicroísmo circular, la presencia de AdoCbl incrementa el contenido en hélices α en luz y oscuridad. Además, una proteína con una conformación adecuada debe mantener sus regiones hidrofóbicas resguardadas del solvente y en el caso de apoBmCarH no ocurre así. Nuestros datos apuntan a que la forma apo de BmCarH posee una conformación intermedia entre la forma final correctamente plegada y la proteína sin plegar, a modo del denominado glóbulo fundido (Baldwin & Rose, 2013). Ello explicaría por qué no puede unirse al DNA, a pesar de ser un tetrámero como la forma activa. La proteína BmCarH se parece a las proteínas alostéricas de unión al DNA, como los represores LacI y PurR de *E. coli* (Bell & Lewis, 2000; Schumacher *et al.*, 1995) o a proteínas MerR (Heldwein & Brennan, 2001; Newberry & Brennan, 2004). En éstas, la unión del ligando promueve el paso de

glóbulo fundido a proteína funcional. Por otro lado, la transición en TtCarH de monómero a tetrámero unido a AdoCbl y capaz de unirse al DNA es reminiscente de proteínas alostéricas de unión al DNA, tales como el represor de biotina (Weaver *et al.*, 2001).

La proteína BmCarH conserva el motivo de unión a AdoCbl descrito para TtCarH, W-x(9)-EH, que en TtCarH interacciona con el grupo 5'-dAdo y es responsable de los cambios alostéricos que determinan el ensamblaje del monómero a tetrámero. Hasta la realización de este trabajo, solo se había analizado el efecto de mutar dicho motivo en TtCarH. Nuestros resultados con BmCarH y MxCarH han puesto de manifiesto la relevancia funcional del motivo W-x(9)-EH también en estos homólogos, lo que sugiere que su función está también conservada. No obstante, si bien las mutaciones con un efecto más drástico en TtCarH fueron las que afectan a la His, en BmCarH fueron las que afectan al Trp y el Glu, quizás porque TtCarH en su forma apo es un monómero mientras que BmCarH es un glóbulo fundido. Que el mutante de BmCarH en la His (H154A) mantenga parte de la función (en vez de ser completamente inactivo, como en el caso de TtCarH) puede resultar muy útil en un futuro para investigar el papel de dicho residuo en la fotoquímica.

Las diferencias entre TtCarH y BmCarH ponen de manifiesto la plasticidad de AdoCbl para modular la oligomerización y la actividad de esta familia de fotorreceptores, una plasticidad que también se observa en la respuesta a la iluminación. En ambas proteínas, la iluminación conlleva la fotólisis de AdoCbl y la disociación del tetrámero, pero a monómeros en el caso de TtCarH y a dímeros en el de BmCarH. Y aunque las dos retienen la Cbl fotolisada, BmCarH puede intercambiarla por AdoCbl fresca *in vitro*, acorde con la falta de una His en la posición correspondiente a la His132 de TtCarH (en su lugar, BmCarH presenta un Glu). Que no se forme el enlace bis-His en BmCarH (ni, probablemente, en MxCarH) puede facilitar la regeneración de los fotorreceptores, mediante simple intercambio con AdoCbl, lo que permitiría un ciclo más rápido entre los estados activo e inactivo.

IV.2.2 Plasticidad en la unión de BmCarH al DNA

Los resultados obtenidos en los estudios de unión al DNA han permitido concluir que BmCarH conserva el diseño del operador y el modo de unión al DNA descrito para TtCarH. Sin embargo, existen diferencias en el tamaño de los operadores, ya que BmCarH se une a cuatro DRs (en lugar de a tres, como TtCarH), empleando para ello sus cuatro DBDs. Además, la búsqueda en el genoma de *B.*

megaterium de regiones con tres DRs en tándem y con la secuencia 5'-nnnnTnnACAn-3' dio como resultado el hallazgo de tres nuevas posibles dianas de BmCarH (Fernández-Zapata *et al*., en prensa) (Figura 92A). El primero de dichos sitios se corresponde con una secuencia situada 43 pb aguas arriba de un gen que codifica una proteína homologa a Spx. Las proteínas Spx, muy conservadas en el phylum Firmicutes, contienen un motivo disulfuro CXXC con actividad redox que controla su actividad; normalmente, actúan como reguladores globales de la transcripción en respuesta a estrés oxidativo de tioles, mediante la interacción con el dominio C-terminal de la subunidad α de la RNAP (Lamour *et al*., 2009; Nakano *et al*., 2003; Zuber, 2009). En el genoma de *B. megaterium* coexisten dos genes *spx* parálogos: un primer gen anotado como *spxA*, al que en este trabajo hemos denominado *spxA1*, y el que presenta el posible sitio de unión de BmCarH en su región promotora, al que hemos denominado *spxA2*. Tanto SpxA1 como SpxA2 son muy parecidos a la proteína Spx de *B. subtilis* (identidad del 86% SpxA1 y 59,20% SpxA2) (Figura 92B). El segundo posible operador identificado en la búsqueda genómica se sitúa 193 pb aguas arriba de un gen que codifica la proteína DnaA, implicada en el inicio de la replicación. El tercer sitio se localiza 208 pb aguas arriba del gen para una proteína hipotética de la familia de la hemolisina III y 161 pb aguas arriba de un gen (que se transcribe en dirección opuesta) para otra proteína hipotética con dominio hélice-giro-hélice.

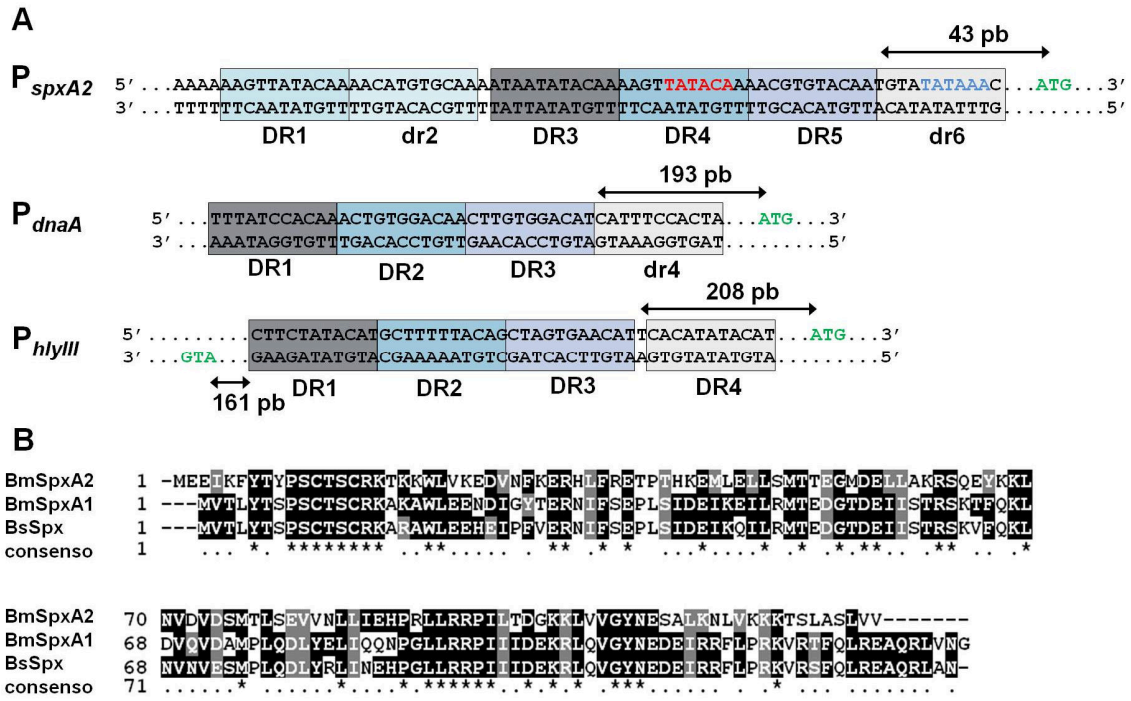


Figura 92. Identificación de tres posibles operadores de BmCarH. (A) Secuencias promotoras de los tres posibles sitios de unión de BmCarH, encontrados mediante la búsqueda en el genoma de *B. megaterium* de la secuencia nnnnTnnACAn repetida tres veces en tándem. Se indica la distancia al codón de inicio de la traducción (en verde). Se muestra en P_{spxA2} las posibles regiones -35 y -10, en rojo y en azul, respectivamente. **(B)** Alineamiento de la secuencia de las dos proteínas parálogas de Spx en *B. megaterium* (Bm): SpxA1 (código NCBI, BG04_RS15045) y SpxA2 (NCBI BG04_RS07565); y *B. subtilis* (*Bs*) (NCBI BSU11500). En negro (*) se muestran los residuos idénticos y, en gris (.), los conservados.

Inesperadamente, en los ensayos *in vitro* solo se observó unión de BmCarH al promotor de *spxA2*, no detectándose la formación del complejo CarH-DNA en las hipotéticas regiones operadoras de *dnaA* y *hlyIII* (Fernández-Zapata *et al*., en prensa). Estos resultados indican que no basta con la presencia de tres repeticiones en tándem de la secuencia nnnnTnnACAn para garantizar la unión al DNA de BmCarH y sugieren que las bases menos conservadas de las DRs también son importantes para el reconocimiento del DNA, al igual que ocurre en TtCarH. Que la expresión de *spxA2* está sujeta, en efecto, a regulación por BmCarH ha quedado demostrado por la observación de que su expresión está fotorregulada *in vivo* y que dicha regulación se pierde en un mutante de *B. megaterium* portador de una deleción completa y en fase de *BmcarH* (Fernández-Zapata *et al*., en prensa). Se trata, por tanto, del primer ejemplo descrito en el que la expresión de un gen *spx* está sujeta a regulación por luz.

Los ensayos de *footprint* revelaron un sitio de unión de BmCarH en P_{spxA2} considerablemente mayor al esperado de la unión solo a las tres DRs (DR3, DR4 y DR5; Figura 92A) halladas en la búsqueda bioinformática. Ello permitió identificar otra

DR (DR1) y una pseudorepetición (dr2) aguas arriba de DR3-DR5, pero separadas de éstas por un pb, y una pseudorepetición adicional (dr6) (Figura 92A y 93A). El análisis detallado del modo de unión de BmCarH a este sitio multipartito reveló que está constituido por tres posibles sitios de unión, a los que BmCarH se une con afinidades similares, y que están formados por 4 DRs o 3 DRs y una pseudorepetición: DR1-DR4, dr2-DR5 y DR3-dr6 (Fernández-Zapata *et al*., en prensa). Sorprendentemente, el cambio de registro derivado de la inserción de un pb entre dos DRs contiguas (dr2 y DR3) no parece afectar a la unión de BmCarH. Por otro lado, BmCarH muestra menor afinidad por la región operadora de su propio promotor (K_D 4 veces mayor), que tiene cuatro DRs en tándem de 11 bp, que por P_{crtI} o a cualquiera de los segmentos de P_{spxA2}. Esta cualidad permitiría el uso combinatorio de DRs y/o pseudo-repeticiones diferencialmente optimizadas para conseguir un ajuste fino de las afinidades por cada uno de los sitios de unión al DNA, lo que puede considerarse como una estrategia fisiológicamente relevante para la regulación génica *in vivo*. Además, la regulación simultánea de la síntesis de carotenoides (para paliar el efecto del oxígeno singlete) y de la expresión de *spx* (para activar las vías de respuesta al estrés oxidativo general) permite que estas dos líneas de defensa converjan como una estrategia más efectiva para combatir el daño celular oxidativo causado por la luz (Figura 93B).

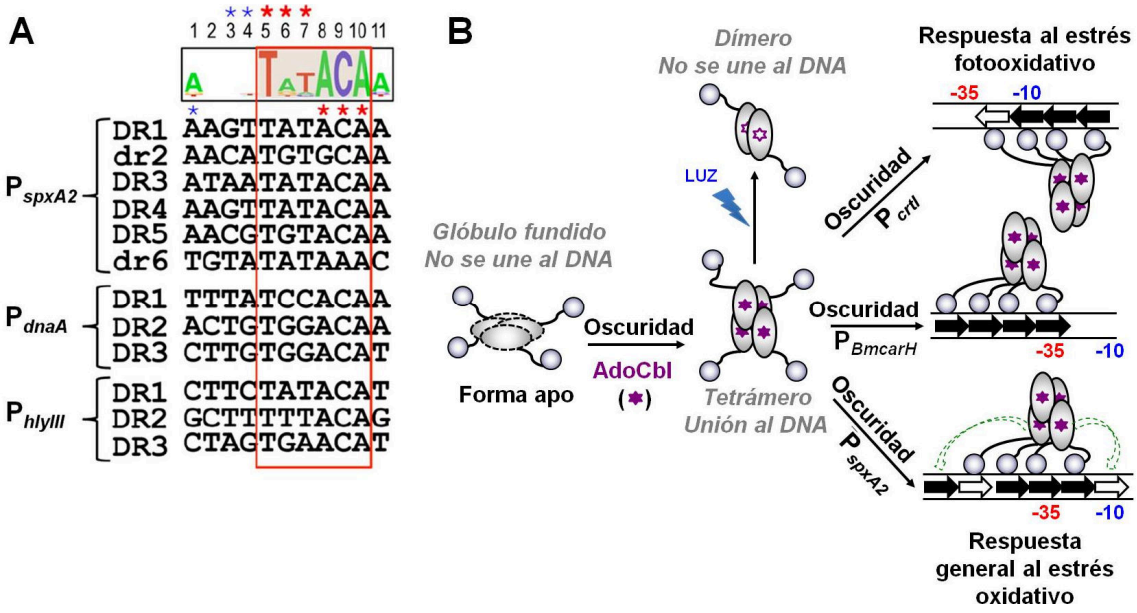


Figura 93. Comparación de las DRs de P_{spxA2}, P_{dnaA} y P_{hlyIII}, y modo de acción de BmCarH. **(A)** Alineamiento de las repeticiones de P_{spxA2}, P_{dnaA} y P_{hlyIII}, con la secuencia logo numerada basada en las repeticiones de P_{TtcarH}, P_{BmcarH} y P_{crtI}. El motivo TnnACA se encuentra sombreado en naranja, Los asteriscos indican los contactos observados en la estructura del complejo TtCarH-DNA en el surco mayor (rojo) y en el surco menor (azul). **(B)** Modelo del proceso de oligomerización de BmCarH dependiente de AdoCbl y luz, diseño del operador y modo de unión al DNA. La proteína apoBmCarH no se une al DNA. Su unión a AdoCbl (estrellas púrpuras) en la oscuridad produce el tetrámero con el plegamiento adecuado para la unión al DNA. La luz fotolisa la AdoCbl unida a BmCarH (estrellas púrpuras huecas) e induce la disociación del tetrámero a dímeros incapaces de unirse al DNA operador. Las flechas negras indican repeticiones con el motivo TnnACA y las flechas huecas son pseudo-repeticiones. Las repeticiones están orientadas en la misma dirección del promotor en P_{BmcarH} y P_{spxA2}, y en el sentido opuesto en P_{crtI} (se indican los elementos -35 y -10). Las flechas verdes discontinuas en la unión de BmCarH a P_{spxA2} indican dos modos adicionales de unión a cuatro repeticiones en tándem a cada lado del representado en este operador multipartito de seis repeticiones.

La falta de unión de BmCarH a los posibles sitios identificados en P_{dnaA} o P_{hlyIII} no puede atribuirse a la falta de una cuarta repetición, pues la inspección “manual” de la secuencia permitió identificar una pseudo-repetición en tándem aguas abajo de DR3 en P_{dnaA} y una DR separada por un pb aguas abajo de DR3 en P_{hlyIII}. El alineamiento de las seis repeticiones en P_{spxA2} con las repeticiones en P_{BmcarH} y P_{crtI} puso de manifiesto una secuencia consenso más refinada, Ann**T**AT**ACA**A (las bases más conservadas en negrita; Figura 93A), para la unión de BmCarH. Las desviaciones en relación a esta secuencia consenso en una o más repeticiones en P_{dnaA} o P_{hlyIII} podrían explicar la falta de unión de BmCarH a estas dos secuencias promotoras.

Una de las características de TtCarH y BmCarH es que se unen a una cara del DNA, determinada por la orientación de las DRs, que es la misma en relación al promotor en P_{BmcarH} y P_{spxA2}, pero opuesta en P_{crtI}. Curiosamente, BmCarH es capaz de

reconocer la región operadora de TtCarH uniéndose solo a tres DRs, lo que demuestra una notable plasticidad en su capacidad de unirse al DNA. Sin embargo, TtCarH solo se une a tres DRs incluso cuando hay una cuarta disponible, prefiriendo las tres situadas aguas arriba, lo que sugiere que existen determinantes de posición desconocidos que condicionen su unión al DNA.

Los operadores de BmCarH pueden solapar con el elemento -35 (P_{BmcarH}), el -10 (P_{crtI}) o ambos elementos del promotor (posiblemente en P_{spxA2}; Figura 92A y 93B), lo que nuevamente indica una plasticidad, en este caso en su capacidad de bloquear el acceso de la RNAP para reprimir la transcripción. Esta plasticidad en cierto modo recuerda a la descrita para el dímero MepR, un miembro de la familia de factores de transcripción bacterianos que regulan la resistencia a múltiples antibióticos (MarR). MepR es capaz de reprimir la expresión del gen *mepA* (que codifica una bomba de expulsión multifármaco) así como la transcripción de su propio gen (Birukou *et al*., 2014), al unirse mediante un dominio H-T-H "alado" a las regiones del operador que albergan repeticiones invertidas que contienen la secuencia GTTAG. El operador de *mepR* contiene una única repetición invertida y, por lo tanto, solo se une un dímero de MepR, que se extiende sobre el elemento -10 y TSS. Por el contario, la secuencia del operador de *mepA* abarca dos repeticiones invertidas, que solapan con los elementos -35, -10 y el TSS, lo que permite la unión de dos dímeros MepR posicionados en caras opuestas del DNA (Birukou *et al*., 2014; Kaatz *et al*., 2006) (Figura 94).

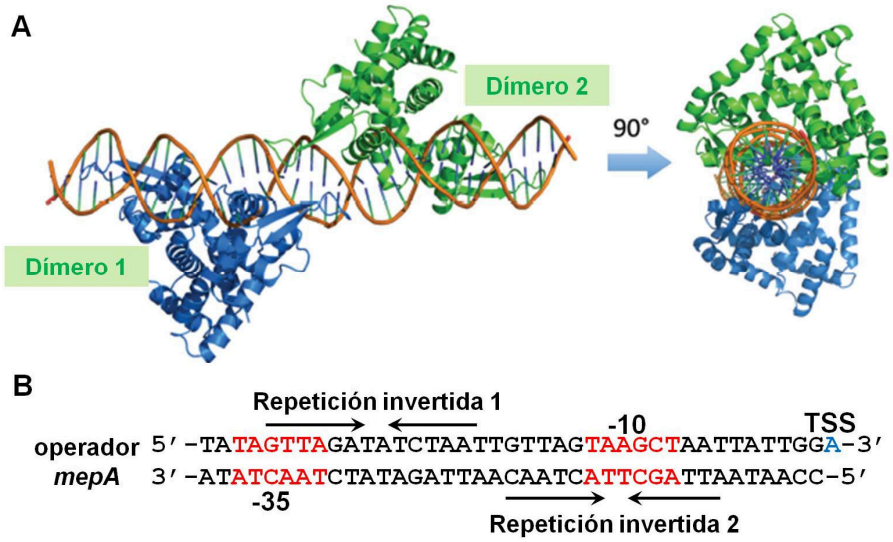


Figura 94. Unión de MepR al operador de *mepA*. (A) Izquierda, Modelo del complejo MepR-*mepA*. Derecha, modelo girado 90º. **(B)** Secuencia del operador de *mepA*. Se muestran en la secuencia los elementos -10 y -35 coloreados en rojo. Los dos sitios de unión de MepR están indicados con flechas. En azul se indica el sitio de inicio de la transcripción (Birukou *et al*., 2014).

La unión de BmCarH a 4 DRs, en lugar de a tres como TtCarH, puede ir asociado a la longitud y composición del *linker* que une el DBD y el dominio sensor de luz. La colaboración con el grupo del Prof. Modesto Orozco (IRB-UB, Barcelona), para la realización de simulaciones de dinámica molecular (MD) y modelado de la unión CarH-DNA, apunta a que la mayor longitud del *linker* de BmCarH es crucial para la unión a la cuarta repetición (Figura 95A) (Fernández *et al*, 2018). En la estructura del complejo de TtCarH con el DNA, el *linker* no posee una estructura definida y no establece ningún contacto con la proteína o el DNA. El análisis comparativo de los múltiples homólogos indica variabilidad tanto en la composición aminoacídica como en la longitud de esta región conectora (Padmanabhan *et al*., 2017). En principio, ello podría sugerir que el *linker* es una región no específica y pasiva de la proteína cuya única función sería la de unir físicamente los dos dominios funcionales. Sin embargo, los ensayos con proteínas quiméricas (TtLkB, BmLk4 o BmLkT) han puesto de manifiesto cómo la modificación del *linker* afecta a la funcionalidad de la proteína, ya sea interfiriendo con la unión al DNA (en TtLkB) o con su estabilidad en disolución (BmLk4, BmLkT). Que una parte de una proteína cualquiera tenga una estructura definida facilita mucho el estudio de su modo de acción a nivel molecular. Tradicionalmente, se han estudiado dominios estructurados de forma aislada, sin tener en cuenta la influencia que puedan tener estos segmentos intrínsecamente desordenados localizados en sitios cercanos a las regiones de interés.

Resultados recientes han demostrado cómo estas regiones conectoras, que deben poder transmitir efectos alostéricos entre dominios, modulan cambios conformacionales en DBDs que alteran la especificidad y la afinidad por el DNA mediante interacciones dinámicas y transitorias con la superficie de unión al operador (Fuxreiter *et al*., 2011; Motlagh *et al*., 2014; Vuzman & Levy, 2012). Los estudios con la proteína H-NS asociada a nucleoides bacterianos (Gao *et al*., 2017) y los factores de transcripción eucariotas Oct1 y Pax6 (Van Leeuwen *et al*., 1997; Vuzman *et al*., 2010) han demostrado la importancia de la longitud y la composición de estos *linkers* para favorecer la unión específica al DNA. Por el contrario, el *linker* puede disminuir la unión al DNA mediante interacciones competitivas y desfavorables a través de la presencia de muchos residuos ácidos, mediante fosforilaciones que aumentan su carga negativa o por el incremento de los costes entrópicos debidos a una mayor longitud y flexibilidad (Flock *et al*., 2014; Fuxreiter *et al*., 2011). Estos factores pueden ayudarnos a entender las diferencias en la unión de TtCarH y BmCarH. A ello han contribuido las simulaciones de MD para TtLkB, que es como TtCarH pero con el *linker* de BmCarH. Dichos estudios sugieren que TtLkB no se une al DNA porque se establecen

interacciones entre las Arg 28, 37 y 43 del DBD de TtLkB con el *linker* de BmCarH (Figura 95B), que ni BmCarH ni en TtCarH ocurren. En conjunto, estos datos confirman el importante papel que juega en CarH el tamaño y la composición aminoacídica del *linker*. Para descifrar el papel a nivel molecular de esta región sería necesaria la realización de ensayos de alta resolución, una tarea desafiante para regiones flexibles estructuralmente desordenadas.

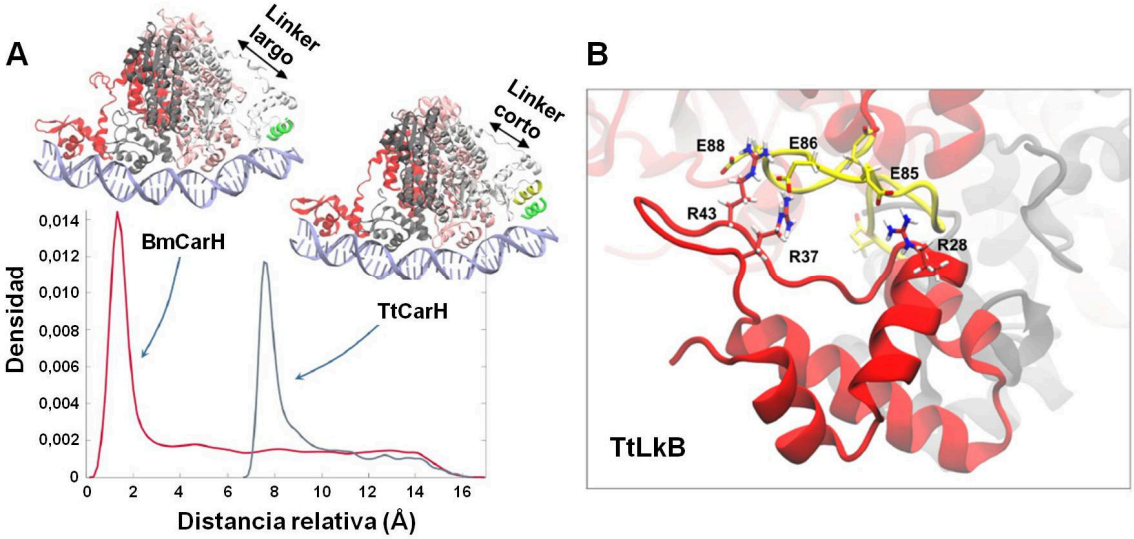


Figura 95.Efecto del *linker* en BmCarH, TtCarH y TtLkB. (A) Ensayo de dinámica molecular dirigida para evaluar la probabilidad de que el cuarto DBD de BmCarH y TtCarH sea capaz de unirse a un DNA con una cuarta DR en un espacio conformacional de 0 a 15 Å de RMSD (*Root Mean Square Deviation*, es una medida de distancia promedio entre átomos). La distancia de los picos de densidad obtenidos es relativa al valor de referencia de la hélice de reconocimiento unida al DNA (en verde). BmCarH al tener un *linker* más largo muestra un valor (~1 Å) cercano al valor de referencia, mientras que TtCarH al tener un linker más corto muestra un valor más alejado (~8 Å). **(B)** Imagen de los últimos 50 ns (de 500 ns) de simulación de dinámica molecular con TtLkB Se muestran las interacciones por puentes de hidrogeno formadas entre tres residuos de arginina (R28, R37, R43) del DBD (rojo) y tres residuos de glutámico (E85, E86, E88) del *linker* de BmCarH. Imagen modificada de Fernández-Zapata *et al*., (en prensa).

IV.3 Conservación en la naturaleza y aspectos evolutivos de la familia de fotorreceptores CarH

La búsqueda de proteínas que conservan los motivos determinados experimentalmente en este trabajo (RxWxxR en el DBD y W-(9)x-EH precediendo al motivo E/DxH en el dominio de unión a AdoCbl) ha permitido identificar ~600 proteínas homólogas que se distribuyen en varios phyla bacterianos, siendo más abundantes en Actinobacteria (con un motivo W-(10)x-EH, en vez de W-(9)x-EH), Bacteroidetes, Chloroflexi, Deinococcus-Thermus, Firmicutes, y β- y σ-Proteobacteria. La presencia

de dichos motivos sugiere que, como las tres proteínas CarH estudiadas hasta el momento, el resto de los homólogos también funcionen de una manera dependiente de AdoCbl y luz (Padmanabhan *et al*., 2017) (Figura 96A). Además de los residuos que forman parte de los motivos conservados, también se conservan otros residuos circundantes en el DBD y en el dominio de unión a B_{12} (Figura 96B) que probablemente sean también importantes desde un punto de vista estructural y/o funcional. Sin embargo, la His132 que acaba formando el enlace bis-His en la forma fotolisada de TtCarH solo está conservada en algunos phyla, como Deinococcus-Thermus. Un hecho a destacar es que la His del motivo W-(9)x-EH (His142 en *T. thermophilus*) y el Glu/Asp del E/DxH del motivo de unión a AdoCbl (Glu175 en *T. thermophilus*) están típicamente separados por 32-39 residuos (33-36 lo más común). Otra característica importante es la diversidad de tamaños del *linker* (~6-120 aminoácidos) entre el DBD y el dominio sensor de luz. En conjunto, estas observaciones sugieren que los motivos conservados mostrados en la Figura 96B pueden servir como firma característica para la identificación de otros homólogos de CarH (Padmanabhan *et al*., 2017).

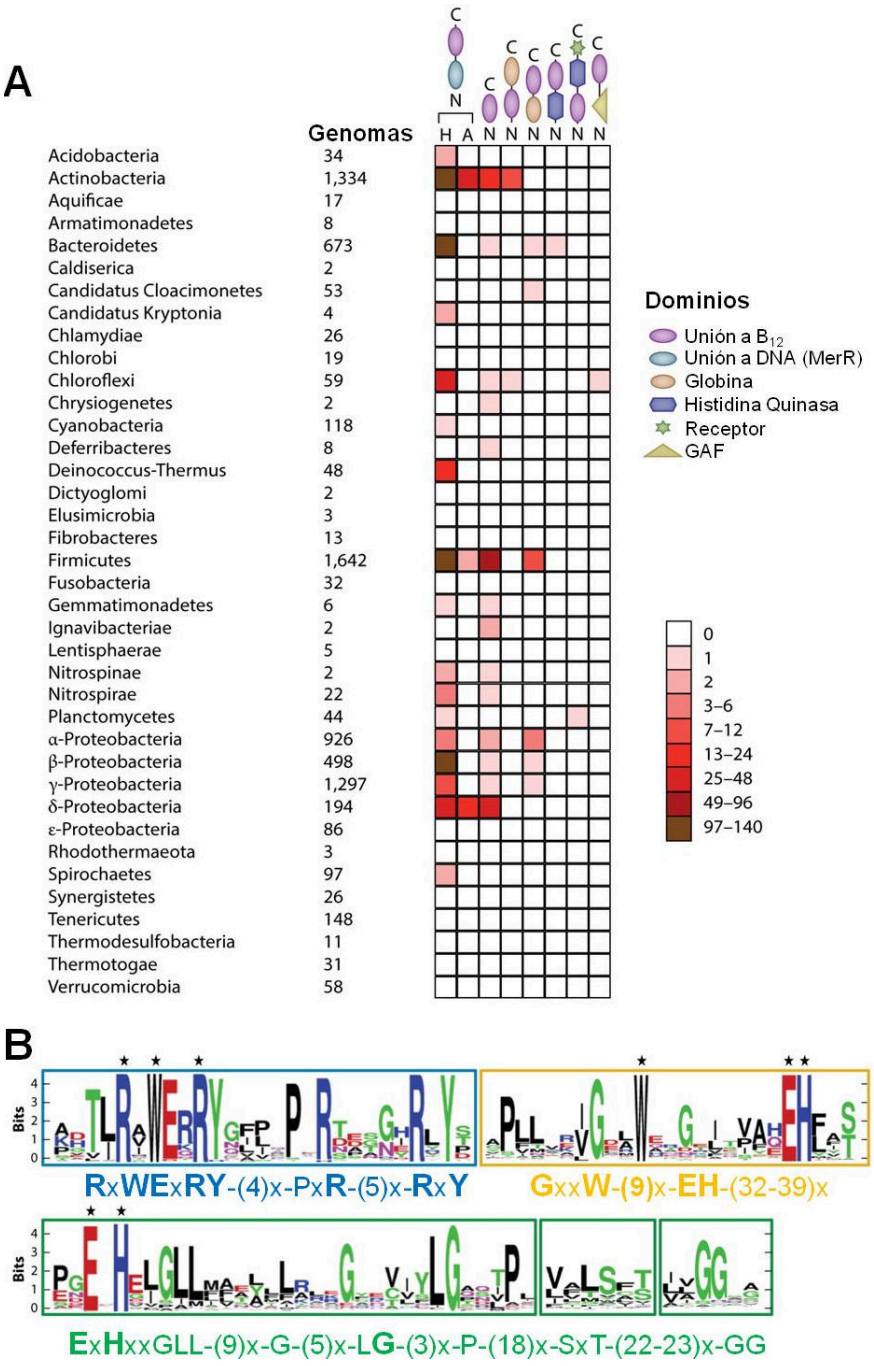


Figura 96. Distribución filogenética de CarH y de su dominio de unión a AdoCbl. (A) Distribución de las arquitecturas de dominios indicadas en diferentes phyla bacterianos. Se indica el número de genomas analizados para cada phylum (en total unos ~8,400 genomas bacterianos, disponibles en NCBI en el momento de la búsqueda). El número de proteínas en cada phylum (H, CarH; A, CarA) se muestra mediante un color asociado a un mapa de calor (derecha). Se utilizó InterPro para buscar los dominios de unión a AdoCbl (IPR006158) solo o en combinación con un dominio de unión a DNA tipo MerR (IPR000551) u otros dominios (IPR007024, tipo globina; IPR005467, histidina quinasa; IPR029016, GAF). Las secuencias de proteínas se obtuvieron de UniProt y se alinearon usando MUSCLE en MEGA7. **(B)** Secuencia logo de 498 proteínas CarH con el motivo W-x(9)-EH. Se muestran los residuos utilizados (asterisco) en la búsqueda del dominio conservado DBD (azul), haz de hélices α (amarillo) y dominio tipo Rossmann (verde). En la secuencia, debajo de cada logo, se destacan en negrita y en un tamaño de letra superior los residuos conservados (≥95%) (Padmanabhan *et al.*, 2017).

Otro aspecto destacable es el hallazgo de ~60 proteínas (en Actinobacteria, Firmicutes y δ –Proteobacteria) clasificadas como de tipo CarA, por la ausencia del Trp en el motivo W-x(9)-EH, para las cuales cabe esperar un modo de acción independiente de AdoCbl (Figura 96A). El predominio de las proteínas CarH y su distribución más amplia sugiere que derivan de una proteína ancestral más parecida a CarH que a CarA, una hipótesis en línea con la distribución de CarH y CarA en el orden Myxococcales de δ-Proteobacteria (25 y 10 proteínas, respectivamente). Los análisis genómicos también revelan la existencia de numerosas (~170) versiones unimodulares (o *stand-alone*), constituidas solo por el dominio de unión a AdoCbl, o de algunas proteínas en las que dicho dominio está unido a otros dominios efectores (Figura 96A) (Cheng *et al*., 2016; Ortiz-Guerrero *et al*., 2011). La asociación con otros dominios normalmente sucede con dominios implicados en la transducción de señales como globina (sensor de oxígeno basado en hemo), histidina quinasa o GAF (fosfodiesterasas específicas de cGMP, ciclasa de adenilato, FhlA) (Martinkova *et al*., 2013; Padmanabhan *et al*., 2017). De momento, se desconoce cuáles pueden ser las funciones que desempeñan estos módulos independientes y más aún sus posibles modos de acción, pero es tentador pensar que sean capaces de interaccionar entre sí o con otras proteínas efectoras de una forma dependiente de luz y de AdoCbl. Por lo tanto, se ha establecido el escenario para futuros estudios sobre la función y evolución de estas supuestas proteínas de unión a Cbl.

V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Los estudios sobre la relación estructura-función realizados con la proteína CarH de *Thermus thermophilus*, TtCarH, en colaboración con el grupo de la Prof. Catherine L. Drennan, han permitido entender con un alto grado de resolución cómo funciona el fotorreceptor CarH.

2. Cada protómero de TtCarH está constituido por: (i) un dominio N-terminal estructuralmente muy similar al DBD de CarA y de las proteínas de tipo MerR; (ii) un *linker* flexible; (iii) y un dominio C-terminal de unión a AdoCbl y sensor de luz, constituido por un haz de cuatro hélices α y un subdominio tipo Rossmann de unión a cobalamina.

3. En lugar de parecerse al módulo de unión a B_{12} de enzimas dependientes de AdoCbl, el dominio C-terminal de TtCarH se asemeja estructuralmente al dominio de unión a MeCbl de la sintetasa de metionina. Esta reconversión de un módulo enzimático que une MeCbl en un módulo fotorreceptor que une a AdoCbl requiere el motivo W-x(9)-EH, presente en el haz de hélices α. La mutación de cualquiera de los tres aminoácidos en dicho motivo elimina la unión a AdoCbl y, por tanto, la oligomerización y la unión al DNA.

4. En el tetrámero de TtCarH, constituido por dos dímeros con una conformación “cabeza-cola” muy inusual, la Arg176 y el Asp201 forman un puente salino importante para la formación del dímero, mientras que la G160 y la G192, probablemente por el pequeño tamaño de su cadena lateral, son importantes para la formación del tetrámero.

5. TtCarH presenta un modo sorprendente de unión al DNA, en el que utiliza solo tres de sus cuatro DBDs para unirse a tres repeticiones directas en tándem, de 11 pb cada una, con una secuencia consenso 5’-nAnnTnnACAn-3’. La represión se produce porque una de las tres DRs, la central, solapa con la region -35 del promotor.

6. El desplazamiento del haz de hélices α debido a la fotólisis de la AdoCbl provoca la disociación del tetrámero a monómeros que presentan un enlace bis-His extremadamente estable en el que participa la His132, el cobalto y la His177 y que, hasta el momento, nunca se había observado con una proteína de unión a Cbl. Dicho enlace bis-His atrapa a la cobalamina fotolisada de tal modo que impide su intercambio con AdoCbl, pudiendo constituir una estrategia para la reutilización del cofactor en bacterias termófilas.

7. El análisis de la proteína CarH de *M. xanthus*, cuya estructura tridimensional se desconoce, sugiere un modo de unión a AdoCbl, de oligomerización y de unión al DNA similar al descrito para TtCarH.

8. La proteína homóloga a CarH de *B. megaterium*, BmCarH, posee una estructura secundaria y una asociación de dominios similar a TtCarH. Además, conserva el motivo de unión al DNA y el motivo de unión a Cbl descrito como la seña de identidad de los módulos sensores de luz que se unen a AdoCbl.

9. Sin embargo, a diferencia de TtCarH, la forma apo de BmCarH es un tetrámero, en vez de un monómero, que se comporta como un glóbulo fundido incapaz de unirse al DNA. La unión a AdoCbl permite la transición a un tetrámero activo que, cuando se expone a la luz, se convierte en un dímero inactivo, en vez de un monómero como TtCarH.

10. A pesar de las diferencias entre TtCarH y BmCarH en el modo de oligomerización, el motivo W-x(9)-EH es también crucial en BmCarH para la unión a AdoCbl, la formación del tetrámero activo y la unión al DNA.

11. Las regiones operadoras de BmCarH en los promotores P_{BmcarH} y P_{crtI} conservan el diseño del operador descrito para TtCarH, pero presentan una repetición o pseudorepetición adicional, lo que sugiere que BmCarH emplea sus cuatro DBDs para unirse a dichos operadores.

12. No obstante, BmCarH puede unirse a solo tres DRs (como en el operador de TtCarH), mientras que TtCarH continúa uniéndose a tres aunque haya cuatro disponibles. Esta plasticidad de BmCarH puede estar asociada con la mayor longitud de su *linker*.

13. BmCarH, al igual que TtCarH, se une a una cara del DNA, determinada por la orientación de las DRs, que es la misma en relación con el promotor en P_{BmcarH} pero opuesta en P_{crtI}. Que las regiones operadoras de BmCarH solapen con el elemento -35 (P_{BmcarH}) o el -10 (P_{crtI}) del promotor sugiere que su acción represora puede estar mediada por el bloqueo al acceso de la RNA polimerasa a cualquiera de las dos regiones.

14. Los resultados revelan una plasticidad insospechada en el modo de oligomerización, arquitectura del operador y unión al DNA en los fotorreceptores de la familia CarH que tiene relevancia tanto en su función biológica como en su uso como una herramienta en optogenética.

V.I. BIBLIOGRAFÍA

Al-zyoud, W. A., Hynson, R. M. G., Ganuelas, L. A., Coster, A. C. F., Duff, A. P., Baker, M. A. B., … Till, B. (2016). Binding of transcription factor GabR to DNA requires recognition of DNA shape at a location distinct from its cognate binding site. *Nucleic Acid Research*, *44*, 1411-1420.

Amaratunga, M., Fluhr, K., Jarrett, J. T., Drennan, C. L., Ludwig, M. L., Matthews, R. G., & Scholten, J. D. (1996). A synthetic module for the *metH* gene permits facile mutagenesis of the cobalamin-binding region of Escherichia coli methionine synthase: Initial characterization of seven mutant proteins. *Biochemistry*, *35*, 2453-2463.

Armstrong, G. (1997). Genetic of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Annual Review of Microbiology*, *51*, 629-659.

Armstrong, G., & Hearst, J. E. (1996). Carotenoids 2: genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, *10*, 228-237.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (1998). Current Protocols in Molecular Biology. *New York: Wiley Interscience*.

Baker, K. A., & Perego, M. (2011). Transcription antitermination by a phosphorylated response regulator and cobalamin-dependent termination at a B_{12} riboswitch contribute to ethanolamine utilization in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, *193*, 2575-2586.

Baldwin, R. L., & Rose, G. D. (2013). Molten globules, entropy-driven conformational change and protein folding. *Current Opinion in Structural Biology*, *23*, 4-10.

Ballaré, C. L. (2014). Light regulation of plant defense. *Annual Review of Plant Biology*, *65*, 335-363.

Bandarian, V., Ludwig, M. L., & Matthews, R. G. (2003). Factors modulating conformational equilibria in large modular proteins: a case study with cobalamin-dependent methionine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, *100*, 8156-8163.

Banerjee, R., & Ragsdale, S. W. (2003). The many faces of vitamin B_{12} : catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, *72*, 209-247.

Barker, H. A., Weissbach, H., & Smyth, R. D. (1958). A coenzyme containing pseudovitamin B_{12}. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, *44*, 1093-1097.

Barrick, J. E., & Breaker, R. R. (2007). The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biology*, *8*.

Bastet, L., Dubé, A., Massé, E., & Lafontaine, D. A. (2011). New insights into riboswitch regulation mechanisms. *Molecular Microbiology*, 80, 1148-1154

Bell, C. E., & Lewis, M. (2000). A closer view of the conformation of the Lac repressor bound to operator. *Nature Structural Biology*, *7*, 209-214.

Bentley, S., Chater, K., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., … Hopwood, D. A. **(2002)**. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, *417*, 141-147.

Berkovitch, F., Behshad, E., Tang, K.-H., Enns, E. A., Frey, P. A., & Drennan, C. L. (2004). A locking mechanism preventing radical damage in the absence of substrate, as revealed by the x-ray structure of lysine 5,6-aminomutase. *Proceedings of the National Academy, USA*, *101*, 15870-15875.

Berleman, J. E., Allen, S., Danielewicz, M. A., Remis, J. P., Gorur, A., Cunha, J., … Auer, M. (2014). The lethal cargo of *Myxococcus xanthus* outer membrane vesicles. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 1-11.

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*, 655-680.

Birukou, I., Seo, S. M., Schindler, B. D., Kaatz, G. W., & Brennan, R. G. (2014). Structural mechanism of transcription regulation of the Staphylococcus aureus multidrug efflux operon mepRA by the MarR family repressor MepR. *Nucleic Acids Research*, *42*, 2774-2788.

Bocobza, S. E., & Aharoni, A. (2008). Switching the light on plant riboswitches. *Trends in Plant Science*, *13*, 526-533.

Botella, J. A., Murillo, F. J., & Ruiz-Vázquez, R. (1995). A cluster of structural and regulatory genes for light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *European Journal of Biochemistry*, *233*, 238-248.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248-254.

Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P., & Hobman, J. L. (2003). The MerR family of transcriptional regulators. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, *27*, 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*, 773-780.

Bulyha, I., Hot, E., Huntley, S., & Søgaard-Andersen, L. (2011). GTPases in bacterial cell polarity and signalling. *Current Opinion in Microbiology*, *14*, 726-733.

Burchard, R. P., & Dworkin, M. (1966). Light-induced lysis and carotinogenesis in Myxococcus xanthus. *Journal of Bacteriology*, *91*, 535-545.

Burgie, E. S., & Vierstra, R. D. (2014). Phytochromes: an atomic perspective on photoactivation and signaling. *The Plant Cell Online*, *26*, 4568-4583.

Burnette, W. N. (1981). "Western Blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, *112*(2), 195–203.

Cervantes, M., & Murillo, F. J. (2002). Role for vitamin B_{12} in light induction of gene expression in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, *184*, 2215-2224.

Chang, C. C., Lin, L. Y., Zou, X. W., Huang, C. C., & Chan, N. L. (2015). Structural basis of the mercury(II)-mediated conformational switching of the dual-function transcriptional regulator MerR. *Nucleic Acids Research*, *43*(15), 7612–7623.

Chatelle, C., Ochoa-Fernandez, R., Engesser, R., Schneider, N., Beyer, H. M., Jones, A. R., … Weber, W. (2018). A green-light-responsive system for the control of transgene expression in mammalian and plant cells. *American Chemical Society Synthetic Biology*, *7*, 1349-1358.

Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., … Ahmad, M. (2011). The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annual Review of Plant Biology*, *62*, 335-364.

Chen, E. (1989). Nanosecond transient absorption spectroscopy of coenzyme B_{12}. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *36*, 264-264.

Cheng, Z., Li, K., Hammad, L. A., Karty, J. A., & Bauer, C. E. (2014). Vitamin B_{12} regulates photosystem gene expression via the CrtJ antirepressor AerR in *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular Microbiology*, *91*, 649–664.

Cheng, Z., Wu, J., Setterdahl, A., Reddie, K., Carroll, K., Hammad, L. 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*, 734-746.

Cheng, Z., Yamamoto, H., & Bauer, C. E. (2016). Cobalamin's (vitamin B_{12}) surprising function as a photoreceptor. *Trends in Biochemical Sciences*, *41*, 647-650.

Christie, J. M., Arvai, A. S., Baxter, K. J., Heilmann, M., Pratt, A. J., O'Hara, A., … Getzoff, E. D. (2012). Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges. *Science*, *335*, 1492-1496.

Cohen-Bazire, G., Sistrom, W. R., & Stanier, R. Y. (1957). Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, *49*, 25-68.

Cohen, S. E., & Golden, S. S. (2015). Circadian rhythms in cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *79*, 373-385.

Conrad, K. S., Jordan, C. D., Brown, K. L., & Brunold, T. C. (2015). Spectroscopic and computational studies of cobalamin species with variable lower axial ligation: Implications for the mechanism of Co-C bond activation by class i cobalamin-dependent isomerases. *Inorganic Chemistry*, *54*(8), 3736-3747.

Craig, M. L., Suh, W. C., & Record, M. T. (1995). HO. and DNase I probing of Es^{70} RNA polymerase--lambda P_R promoter open complexes: Mg^{2+} binding and its structural consequences at the transcription start site. *Biochemistry*, *34*, 15624-15632.

Davis, S. J., Vener, A. V., & Vierstra, R. D. (1999). Bacteriophytochromes: Phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science*, *286,* 2517-2520.

Dawid, W. (2000). Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *Federation of European Microiological Societies Microbiology Reviews*, *24*, 403-427.

DebRoy, S., Gebbie, M., Ramesh, A., Goodson, J. R., Cruz, M. R., Van Hoof, A., … Garsin, D. A. (2014). A riboswitch-containing sRNA controls gene expression by sequestration of a response regulator. *Science*, *345*, 937-940.

DeForest, C. A., & Anseth, K. S. (2012). Advances in bioactive hydrogels to probe and direct cell fate. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, *3*, 421-444.

Deruere, J. (1994). Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *The Plant Cell Online*, *6*, 119-133.

Di Wu, Hu, Q., Yan, Z., Chen, W., Yan, C., Huang, X., … Shi, Y. (2012). Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature*, *484*, 214-219.

Díez, A. I., Ortiz-Guerrero, J. M., Ortega, A., Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S., & García de la Torre, J. (2013). Analytical ultracentrifugation studies of oligomerization and DNA-binding of TtCarH, a *Thermus thermophilus* coenzyme B_{12}-based photosensory regulator. *European Biophysics Journal* , *42*, 463-476.

Dowling, D. P., Croft, A. K., & Drennan, C. L. (2012). Radical use of Rossmann and TIM barrel architectures for controlling coenzyme B_{12} chemistry. *Annual Review of Biophysics*, *41*, 403-427.

Dowling, D. P., Miles, Z. D., Köhrer, C., Maiocco, S. J., Elliott, S. J., Bandarian, V., & Drennan, C. L. (2016). Molecular basis of cobalamin-dependent RNA modification. *Nucleic Acids Research*, *44*, 9965-9976.

Drennan, C. L., Huang, S., Drummond, J. T., Matthews, R. G., & Ludwig, M. L. (1994). How a protein binds B_{12}: a 3.0 Å X-ray structure of B_{12}-binding domains of methionine synthase. *Science* , *266*, 1669-1674.

Ducret, A., Valignat, M.-P., Mouhamar, F., Mignot, T., & Theodoly, O. (2012). Wet-surface-enhanced ellipsometric contrast microscopy identifies slime as a major adhesion factor during bacterial surface motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *USA*, *109*, 10036-10041.

Dworkin, M. (1962). Nutritional requirements for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, *84*, 250–257.

Dworkin, M. (1963). Nutritional regulation of morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, *86*, 67-72.

Dworkin, M. (1996). Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiological Reviews*, *6*, 70-102.

Edayathumangalam, R., Wu, R., Garcia, R., Wang, Y., Wang, W., & Kreinbring, C. A. (2013). Crystal structure of *Bacillus subtilis* GabR , an autorepressor and transcriptional activator of *gabT*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *USA, 110,* 17820-17825.

Elias-Arnanz, M., & Murillo, F. (1991a). Induction of germination in *Myxococcus xanthus* fruiting body spores. *Journal of General Microbiology*, *137*, 381–388.

Elias-Arnanz, M., & Murillo, F. (1991b). Mutations affecting germination in Myxococcus xanthus. *Molecular Microbiology*, *137*, 389–397.

Elías-Arnanz, M., Fontes, M., & Padmanabhan, S. (2008). Carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: a complex regulatory network. *Myxobacteria: Multicellularity and Differentiation*. ASM Press, Washington, DC, 221-225.

Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S., & Murillo, F. J. (2010). The regulatory action of the myxobacterial CarD/CarG complex: A bacterial enhanceosome?. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, *34*, 764-778.

Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S., & Murillo, F. J. (2011). Light-dependent gene regulation in nonphototrophic bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, *14*, 128-135.

Eschenmoser, A., & Wintner, C. (1977). Natural product synthesis and vitamin B_{12}. *Science*, *196*, 1410-1420.

Evans, J. C., Huddler, D. P., Hilgers, M. T., Romanchuk, G., Matthews, R. G., & Ludwig, M. L. (2004). Structures of the N-terminal modules imply large domain motions during catalysis by methionine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences,USA* , *101*, 3729-3736.

Fang, H., Kang, J., & Zhang, D. (2017). Microbial production of vitamin B_{12}: a review and future perspectives. *Microbial Cell Factories*, *16*, 1-14.

Fankhauser, C., & Christie, J. M. (2015). Plant phototropic growth. *Current Biology*, 25, 384-389.

Fenno, L., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2011). The development and application of optogenetics. *Annual Review of Neuroscience*, *34*, 389-412.

Fernández-Zapata, J., Pérez-Castaño, R., Aranda, J., Colizzi, F., Polanco, M. C., Orozco, M., ... , Elías-Arnaz, M. (En prensa). Plasticity in oligomerization, operator architecture, and DNA binding in the mode of action of a bacterial B_{12}-based photoreceptor. *Journal of Biological Chemistry*.

Findlay, B. L. (2016). The chemical ecology of predatory soil bacteria. *American Chemical Society Chemical Biology*, *11*, 1502-1510.

Flock, T., Weatheritt, R. J., Latysheva, N. S., & Babu, M. M. (2014). Controlling entropy to tune the functions of intrinsically disordered regions. *Current Opinion in Structural Biology*, *26*(1), 62-72.

Fox, K. A., Ramesh, A., Stearns, J. E., Bourgogne, A., Reyes-Jara, A., Winkler, W. C., & Garsin, D. A. (2009). Multiple posttranscriptional regulatory mechanisms partner to control ethanolamine utilization in Enterococcus faecalis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *USA*, *106*, 4435-4440.

Froehlich, A. C., Liu, Y., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2002). White collar-1 , a circadian blue light photoreceptor , binding to the frequency promoter. *Science*, *1605*, 815-819.

Fuchs, R. T., Grundy, F. J., & Henkin, T. M. (2007). S-adenosylmethionine directly inhibits binding of 30S ribosomal subunits to the SMK box translational riboswitch RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *USA*, *104*, 4876-4880.

Fuxreiter, M., Simon, I., & Bondos, S. (2011). Dynamic protein-DNA recognition: Beyond what can be seen. *Trends in Biochemical Sciences*, *36*(8), 415-423.

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*, 1427-1436.

Gao, Y., Foo, Y. H., Winardhi, R. S., Tang, Q., Yan, J., & Kenney, L. J. (2017). Charged residues in the H-NS linker drive DNA binding and gene silencing in single cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *USA*, *114*, 12560-12565.

García-Heras, F., Abellón-Ruiz, J., Francisco, M., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanza, M. (2013). High-mobility-group a-like CarD binds to a DNA site optimized for affinity and position and to RNA polymerase to regulate a light-inducible promoter in *Myxococcus xanthus. Journal of Bacteriology*, *195*(2), 378–388.

García-Heras, F., Padmanabhan, S., Murillo, F. J., & Elías-Arnanz, M. (2009). Functional equivalence of HMGA- and histone H1-like domains in a bacterial transcriptional factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *USA*, *106*, 13546–13551.

García-Moreno, D., Abellón-Ruiz, J., García-Heras, F., Murillo, F. J., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2010). CdnL, a member of the large CarD-like family of bacterial proteins, is vital for *Myxococcus xanthus* and differs functionally from the global transcriptional regulator CarD. *Nucleic Acids Research*, *38*, 4586-4598.

Garr, C. D., & Finke, R. G. (1993). Adocobalamin (AdoCbl or Coenzyme B_{12}) Co-C bond homolysis radical-cage effects: product, kinetic, mechanistic, and cage efficiency factor (fc) studies, plus the possibility that coenzyme B_{12}-dependent enzymes function as “ultimate radical cages” and “ultimate radical traps". *Inorganic Chemistry*, *32*, 4414-4421.

Giedyk, M., Goliszewska, K., & Gryko, D. (2015). Vitamin B_{12} catalysed reactions. *Chemical Society reviews*, *44*, 3391-3404.

Glaeser, J., Nuss, A. M., Berghoff, B. A., & Klug, G. (2011). Singlet oxygen stress in microorganisms. *Advances in Microbial Physiology*, *58*, 142-173.

Gomelsky, L., Sram, J., Moskvin, O. V., Horne, I. M., Dodd, H. N., Pemberton, J. M., … Gomelsky, M. (2003). Identification and in vivo characterization of PpaA, a regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology*, *149*(2), 377–388.

Gomelsky, M., & Hoff, W. D. (2011). Light helps bacteria make important lifestyle decisions. *Trends in Microbiology*, 19, 441-448.

Goto, Y., & Fink, A. L. (1989). Conformational States of β-Lactamase: molten-globule states at acidic and alkaline ph with high salt. *Biochemistry*, *28*, 945–952.

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*, 8082–8091.

Griffith, K. L., & Wolf, R. E. (2002). Measuring β-galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *290*, 397-402.

Grossman, A. (2016). Nutrient Acquisition: The generation of bioactive vitamin B_{12} by microalgae. *Current Biology*, *26*, 319-321.

Gruber, K., Puffer, B., & Kräutler, B. (2011). Vitamin B_{12}-derivatives-enzyme cofactors and ligands of proteins and nucleic acids. *Chemical Society Reviews*, *40*, 4346-4363.

Guest, J. R., Friedman, S., Woods, D. D., & Lester Smith, E. (1962). A methyl analogue of cobamide coenzyme in relation to methionine synthesis by bacteria. *Nature*, *195*, 340–342.

Guzzo, M., Agrebi, R., Espinosa, L., Baronian, G., Molle, V., Mauriello, E. M. F., … Mignot, T. (2015). Evolution and design governing signal precision and amplification in a bacterial chemosensory pathway. *PLoS Genetics*, *11*, 1–26.

Hanahan, D. (1983). Studies on Transformation of Escherichia coli with Plasmids. *Journal of Molecular Biology*, *166*, 557–580.

Hay, B. P., & Finke, R. G. (1986). Thermolysis of the cobalt-carbon bond of adenosylcobalamin. 2. Products, kinetics, and cobalt-carbon bond dissociation energy in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, *108*, 4820–4829.

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.

Herrou, J., & Crosson, S. (2011). Function, structure and mechanism of bacterial photosensory LOV proteins. *Nature Reviews Microbiology*, *9*, 713-723.

Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, *77*, 51–59.

Hodgkin, D. C., Kamper, J., MacKay, M., Pickworth, J., Trueblood, K. N., & White, J. G. (1956). Structure of vitamin B_{12}. *Nature*, *178*, 64-66.

Hogenkamp, H. P. C. (1963). A cyclic nucleoside derived from coenzyme B_{12}. *The Journal of Biological Chemistry*, *238*, 477–480.

Hogenkamp, H. P. C. (1966). The photolysis of methylcobalamin. *Biochemistry*, *5*, 417–422.

Iniesta, A. A., Cervantes, M., & Murillo, F. J. (2007). Cooperation of two carotene desaturases in the production of lycopene in *Myxococcus xanthus*. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, *274*, 4306-4314.

Iniesta, A. A., Cervantes, M., & Murillo, F. J. (2008). Conversion of the lycopene monocyclase of *Myxococcus xanthus* into a bicyclase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *79*, 793–802.

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*, 5875-5885.

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.

Jain, S. S., & Tullius, T. D. (2008). Footprinting protein–DNA complexes using the hydroxyl radical. *Nature Protocols*, *3*, 1092-1100.

Jarrett, 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*, 1237-1246.

Jenkins, G. (2014). The UV-B photoreceptor UVR8: from structure to physiology. *The Plant Cell*, *26*, 21–37.

Johnson, C., Pechonick, E., Park, S. D., Havemann, G., Leal, N., & Bobik, T. (2011). Functional genomics, biochemical, and genetic characterisation of the *Salmonella pduO* gene, and ATP_Cob(I)alamin adenosyltranseferase gene. *Journal of Bacteriology*, *183*, 1577-1584.

Johnson, J., Reyes, F. E., Polaski, J. T., & Batey, R. T. (2012). B_{12} cofactors directly stabilize an mRNA regulatory switch. *Nature*, *492*, 133-137.

Jost, M., Cracan, V., Hubbard, P. A., Banerjee, R., & Drennan, C. L. (2015a). Visualization of a radical B_{12} enzyme with its G-protein chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *USA*, *112*, 2419-2424.

Jost, M., Fernández-Zapata, J., Polanco, M. C., Ortiz-guerrero, J. M., Chen, P. Y., Kang, G., … Drennan, C. L. (2015b). Structural basis for gene regulation by a B_{12} - dependent photoreceptor. *Nature*, *526*, 536–541.

Jost, M., Simpson, J. H., & Drennan, C. L. (2015c). The transcription factor CarH safeguards use of adenosylcobalamin as a light sensor by altering the photolysis products. *Biochemistry*, *54*, 3231-3234.

Kaatz, G. W., Demarco, C. E., & Seo, S. M. (2006). MepR , a repressor of the *staphylococcus aureus* mate family multidrug efflux pump MepA , is a substrate-responsive regulatory protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*, 1276-1281.

Kainrath, S., Stadler, M., Reichhart, E., Distel, M., & Janovjak, H. (2017). Green-light-induced inactivation of receptor signaling using cobalamin-binding domains. *Angewandte Chemie - International Edition*, *56*, 4608-4611.

Kaiser, D. (2008). *Myxococcus*-from single-cell polarity to complex multicellular patterns. *Annual Review of Genetics*, *42*, 109-130.

Kaiser, D., & Dworkin, M. (2008). From glycerol to the genome. *ASM Press*, 257-284.

Kaiser, D., Robinson, M., & Kroos, L. (2010). Myxobacteria, polarity, and multicellular morphogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*, 1-26.

Kaiser, D., & Warrick, H. (2011). *Myxococcus xanthus* swarms are driven by growth and regulated by a pacemaker. *Journal of Bacteriology*, *193*, 5898-5904.

Karimova, G., Robichon, C., & Ladant, D. (2009). Characterization of YmgF , a 72-residue inner membrane protein that associates with the E*scherichia coli* Cell Division machinery. *Journal of Bacteriology*, *191*, 333-346.

Kashefi, K., & Hartzell, P. L. (1995). Genetic suppression and *Myxococcus xanthus* frzF-defect. *Molecular Microbiology*, *15*, 483-494.

Katz, R. N., Vickrey, M., & Schrnuzer, G. N. (1976). Detection of 4',5'-anhydroadenosine as the cleavage product of coenzyme B_{12} in functional holoenzymes. *Angewandte Chemie - International Edition*, *187*, 542-543.

Kaval, K. G., & Garsin, A. (2018). Ethanolamine Utilization in Bacteria. *American Society for Microbiology*, *9*, 1-13.

Keane, R., & Berleman, J. (2016). The predatory life cycle of *Myxococcus xanthus*. *Microbiology*, *162*, 1-11.

Kearns, D. B., & Shimkets, L. J. (1998). Chemotaxis in a gliding bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *USA*, *95*(20), 11957-11962.

Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1751*, 119-139.

Kirby, J. R. (2009). Chemotaxis-like regulatory systems: unique roles in diverse bacteria. *Annual Review of Microbiology*, *63*, 45-59.

Kish, E., Manuela, M., Pinto, M., Kirilovsky, D., Spezia, R., & Robert, B. (2015). Echinenone vibrational properties: From solvents to the orange carotenoid protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1847*, 1044-1054.

Klug, G. (2014). Beyond catalysis: vitamin B_{12} as a cofactor in gene regulation. *Molecular Microbiology*, *91*, 635-640.

Koutmos, M., Datta, S., Pattridge, K. a, Smith, J. L., & Matthews, R. G. (2009). Insights into the reactivation of cobalamin-dependent methionine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *USA*, *106*(44), 18527-18532.

Kratky, C., & Gruber, K. (2006). Glutamate mutase. *Handbook of Metalloproteins*. John Wiley & Sons, 2, 289-306.

Kroos, L. (2007). The *Bacillus* and *Myxococcus* developmental networks and their transcriptional regulators. *Annual Review of Genetics*, *41*, 13-39.

Kroos, L., & Kaiser, D. (1987). Expression of many developmentally regulated genes depends on a sequence of cell interactions. *Genes Development*, *1*, 840-854.

Krouwer, J., & Babior, M. (1977). The mechanism of action of ethanolamine an adenosylcobalamin-dependent enzyme. *Journal of Biological Chemistr*y, *253*, 1041-1047.

Kutta, R. J., Hardman, S. J. O., Johannissen, L. O., Bellina, B., Messiha, H. L., Ortiz-Guerrero, J. M., … Jones, A. R. (2015). The photochemical mechanism of a B_{12}-dependent photoreceptor protein. *Nature Communications*, *6*, 7907.

Lamour, V., Westblade, L. F., Campbell, E. A., & Darst, S. A. (2009). Crystal structure of the in vivo-assembled *Bacillus subtilis* Spx/RNA polymerase α subunit c-terminal domain complex. *Journal of Structural Biology*, *168*, 352-356.

Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2001). Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews*, *101*, 1869-1879.

Lenhert, P. G. (1968). The structure of vitamin B_{12}. The X-ray Analysis of the vitamin B_{12} coenzyme. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciencies, 303*, 45–84.

Lenhert, P. G., & Hodgkin, D. C. (1961). Structure of the 5,6-dimetilbenzimidazolylcobamide coenzyme. *Nature*, *192*, 937–938.

León, E., Navarro-Avilés, G., Santiveri, C. M., Flores-Flores, C., Rico, M., González, C., … Padmanabhan, S. (2010). A bacterial antirepressor with SH3 domain topology mimics operator DNA in sequestering the repressor DNA recognition helix. *Nucleic Acids Research*, *38*, 5226-5241.

Leverenz, R. L., Sutter, M., Wilson, A., Gupta, S., Thurotte, A., De Carbon, C. B., … Kerfeld, C. A. (2015). A 12 Å carotenoid translocation in a photoswitch associated with cyanobacterial photoprotection. *Science*, *348*, 1463-1466.

Linden, H., & Macino, G. (1997). White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO Journal*, *16*, 98–109.

Liptak, M. D., & Brunold, T. C. *(2006)*. Spectroscopic and computational studies of Co1+cobalamin: spectral and electronic properties of the "superreduced" B_{12} cofactor. *Journal of the American Chemical Society*, *USA 128*, 9144-9156.

Lizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R., & Yamanaka, S. (1998). Isolation of myxobacteria from the marine environment. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, *169*, 317-322.

López-Rubio, J. J. (2005). Mecanismo de regulación de un promotor de la bacteria *Myxococcus xanthus* inducible por luz azul. *Departamento de Genética*. Tesis doctoral.

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*, 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*, 28945-28953.

Losi, A., & Gärtner, W. (2008). Bacterial bilin- and flavin-binding photoreceptors. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *7*, 1168-1178.

Losi, A., Polverini, E., Quest, B., & Gärtner, W. (2002). First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes. *Biophysical Journal*, *82*, 2627-2634.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis, A., Randall, R. J., & Lewis, A. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265-275.

Ludwig and, M. L., & Matthews, R. G. (1997). Structure-based perspectives on B_{12} -dependent enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, *66*(1), 269-313.

Ludwig, M. L., & Matthews, R. G. (1997). Structure-based perspectives on B_{12}-dependent enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, *66*, 269-313.

Lussier, A., Bastet, L., Chauvier, A., & Lafontaine, D. A. (2015). A kissing loop is important for *btuB* riboswitch ligand sensing and regulatory control. *Journal of Biological Chemistry*, *290*, 26739-26751.

Luzader, D. H., Clark, D. E., Gonyar, L. A., & Kendall, M. M. (2013). EutR is a direct regulator of genes that contribute to metabolism and virulence in enterohemorrhagic Escherichia coli o157: H7. *Journal of Bacteriology*, *195*, 4947-4953.

Mancia, F., Keep, N. H., Nakagawa, A., Leadlay, P. F., McSweeney, S., Rasmussen, B., … Evans, P. R. (1996). How coenzyme B_{12} radicals are generated: The crystal structure of methylmalonyl-coenzyme A mutase at 2 Å resolution. *Structure*, *4*, 339–350.

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*, 121-140.

Marsh, E. (2000). Coenzyme-B_{12}-dependent glutamate mutase. *Bioorganic Chemistry*, *28*, 176-189.

Marsh, E., & Ballou, D. P. (1998). Coupling of cobalt-carbon bond homolysis and hydrogen atom abstraction in adenosylcobalamin-dependent glutamate mutase. *Biochemistry*, *37*, 11864-11872.

Marsh, E., & Drennan, C. L. (2001). Adenosylcobalamin-dependent isomerases: new insights into structure and mechanism. *Current Opinion in Chemical Biology*, *5*, 499-505.

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*. *Molecular & General Genetics*, *223*, 205-210.

Martinkova, M., Kitanishi, K., & Shimizu, T. (2013). Heme-based globin-coupled oxygen sensors: linking oxygen binding to functional regulation of diguanylate cyclase, histidine kinase, and methyl-accepting chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, *288*, 27702–27711.

Masuda, S., Berleman, J., Hasselbring, B. M., & Bauer, C. E. (2008). Regulation of aerobic photosystem synthesis in the purple bacterium *Rhodospirillum centenum* by CrtJ and AerR. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *7*, 1267-1272.

Masuda, S., Dong, C., Swem, D., Setterdahl, A. T., Knaff, D. B., & Bauer, C. E. (2002). Repression of photosynthesis gene expression by formation of a disulfide bond in CrtJ. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, *99*, 7078-7083.

Matthews, R. G., Koutmos, M., & Datta, S. (2009). Cobalamin- and cobamide-dependent methyltransferase. *Current Opinion 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*, *USA*, *103*, 19128-19133.

Mellin, J. R., & Cossart, P. (2015). Unexpected versatility in bacterial riboswitches. *Trends in Genetics*, *31*, 150-156.

Mellin, J. R., Koutero, M., Dar, D., Nahori, M.-A., Sorek, R., & Cossart, P. (2014). Sequestration of a two-component response regulator by a riboswitch-regulated noncoding RNA. *Science*, *345*, 940-943.

Miesenböck, G. (2011). Optogenetic Control of Cells and Circuits. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *27*(1), 731–758.

Mignot, T., Merlie, J. P., & Zusman, D. R. (2005). Regulated pole-to-pole oscillations of a bacterial gliding motility protein. *Science*, *310*, 855-857.

Miller, J. (1972). Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor. Laboratory Press.NY*

Minot, G. R., & Murphy, W. (1926). Treatment of pernicious anemia by a special diet. *Journal of the American Medical Association*, *87*, 470-476.

Möglich, A., Yang, X., Ayers, R. A., & Moffat, K. (2010). Structure and function of plant photoreceptors. *Annual Review of Plant Biology*, *61*, 21-47.

Moine, A., Agrebi, R., Espinosa, L., Kirby, J. R., Zusman, D. R., Mignot, T., & Mauriello, E. M. F. (2014). Functional Organization of a Multimodular Bacterial Chemosensory Apparatus. *PLoS Genetics*, *10*.

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*, 1159-1168.

Motlagh, H. N., Wrabl, J. O., Li, J., & Hilser, V. J. (2014). The ensemble nature of allostery. *Nature*, *508*, 331-339.

Muñoz-Dorado, J., Marcos-Torres, F. J., García-Bravo, E., Moraleda-Muñoz, A., & Pérez, J. (2016). Myxobacteria: moving, killing, feeding, and surviving together. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1-18.

Nagaswamy, U., & Fox, G. E. (2002). Frequent occurrence of the T-loop RNA folding motif in ribosomal RNAs. *Rna*, *8*, 1112-1119.

Nagel, D., & Kay, S. (2012). Complexity in the wiring and regulation of plant circadian networks. *Current Biology*, *22*, 648–657.

Nahvi, A., Barrick, J. E., & Breaker, R. R. (2004). Coenzyme B_{12} riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, *32*, 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*, 1043-1049.

Nakano, S., Küster-Schöck, E., Grossman, A. D., & Zuber, P. (2003). Spx-dependent global transcriptional control is induced by thiol-specific oxidative stress in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, *100*, 13603-13608.

Nan, B., Bandaria, J. N., Moghtaderi, A., Sun, I.-H., Yildiz, A., & Zusman, D. R. (2013). Flagella stator homologs function as motors for myxobacterial gliding motility by moving in helical trajectories. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *USA*, *110*, 1508-1513.

Nan, B., McBride, M. J., Chen, J., Zusman, D. R., & Oster, G. (2014). Bacteria that Glide with Helical Tracks. *Current Biology*, *24,* 169-173.

Nan, B., & Zusman, D. R. (2011). Uncovering the mystery of gliding motility in the myxobacteria. *Annual Review of Genetics*, *45*, 21-39.

Nash, A. I., Mcnulty, R., Elizabeth, M., Swartz, T. E., Bogomolni, R. A., & Luecke, H. (2012). Structural basis of photosensitivity in a bacterial light-oxygen-voltage/helix-turn-helix (LOV-HTH) DNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *USA*, *109*, 5904-5904.

Navarro-Avilés, G., Jiménez, M. A., Pérez-Marín, M. C., González, C., Rico, M., Murillo, F. J., … Padmanabhan, S. (2007). Structural basis for operator and antirepressor recognition by *Myxococcus xanthus* CarA repressor. *Molecular Microbiology*, *63*, 980-994.

Nawrocki, E. P., Burge, S. W., Bateman, A., Daub, J., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., … Finn, R. D. (2015). Rfam 12.0: updates to the RNA families database. *Nucleic Acids Research*, *43*, 130–137.

Newberry, K. J., & Brennan, R. G. (2004). The structural mechanism for transcription activation by MerR family member multidrug transporter activation, n terminus. *Journal of Biological Chemistry*, *279*, 20356-20362.

Nudel, C. B., & Hellingwerf, K. J. (2015). Photoreceptors in Chemotrophic Prokaryotes: The Case of *Acinetobacter spp*. Revisited. *Photochemistry and Photobiology*, *91*, 1012-1020.

O'Connor, K. A., & Zusman, D. R. (1988). Reexamination of the role of autolysis in the development of *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, *170*, 4103-4112.

O'Connor, K. A., & Zusman, D. R. (1991). Behavior of peripheral rods and their role in the life cycle of *Myxococcus xanthus*. *Journal Bacteriology*, *173*, 3342-3355.

Oltean, S., & Banerjee, R. (2003). Nutritional modulation of gene expression and homocysteine utilization by vitamin B_{12}. *Journal of Biological Chemistry*, *278*, 20778-20784.

Oltean, S., & Banerjee, R. (2005). A B_{12}-responsive internal ribosome entry site (IRES) element in human methionine synthase. *Journal of Biological Chemistry*, *280*, 32662-32668.

Ortiz-Guerrero, J. M. (2013). Papel de la vitamina B12 en la actividad de una familia de factores transcripcionales con una arquitectura singular de dominios. *Departamento de Genética*. Tesis doctoral.

Ortiz-Guerrero, J. M., Polanco, M. C., Murillo, F. J., Padmanabhan, S., & Elias-Arnanz, M. (2011). Light-dependent gene regulation by a coenzyme B_{12}-based photoreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *USA*, *108*, 7565-7570.

Padmakumar, R., Padmakumar, R., & Banerjee, R. (1997). Evidence that cobalt-carbon bond homolysis is coupled to hydrogen atom abstraction from substrate in methylmalonyl-CoA mutase. *Biochemistry*, *36*, 3713-3718.

Padmanabhan, S., Elías-Arnanz, M., Carpio, E., Aparicio, P., & Murillo, F. J. (2001). Domain Architecture of a high mobility group A-type bacterial transcriptional factor. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(45), 41566-41575.

Padmanabhan, S., Jost, M., Drennan, C. L., & Elías-Arnanz, M. (2017). A new facet of vitamin B_{12} : gene regulation by cobalamin-based photoreceptors. *Annual Review of Biochemistry*, *86*, 485–514.

Palczewski, K. (2012). Chemistry and biology of vision. *Journal of Biological Chemistry*, *287*, 1612-1619.

Pallares, I. G., Moore, T. C., Escalante-Semerena, J. C., & Brunold, T. C. (2017). Spectroscopic studies of the EutT adenosyltransferase from *Salmonella enterica*: evidence of a tetrahedrally coordinated divalent transition metal cofactor with cysteine ligation. *Biochemistry*, *56*, 364-375.

Park, S. A., Park, Y. S., & Lee, K. S. (2017). Crystal structure of the c-terminal domain of *Bacillus subtilis* GabR reveals a closed conformation by g -aminobutyric acid binding, inducing transcriptional activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *487*, 287-291.

Pathak, D. T., Wei, X., & Wall, D. (2012). Myxobacterial tools for social interactions. *Research in Microbiology*, *163*, 579-591.

Payne, K. A. P., Fisher, K., Sjuts, H., Dunstan, M. S., Bellina, B., Johannissen, L., … Leys, D. (2015). Epoxyqueuosine reductase structure suggests a mechanism for cobalamin-dependent tRNA modification. *Journal of Biological Chemistry*, *290*, 27572-27581.

Payne, K. A. P., Quezada, C. P., Fisher, K., Dunstan, M. S., Collins, F. A., Sjuts, H., … Leys, D. (2015). Reductive dehalogenase structure suggests a mechanism for B_{12}-dependent dehalogenation. *Nature*, *517*, 513-516.

Pejchal, R., & Ludwig, M. L. (2005). Cobalamin-independent methionine synthase (MetE): A face-to-face double barrel that evolved by gene duplication. *PLoS Biology*, *3*, 254–265.

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*, 910-926.

Penfold, R. J., & Pemberton, J. M. (1991). A gene from the photosynthetic gene cluster of *Rhodobacter sphaeroides* inducestrans suppression of bacteriochlorophyll and carotenoid levels in *R. sphaeroides* and *R. capsulatus*. *Current Microbiology*, *23*, 259–263.

Penfold, R. J., & Pemberton, J. M. (1994). Sequencing, chromosomal inactivation, and functional expression in *Escherichia coli* of ppsR, a gene which represses carotenoid and bacteriochlorophyll synthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, *176*, 2869-2876.

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*, 33093-33103.

Pérez-Marín, M. C., Padmanabhan, S., Polanco, M. C., Murillo, F. J., & Elías-Arnanz, M. (2008). Vitamin B_{12} partners the CarH repressor to downregulate a photoinducible promoter in *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, *67*, 804-819.

Peselis, A., & Serganov, A. (2012). Structural insights into ligand binding and gene expression control by an adenosylcobalamin riboswitch. *Nature Structural and Molecular Biology*, *19*, 1182-1184.

Ponnampalam, S. N., & Bauer, C. E. (1997). DNA binding characteristics of CrtJ. *Journal of Biological Chemistry*, *272*, 18391-18396.

Ponnampalam, S. N., Buggy, J. J., & Bauer, C. E. (1995). Characterization of an aerobic repressor that coordinately regulates bacteriochlorophyll, carotenoid, and light harvesting-II expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, *177*, 2990-2997.

Purcell, E. B., & Crosson, S. (2008). Photoregulation in prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology, 11*, 168-178.

Randaccio, L., Geremia, S., Demitri, N., & Wuerges, J. (2010). Vitamin B_{12}: unique metalorganic compounds and the most complex vitamins. *Molecules*, *15*, 3228-3259.

Ravnum, S., & Andersson, D. I. (1997). Vitamin B_{12} repression of the *btuB* gene in *Salmonella typhimurium* is mediated via a translational control which requires leader and coding sequences. *Molecular Microbiology*, *23*, 35-42.

Reichenbach, H. (1993). Biology of the Myxobacteria: ecology and taxonomy. *ASM Press*, Washington, DC.

Reichenbach, H. (1999). The ecology of the myxobacteria. *Environmental Microbiology*, *1*, 15–21.

Reining, A., Nozinovic, S., Schlepckow, K., Buhr, F., Fürtig, B., & Schwalbe, H. (2013). Three-state mechanism couples ligand and temperature sensing in riboswitches. *Nature*, *499*, 355-359.

Rickes, E. L., Brink, N. G., Koniuszy, F. R., Wood, T. R., & Folkers, K. (1948). Crystalline vitamin B_{12}. *Science*, *107*, 396-397.

Rizzini, L., Favory, J. J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., … Ulm, R. (2011). Perception of UV-B by the arabidopsis UVR8 protein. *Science*, *332*(6025), 103–106. https://doi.org/10.1126/science.1200660

Rodionov, D. A., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A., & Gelfand, M. S. (2003). Comparative genomics of the vitamin B_{12} metabolism and regulation in prokaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, *278*, 41148-41159.

Rohl, C. A., & Baldwin, R. L. (1997). Comparison of nh exchange and circular dichroism as techniques for measuring the parameters of the helix-coil transition in peptides. *Biochemistry*, *36*, 8435-8442.

Román-Meléndez, G. D., Glehn, P. von, Harvey, J. N., Mulholland, A. J., & Marsh, E. N. G. (2014). Role of active site residues in promoting cobalt-carbon bond homolysis in adenosylcobalamin-dependent mutases revealed through experiment and computation. *Biochemistry*, *53*, 169–177.

Roof, D. M., & Roth, J. R. (1989). Functions required for vitamin B_{12}-dependent ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, *171*, 3316-3323.

Roof, D. M., & Roth, J. R. (1992). Autogenous regulation of ethanolamine utilization by a transcriptional activator of the *eut* operon in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, *174*, 6634-6643.

Rossi, M., Glusker, J. P., Randaccio, L., Summers, M. F., Toscano, P. J., & Marzilli, L. G. (1985). The structure of a B_{12} coenzyme: methylcobalamin studies by X-ray and NMR methods. *Journal of American Chemical Society*, *107*, 1729-1738.

Roth, J. R., Lawrence, J. G., & Bobik, T. A. (1996). Cobalamin (coenzyme B_{12}): Synthesis and biological significance. *Annual Review of Biochemistry*, *50*, 137-181.

Ruiz-Vazquez, R., & Murillo, F. J. (1984). Abnormal motility and fruiting behavior of *Myxococcus xanthus* bacteriophage-resistant strains induced by a clear-plaque mutant of bacteriophage Mx8. *Journal of Bacteriology*, *160*, 818-821.

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*, 860–867.

Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A., & Barrell, B. (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, *16*, 944-945.

Ryter, S. W., & Tyrrell, R. M. (1998). Singlet molecular oxygen ($^1O_2$): A possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radical Biology and Medicine*, *24*, 1520-1534.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. *NY: Cold Spring Harbor. Laboratory Press.*

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Kang, T.-H., Reardon, J. T., Lee, J. H., & Ozturk, N. (2010). Circadian clock control of the cellular response to DNA damage. *Federation European Biochemical Societies Letters*, *584*, 2618-2625.

Sandala, G. M., Smith, D. M., & Radom, L. (2005). Divergent mechanisms of suicide inactivation for ethanolamine ammonia-lyase. *Journal of the American Chemical Society*, *127*, 8856-8864.

Sandmann, G. (2009). Evolution of carotene desaturation: the complication of a simple pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *483*, 169-174.

Schmid, F. X. (1997). Protein structure : a practical approach. *Oxford University Press, Oxford, UK*.

Schrauzer, G. N., & Stadlbauer, E. A. (1975). Ethanolamine ammonia-lyase: inactivation of the holoenzyme by N_2O and the mechanism of action of coenzyme B_{12}. *Bioinorganic Chemistry*, *4*, 185-198.

Schumacher, M. A., Choi, K. Y., Lu, F., Zalkin, H., & Brennan, R. G. (1995). Mechanism of corepressor-mediated specific DNA binding by the purine repressor. *Cell*, *83*, 147-155.

Schwartz, P. A., & Frey, P. A. (2007). 5'-Peroxyadenosine and 5'-peroxyadenosylcobalamin as intermediates in the aerobic photolysis of adenosylcobalamin. *Biochemistry*, *46*, 7284-7292.

Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas', A. F., & Gilmanshin, R. I. (1991). Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers*, *31*, 119-128.

Sension, R. J., Cole, A. G., Harris, A. D., Fox, C. C., Woodbury, N. W., Lin, S., & Marsh, E. N. G. (2004). Photolysis and recombination of adenosylcobalamin bound to glutamate mutase. *Journal of the American Chemical Society*, *126*, 1598-1599.

Sension, R. J., Harris, D. A., Stickrath, A., Cole, A. G., Fox, C. C., & Marsh, E. N. G. (2005). Time-resolved measurements of the photolysis and recombination of adenosylcobalamin bound to glutamate mutase. *Journal of Physical Chemistry B*, *109*(38), 18146-18152.

Serganov, A., & Patel, D. J. (2012). Metabolite recognition principles and molecular mechanisms underlying riboswitch function. *Annual Review Biophysics*, *41*, 343-370.

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*, 519-550.

Sheppard, D. E., & Roth, J. R. (1994). A rationale for autoinduction of a transcriptional activator: ethanolamine ammonia-lyase (EutBC) and the operon activator (EutR) compete for adenosyl- cobalamin in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, *176*, 1287-1296.

Sherwood, A. V., & Henkin, T. M. (2016). Riboswitch-mediated gene regulation: novel rna architectures dictate gene expression responses. *Annual Review of Microbiology*, *70*, 361-374.

Shibata, N., Masuda, J., Tobimatsu, T., Toraya, T., Suto, K., Morimoto, Y., & Yasuoka, N. (1999). A new mode of B_{12} binding and the direct participation of a potassium ion in enzyme catalysis: x-ray structure of diol dehydratase. *Structure*, *7*, 997-1008.

Shimkets, L. J., & Arnold, J. W. (1988). Cell surface properties correlated with cohesion in *Myxococcus xanthus*. *Society*, *170*, 5771-5777.

Shimkets, L. J., & Woese, C. R. (1992). A phylogenetic analysis of the myxobacteria: basis for their classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, *89*, 9459-9463.

Skerker, J. M., & Berg, H. C. (2001). Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *USA*, *98*, 6901-6904.

Smith, E. (1948). Purification of anti-pernicious anaemia factors from liver. *Nature*, *161*, 638.

Sproer, C., Reichenbach, H., & Stackebrandt, E. (1999). The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *49*, 1255-1262.

Stich, T. A., Brooks, A. J., Buan, N. R., & Brunold, T. C. (2003). Spectroscopic and computational studies of Co^{3+}-corrinoids: spectral and electronic properties of the B_{12} cofactors and biologically relevant precursors. *Journal of the American Chemical Society*, *125*, 5897-5914.

Stickrath, A. B., Carroll, E. C., Dai, X., Harris, D. A., Rury, A., Smith, B., … Sension, R. J. (2009). Solvent-dependent cage dynamics of small nonpolar radicals: Lessons from the photodissociation and geminate recombination of alkylcobalamins. *Journal of Physical Chemistry*, *113*, 8513-8522.

Sukumar, N. (2013). Crystallographic studies on B_{12} binding proteins in eukaryotes and prokaryotes. *Biochimie*, *95*, 976-988.

Sun, H., Zusman, D. R., & Shi, W. (2000). Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the frz chemosensory system. *Current Biology*, *10*, 1143-1146.

Takaichi, S. (2013). Distributions, biosyntheses and functions of carotenoids in algae. *Agro Food Industry Hi-Tech*, *24*, 55-58.

Takano, H. (2016). The regulatory mechanism underlying light-inducible production of carotenoids in nonphototrophic bacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *80*, 1264-1273.

Takano, H., Beppu, T., & Ueda, K. (2006). The CarA/LitR-family transcriptional regulator: its possible role as a photosensor and wide distribution in non-phototrophic bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *70*, 2320-2324.

Takano, H., Kondo, M., Usui, N., Usui, T., Ohzeki, H., Yamazaki, R., … Ueda, K. (2011). Involvement of CarA/LitR and CRP/FNR family transcriptional regulators in light-induced carotenoid production in *Thermus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, *193*, 2451-2459.

Takano, H., Mise, K., Hagiwara, K., Hirata, N., Watanabe, S., Toriyabe, M., … Ueda, K. (2015). Role and Function of LitR, an adenosyl B_{12}-bound light-sensitive regulator of *Bacillus megaterium* QM B1551, in regulation of carotenoid production. *Journal of Bacteriology*, *197*, 2301-2315.

Takano, H., Obitsu, S., Beppu, T., & Ueda, K. (2005). Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. *Journal of Bacteriology*, *187*, 1825-1832.

Thomä, N. H., & Leadlay, P. F. (1996). Homology modeling of human methylmalonyl-CoA mutase: a structural basis for point mutations causing methylmalonic aciduria. *Protein Science*, *5*, 1922-1927.

Tian, B., & Hua, Y. (2010). Carotenoid biosynthesis in extremophilic *Deinococcus-Thermus* bacteria. *Trends in Microbiology*, *18*, 512-520.

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *USA*, *76*(9), 435-4354.

Tsoy, O., Ravcheev, D., & Mushegian, A. (2009). Comparative genomics of ethanolamine utilization. *Journal of Bacteriology*, *191*, 7157-7164.

Ubhi, D. K., & Robertus, J. D. (2015). The cobalamin-independent methionine synthase enzyme captured in a substrate-induced closed conformation. *Journal of Molecular Biology*, *427*, 901-909.

Ueki, T., & Inouye, S. (2006). A novel regulation on developmental gene expression of fruiting body formation in myxobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *72*, 21-29.

Van der Horst, M. A., Key, J., & Hellingwerf, K. J. (2007). Photosensing in chemotrophic, non-phototrophic bacteria: let there be light sensing too. *Trends in Microbiology*, *15*, 554-562.

Van Leeuwen, H. C., Strating, M. J., Rensen, M., De Laat, W., & Van Der Vliet, P. C. (1997). Linker length and composition influence the flexibility of Oct-1 DNA binding. *EMBO Journal*, *16*, 2043-2053.

Vermeulen, A. J., & Bauer, C. E. (2015). Members of the PpaA/AerR antirepressor family bind cobalamin. *Journal of Bacteriology*, *197*, 2694-2703.

Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. & Gelfand, M. (2003). Regulation of the vitamin B12 metabolism and transport in bacteria by a conserved RNA structural element Regulation of the vitamin B_{12} metabolism and transport in bacteria by a conserved RNA structural element. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *9*, 1084-1097.

Vuzman, D., & Levy, Y. (2012). Intrinsically disordered regions as affinity tuners in protein-DNA interactions. *Molecular BioSystems*, *8*, 47-57.

Vuzman, D., Polonsky, M., & Levy, Y. (2010). Facilitated DNA search by multidomain transcription factors: cross talk via a flexible linker. *Biophysical Journal*, *99*, 1202-1211.

Wald, G. (1968). The molecular basis of visual excitation. *Nature*, *219*, 800-807.

Walker, L. A., Jarrett, J. T., Anderson, N. A., Pullen, S. H., Matthews, R. G., & Sension, R. J. (1998). Time-resolved spectroscopic studies of B_{12} coenzymes: the identification of a metastable cob(III)alamin photoproduct in the photolysis of methylcobalamin. *Journal of the American Chemical Society*, *120*, 3597-3603.

Walker, L. A., Shiang, J. J., Anderson, N. A., Pullen, S. H., & Sension, R. J. (1998). Time-resolved spectroscopic studies of B_{12} coenzymes: the photolysis and geminate recombination of adenosylcobalamin. *Journal of the American Chemical Society*, *120*, 7286-7292.

Wall, D., & Kaiser, D. (1999). Type IV pili and cell motility. *Molecular Microbiology*, *32*, 1-10.

Wang, R., Yang, Z., Luo, J., Hsing, I.-M., & Sun, F. (2017). B_{12}-dependent photoresponsive protein hydrogels for controlled stem cell/protein release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *USA*, *114*, 5912-5917.

Warren, M. J., Raux, E., Schubert, H. L., & Escalante-Semerena, J. C. (2002). The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B_{12}). *Natural Product Reports*, *19*, 39-–412.

Watanabe, S., Kita, A., Kobayashi, K., & Miki, K. (2008). Crystal structure of the [2Fe-2S] oxidative-stress sensor SoxR bound to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, *105*, 4121-4126.

Weaver, L. H., Kwon, K., Beckett, D., & Matthews, B. W. (2001). Corepressor-induced organization and assembly of the biotin repressor: a model for allosteric activation of a transcriptional regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *USA*, *98*, 6045-6050.

Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H. U., Bruccoleri, R., … Medema, M. H. (2015). AntiSMASH 3.0-A comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, *43*, 237–243.

Wei, J., Wu, W. H., Wang, R., Yang, Z., Sun, F., & Zhang, W. Bin. **(2018)**. B_{12}-Dependent protein oligomerization facilitates layer-by-layer growth of photo/thermal responsive nanofilms. *American Chemical Society Macro Letters*, *7*, 514-518.

Wheatley, R. W., Ng, K. K. S., & Kapoor, M. (2016). Fungal cobalamin-independent methionine synthase: insights from the model organism, *Neurospora crassa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *590*, 125-137.

Whipple, G., & Robscheitt-Robbins, F. (1925). Favourable influence of liver, heart and skeletal muscle in diet on blood regeneration in anemia. *American Journal of Physiology*, *72*, 404-418.

Whitworth, D. E., & Hodgson, D. A. (2001). Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: evidence that CarS acts as an anti-repressor of CarA. *Molecular Microbiology*, *42*, 809-819.

Winkler, W., Nahvi, A., & Breaker, R. R. (2002). Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*, *419*, 952-956.

Wolgemuth, C., Hoiczyk, E., Kaiser, D., & Oster, G. (2002). How myxobacteria glide. *Current Biology*, *12*, 369-377.

Wolthers, K. R., Levy, C., Scrutton, N. S., & Leys, D. (2010). Large-scale domain dynamics and adenosylcobalamin reorientation orchestrate radical catalysis in ornithine 4,5-aminomutase. *Journal of Biological Chemistry*, *285*, 13942-13950.

Yamada, R., Shimizy, S., & Fukui, S. (1966). Factors affecting the anaerobic photolysis of the cobalt-carbon bond of cobalt-methylcobalamin. *Biochim Biophys Acta*, *124*, 195-197.

Yamanishi, M., Vlasie, M., & Banerjee, R. (2005). Adenosyltransferase: an enzyme and an escort for coenzyme B_{12}? *Trends in Biochemical Sciences*, *30*, 304-308.

Yanisch-perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985). Improved Ml3 phage cloning vectors and host strains : nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, *33*, 103-119.

Yu, R., & Kaiser, D. (2007). Gliding motility and polarized slime secretion. *Molecular Microbiology*, *63*, 454-467.

Zhang, K., & Cui, B. (2015). Optogenetic control of intracellular signaling pathways. *Trends in Biotechnology*, *33*, 92-100.

Zhang, Y., Ducret, A., Shaevitz, J., & Mignot, T. (2012). From individual cell motility to collective behaviors: Insights from a prokaryote, *Myxococcus xanthus*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, *36*, 149-164.

Ziegelhoffer, E. C., & Donohue, T. J. (2009). Bacterial responses to photo-oxidative stress. *Nature Reviews Microbiology*.

Zisapel, N. (2018). New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *British Journal of Pharmacology*, *175*, 3190-3199.

Zuber, P. (2009). Management of Oxidative Stress in *Bacillus*. *Annual Review of Microbiology*, *63*, 575-597.