



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Nuevos Aspectos Moleculares de la
Transducción de la Señal Luminosa en
la Bacteria *Myxococcus xanthus*

Dña. Elena Pajares Martínez
2020



D.^a **Montserrat Elías Arnanz**, Catedrática de Universidad del Área de Genética, en el Departamento de Genética y Microbiología, y D. **Antonio Ángel Iniesta Martínez**, Profesor Titular del Área de Genética, en el Departamento de Genética y Microbiología, **AUTORIZAN**:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Nuevos aspectos moleculares de la transducción de la señal luminosa en la bacteria *Myxococcus xanthus*", realizada por D.^a Elena Pajares Martínez, 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 21 de octubre de 2020



Montserrat Elías Arnanz

Antonio A. Iniesta Martínez

“And now, Harry, let us step out into the night and pursue that flighty temptress, adventure”

Albus Dumbledore

A mi padre

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores, Montse y Antonio, la oportunidad de realizar esta tesis. A Montse, una gran científica, por enseñarme el camino de la buena ciencia, con rigor, esfuerzo y dedicación. A Antonio, mi guía desde que comencé como alumna interna hasta hoy, gracias por iniciarme en el mundo de la investigación y por tu paciencia, charlas y consejos durante estos años. A Paco Murillo, por despertarme la curiosidad por la Genética en sus clases. A Carmen, por estar siempre dispuesta a ayudar en todo lo que se le pide. A Marta, por esas conversaciones sobre el Mar Menor, aún tenemos pendiente una vuelta por Cabo de Palos. A Marisa, por esas comidas, risas y quedadas, algún día volveremos a la playa (y aparcarás). A Padhu, por esas conversaciones científicas. A Jose Antonio, por su ayuda y consejos. A Victoria, por su amabilidad y resolución.

A mis compañeros de laboratorio. Este camino ha sido muy divertido gracias a vosotros. A Aranza (Aransaw), por ser una gran compañera y resolverme toda duda que me ha surgido, y por enseñarme muy bien a utilizar la prensa francesa. A Diego (Diegosaw), siempre dispuesto a ayudarme en todo, estos años no habrían sido lo mismo sin tus malignidades. A Ricardo, mi “archienemigo”, por esas peleas absurdas pero de lo más entretenidas, biotecnólogo tenías que ser. A Antonio M. (Joako), mi compañero de “repasos”, por esas risas y conversaciones sobre cualquier cosa, nunca calcular una concentración había sido tan divertido. A Eva, por esos debates científicos y compartir la inolvidable experiencia de los envíos de *RNA-seq*. A Irene, por atreverse a invitarnos a Chinchilla nada más llegar, y por esos caminos hacia Albacete. A Alfonso, por aguantar mis neuras como profesora, aunque puede que el alumno supere al maestro. P.D. Tienes que acompañar a Antonio en los “repasos”. A Joselito, al que deseo mucha suerte en su inicio en la investigación. A Jesús, por esas conversaciones en las comidas y por su ayuda. A Silvia, por su amistad y acompañarme en todo tipo de actividades deportivas. De locos.

A los compañeros del ala B. A Sergio, co-fundador de los almuerzos, por ser un gran amigo y estar ahí siempre que lo he necesitado, nunca la palabra “plaquers” había tenido tantos significados. A Santi, Rosa, Víctor, Sebi, Curro y Laura, por su amabilidad y ayuda en todo momento. A Albert, por esas quedadas y *speaking*s tan divertidos; a Manu, por su alegría y estar siempre dispuesto para cualquier plan; y a Nancy, por esos momentos tan divertidos y su buen rollo; espero que nos volvamos a ver muy pronto. A Carlos, Maribel y Pablo, por esos momentos seriéfilos sin igual. A

Jose, por sus consejos y ayuda, ya tengo ganas de otro pulpo por Águilas. A Joseto, Carlos L. y Tahiri, por ser compañeros siempre dispuestos a ayudar.

Al resto de compañeros de otros laboratorios. A Dani, el rey de los lípidos, por iniciarnos en el mundo de los ácidos grasos. A Josepe, por todas las risas, despistes y calderos. A Pepe, por su amistad y disposición en todo momento. A Begoña, por esos momentos tan divertidos en las comidas.

A Daniel López y su grupo de investigación, por su hospitalidad y enseñanzas, aprendí mucho. A Rafa Giraldo, por dejarme un hueco en su laboratorio y por esas comidas tan interesantes. A Cris, Paula y Aída, el “213a power”, por acogerme tan bien en su laboratorio, espero que nos veamos pronto. A Miguel Hernández Prieto, por toda su ayuda con los análisis bioinformáticos.

A mis amigos de Albacete, por estar ahí siempre y por esas quedadas en las que no pasan los años. A Olga, por ser una gran amiga y confidente. A Santi, por su disposición en todo, y por aguantar todas mis bromas...”lo que pasa”. A Ángel, el hombre sin rostro, por tu malignidad en todo momento. A Pablo, por todas tus teorías locas de lo hago en el laboratorio, llegaré a la clave de la inmortalidad. A Laura, por todos los momentos tan divertidos, véase Laura Ruge. A Esther, por ser una gran *sister*. ¿Para cuándo otro camino de Santiago?

A mis amigas de Murcia. Por la amistad de todos estos años. A Rebeca, por esos pomodoros y por compartir momentos de supervivencia en La Llana, si es que estamos “mutás”. A Gema, otra amante de La Manga, por todos los momentos de risas y por esas conversaciones sobre el Terra. Qué ganas de hacer otro viaje con vosotras. A Polina, por esos momentos en el piso tan divertidos y esos repasos de los exámenes, nunca me he reído tanto estudiando. A otros amigos que me han alegrado las semanas en Murcia. A M.^a José, por esas quedadas en Murcia y esas rutas por el Valle. A Jose, por esos arroccicos al horno y las noches de serie viendo al exguaperas.

A mis amigas de la ruta Quetzal. En especial, a Claudia, por compartir conmigo una de las experiencias más increíbles de mi vida.

A amigos que son familia. A Carlos y Carmen, por ayudarme siempre que lo necesito y por esas desconexiones en La Manga. A Gema y Celia, por esos veranos tan divertidos. A Carmelo y Lucre, por esas conversaciones tan interesantes, los conciertos de Jazz y los viajes tan entretenidos a Albacete. A Palmira, Luis, Pablo y Laura, por todos esos viajes a final de año. A Jose Miguel, Llanos, Miguel y Llanetes, por esas fabadas deliciosas. A personas que, de algún modo u otro, me han

acompañado en muchos momentos. A Josefa, por su disposición y paciencia infinita durante muchos años.

A mi familia murciana. A Alberto, por apoyarme, cuidarme y ayudarme estos años (y por esas tortillas...), este camino ha sido mucho más fácil gracias a ti. A Paco, Consuelo y Juan Pablo, por esos días en el campico en los que te olvidas de todo. A Inés y Miguel, espero que pronto podamos ponernos al día. A Corvi y Chuchi, por alegrarme los días. A Magdalena, por recibirme tan bien en Villena.

Por último, pero no menos importante, me gustaría dedicarle esta tesis a mi familia. A todos ellos. Y en especial: a mis tres abuelas. A mi tita, por tener una paciencia infinita para tomarme la lección y por sus interesantes historias; a mi abuela, por enseñarme a ser constante y trabajadora; y a mi yaya, por su bondad y apoyarme en todo lo que hago. ¡Qué sería yo sin vosotras! A mi abuelo Leopoldo, por esos paseos por el parque. A mi abuelo Arturo, ojalá te hubiese conocido. A mis tíos Chelo y Jose, por esas conversaciones y barbacoas en el patio. A mi primo Jose Javier, por esas horas y horas viendo series sin parar. A los pavacos: Cristina, Esaúl (el rey del Word y del PDF), Inés y el próximo pavito/a que está por llegar, por esas exploraciones sin igual en Gascuña, las teorías sobre la selección natural y todos los momentos tan divertidos que hemos pasado. A mis padres, por ser un ejemplo en mi vida. A mi madre, por enseñarme que con dedicación y esfuerzo puedo lograr todo lo que me proponga. A mi padre, porque aunque ya no estés, yo siempre te tengo presente en todo lo que hago. Gracias por enseñarme a disfrutar de la vida y por compartir tantas cosas conmigo. Espero que estés orgulloso de mí.

A todos vosotros, por acompañarme en este camino de algún modo u otro, os dedico este trabajo. Y ahora, rumbo al horizonte.

ÍNDICE

ÍNDICE DE MATERIAS

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Respuesta general a la luz	3
I.1.1 Fotorrecepción en bacterias	4
I.1.2 Oxígeno singlete y estrés foto-oxidativo	6
I.1.2.1 Mecanismos para hacer frente al estrés foto-oxidativo	9
I.1.2.1.1 Defensa directa frente al $^1\text{O}_2$	9
I.1.2.1.2 Defensa enzimática frente a los daños generados por el $^1\text{O}_2$	11
I.1.2.2 Respuestas al estrés foto-oxidativo en microorganismos	12
I.1.2.2.1 En microorganismos fototrofos oxigénicos	12
I.1.2.2.2 En microorganismos fototrofos anoxigénicos: <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	14
I.1.2.2.3 En bacterias no fototrofas	17
I.2 <i>Myxococcus xanthus</i> como modelo de estudio de respuesta a la luz	18
I.2.1 Características generales de las mixobacterias	18
I.2.2 Respuesta a la luz en <i>M. xanthus</i>	20
I.2.2.1 Mecanismo de respuesta a la luz dependiente de B_{12}	21
I.2.2.2 Mecanismo de respuesta a la luz independiente de B_{12}	22
I.2.3 La proteína CarF	25
I.3 Los factores σ-ECF/anti-σ	27
I.3.1 Factores σ -ECF/anti- σ en <i>M. xanthus</i>	29
I.3.1.1 La pareja de factores σ -ECF/anti- σ DdvS/DdvA	30
I.3.1.2 La pareja de factores σ -ECF/anti- σ CarQ/CarR	32
I.3.1.3 Factores σ -ECF sin anti- σ : CorE y CorE2	33
I.3.2 Mecanismos de regulación de los factores σ -ECF	33
I.4 Microdominios funcionales de membrana	38
I.4.1 Características generales de las balsas lipídicas y los FMMs	38
I.4.2 Balsas lipídicas y FMMs en bacterias	39
I.4.3 Componentes de los FMMs en bacterias	40
I.5 Objetivos	44
II. MATERIALES Y MÉTODOS	45
II.1 Estirpes y plásmidos	47
II.1.1 Estirpes de <i>M. xanthus</i>	47

II.1.2 Estirpes de <i>E. coli</i>	48
II.1.3 Oligonucleótidos	50
II.2 Medios de crecimiento	51
II.2.1 Medios ricos para <i>M. xanthus</i>	51
II.2.2 Medios ricos para <i>E. coli</i>	52
II.3 Condiciones de cultivo	53
II.3.1 Condiciones de cultivo para <i>M. xanthus</i>	53
II.3.2 Condiciones de cultivo para <i>E. coli</i>	53
II.4 Tampones y soluciones	54
II.4.1 Purificación de DNA plasmídico	54
II.4.2 Electroforesis de DNA	54
II.4.3 Electroforesis de RNA	54
II.4.4 Electroforesis de proteínas.....	54
II.4.5 Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos.....	54
II.4.6 Determinación de la actividad β -galactosidasa.....	55
II.4.7 Metilación de ácidos grasos	55
II.4.8 Aislamiento de las fracciones DRM y DSM.....	55
II.5 Extracción de DNA	56
II.6 Transferencia de DNA	56
II.6.1 Transformación de <i>E. coli</i>	56
II.6.2 Transformación de <i>M. xanthus</i>	56
II.7 Tratamiento enzimático del DNA.....	57
II.8 Amplificación de DNA mediante PCR	57
II.9 Secuenciación de DNA	58
II.10 Extracción, cuantificación y análisis de la calidad de RNA	58
II.11 Generación de estirpes de <i>M. xanthus</i> portadoras de una delección	59
II.12 Técnicas electroforéticas.....	60
II.12.1 Electroforesis de DNA en gel de agarosa	60
II.12.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS	61
II.13 Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos (<i>Western blot</i>)	61

II.14 Cuantificación relativa de los cambios en la expresión génica mediante RT-qPCR (<i>reverse transcription quantitative PCR</i>)	62
II.15 Análisis globales de la expresión génica mediante <i>microarrays</i>	64
II.16 Análisis globales de la expresión génica mediante secuenciación de RNA (<i>RNA-seq</i>)	66
II.17 Ensayo de β -galactosidasa.....	68
II.18 Extracción de lípidos totales y análisis por LC-MS/MS	69
II.19 Metilación y sililación de ácidos grasos para su análisis por GC-MS	70
II.20 Complementación química	71
II.21 Aislamiento de las fracciones DRM y DSM.....	72
II.22 Microscopía	73
II.22.1 Preparación y visualización de muestras para microscopía de fluorescencia y DIC.....	73
II.22.2 Preparación y visualización de muestras para microscopía confocal.....	73
II.23 Análisis bioinformático	74
III. RESULTADOS	75
III.1 Caracterización de CarF	77
III.1.1 Análisis de la localización subcelular de CarF mediante microscopía de fluorescencia	77
III.1.2 Análisis de la composición de ácidos grasos en una estirpe carente de CarF.....	79
III.1.3 Estudio del papel de ElbD y MXAN_1676 en la biosíntesis de los lípidos con enlace éter y en la respuesta a la luz.....	84
III.1.3.1 Generación y análisis fenotípico de los mutantes $\Delta elbD$ y $\Delta 1676$	88
III.1.3.2 Estudio de la síntesis de lípidos éter por GC-MS en los mutantes $\Delta elbD$ y $\Delta 1676$	89
III.1.3.3 Estudios de complementación de los mutantes $\Delta elbD$ y $\Delta 1676$	90
III.1.3.4 Estudio de la síntesis de lípidos éter por LC-MS/MS en los mutantes $\Delta elbD$ y $\Delta 1676$	92
III.1.3.5. Estudio de complementación química con lípidos éter humanos	93
III.2 Caracterización de CarQ y CarR.....	96
III.2.1 Generación de los mutantes $\Delta carQ$ y $\Delta carR$	96
III.2.2 Análisis de la localización subcelular de CarR en oscuridad y en luz	97
III.2.3 Análisis de la localización subcelular de CarQ en oscuridad y en luz	99
III.2.4 Análisis de la estabilidad de CarR en oscuridad y en luz	101

III.2.5 Análisis de la posible localización de CarR en los microdominios funcionales de membrana	108
III.2.5.1 Búsqueda de posibles flotilinas en <i>M. xanthus</i>	110
III.2.5.2 Generación de los mutantes $\Delta floA$ y $\Delta floB$ y análisis fenotípico de la respuesta a la luz	112
III.2.5.3 Análisis de la localización subcelular de FloA.....	113
III.2.5.4 Análisis de la localización subcelular de FloB.....	115
III.3 Estudio de la respuesta global al estrés foto-oxidativo en <i>M. xanthus</i>....	116
III.3.1 Análisis transcriptómicos en oscuridad y en luz.....	117
III.3.1.1 Genes dependientes de CarQ.....	120
III.3.1.1.1 Genes relacionados con la carotenogénesis	122
III.3.1.1.2 Identificación de nuevos genes dependientes de CarQ	123
III.3.1.2 Genes independientes o semi-independientes de CarQ	128
III.3.1.2.1 Genes con una cinética de expresión temprana.....	128
III.3.1.2.2 Genes con una cinética de expresión intermedia	130
III.3.1.2.3 Genes con una cinética de expresión tardía.....	132
III.3.1.2.4 Validación por RT-qPCR de algunos de los genes fotoinducibles independientes de CarQ	135
IV. DISCUSIÓN	137
IV.1 Respuesta a la luz en <i>M. xanthus</i> mediada por los plasmalógenos.....	139
IV.2 FMMs en <i>M. xanthus</i> y su posible relación con la respuesta a la luz.....	153
IV.3 Respuesta global al estrés foto-oxidativo en <i>M. xanthus</i>	159
V. CONCLUSIONES.....	169
VI. BIBLIOGRAFÍA	173

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Espectro electromagnético.....	3
Figura 2.	Generación de $^1\text{O}_2$ en procesos dependientes e independientes de la luz.....	7
Figura 3.	Formación de especies reactivas del oxígeno y mecanismos de desactivación del $^1\text{O}_2$	8
Figura 4.	Respuestas al $^1\text{O}_2$ y señalización en <i>C. reinhardtii</i>	14
Figura 5.	El $^1\text{O}_2$ activa una cascada transcripcional en <i>R. sphaeroides</i>	16
Figura 6.	Ciclo de vida de <i>M. xanthus</i>	20
Figura 7.	Carotenogénesis inducida por la luz en <i>M. xanthus</i>	21
Figura 8.	Modelo de regulación de la respuesta a la luz dependiente del fotorreceptor CarH y de la vitamina B ₁₂ en <i>M. xanthus</i>	22
Figura 9.	Modelo de regulación de la respuesta a la luz dependiente de la pareja de factores σ -ECF/anti- σ CarQ/CarR en <i>M. xanthus</i>	24
Figura 10.	Topología en la membrana de CarF	26
Figura 11.	Mecanismo de acción general de las parejas de factores σ -ECF/anti- σ	29
Figura 12.	Factores σ -ECF/anti- σ de <i>M. xanthus</i>	31
Figura 13.	Diferentes modos de regulación de los factores σ -ECF	37
Figura 14.	Modelo de organización de un FMM en <i>B. subtilis</i>	40
Figura 15.	Estructura molecular de los lípidos constituyentes de los FMMs	41
Figura 16.	Estructura de las flotilinas FloA y FloT de <i>B. subtilis</i>	43
Figura 17.	Esquema del proceso de obtención de una estirpe portadora de una delección en <i>M. xanthus</i>	60
Figura 18.	Protocolo seguido en los experimentos de <i>microarrays</i>	66
Figura 19.	Protocolo seguido en el análisis de <i>RNA-seq</i>	68
Figura 20.	Generación de la estirpe que expresa CarF-YFP y análisis de su funcionalidad.....	78
Figura 21.	Localización subcelular de CarF	79
Figura 22.	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de CarF con algunos de sus homólogos en animales y plantas	80
Figura 23.	CarF es esencial para la producción del plasmalógeno MxVEPE.....	83
Figura 24.	Biosíntesis de lípidos éter y plasmalógenos en <i>M. xanthus</i> y en mamíferos	87
Figura 25.	Generación y análisis fenotípico de los mutantes $\Delta elbD$, $\Delta 1676$ y del doble mutante $\Delta elbD \Delta 1676$	89
Figura 26.	Análisis de la implicación de ElbD y MXAN_1676 en la síntesis de lípidos éter por GC-MS	90
Figura 27.	Generación de las estirpes que expresan ElbD y MXAN_1676 en el doble mutante $\Delta elbD \Delta 1676$ y análisis de complementación	91
Figura 28.	Análisis por LC-MS/MS de MxVEPE y MxAEPE en <i>M. xanthus</i>	92
Figura 29.	La respuesta a la luz de <i>M. xanthus</i> depende directamente de los plasmalógenos, y <i>M. xanthus</i> es capaz de utilizar los plasmalógenos humanos para responder a la luz.....	95
Figura 30.	Generación y análisis fenotípico de los mutantes $\Delta carQ$ y $\Delta carR$	97

Figura 31. Generación de las estirpes que expresan mCherry-CarR y CarR-mCherry, y análisis de su funcionalidad	98
Figura 32. Localización subcelular de CarR.....	99
Figura 33. Generación de las estirpes que expresan CarQ-YFP e YFP-CarQ, y análisis de su funcionalidad	100
Figura 34. Localización subcelular de CarQ	101
Figura 35. Generación de la estirpe que expresa CarR y análisis de su funcionalidad.....	102
Figura 36. Regiones de unión de los anticuerpos anti-CarR	103
Figura 37. Detección de CarR utilizando los anticuerpos anti-CarR de manera individual	104
Figura 38. Detección de CarR utilizando los anticuerpos anti-CarR de manera conjunta.....	105
Figura 39. Generación de las estirpes que expresan CarR-Flag y Flag-CarR, y análisis de su funcionalidad	106
Figura 40. Estudio de la acumulación de CarR en oscuridad y en luz a diferentes concentraciones de vanilato.....	107
Figura 41. Estudio de la acumulación de CarR en oscuridad y en luz tras eliminar el inductor.....	108
Figura 42. Fraccionamiento de la membrana de <i>M. xanthus</i> y detección de CarR	110
Figura 43. Posibles flotilinas de <i>M. xanthus</i>	111
Figura 44. Generación y análisis fenotípico de los mutantes sencillos $\Delta floA$, $\Delta floB$ y del doble mutante $\Delta floA \Delta floB$	113
Figura 45. Localización subcelular de FloA.....	114
Figura 46. Localización subcelular de FloA mediante microscopía confocal.....	115
Figura 47. Localización subcelular de FloB mediante microscopía confocal.....	116
Figura 48. Protocolo seguido para la obtención de las muestras de cultivo para la extracción de RNA	118
Figura 49. Número de genes activados y reprimidos en los análisis transcriptómicos.....	120
Figura 50. Genes dependientes de CarQ	121
Figura 51. Análisis de expresión de los genes relacionados con la carotenogénesis	123
Figura 52. Análisis de expresión de nuevos genes dependientes de CarQ	126
Figura 53. Análisis de promotores dependientes de CarQ	128
Figura 54. Análisis de expresión del operón <i>MXAN_0665-67</i>	129
Figura 55. Análisis de expresión de genes independientes de CarQ con una cinética de expresión intermedia	132
Figura 56. Análisis de expresión de genes semi-independientes de CarQ con una cinética de expresión tardía (a partir de 8 horas).....	134
Figura 57. Validación por RT-qPCR de algunos de los genes independientes de CarQ en los análisis transcriptómicos.....	136
Figura 58. Rotura de plasmalógenos por 1O_2	144
Figura 59. Respuesta a la luz en <i>M. xanthus</i> mediada por plasmalógenos	146
Figura 60. Aminoácidos de CarR que podrían formar aductos con aldehídos	147
Figura 61. Formación de aductos entre aldehídos y proteínas.....	149
Figura 62. Similitud entre CarR y los factores anti- σ NrsF, OsrA y TmrS.....	152
Figura 63. Distribución de FloA y FloT en bacterias	155

Figura 64. Comparación de las estructuras proteicas de las posibles flotilinas de <i>M. xanthus</i> con las de <i>B. subtilis</i>	156
Figura 65. Comparación de la distribución subcelular de las posibles flotilinas de <i>M. xanthus</i> con las de <i>B. subtilis</i>	158
Figura 66. Diagrama de Venn comparativo de los genes que aumentan su expresión en los experimentos de <i>RNA-seq</i> en función del tiempo de exposición a la luz	161
Figura 67. Cinética de expresión de los genes que se inducen en respuesta a la luz en <i>M. xanthus</i>	164
Figura 68. Análisis del número de genes “de defensa” activados durante el estrés foto-oxidativo	165
Figura 69. Análisis del número de genes “reguladores” activados durante el estrés foto-oxidativo	166
Figura 70. La respuesta global al estrés foto-oxidativo en <i>M. xanthus</i>	168

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fotorreceptores bacterianos	5
Tabla 2. Estirpes de <i>M. xanthus</i>	47
Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.	48
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	50
Tabla 5. Antibióticos utilizados en <i>M. xanthus</i>	52
Tabla 6. Antibióticos utilizados en <i>E. coli</i>	53

LISTADO DE ABREVIATURAS

- **ADHAPS**: *alkyldihydroxyacetone phosphate synthase*
- AdoB₁₂: adenosilcobalamina
- AEPE: alquil éter fosfatidiletanolamina
- **BHT**: butilhidroxitolueno
- BisTMS: bis trimetilsilil
- BLUF: *Blue-Light sensing Using FAD*
- **DEPC**: dietil-pirocarbonato
- DIC: *differential interference contrast*
- DMA: dimetilacetal
- DRM: *detergent-resistant membrane*
- DSM: *detergent-sensitive membrane*
- **ECF**: *extracytoplasmic function*
- *Elb*: *ether lipid biosynthesis*
- **FAMES**: *fatty acid methyl esters*
- FC: *fold change*
- FMMS: microdominios funcionales de membrana
- **Gal^S**: sensibilidad a galactosa conferida por el gen *galk*
- GC-MS: cromatografía de gases-espectrometría de masas
- GSH: Glutación
- GST: S-transferasa de glutación
- **K^{mR}**: Resistencia a kanamicina
- **LC-MS/MS**: cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem
- Liso-PE: lisofosfatidiletanolamina
- LOV: *Light, Oxygen and Voltage*
- ¹O₂: oxígeno singlete
- OAG: O-alquilglicerol
- OCP: *Orange Carotenoid Protein*
- o/n: *overnight*
- **PHB**: dominio prohibitina
- PPIX: protoporfirina IX
- P_{van}: promotor inducible por vanilato

- PYP: *Photoactive Yellow Protein*
- **R**epeticiones EA: repeticiones de ácido glutámico (E) y alanina (A)
- RIN: *RNA integrity number*
- RNAP: polimerasa de RNA
- *RNA-seq*: secuenciación de RNA
- ROS: especies reactivas del oxígeno
- RT-qPCR: *reverse transcription quantitative PCR*
- **S**2C: sistema de 2 componentes
- SPFH: *stomatin, prohibitin, flotillin, and HflK/C*
- **T**CA: ácido tricloroacético
- Tc^R: resistencia a oxitetraciclina
- Transportadores ABC: transportadores *ATP-binding cassette*
- **V**EPE: vinil éter fosfatidiletanolamina
- Vs.: versus
- **W**T: estirpe silvestre
- **Y**FP: proteína amarilla fluorescente
- **Z**AS: *zinc binding anti-sigma*

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Respuesta general a la luz

Una característica distintiva de cualquier ser vivo es su capacidad para percibir y responder a los cambios de su entorno (Starón *et al.*, 2009), como la disponibilidad de agua y nutrientes o las variaciones de factores ambientales como la temperatura o la luz. La luz solar es una fuente esencial de energía que forma parte de la radiación electromagnética. Comprende desde los rayos X de alta energía hasta las ondas de radio de baja energía, siendo “luz visible” la que presenta longitudes de onda entre 380-760 nm, perceptibles por el ojo humano. Cabe destacar la importancia de la radiación visible y la infrarroja porque la vida en la tierra, tal y como se conoce, no sería posible sin ellas (revisado en Elías-Arnanz *et al.*, 2011; Lean, 1997; Purcell & Crosson, 2008). La luz es un factor ambiental clave para muchos procesos biológicos como la fotosíntesis, los ritmos circadianos, el fototropismo y la visión, entre otros (Cohen & Golden, 2015; Faulkner *et al.*, 2019; Johnson, 2016; Liscum *et al.*, 2014; Sung & Chuang, 2010) (Figura 1), pero un exceso de luz puede ser perjudicial tanto para los organismos fototrofos como los no fototrofos (Erickson *et al.*, 2015; Glaeser *et al.*, 2011).

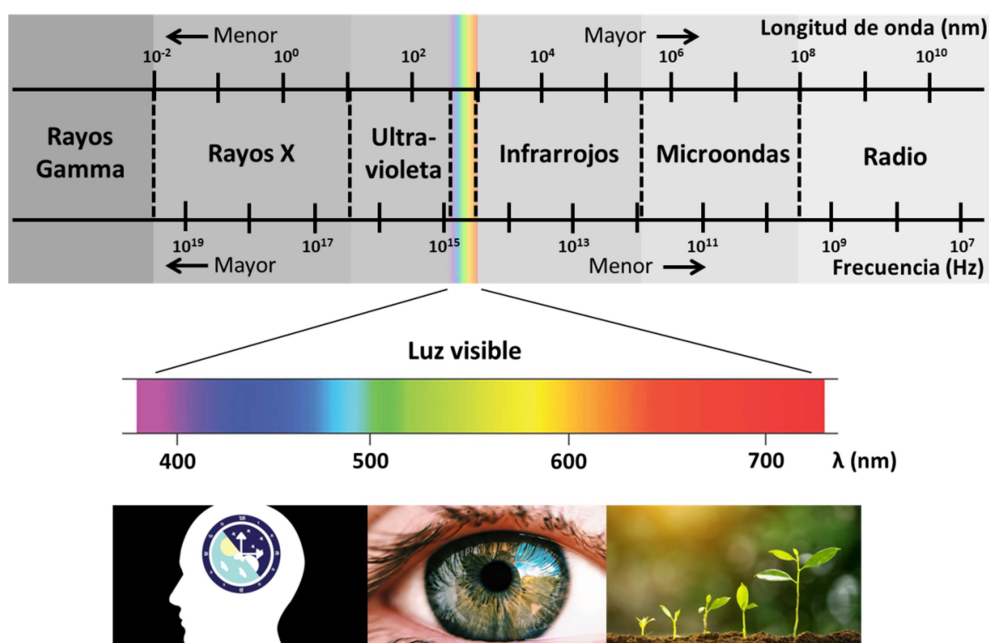


Figura 1. Espectro electromagnético. Bandas del espectro electromagnético en función de la frecuencia (Hz) y la longitud de onda (nm). Se muestra una ampliación de la región visible del espectro en la que se desarrollan la mayoría de los procesos biológicos, como los ritmos circadianos, la visión o la fotosíntesis. Modificada de Verhoeven (2017) y Zoratti *et al.* (2014). Fotografías tomadas de <https://www.israel21c.org/10-things-you-didnt-know-about-how-circadian-rhythm-affects-your-health/>, <https://papers.co/oc48-eye-face-human-nature/> y <https://science.howstuffworks.com/life/cellular-microscopic/photosynthesis.htm>.

I.1.1 Fotorrecepción en bacterias

Generalmente, la detección de la luz está mediada por fotorreceptores tanto en organismos procarióticos como eucarióticos. Los fotorreceptores están formados por una parte proteica con un dominio característico, que puede estar asociado a uno o varios cofactores o cromóforos. Los cromóforos son el componente orgánico no proteico del fotorreceptor, que absorbe en o cerca de la región visible del espectro electromagnético, confiriendo a la proteína sensibilidad a la luz. Los fotorreceptores regulan funciones biológicas muy diversas, desde la producción de energía hasta la virulencia (Purcell & Crosson, 2008). Por ejemplo, se ha observado que los criptocromos tienen un papel muy importante en la regulación de los ritmos circadianos. Este es el caso de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, que presenta el criptocromo CRY, que actúa como proteína fotorreceptora y como componente del reloj circadiano en los tubos de Malpighi y las antenas (Dubowy & Sehgal, 2017; Ivanchenko *et al.*, 2001; Krishnan *et al.*, 2001; Stanewsky *et al.*, 1998). Los fotorreceptores también pueden asociarse a virulencia, como en el caso de la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), causante de la enfermedad de la podredumbre negra en plantas crucíferas. Esta bacteria presenta el bacteriofitocromo XccBphP que, cuando se expone a la luz, regula negativamente diversos factores relacionados con la producción de exopolisacárido de xantano y la formación de *biofilms*, atenuándose así la virulencia (Bonomi *et al.*, 2016).

Los fotorreceptores bacterianos se clasifican en función del módulo proteico y el cromóforo asociado (Möglich *et al.*, 2010) (Tabla 1). Entre los principales grupos de cromóforos bacterianos que detectan la luz visible se encuentran: el retinal (derivado de la vitamina A), los tetrapirroles lineales, el ácido p-cumárico, los derivados de flavina FMN (flavín mono nucleótido) y FAD (flavín adenín dinucleótido), los cetocarotenoides y la adenosilcobalamina. Por otro lado, los diferentes módulos proteicos de los fotorreceptores bacterianos incluyen: a) las proteorrodopsinas, que absorben luz azul/verde mediante el retinal; b) los bacteriofitocromos, que absorben luz roja/roja lejana mediante tetrapirroles lineales; c) las xantopsinas, que absorben luz azul a través del ácido p-cumárico; d) el dominio LOV (*Light, Oxygen, Voltage*), que absorbe luz azul mediante FMN; e) el dominio BLUF (*Blue-Light sensing Using FAD*), que absorbe luz azul mediante FAD; f) los criptocromos, que absorben luz azul a través de FAD; g) las OCP (*Orange Carotenoid Proteins*), que absorben luz azul/verde mediante cetocarotenoides (Leverenz *et al.*, 2015); y h) CarH, una nueva familia de fotorreceptores bacterianos que absorben luz azul/verde y radiación UV a través de la adenosilcobalamina (una forma de la vitamina B₁₂), y que ha sido descubierta por el

grupo de investigación en el que se ha realizado esta Tesis Doctoral (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011).

Tabla 1. Fotorreceptores bacterianos

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

(Leverenz *et al.*, 2015; Padmanabhan *et al.*, 2019; Purcell & Crosson, 2008)

Los cromóforos actúan como el sitio primario de absorción de fotones, lo que conlleva variaciones en su estructura que provocan cambios conformacionales en el fotorreceptor. Según la fotoquímica del cromóforo, la absorción de luz puede resultar en diversos procesos químicos dependientes de luz, como la formación de aductos con una cisteína (FMN de los fotorreceptores LOV), la transferencia de electrones (FAD de los sensores BLUF y criptocromos), la ruptura de un enlace cobalto-carbono (Co-C) (adenosilcobalamina de los fotorreceptores CarH) y la isomerización *cis-trans* (cromóforos de xantopsinas, bacteriofitocromos y proteorrodopsinas). En el caso de las OCP, se ha sugerido que el cromóforo también podría sufrir una isomerización *cis-trans*, pero se desconoce el mecanismo exacto (Kish *et al.*, 2015; Kutta *et al.*, 2015; Llansola-Portoles *et al.*, 2017; Möglich *et al.*, 2010).

Aunque tradicionalmente los fotorreceptores bacterianos se han relacionado en su mayoría con organismos fototrofos, la disponibilidad creciente de genomas bacterianos ha revelado que también están presentes en una gran variedad de organismos quimiotrofos (Purcell & Crosson, 2008). La distribución de los fotorreceptores en bacterias no fototrofas varía mucho entre especies. Por ejemplo,

todas las especies secuenciadas de *Escherichia coli* presentan un fotorreceptor con dominio BLUF, mientras que organismos del género *Salmonella* y *Yersinia* no tienen ninguno, y *Klebsiella* tiene dos (Gomelsky & Hoff, 2011). En los últimos años, muchos estudios han mostrado una gran diversidad de respuestas celulares dependientes de luz, como la formación de pigmentos, la reparación del DNA, la respuesta a estrés, la formación de *biofilms* y de cuerpos fructíferos, la aclimatación cromática, así como la elección de un estilo de vida libre o asociado al hospedador (en algunas bacterias patógenas), poniendo de manifiesto la gran versatilidad en la función de los fotorreceptores bacterianos (Gomelsky & Hoff, 2011; van der Horst *et al.*, 2007; Wiltbank & Kehoe, 2019).

I.1.2 Oxígeno singlete y estrés foto-oxidativo

La exposición a la luz puede generar oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y otras especies reactivas del oxígeno (ROS), causando lo que se conoce como estrés foto-oxidativo. Los pigmentos fotosintéticos (clorofila, bacterioclorofila) u otras moléculas fotosensibilizadoras (porfirinas, flavinas, quinonas) alcanzan un nivel de energía más alto, el estado triplete excitado, cuando absorben luz. Estas moléculas excitadas pueden transferir la energía al oxígeno triplete (estado fundamental del oxígeno molecular, O_2) para producir $^1\text{O}_2$. El $^1\text{O}_2$ también puede generarse en un proceso independiente de luz mediante varias peroxidasas, a partir del estallido respiratorio de los macrófagos y de otras reacciones enzimáticas (Berghoff & Klug, 2016; Glaeser *et al.*, 2011; Ziegelhoffer & Donohue, 2009) (Figura 2).

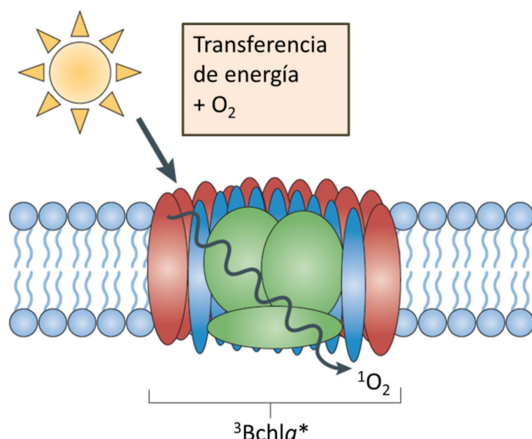
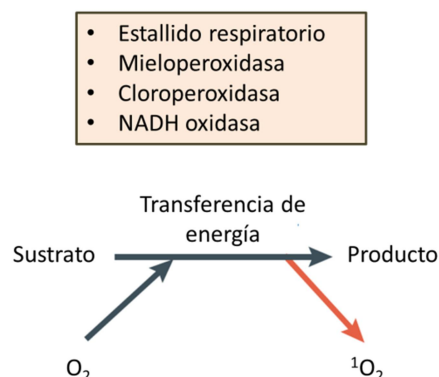
Dependiente de luz**A. Fotoquímica****B. Fotosensibilizadores****Independiente de luz****C. Enzimas**

Figura 2. Generación de ${}^1\text{O}_2$ en procesos dependientes e independientes de la luz. **A)** Transferencia de energía al O_2 desde un pigmento fotosintético como la bacterioclorofila *a* (Bchl*a*) en estado triplete excitado (${}^3\text{Bchl}a^*$) inducido por la luz. **B)** Transferencia de energía al O_2 desde un fotosensibilizador expuesto a la luz. **C)** Procesos independientes de luz que generan ${}^1\text{O}_2$ a partir de diferentes enzimas. Modificada de Ziegelhoffer & Donohue (2009).

Existen dos tipos de ROS: los que se forman por transferencia de electrones (tipo I) y los que se forman por transferencia de energía (tipo II) (Ryter & Tyrrell, 1998) (Figura 3). En el caso de los ROS de tipo I, la transferencia de electrones al O_2 genera superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), todos ellos tóxicos para las células (Figura 3B). El O_2^- y el H_2O_2 dañan proteínas a través de la oxidación, mientras que los $\cdot\text{OH}$ dañan el DNA (Ziegelhoffer & Donohue, 2009). El ${}^1\text{O}_2$ pertenece a los ROS de tipo II, en los que la transferencia de energía al O_2 genera dos versiones de ${}^1\text{O}_2$ (${}^1\Sigma_g$, ${}^1\Delta_g$). En la versión ${}^1\Sigma_g$, se invierte el espín del electrón que ocupa uno de los orbitales p más externos (y), quedando de forma antiparalela respecto al electrón del otro orbital p (x), mientras que en el O_2 los espines de estos electrones están paralelos (Figura 3A). En la versión ${}^1\Delta_g$, el electrón de uno de los orbitales p más externos salta de orbital, quedando un orbital con dos electrones apareados (x) y el otro vacío (y) (Figura 3A). Esta disposición electrónica hace que el ${}^1\Delta_g$ sea una especie muy reactiva, dañando muchos componentes de la célula como lípidos, proteínas, DNA y RNA, entre otros (Ryter & Tyrrell, 1998; Ziegelhoffer & Donohue, 2009). En los sistemas biológicos ${}^1\Delta_g$ es más importante que ${}^1\Sigma_g$ debido a que tiene una vida media mayor (Glaeser *et al.*, 2011), por lo que a partir de ahora nos referiremos al ${}^1\Delta_g$ como ${}^1\text{O}_2$. Recientemente, se ha demostrado que el ${}^1\text{O}_2$ tiene un

papel fisiopatológico en mamíferos a través de la formación de un hidroperóxido que regula el tono vascular y la presión arterial en condiciones inflamatorias (Stanley *et al.*, 2019).

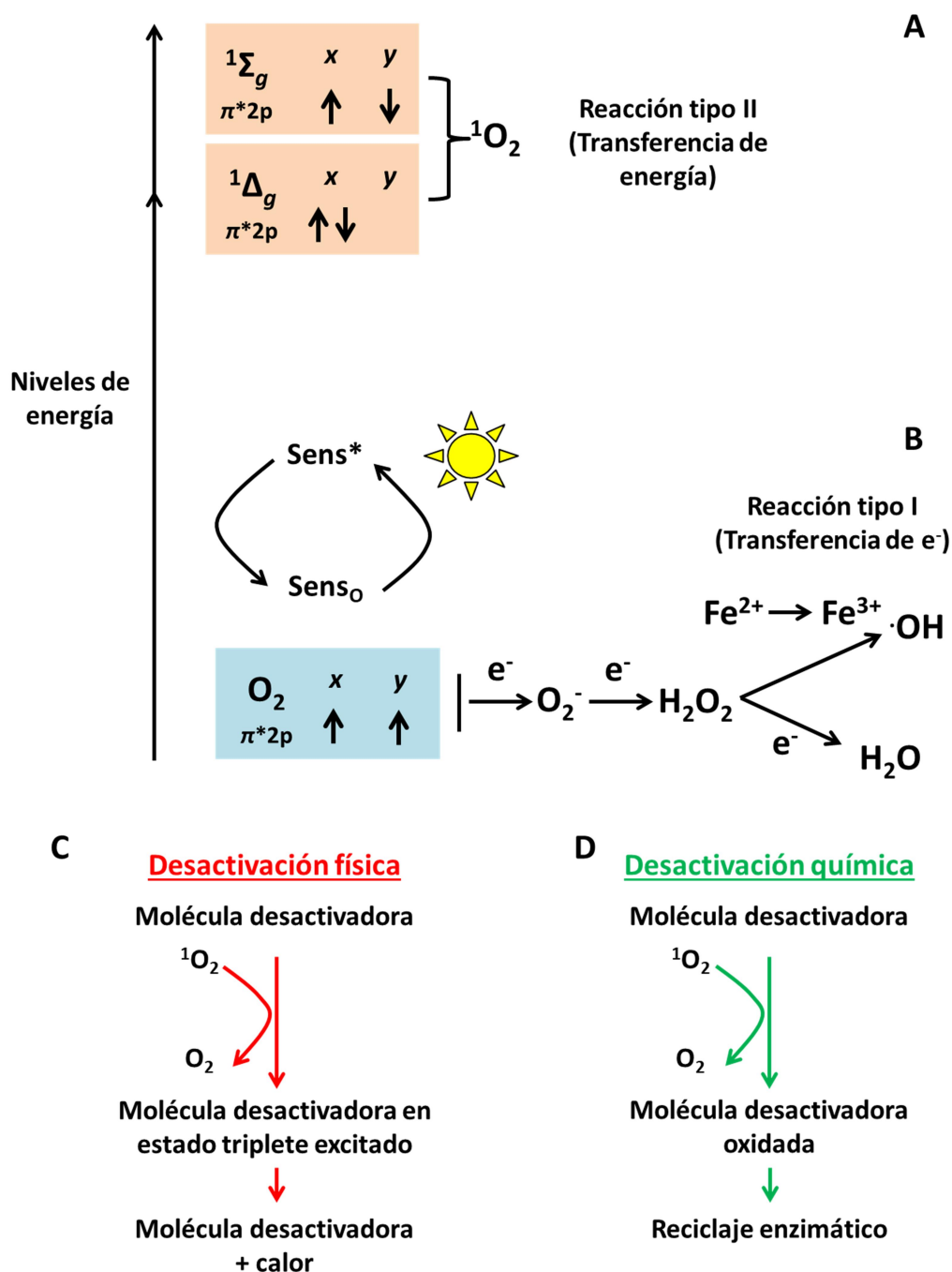


Figura 3. Formación de especies reactivas del oxígeno y mecanismos de desactivación del 1O_2 . **A)** Formación de 1O_2 . Un fotosensibilizador ($Sens_0$) es excitado por la luz ($Sens^*$) para después transferir la energía al O_2 , generando 1O_2 ($^1\Delta_g$, $^1\Sigma_g$). Se muestran los cambios producidos en la distribución de electrones en los orbitales p más externos. **B)** Transferencia de electrones (e^-) al O_2 generando superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($\cdot OH$). Modificada de Glaeser *et al.* (2011). **C)** Desactivación física del 1O_2 . **D)** Desactivación química del 1O_2 .

I.1.2.1 Mecanismos para hacer frente al estrés foto-oxidativo

Existen diversos mecanismos para hacer frente al estrés foto-oxidativo. Algunos se basan en el uso de moléculas con funciones antioxidantes que participan en una defensa directa frente al $^1\text{O}_2$; otros dependen de una batería de enzimas que contrarrestan los efectos dañinos del $^1\text{O}_2$. Además, los organismos han desarrollado mecanismos que permiten modular la expresión génica en respuesta al $^1\text{O}_2$.

I.1.2.1.1 Defensa directa frente al $^1\text{O}_2$

Se conocen dos mecanismos principales involucrados en la desactivación (*quenching*) del $^1\text{O}_2$ de forma directa: los que implican transferencia de energía (desactivación física) y los que implican reacciones químicas (desactivación química). En la desactivación física (Figura 3C), la molécula desactivadora (*quencher*) convierte el $^1\text{O}_2$ en O_2 , ganando energía y alcanzando un estado triplete excitado. Esta molécula desactivadora pierde rápidamente el exceso de energía despidiendo calor al entorno y regresando al estado basal para su reutilización. En la desactivación química (Figura 3D), se produce una reacción química entre el desactivador y el $^1\text{O}_2$, en la que el desactivador es oxidado y consumido, a menos que se produzca una reacción enzimática que permita reutilizarlo. En muchos casos, los niveles del desactivador se mantienen mediante síntesis *de novo* (Ramel *et al.*, 2012; Triantaphylidès & Havaux, 2009). A continuación, se comentan los desactivadores de $^1\text{O}_2$ más relevantes.

Carotenoides. Son pigmentos naturales ampliamente extendidos en la naturaleza, con importantes funciones en fotosíntesis, nutrición y protección contra el estrés foto-oxidativo. Pertenecen al grupo de los lípidos isoprenoides, con una estructura básica compuesta por un esqueleto hidrocarbonado, y tienen una coloración variable, que comprende desde el amarillo claro al rojo intenso. Están presentes tanto en organismos fotosintéticos (plantas, algas y cianobacterias) como en no fotosintéticos. El término carotenoide engloba a los carotenos y a las xantofilas, siendo estas últimas compuestos derivados de caroteno que contienen uno o más átomos de oxígeno (Armstrong, 1997). En los organismos fotosintéticos, los carotenoides se encuentran asociados a proteínas de membrana junto a la clorofila o bacterioclorofila del complejo fotosintético, mientras que en los no fotosintéticos pueden encontrarse unidos a la membrana plasmática o a proteínas del citoplasma. En ambos casos, los carotenoides pueden ser utilizados como mecanismo defensivo frente al $^1\text{O}_2$ a través de la desactivación química o física, siendo esta última el mecanismo más utilizado (Armstrong, 1997; Di Mascio *et al.*, 1990; Erickson *et al.*, 2015; Ramel *et al.*, 2012). En la desactivación física, pueden actuar directamente sobre el $^1\text{O}_2$ o bien sobre el

fotosensibilizador excitado en estado triplete. En organismos fotosintéticos, los fotosensibilizadores son pigmentos fotosintéticos (clorofila, bacterioclorofila), mientras que en organismos no fotosintéticos son moléculas como la protoporfirina IX (PPIX) y el hemo (Armstrong, 1997; Glaeser *et al.*, 2011).

Tocoferoles. Son un grupo de antioxidantes lipofílicos sintetizados exclusivamente por organismos fotosintéticos, principalmente en hojas y semillas (Kruk & Trebst, 2008). Los tocoferoles forman parte de una familia de moléculas que se engloban dentro del término vitamina E, cuyos miembros constituyen un grupo esencial de nutrientes para los mamíferos (Maeda & DellaPenna, 2007; Schneider, 2005). Una de sus funciones principales consiste en proteger de la peroxidación lipídica a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de las membranas (Munné-Bosch & Alegre, 2002). Se ha observado que pueden desactivar el $^1\text{O}_2$ mediante desactivación física (el mecanismo mayoritario) o química (Di Mascio *et al.*, 1990; Kaiser *et al.*, 1990).

Plastoquinoles. Son lípidos isoprenoides que se forman por la reducción de la plastoquinona en los organismos fotosintéticos. Presentan capacidad antioxidante mediante desactivación física o química del $^1\text{O}_2$ (Ferretti *et al.*, 2018).

Flavonoides. Son pigmentos polifenólicos ampliamente distribuidos en las plantas, que pueden funcionar como desactivadores químicos o físicos del $^1\text{O}_2$ (Tournaire *et al.*, 1993).

Ascorbato. También denominado vitamina C, es sintetizado por plantas y animales. Es un eficiente desactivador químico del $^1\text{O}_2$ (Noctor & Foyer, 1998; Triantaphylidès & Havaux, 2009).

Glutación. Es un tripéptido (cisteína, glicina y ácido glutámico) que se encuentra en concentraciones muy elevadas en la célula, siendo el tiol más abundante. Puede funcionar como desactivador químico del $^1\text{O}_2$ (Devasagayam *et al.*, 1991).

Tiorredoxina. Es una proteína ditiol de pequeño tamaño con función oxidorreductasa conocida por su papel protector frente al estrés oxidativo. Puede funcionar como desactivador químico frente al $^1\text{O}_2$ (Das & Das, 2000).

I.1.2.1.2 Defensa enzimática frente a los daños generados por el $^1\text{O}_2$

Como ya se ha comentado, el $^1\text{O}_2$ es una molécula muy reactiva que reacciona con numerosos componentes celulares tales como lípidos, proteínas, DNA y RNA, y forma productos de reacción oxidados como peróxidos de lípidos y proteínas, que son tóxicos para las células (Nuss *et al.*, 2009; Ziegelhoffer & Donohue, 2009). Las proteínas son la diana principal del $^1\text{O}_2$, ya que son los componentes celulares más abundantes, y algunos aminoácidos reaccionan más rápido con el $^1\text{O}_2$ que otras biomoléculas (Davies, 2003). Por todo esto, es muy importante que la célula presente una respuesta para contrarrestar los efectos dañinos de este ROS. A continuación, se describen varias enzimas implicadas en esta respuesta defensiva que están ampliamente distribuidas tanto en organismos fotosintéticos como en no fotosintéticos. Cabe destacar que muchas de ellas están relacionadas con el glutatión.

Peroxidasa de glutatión. Esta enzima en presencia de glutatión reducido degrada peróxidos peptídicos generados por el daño oxidativo. Para que su actividad sea eficiente, es necesario que, en primer lugar, diversas proteasas degraden los peróxidos de proteínas en péptidos (Morgan *et al.*, 2004).

Sistema glioxalasa. Está formado por dos enzimas (glioxalasa I y II) que llevan a cabo la degradación de metilglioxal (Li, 2016), un fuerte nucleófilo (cede electrones) que puede reaccionar rápidamente con proteínas y ácidos nucleicos (Cooper, 1984). Este compuesto puede acumularse bajo condiciones de estrés oxidativo. El sistema glioxalasa evita la acumulación intracelular de metilglioxal para prevenir los daños celulares mediante un mecanismo dependiente de glutatión (Kalapos, 1999).

S-Transferasa de glutatión. Cataliza la detoxificación de una gran variedad de moléculas que presentan un carbono, azufre, o nitrógeno electrofílico (acepta electrones), y puede reducir peróxidos orgánicos. Conjuga la forma reducida del glutatión (nucleófilo) al sustrato diana (electrófilo) (Hayes *et al.*, 2005; Nuss *et al.*, 2009).

Tiorredoxina. No solo funciona como desactivador químico frente al $^1\text{O}_2$ sino que también es capaz de reparar proteínas oxidadas a través de su poder reductor (Spector *et al.*, 1988).

Además, pueden participar otras enzimas, tales como proteasas y peptidasas, que degradan proteínas dañadas por la peroxidación; y fotoliasas, que reparan el DNA. Los transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) también podrían tener un papel

importante en la defensa frente al $^1\text{O}_2$, ayudando a eliminar productos de desecho tóxicos (Berghoff & Klug, 2016).

I.1.2.2 Respuestas al estrés foto-oxidativo en microorganismos

La mayoría de los estudios sobre respuestas biológicas a los ROS se han centrado en la protección frente al O_2^- y al H_2O_2 . Sin embargo, durante estos últimos años nuestro entendimiento acerca de las respuestas frente al $^1\text{O}_2$ ha mejorado notablemente (Berghoff & Klug, 2016). Aun así, quedan muchas preguntas por resolver sobre los mecanismos reguladores implicados y los regulones bajo su control.

Los microorganismos pueden estar expuestos a niveles elevados de $^1\text{O}_2$ cuando se dan altas intensidades de luz, oxígeno y un fotosensibilizador interno o externo. Para sobrevivir a esta situación y minimizar los daños pueden escapar de la alta radiación solar de su entorno, o activar mecanismos de defensa (Glaeser *et al.*, 2011). En microorganismos, se han identificado mecanismos reguladores mediados por factores de transcripción, quinasas, sistemas de dos componentes o factores σ alternativos (Elías-Arnanz *et al.*, 2011; Erickson *et al.*, 2015; Hakkila *et al.*, 2019; Nuss *et al.*, 2010; Nuss *et al.*, 2009), que promueven cambios en la expresión génica, activando genes cuyos productos sirven para hacer frente al $^1\text{O}_2$ y a los daños ocasionados por este.

I.1.2.2.1 En microorganismos fototrofos oxigénicos

Los organismos fotosintéticos están sujetos a estrés foto-oxidativo cuando absorben más energía luminosa de la que utilizan en la fotosíntesis. La clorofila actúa como un fotosensibilizador que provoca la aparición de $^1\text{O}_2$ mediante transferencia de energía al O_2 (Krieger-Liszkay, 2005).

Entre los microorganismos fotosintéticos, las cianobacterias han desarrollado múltiples mecanismos para hacer frente al estrés foto-oxidativo. Por ejemplo, *Synechocystis* utiliza los carotenoides, los tocoferoles y la plastoquinona como desactivadores químicos y físicos del $^1\text{O}_2$ (Hakkila *et al.*, 2014; Inoue *et al.*, 2011). También aprovecha el doble papel fotoprotector de las OCPs, las cuales no solo funcionan como disipadoras del exceso de energía, sino también como desactivadoras del $^1\text{O}_2$ mediante los dos mecanismos conocidos (Sedoud *et al.*, 2014). La exposición a altas intensidades de luz genera muchos cambios a nivel transcripcional en *Synechocystis*, induciendo genes implicados en la protección celular como, por ejemplo, un gen que determina una peroxidasa de glutatión (Singh *et al.*, 2008). Respecto a los mecanismos reguladores en respuesta al $^1\text{O}_2$, se ha observado que un

tipo de factores σ alternativos tiene un importante papel protector frente a este ROS, favoreciendo el proceso de aclimatación en *Synechocystis* (Hakkila *et al.*, 2019).

El alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* es capaz de sintetizar antioxidantes como los tocoferoles y los carotenoides, desactivando química y físicamente al $^1\text{O}_2$ (Erickson *et al.*, 2015) (Figura 4). Análisis globales de los niveles de RNA, tras ser expuesta esta alga al $^1\text{O}_2$, mostraron un incremento de la expresión de una serie de genes que determinan una peroxidasa de glutatión, una S-transferasa de glutatión y una tioredoxina citosólica, todas ellas proteínas relacionadas con la respuesta defensiva frente a los daños generados por $^1\text{O}_2$. La sobreexpresión tanto de la peroxidasa de glutatión como de la S-transferasa de glutatión fue suficiente para potenciar la resistencia frente a este ROS (Ledford *et al.*, 2007). *C. reinhardtii* también presenta diferentes reguladores implicados en el proceso de aclimatación al $^1\text{O}_2$, que alertan al núcleo de la presencia de niveles tóxicos de $^1\text{O}_2$ en el cloroplasto, modulando la expresión génica (Figura 4). Uno de ellos es el factor de transcripción SOR1, que responde a electrófilos reactivos generados por $^1\text{O}_2$ (Fischer *et al.*, 2012). Otro regulador clave es la fosfoproteína citosólica SAK1, un posible factor de transcripción que es inducido y fosforilado en respuesta al $^1\text{O}_2$. SAK1 es necesaria para la expresión de gran parte de los genes requeridos para la respuesta al $^1\text{O}_2$ (Wakao *et al.*, 2014).

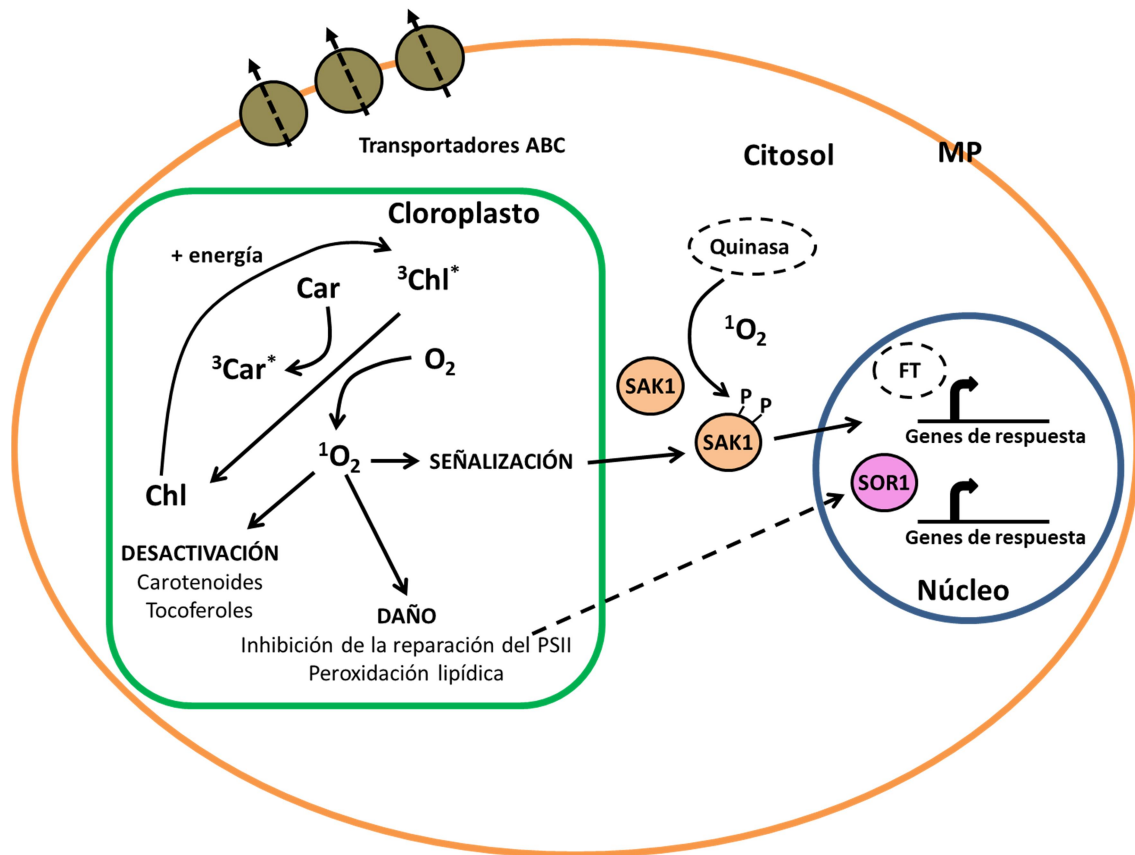


Figura 4. Respuestas al $^1\text{O}_2$ y señalización en *C. reinhardtii*. Cuando se produce un exceso de luz, la clorofila (Chl) alcanza un estado triplete excitado ($^3\text{Chl}^*$) que genera $^1\text{O}_2$ por transferencia de energía. Los carotenoides (Car) pueden desactivar a la $^3\text{Chl}^*$ o al $^1\text{O}_2$ mediante desactivación física, excitándose y pasando a un estado triplete excitado ($^3\text{Car}^*$). Una vez generado, el $^1\text{O}_2$ puede seguir diferentes destinos: (I) sufrir desactivación química por carotenoides y tocoferoles; (II) dañar la maquinaria de reparación del fotosistema II (PSII) y provocar la oxidación de lípidos, entre otros; y (III) señalizar a través de segundos mensajeros o proteínas sensoras del estrés. La proteína citosólica SAK1 es necesaria para la inducción de genes de respuesta frente al $^1\text{O}_2$. SAK1 es fosforilada tras la exposición a $^1\text{O}_2$, lo que implica la participación de una quinasa. Además, el factor de transcripción SOR1 también confiere resistencia frente al $^1\text{O}_2$ activando otra serie de genes de respuesta. Durante la respuesta al $^1\text{O}_2$, también incrementa la expresión de genes que determinan transportadores ABC, que pueden favorecer la expulsión de productos tóxicos para la célula. Flechas o círculos discontinuos indican posibles rutas o proteínas, respectivamente. FT, factor de transcripción; MP, membrana plasmática. Modificada de Erickson *et al.* (2015).

I.1.2.2.2 En microorganismos fototrofos anoxigénicos: *Rhodobacter sphaeroides*

Un microorganismo muy utilizado como sistema modelo para estudiar la respuesta al estrés foto-oxidativo es la bacteria púrpura *R. sphaeroides*. En *R. sphaeroides*, la bacterioclorofila *a* es el fotosensibilizador que, tras ser expuesto a la luz, reacciona con el O_2 para producir $^1\text{O}_2$ (Ziegelhoffer & Donohue, 2009). Los carotenoides son componentes esenciales del complejo fotosintético en esta bacteria,

por su papel en la captura y la transferencia de la energía luminosa; además, actúan como barrera primaria de defensa frente al $^1\text{O}_2$ mediante desactivación química o física. A pesar de su función protectora frente al $^1\text{O}_2$, no se ha observado un aumento ni en la expresión de los genes relacionados con la síntesis de carotenoides ni en los niveles de carotenoides bajo condiciones de estrés foto-oxidativo, respecto a los niveles observados en oscuridad. Por lo tanto, deben existir otros factores que se expresen en respuesta al estrés foto-oxidativo para permitir la adaptación a niveles elevados de $^1\text{O}_2$ (Glaeser & Klug, 2005).

La inactivación de una enzima temprana de la biosíntesis de carotenoides, la sintetasa de fitoeno (CrtB), incrementa ligeramente la actividad del factor σ alternativo de tipo ECF (*extracytoplasmic function*) conocido como RpoE (σ^E) (en el siguiente apartado se comentarán las características generales de los factores σ -ECF). Por ello, se propuso la existencia de una conexión entre el estrés originado por $^1\text{O}_2$ y el regulador transcripcional σ^E . Experimentos adicionales demostraron que el $^1\text{O}_2$ es el activador específico de la respuesta transcripcional dependiente de σ^E , y que esta respuesta es necesaria para la viabilidad de *R. sphaeroides* en presencia de $^1\text{O}_2$ cuando las células presentan niveles bajos de carotenoides (Anthony *et al.*, 2005; Ziegelhoffer & Donohue, 2009). En ausencia de $^1\text{O}_2$, σ^E se encuentra inactivo formando un complejo con su factor anti- σ ChrR. En presencia de $^1\text{O}_2$, σ^E es liberado de su factor anti- σ y activa su propia expresión y la de ChrR, además de activar la transcripción de otros genes diana como *cfaS*, *phrA*, *cycA* y *rpoH2*. El gen *cfaS* (*cyclopropane fatty acyl-phospholipid synthase*) determina una metilasa de ácidos grasos que, junto con el producto de otro gen, da lugar a la producción de un ácido graso de furano que podría actuar como segundo mensajero, y aumentar así la magnitud de la respuesta frente al $^1\text{O}_2$. El gen *phrA* determina una fotoliasa de DNA, que repara los dímeros de pirimidina generados por la radiación ultravioleta. La expresión del gen *cycA*, que da lugar al citocromo c_2 , podría ayudar en el mantenimiento de la función del aparato fotosintético cuando se genera $^1\text{O}_2$. Por último, el gen *rpoH2* determina uno de los dos factores σ de choque térmico de *R. sphaeroides* (Anthony *et al.*, 2005; Erickson *et al.*, 2015; Lemke *et al.*, 2014; Ziegelhoffer & Donohue, 2009).

La expresión de *rpoH2* promovida por σ^E muestra que el $^1\text{O}_2$ da lugar a una cascada transcripcional en la que RpoH2 activa un primer grupo de genes implicados en la detoxificación dependiente de glutatión de productos formados por la interacción de macromoléculas celulares con el $^1\text{O}_2$. Dentro de este grupo se encuentran proteínas como la S-transferasa de glutatión, la γ -glutamyltransferasa y

aminopeptidasas. Cabe destacar el importante papel de la γ -glutamyltransferasa en la regeneración de glutatión y en la homeostasis redox. El segundo grupo de genes dependientes de RpoH2 determina proteínas relacionadas con la degradación de peróxidos. Este grupo está formado por proteínas como la peroxirredoxina y la peroxidasa de glutatión. RpoH2 controla un tercer grupo de genes que están destinados a la eliminación de metilglioxal a través de un mecanismo dependiente de glutatión (mediante el sistema glioxalasa) o independiente de glutatión (mediante reductasas y deshidrogenasas). Por último, hay genes dependientes de RpoH2 que determinan proteínas de unión a hierro implicadas en el control de la concentración intracelular del mismo, para evitar la formación de radicales hidroxilo. En este grupo se encuentran proteínas con un dominio *ferredoxin-like* y bacterioferritinas (Nuss *et al.*, 2009) (Figura 5).

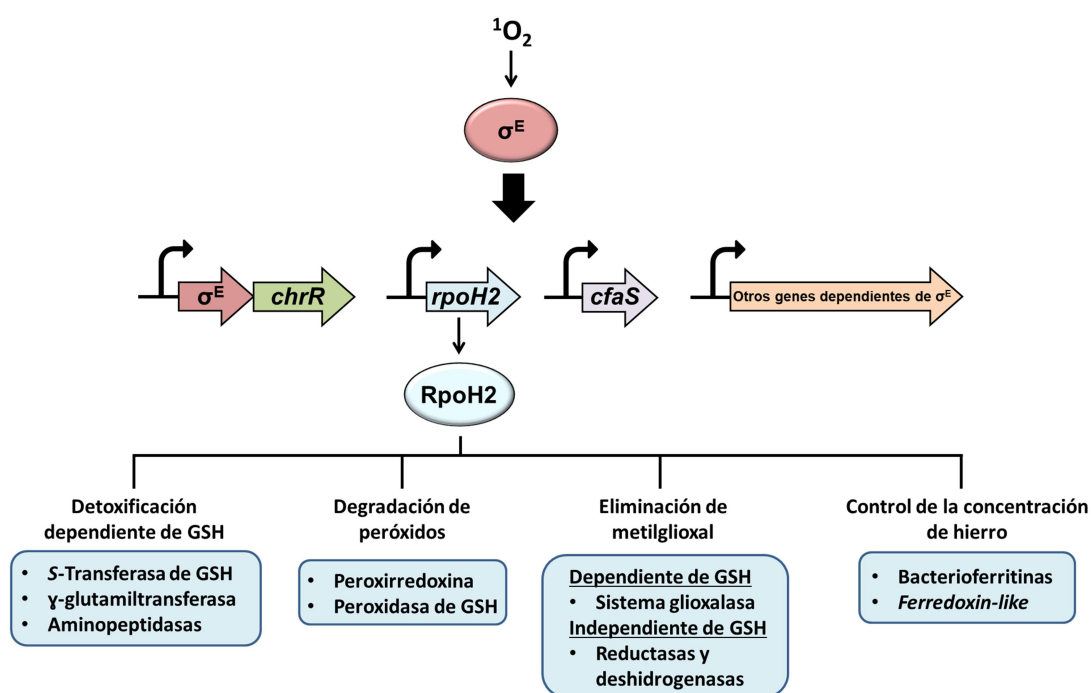


Figura 5. El $^1\text{O}_2$ activa una cascada transcripcional en *R. sphaeroides*. La formación de $^1\text{O}_2$ incrementa la actividad del factor σ alternativo σ^E , que activa su propia expresión, la de su factor anti- σ ChrR, la del factor σ de choque térmico RpoH2, la de CfaS y la de otras proteínas cuyos genes dependen de σ^E . Posteriormente, RpoH2 activa la expresión de genes relacionados con la defensa frente a los daños generados por el $^1\text{O}_2$. GSH, glutatión; *cfaS*, *cyclopropane fatty acyl-phospholipid synthase*. Modificada de Nuss *et al.* (2009) y Ziegelhoffer & Donohue (2009).

El otro factor σ de choque térmico de *R. sphaeroides*, RpoH1, también contribuye a la respuesta frente al $^1\text{O}_2$, pero en menor medida que RpoH2. Ambos factores σ desencadenan la expresión de otros factores reguladores, como la proteína de unión al DNA OmpR, que es un regulador de la respuesta de un sistema de dos

componentes (Nuss *et al.*, 2010). La sobreexpresión de OmpR aumenta los niveles de diferentes RNAs pequeños (sRNAs) relacionados con la respuesta al $^1\text{O}_2$ (Zhao *et al.*, 2019). RpoH2, RpoH1 y RpoE también activan la expresión de sRNAs, que actuarían como reguladores a nivel post-transcripcional controlando la expresión génica en respuesta al $^1\text{O}_2$. Otro regulador importante del estrés foto-oxidativo en *R. sphaeroides* es la chaperona de RNA Hfq, que media la unión de los sRNAs (excepto del sRNA inducido por σ^E) a sus RNAs mensajeros diana y afecta a la expresión del complejo fotosintético, a la actividad de σ^E y a las funciones controladas por RpoH2 (Glaeser *et al.*, 2011).

I.1.2.2.3 En bacterias no fototrofas

Las bacterias no fototrofas también están expuestas a los daños provocados por el $^1\text{O}_2$. En *E. coli*, por ejemplo, el $^1\text{O}_2$ puede generarse por exposición a la luz de la PPIX, que actuaría como fotosensibilizador (Yang *et al.*, 1995). *E. coli* presenta varios sistemas que suelen relacionarse con respuestas defensivas frente al estrés oxidativo, como los factores de transcripción OxyR y SoxRS, que responden a H_2O_2 y O_2^- , respectivamente, pero también al $^1\text{O}_2$. Kim *et al.* (2002) sometieron a estrés foto-oxidativo a una estirpe mutante que sobreexpresa *oxyR* y a otra que lo tiene deletado, y examinaron la cinética de crecimiento, la viabilidad, las actividades de las principales enzimas antioxidantes y el daño oxidativo a proteínas. Los datos mostraron que el regulón *oxyR* tiene un papel protector frente al $^1\text{O}_2$ a través de la protección de enzimas antioxidantes. El $^1\text{O}_2$ también activa genes del regulón *soxRS* y esta respuesta depende de SoxR. Es probable que la superóxido dismutasa activada por SoxRS tenga un papel protector frente al $^1\text{O}_2$ (Agnez-Lima *et al.*, 2001), como se ha demostrado para las superóxido dismutasas de hierro de *Agrobacterium tumefaciens* (Saenkham *et al.*, 2008).

Caulobacter crescentus, que al igual que *R. sphaeroides* pertenece a la clase Alphaproteobacteria, presenta genes homólogos a aquellos que determinan la pareja de factores σ -ECF/anti- σ σ^E /ChrR identificados previamente en *R. sphaeroides*. *C. crescentus* utiliza el sistema σ^E /ChrR para responder al $^1\text{O}_2$ y otros estreses, como hidroperóxidos orgánicos, la radiación UV-A y el cadmio, induciendo genes de respuesta implicados en la protección frente al estrés oxidativo (Lourenço & Gomes, 2009).

Otra bacteria no fototrofa, como *Myxococcus xanthus*, responde al estrés foto-oxidativo a través de dos mecanismos: uno dependiente de la vitamina B₁₂ y otro

dependiente de una pareja de factores σ -ECF/anti- σ (Elías-Arnanz *et al.*, 2011), que se tratan con más detalle a continuación.

I.2 *Myxococcus xanthus* como modelo de estudio de respuesta a la luz

I.2.1 Características generales de las mixobacterias

Las mixobacterias, descritas por el botánico Roland Thaxter en 1892, son bacterias Gram negativas, aerobias, de forma bacilar, no patógenas y de tamaño relativamente grande (0,7-1,2 μm de ancho por 3-12 μm de largo). Pertenecen a la clase de las Deltaproteobacteria, junto con las bacterias reductoras de sulfato y el género *Bdellovibrio* (Shimkets & Woese, 1992). En función de sus características morfológicas y fisiológicas, y apoyado por el análisis de las secuencias del rRNA 16S, se han clasificado en tres subórdenes: *Sorangineae*, *Cystobacterineae* (que incluye a *M. xanthus*) y *Nannocystineae* (Reichenbach, 1999; Shimkets & Woese, 1992; Spröer *et al.*, 1999). Las mixobacterias suelen vivir en el suelo, aunque también pueden encontrarse habitualmente en los excrementos de animales herbívoros, en material vegetal en descomposición, en la corteza de los árboles y, ocasionalmente, en la superficie de las hojas de las plantas, en aguas dulces o en ambientes marinos. Una característica distintiva es su actividad depredadora sobre otros microorganismos, ya que son capaces de lisar una gran variedad de bacterias y hongos, y obtener nutrientes de los productos de lisis (Dawid, 2000; Iizuka *et al.*, 1998; Mohr, 2018). La mayoría de las especies son mesófilas. En concreto, *M. xanthus* presenta una tasa máxima de crecimiento cuando se incuba a temperaturas entre 34-36 °C, pero deja de crecer a temperaturas superiores a 40 °C, mientras que las mixosporas (o esporas de resistencia) son completamente estables a 50-60 °C (Janssen *et al.*, 1977). No obstante, en muestras procedentes de la Antártida se encontraron especies psicrófilas capaces de crecer a temperaturas entre 4-9 °C (Dawid *et al.*, 1988).

En comparación con otros procariotas, las mixobacterias presentan un genoma muy grande (9,14 Mb para *M. xanthus* y hasta unas 13 Mb para *Sorangium cellulosum*) y con un alto contenido en G+C (67-71%). Esta expansión genómica podría derivar de una duplicación génica masiva de genes implicados en la señalización intercelular, la percepción sensorial de pequeñas moléculas y el control integrado de la transcripción, que podría haber impulsado la evolución del estilo de vida multicelular de las mixobacterias (Goldman *et al.*, 2006; Kaiser & Dworkin, 2008).

Por otro lado, eventos de transferencia génica horizontal también podrían haber contribuido a la expansión genómica y a la adquisición de genes implicados en la producción de metabolitos secundarios, que quizás estén relacionados con la depredación (Yang & Higgs, 2014).

Las mixobacterias presentan un ciclo de vida complejo, en el que se distingue una fase vegetativa y otra de desarrollo multicelular (Muñoz-Dorado *et al.*, 2016), siendo el ciclo de vida más estudiado el de *M. xanthus* (Figura 6), la especie que suele utilizarse como sistema modelo. La fase vegetativa se produce cuando hay nutrientes en el entorno. Entonces, los grupos o enjambres de células crecen y se dividen, desplazándose en busca de alimento (Zusman *et al.*, 2007). Esta forma de desplazamiento grupal constituye una ventaja para la depredación y obtención de nutrientes, ya que numerosas bacterias cooperan para producir antibióticos y enzimas digestivas que matan y digieren a otros microorganismos (Rosenberg *et al.*, 1977). Cuando los nutrientes escasean, las células entran en la fase de desarrollo multicelular, en la que se agregan en pequeños montículos macroscópicos denominados cuerpos fructíferos (Kaiser, 2004). Una fracción de las células sufre morfogénesis y forma esporas esféricas, las mixosporas, que son metabólicamente inactivas y parcialmente resistentes a la desecación y temperatura (Zusman *et al.*, 2007). Otra fracción de las células no se diferencia en mixosporas y forma una monocapa entre los cuerpos fructíferos. Estas células periféricas podrían representar un nuevo tipo celular, que se encuentra interrumpido en su camino hacia la esporulación y es capaz de sobrevivir en entornos con una baja concentración de nutrientes (Whitfield *et al.*, 2019). También podrían funcionar como “exploradoras” para identificar nuevas fuentes de alimentos (O'Connor & Zusman, 1991; Sliusarenko *et al.*, 2006). Finalmente, cuando los nutrientes vuelven a estar disponibles, las esporas germinan y completan el ciclo de vida, iniciando de nuevo la fase vegetativa (Elías & Murillo, 1991a, 1991b).

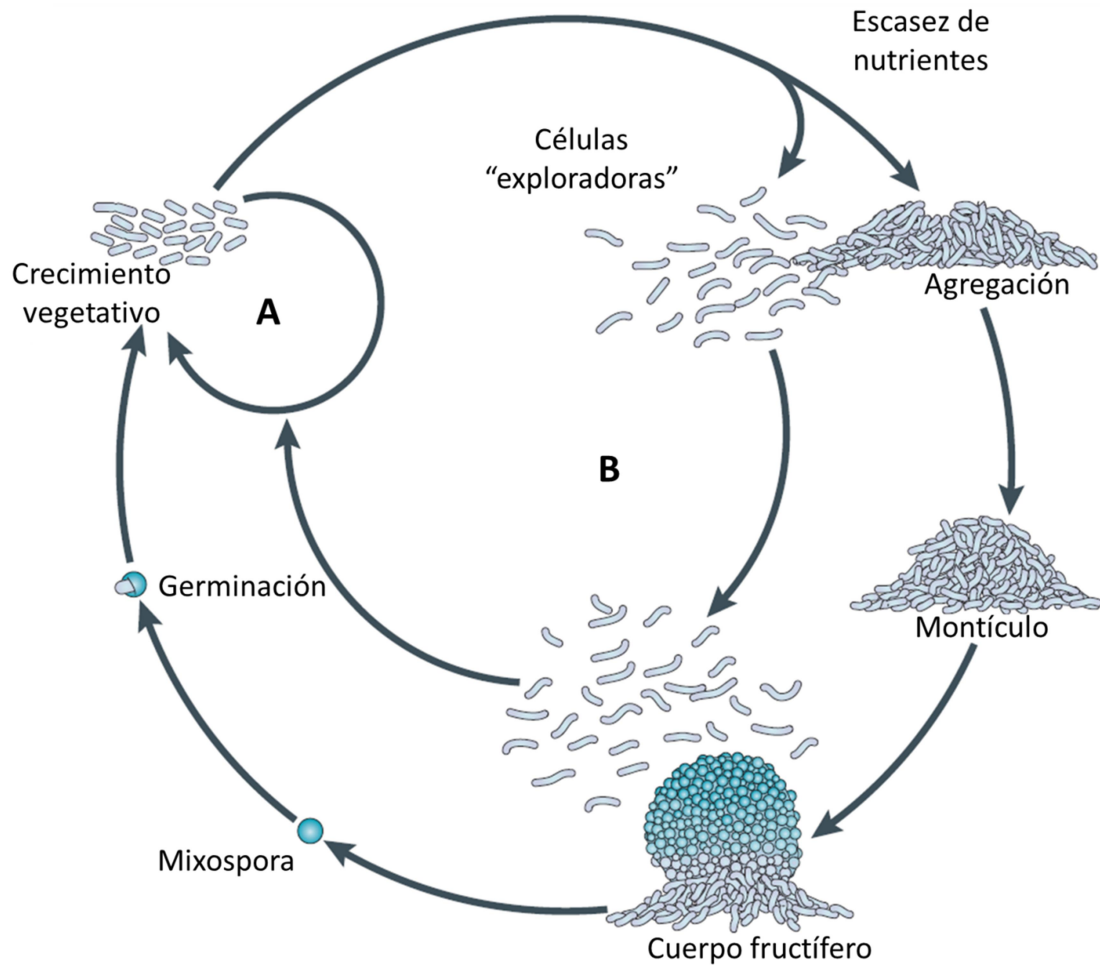


Figura 6. Ciclo de vida de *M. xanthus*. **A)** Fase vegetativa. Los grupos de células (enjambres) crecen y se dividen, desplazándose en busca de nutrientes. **B)** Fase de desarrollo multicelular. En ausencia de nutrientes, las células se agregan en pequeños montículos, los cuerpos fructíferos, en los que algunas células se diferenciarán en mixosporas, metabólicamente inactivas. Otras células, conocidas como periféricas o exploradoras, no se diferencian a mixosporas y se localizan entre los cuerpos fructíferos buscando nuevas fuentes de nutrientes. Cuando las condiciones vuelven a ser óptimas, las mixosporas germinan y dan lugar a la forma vegetativa. Modificada de Zusman *et al.* (2007).

I.2.2 Respuesta a la luz en *M. xanthus*

En condiciones de oscuridad, *M. xanthus* presenta una coloración amarilla debido a la producción de un pigmento hidrosoluble no carotenoide denominado DKxanteno (Meiser *et al.*, 2006). En condiciones de luz, adquiere una coloración roja por la acumulación de diferentes carotenoides, que incluyen un éster glicosilado de mixobacton, grandes cantidades de fitoeno y, en menor medida, fitoflueno y otros intermediarios de la síntesis de carotenos (Martínez-Laborda *et al.*, 1990) (Figura 7).



Figura 7. Carotenogénesis inducida por la luz en *M. xanthus*. Células de *M. xanthus* crecidas en oscuridad y en luz. Se observa el cambio de color de amarillo a rojo debido a la síntesis de carotenoides.

M. xanthus ha desarrollado dos mecanismos de regulación que culminan en la síntesis de carotenoides para protegerse del $^1\text{O}_2$ derivado del estrés foto-oxidativo. Uno de estos mecanismos es dependiente de B_{12} y el otro es independiente de B_{12} (Elías-Arnanz *et al.*, 2011).

I.2.2.1 Mecanismo de respuesta a la luz dependiente de B_{12}

De los dos mecanismos de regulación de la respuesta a la luz de *M. xanthus*, el más sencillo (en cuanto al número de componentes implicados) es el que depende de CarH y su asociación con la adenosilcobalamina (AdoB_{12}), una de las dos formas biológicamente activas de la vitamina B_{12} . CarH es un fotorreceptor, a la vez que un represor, y está constituido por un dominio N-terminal de unión al DNA (de tipo MerR), un pequeño fragmento conector y un dominio C-terminal de unión a AdoB_{12} . En la oscuridad, la unión de AdoB_{12} a CarH promueve un cambio en su estado oligomérico, de monómero a tetrámero, necesario para que CarH se una al DNA operador y ejerza su actividad represora sobre el promotor P_B , que dirige la expresión de la mayoría de los genes estructurales (agrupados en el súper-operón *carB-carA*) responsables de la síntesis de carotenoides. En la luz, la fotólisis de la AdoB_{12} conlleva la disociación de los tetrámeros de CarH a monómeros, dejando libre el operador y facilitando así la expresión de los genes carotenogénicos del súper-operón *carB-carA* a través del promotor P_B , incluyendo la propia expresión de *carH* (situado al final del operón *carA*) (Elías-Arnanz *et al.*, 2011; Jost *et al.*, 2015; Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011; Padmanabhan *et al.*, 2017; Padmanabhan *et al.*, 2019; Pérez-Marín *et al.*, 2008) (Figura 8). Durante años, la acción de CarH y la existencia de un novedoso mecanismo de fotorregulación basado en el uso de B_{12} ha permanecido enmascarado por el mecanismo de regulación independiente de B_{12} . El descubrimiento, por el grupo en el que se ha realizado este trabajo, de CarH, de su mecanismo de acción, y de su amplia distribución en otras especies bacterianas ha supuesto el hallazgo de una nueva

familia de fotorreceptores bacterianos y de una nueva faceta de la vitamina B₁₂, más allá de la ya bien conocida como cofactor enzimático (Padmanabhan *et al.*, 2017). Además, ha impulsado el uso de CarH y de su módulo fotosensor en una variedad de aplicaciones en Optogenética (Padmanabhan *et al.*, 2019).

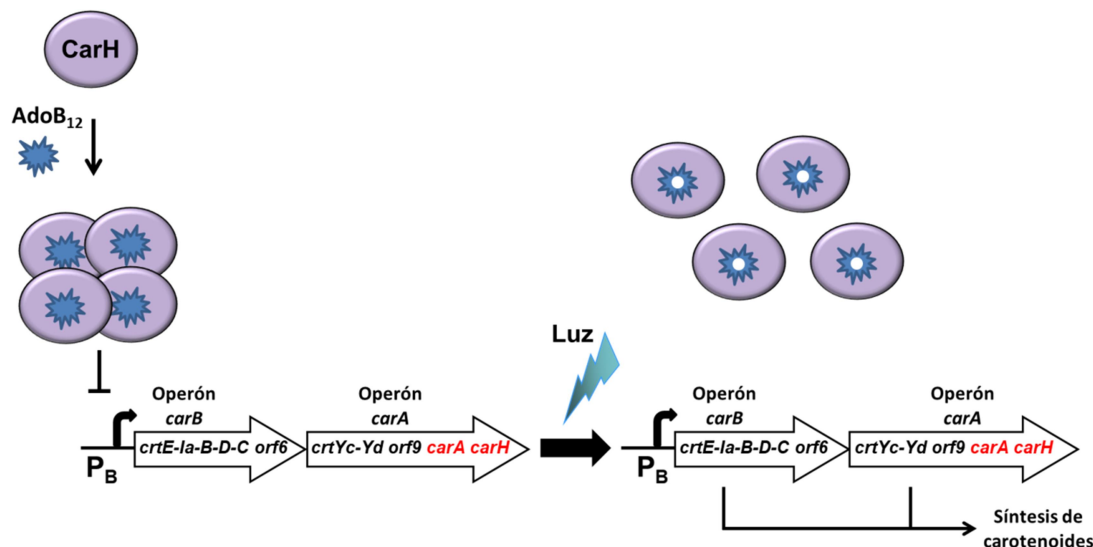


Figura 8. Modelo de regulación de la respuesta a la luz dependiente del fotorreceptor CarH y de la vitamina B₁₂ en *M. xanthus*. En condiciones de oscuridad, la unión de la AdoB₁₂ (asterisco azul) provoca la tetramerización de CarH, que se une a su operador y reprime la expresión de los genes carotenogénicos. La exposición a la luz conlleva la fotólisis de la AdoB₁₂ (asteriscos con un círculo blanco) y la disociación de los tetrámeros de CarH a monómeros, dejando libre el operador y expresándose así los genes carotenogénicos. La línea truncada indica una acción negativa sobre P_B. En letra negra se indican los genes estructurales implicados en la síntesis de carotenoides. Modificada de Padmanabhan *et al.* (2017).

I.2.2.2 Mecanismo de respuesta a la luz independiente de B₁₂

En el segundo mecanismo de respuesta a la luz de *M. xanthus*, independiente de B₁₂, intervienen al menos ocho genes reguladores, que han sido identificados en gran parte por el grupo en el que se ha realizado este trabajo. Estos genes se encuentran distribuidos en cinco loci independientes (Elías-Arnanz *et al.*, 2008, 2011): los operones reguladores *carQRS* y *carDG*; los genes reguladores *ihfA* y *carF* (Fontes *et al.*, 2003; Galbis-Martínez *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2001); el súper-operón *carB-carA*, que contiene el gen regulador *carA* (situado justo aguas arriba de *carH*), además de los genes estructurales (Figura 9).

En la señalización del estímulo luminoso juegan un papel clave el factor σ -ECF CarQ y su factor anti- σ CarR (Figura 9). En condiciones de oscuridad, CarR secuestra a CarQ en la membrana y la mantiene inactiva, por lo que los genes carotenogénicos no se expresan. Cuando la bacteria se expone a la luz azul, la PPIX (que, por motivos

desconocidos, se acumula en la membrana de *M. xanthus*) pasa a un estado triplete excitado ($^3\text{PPIX}^*$) y transfiere su energía al O_2 generando $^1\text{O}_2$. Puesto que CarF es el elemento genético de acción más temprana que se conoce y, dado que CarR y CarF parecen interactuar físicamente, el modelo de acción inicialmente propuesto postulaba que CarF participa en la detección del $^1\text{O}_2$, de algún modo aún por determinar, y ello conlleva la inactivación de CarR (Elías-Arnanz *et al.*, 2011). Sin embargo, como se verá en la sección de Resultados, los experimentos realizados en este trabajo han provocado un interesante cambio de paradigma en este modelo de señalización del $^1\text{O}_2$. En cualquier caso, la inactivación de CarR provocaría la liberación de CarQ, su unión a la polimerasa de RNA (RNAP) y la activación de su propio promotor (P_{QRS}) y del promotor del gen estructural *crtIb* (P_{crtIb}) (Elías-Arnanz *et al.*, 2011). La presencia de cobre también provoca la inactivación de CarR de manera desconocida e independiente de la luz (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2005); sin embargo, esto solo ocurre a temperaturas más bajas de las que muestran un crecimiento óptimo.

La activación de los promotores P_{crtIb} y P_{QRS} por CarQ requiere, además, la acción del complejo proteico CarD-CarG, un complejo regulador global poco convencional que también está implicado en otros procesos, como la formación de cuerpos fructíferos (Elías-Arnanz *et al.*, 2010). La activación de P_{QRS} necesita la acción de una proteína adicional, IHF (*integration host factor*) (Moreno *et al.*, 2001), conocida por su papel como factor arquitectónico en procesos tales como el empaquetamiento del cromosoma, la recombinación y la regulación de la transcripción (Browning *et al.*, 2010). CarD y sus homólogos son las únicas proteínas procarióticas conocidas que presentan un dominio de unión al DNA típico de los factores arquitectónicos eucarióticos de la familia HMGA (*high mobility group A*), localizado en su región C-terminal. CarD se une específicamente a una región rica en pares AT situada aguas arriba de la región -35 del promotor P_{QRS} , que es necesaria para la activación de este promotor por la luz. Además, el dominio N-terminal de CarD es esencial para su función y la interacción consigo misma, con CarG y con la RNAP (Elías-Arnanz *et al.*, 2010; García-Heras *et al.*, 2013; García-Heras *et al.*, 2009; Padmanabhan *et al.*, 2001; Peñalver-Mellado *et al.*, 2006). El otro componente del complejo, CarG, es una proteína de unión a zinc necesaria para todos los procesos en los que participa CarD pero, a diferencia de esta, no se une directamente al DNA (Peñalver-Mellado *et al.*, 2006).

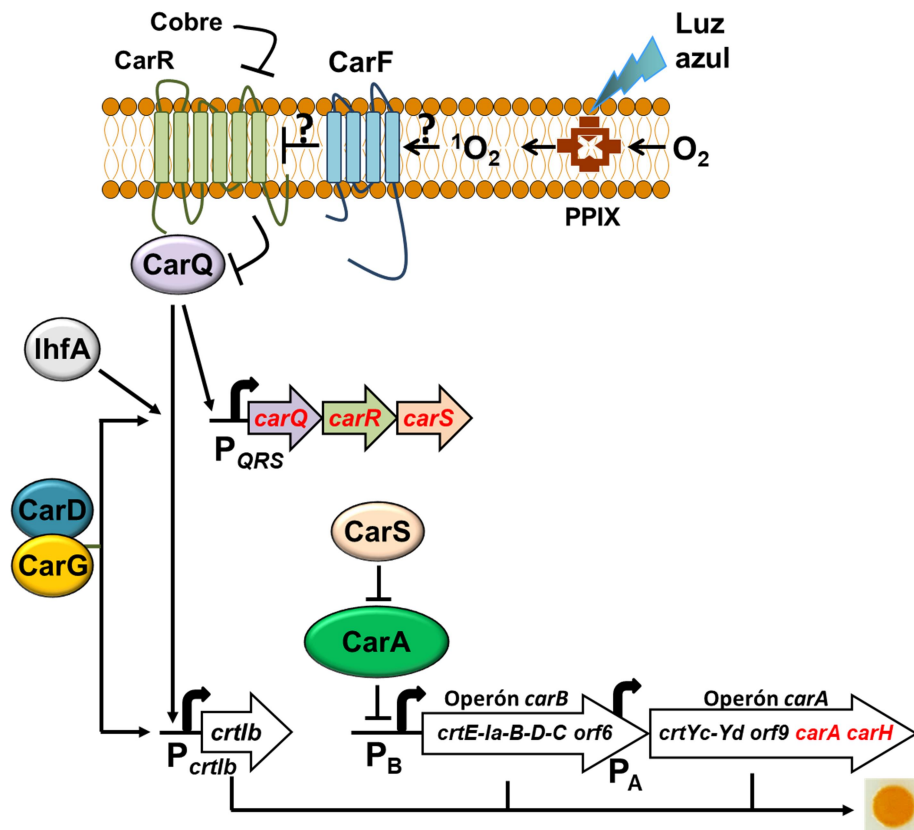


Figura 9. Modelo de regulación de la respuesta a la luz dependiente de la pareja de factores σ -ECF/anti- σ CarQ/CarR en *M. xanthus*. La luz azul excita a la PPIX, que genera $^1\text{O}_2$ por transferencia de energía al O_2 . Esto, de alguna forma, es detectado por la proteína CarF, dando lugar a la inactivación del factor anti- σ CarR y a la liberación de CarQ, que se une a la RNAP y activa la expresión de su propio promotor (P_{QRS}) y del de *crtIb* (P_{crtIb}). Esta activación también es dependiente del complejo regulador global CarD-CarG y de IHF. Una vez se expresan los genes del operón *carQRS*, el antirrepresor CarS se une a CarA, de forma que el promotor P_B queda libre, permitiendo la expresión de los genes de la carotenogénesis que se encuentran en el súper-operón *carB-carA*. La presencia de cobre también provoca la inactivación de CarR de forma independiente de CarF y la luz, aunque a temperaturas más bajas que las de crecimiento óptimo. Los signos de interrogación señalan aspectos desconocidos de la ruta que se abordan en este trabajo. En letra roja se indican los genes reguladores y en letra negra los genes estructurales. Las flechas negras finas indican regulación positiva sobre promotores, mientras que las líneas truncadas indican acciones negativas sobre promotores u otras proteínas. Modificada de Elías-Arnanz *et al.* (2011).

A excepción de *crtIb*, los genes que determinan las enzimas carotenogénicas se encuentran en el súper-operón *carB-carA*. La expresión de los genes del operón *carB* (*crtE*, *crtIa*, *crtB*, *crtD*, *crtC* y *orf6*) depende del promotor P_B . Los otros genes estructurales (*crtYc* y *crtYd*) se encuentran en el operón *carA* que se transcribe en la misma dirección a partir del promotor P_A (localizado en la región estructural de *orf6*) y, en presencia de luz, también lo hace a partir de P_B . Además, el operón *carA* incluye los genes reguladores parálogos *carA* y *carH*, y el gen de función desconocida *orf9* que, en base a la similitud de secuencia de su producto génico con las aciltransferasas

bacterianas, podría estar implicado en la esterificación de mixobacton (Elías-Arnanz *et al.*, 2008). CarA presenta la misma arquitectura de dominios que CarH y, como este, se une al DNA operador en P_B para reprimir su expresión en la oscuridad (Navarro-Avilés *et al.*, 2007; Pérez-Marín *et al.*, 2008). Pero a diferencia de CarH, CarA no requiere de AdoB₁₂ para oligomerizar y ejercer su actividad represora, a pesar de ser capaz de unirse a la misma a través de su dominio C-terminal (Pérez-Marín *et al.*, 2008). Así, CarA es un dímero en solución tanto en presencia como en ausencia de AdoB₁₂ y, como tal, se une de manera cooperativa a un sitio de alta afinidad y a otro de baja afinidad, bloqueando el acceso de la RNAP a P_B. Dado que CarA no responde directamente a la luz, para que se produzca la desrepresión de P_B se requiere la expresión en la luz del antirrepresor CarS que, al imitar la estructura del operador, compite con el DNA por la unión al dominio N-terminal de CarA y lo desplaza del DNA, contrarrestando así su acción represora (León *et al.*, 2010).

I.2.3 La proteína CarF

Aunque el gen *carF* se identificó hace casi veinte años, durante el escrutinio de mutantes de *M. xanthus* incapaces de sintetizar carotenoides en la luz (fenotipo Car⁻) (Fontes *et al.*, 2003), todavía desconocemos de qué manera participa en la respuesta al estrés luminoso. Por ello, uno de los objetivos de este trabajo ha sido profundizar en el mecanismo de acción de CarF. Como se ha comentado anteriormente, de los elementos proteicos implicados en la respuesta a la luz identificados hasta la fecha, CarF es el que actúa más temprano en la cascada de señalización. Sin embargo, CarF no se asemeja a ningún fotorreceptor de luz azul conocido. Se trata de una proteína de 281 aminoácidos situada en la membrana interna (Figura 10) que, curiosamente, presenta similitud de secuencia con las proteínas eucarióticas de función desconocida denominadas TMEM189 o Kua, pertenecientes a la superfamilia de proteínas Kua-UEV1_localn. Estas proteínas están ampliamente distribuidas en eucariotas superiores, pero escasean en procariotas. Existen homólogos de secuencia de CarF en mixobacterias y otras pocas especies bacterianas (Leptospiraceae y algunas Alphaproteobacteria), en animales invertebrados y vertebrados, incluyendo a humanos; y en plantas, como *Arabidopsis thaliana*, que tiene tres. A nivel de secuencia, CarF muestra un parecido mayor con las proteínas de animales que con las de plantas (Fontes *et al.*, 2003; Galbis-Martínez *et al.*, 2008; Galbis-Martínez *et al.*, 2012; Gallego-García *et al.*, 2019; Thomson *et al.*, 2000). Una característica destacable de las proteínas TMEM189 es la presencia de varios residuos de histidinas conservados. CarF tiene 12 histidinas que se localizan en el citoplasma, en base a su topología de cuatro hélices transmembranales determinada experimentalmente.

Concretamente, ocho de las doce histidinas de CarF están presentes, en las mismas posiciones relativas, en todas las proteínas Kua, y tres de ellas en las proteínas Kua de animales y de algunas bacterias, mientras que la histidina 218 solo se encuentra en CarF de *M. xanthus* (Figura 10). Experimentos realizados hace unos años en el grupo habían demostrado la importancia para la función de CarF de cinco de las histidinas conservadas (Galbis-Martínez *et al.*, 2008). Un trabajo más reciente del grupo ha puesto de manifiesto que también son necesarias otras cuatro de las doce histidinas: las tres histidinas conservadas restantes; y la histidina que ocupa la posición 113, no conservada en los homólogos de plantas y de Alphaproteobacteria, pero sí en los de animales y de Leptospiraceae (Gallego-García *et al.*, 2019). Además, CarF presenta una extensión de unos 40 aminoácidos en la región C-terminal, ausente del resto de proteínas Kua, que parece dispensable para su función (Fontes *et al.*, 2003; Galbis-Martínez *et al.*, 2008). Algunas hidroxilasas y desaturasas de ácidos grasos, aunque presentan una baja similitud con CarF, presentan motivos de histidinas con un patrón similar al de algunas de las histidinas de CarF (Figura 10); en dichas enzimas, se ha descrito que las histidinas participan en la formación de un complejo de di-hierro implicado en las interacciones con el O₂ y su activación para la oxidación del sustrato (Fontes *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2009; Shanklin *et al.*, 1997).

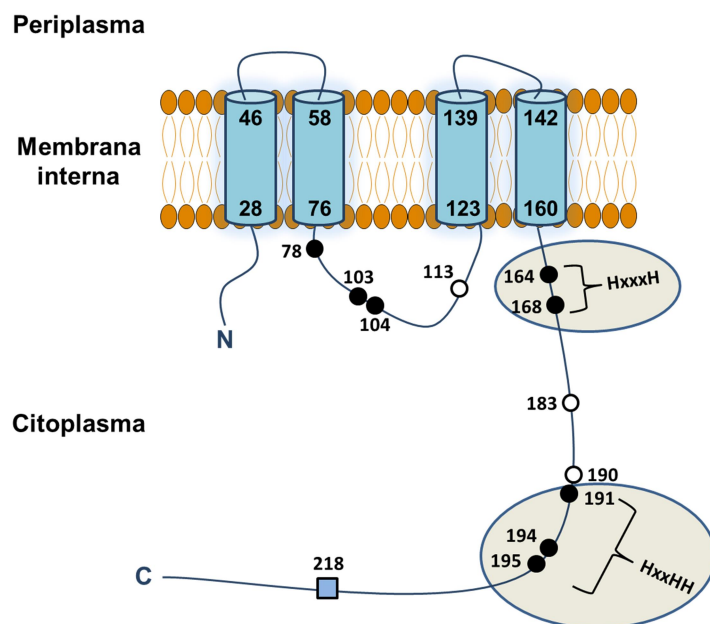


Figura 10. Topología en la membrana de CarF. CarF presenta 4 hélices transmembrales (cilindros azules). Los residuos de histidinas presentes en todos los homólogos de CarF se muestran como círculos negros; los residuos que están conservados en algunos homólogos se muestran como círculos blancos; la histidina 218, representada como un cuadrado azul, solo está presente en CarF. Los círculos indican los motivos de histidinas con un patrón similar al observado en hidroxilasas y desaturasas de ácidos grasos. Modificada de Galbis-Martínez *et al.* (2008).

Como ya se ha comentado anteriormente, la PPIX es el fotosensibilizador endógeno que es sensible a la luz azul, y que media tanto la fotólisis como la carotenogénesis en *M. xanthus*, dos respuestas celulares alternativas que dependen de la fase de crecimiento en la que se encuentre el cultivo iluminado (Burchard & Dworkin, 1966; Burchard & Hendricks, 1969). Como los niveles de PPIX en la membrana interna de las células son mucho más altos en fase estacionaria, es en esta fase cuando la iluminación con luz azul puede desencadenar la fotólisis, probablemente porque los niveles de $^1\text{O}_2$ producidos resultan demasiado dañinos para la supervivencia celular. Por otro lado, la iluminación de las células en fase de crecimiento exponencial, cuando los niveles acumulados de PPIX son más bajos y, por tanto, también lo son los niveles generados de $^1\text{O}_2$, dispara la respuesta fotoprotectora en la que participa CarF y los restantes elementos descritos. CarF, cuya expresión es constitutiva y no depende de la luz, de alguna forma promueve la inactivación de CarR en la luz. La interacción física de CarF con CarR observada en un sistema heterólogo, como es el doble híbrido bacteriano, llevó a proponer que CarF actúa como el factor anti-anti- σ de CarR (Fontes *et al.*, 2003; Galbis-Martínez *et al.*, 2008; Galbis-Martínez *et al.*, 2012), quizás detectando de alguna manera la presencia de niveles alarmantes de $^1\text{O}_2$.

I.3 Los factores σ -ECF/anti- σ

En bacterias, la polimerasa de RNA está constituida por un núcleo enzimático de cinco subunidades ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) y un factor σ dissociable (Alhadid *et al.*, 2017). Los factores σ se unen al núcleo enzimático de la RNAP y generan una holoenzima activa, que reconoce un promotor específico a partir del cual se produce el inicio de la transcripción (Ebright, 2000). Todas las bacterias tienen un factor σ primario, que es el responsable de la expresión basal de la mayoría de los genes durante la fase de crecimiento vegetativo (Gruber & Gross, 2003). Además, la mayoría de los genomas bacterianos, especialmente en especies con estilos de vida complejos, tienen factores σ alternativos que, en presencia del estímulo adecuado, desplazan al factor σ primario y dirigen a la RNAP hacia promotores alternativos para su activación (Helmann & Chamberlin, 1988). Los factores σ se clasifican en dos grandes familias, σ^{54} y σ^{70} , perteneciendo la mayoría a la familia σ^{70} , que incluye a los factores σ primarios y alternativos. Esta familia a su vez se divide en cuatro grupos en base a su secuencia y arquitectura de dominios proteicos (Starón *et al.*, 2009). Además, el alineamiento de la secuencia de los factores de la familia σ^{70} ha permitido establecer cuatro regiones conservadas denominadas σ_1 , σ_2 , σ_3 y σ_4 (Davis *et al.*, 2017).

Dentro de la familia de proteínas σ^{70} , el grupo más grande y diverso es el grupo 4 o de los factores σ -ECF, cuyos miembros responden a señales del medio extracitoplásmico, tales como estrés periplásmico, choque térmico, transporte de hierro, secreción de proteínas u oxígeno singlete. Después de los sistemas de uno y dos componentes, los factores σ -ECF representan el tercer mecanismo fundamental de transducción de señales en bacterias (Pinto *et al.*, 2019; Staroń *et al.*, 2009). Los factores σ -ECF solo tienen dos de las cuatro posibles regiones conservadas, σ_2 y σ_4 , que son suficientes para la interacción con la RNAP y el reconocimiento del promotor. Gran parte de los factores σ -ECF están regulados negativamente por factores anti- σ , que impiden su unión a la RNAP. Los factores anti- σ suelen ser proteínas de membrana que presentan al menos dos dominios, uno de unión al factor σ y otro de señalización o sensor que reconoce un estímulo específico generado fuera o dentro de la célula. Además, los genes que los determinan suelen estar ubicados en un operón junto con el gen de su correspondiente factor σ (Huang *et al.*, 2015; Mascher, 2013; Pinto *et al.*, 2019; Staroń *et al.*, 2009). Algunos grupos de factores anti- σ presentan un motivo de unión a zinc conservado denominado ZAS (*zinc binding anti-sigma*) en su extremo N-terminal, cuya señal de identidad es la secuencia consenso HisX₃CysX₂Cys (Campbell *et al.*, 2007).

En general, en ausencia del estímulo, el factor anti- σ se une fuertemente al factor σ , manteniéndolo en estado inactivo e impidiendo su unión a la RNAP. Tras recibir la señal adecuada, el factor anti- σ se inactiva y libera al factor σ , que se une al núcleo enzimático de la RNAP para iniciar la transcripción de su propio operón, así como la de genes de respuesta al estímulo (Figura 11). La mayoría de los factores σ están sujetos a autorregulación positiva, manteniendo su activación siempre que prevalezcan las condiciones inductoras. Una vez el estímulo cesa, el factor anti- σ vuelve a inactivar al factor σ (Davis *et al.*, 2017; Mascher, 2013; Pinto & Mascher, 2019; Staroń *et al.*, 2009).

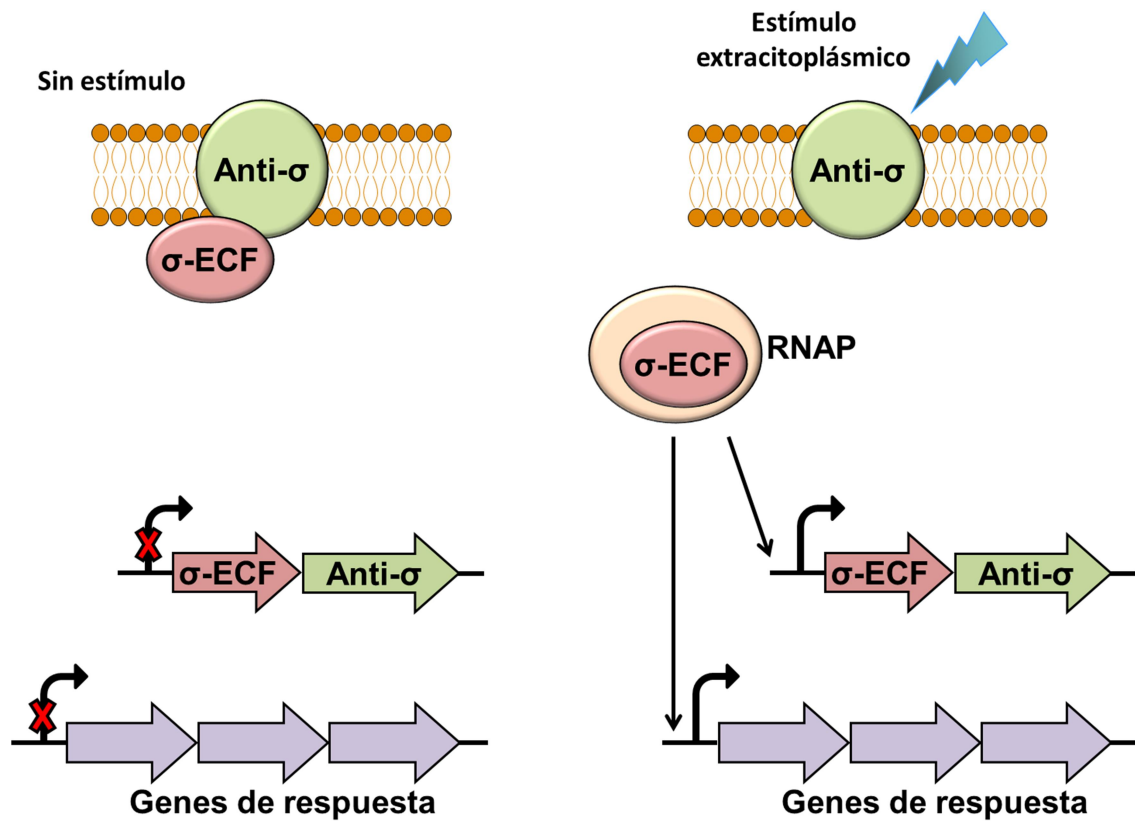


Figura 11. Mecanismo de acción general de las parejas de factores σ -ECF/anti- σ . En ausencia del estímulo, el factor anti- σ secuestra al factor σ -ECF en la membrana. Cuando se produce la señal adecuada, el factor anti- σ es inactivado mediante diferentes mecanismos, liberando al factor σ -ECF, que se une a la RNAP y activa su propia expresión, la del factor anti- σ y la de genes de respuesta al estímulo.

I.3.1 Factores σ -ECF/anti- σ en *M. xanthus*

El análisis del genoma de *M. xanthus* predice hasta 45 factores σ -ECF y 27 proteínas con un dominio ZAS típico de los factores anti- σ . Además, algunos de estos factores σ -ECF presentan asociadas una serie de proteínas quinasas de serina/treonina que podrían regular su función (Abellón-Ruiz *et al.*, 2014; Goldman *et al.*, 2006). Sin embargo, más allá de DdvS y CarQ (y sus factores anti- σ DdvA y CarR, respectivamente), que son objeto de estudio por el grupo en el que se ha realizado este trabajo, y de CorE y CorE2, son muy pocos los factores σ -ECF de *M. xanthus* cuya función se ha investigado.

I.3.1.1 La pareja de factores σ -ECF/anti- σ DdvS/DdvA

Recientemente, se ha descubierto que la pareja DdvS/DdvA participa en el control multifactorial de la expresión de un sistema CRISPR-Cas de *M. xanthus* (Bernal-Bernal *et al.*, 2018). Al igual que CarQ y varios otros factores σ -ECF de *M. xanthus*, DdvS (181 aminoácidos) depende del complejo CarD-CarG para su actividad (Abellón-Ruiz *et al.*, 2014). El factor anti- σ DdvA (991 aminoácidos) está formado por un dominio ZAS N-terminal a través del cual interacciona con DdvS, una hélice transmembranal y un largo dominio extracitoplásmico (unos 900 aminoácidos), que debe estar implicado en la percepción de la señal que desencadena su inactivación y posterior liberación de DdvS (Abellón-Ruiz *et al.*, 2014) (Figura 12A). Dicha señal se desconoce, pero el hecho de que esta pareja de factores σ -ECF/anti- σ regule un sistema CRISPR-Cas sugiere que podría tratarse de fagos o DNA exógeno (Bernal-Bernal *et al.*, 2018).

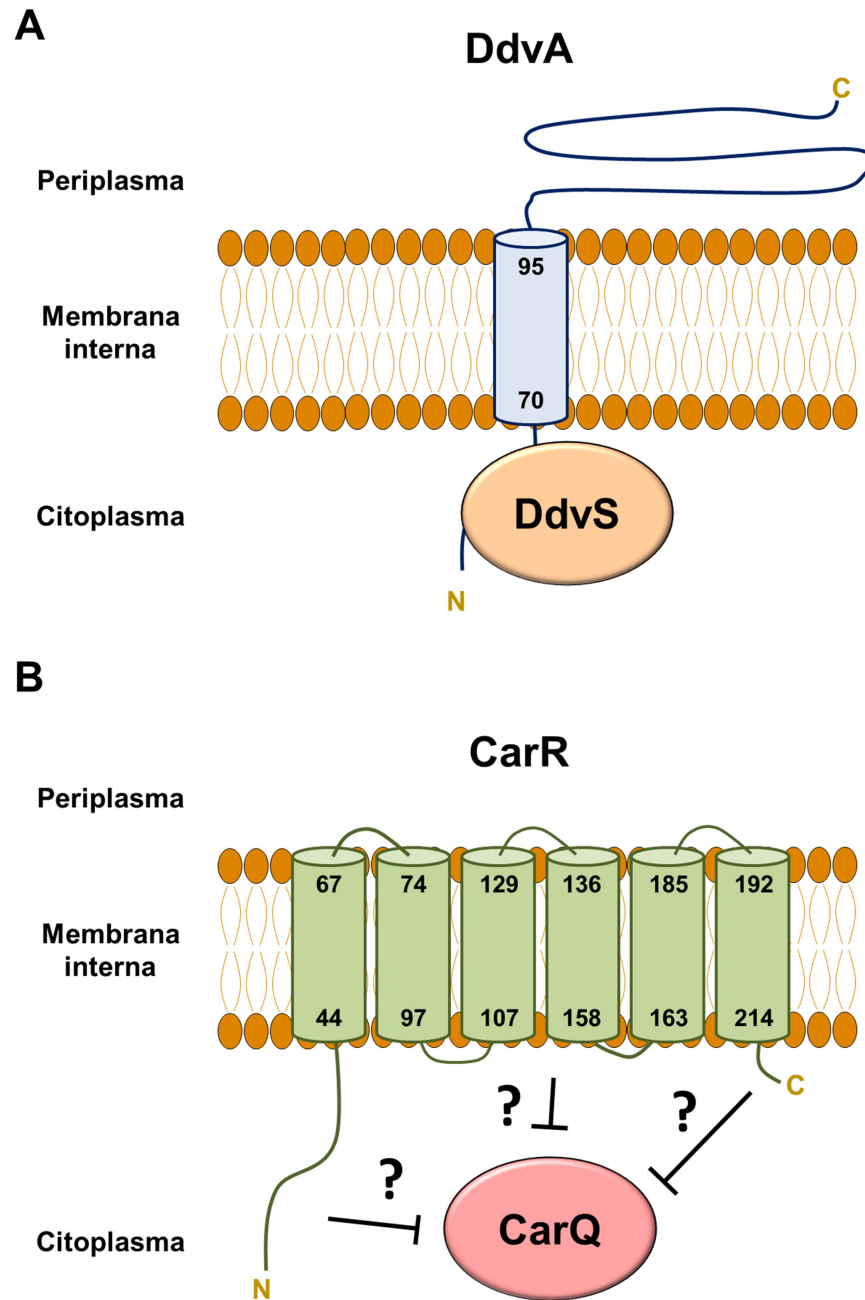


Figura 12. Factores σ -ECF/anti- σ de *M. xanthus*. **A)** La pareja de factores σ -ECF/anti- σ DdvS/DdvA. Se representa la topología de DdvA en la membrana. DdvA posee una región N-terminal con un dominio ZAS a través del cual interacciona con DdvS, inactivándolo en ausencia del estímulo. Se ancla en la membrana a través de una única hélice transmembranal (cilindro azul) que coloca un largo dominio C-terminal en la parte extracitoplásmica. **B)** La pareja de factores σ -ECF/anti- σ CarQ/CarR. Se representa la topología de CarR en la membrana, más inusual que la de DdvA. CarR posee seis hélices transmembranales (cilindros verdes), y los extremos N-terminal y C-terminal orientados hacia la región citosólica. CarR carece de un dominio ZAS y se desconocen las regiones a través de las cuales interacciona con CarQ, inactivándolo en la oscuridad.

I.3.1.2 La pareja de factores σ -ECF/anti- σ CarQ/CarR

Uno de los primeros factores σ -ECF conocidos fue CarQ (Gorham *et al.*, 1996; Lonetto *et al.*, 1994). Las mutaciones de falta de función en *carQ* producen un fenotipo Car⁻, debido a que impiden la activación de los promotores fotoinducibles (P_{QRS} , P_{crtIb} y P_B), lo que permitió concluir que la proteína CarQ actúa como un regulador positivo del sistema (Fontes *et al.*, 1993; Martínez-Laborda & Murillo, 1989). CarQ, de 174 aminoácidos, tiene mostrada actividad sigma *in vitro* (Browning *et al.*, 2003). El gen *carQ*, junto con *carR* y *carS*, constituyen un operón de tres genes acoplados traducionalmente cuya expresión está regulada de manera fotoinducible por el propio CarQ y su pareja anti- σ CarR. Acorde con el papel de CarR como regulador negativo, los mutantes en el gen correspondiente producen la expresión constitutiva del gen *crtIb*, y de los operones *carQRS* y *carB-carA*, generando carotenoides tanto en condiciones de oscuridad como de luz (fenotipo Car^C, producción de carotenoides de manera constitutiva) (Balsalobre *et al.*, 1987; Fontes *et al.*, 1993; Hodgson & Murillo, 1993; Martínez-Laborda *et al.*, 1986). CarR, de 221 aminoácidos, se localiza en la membrana interna (Browning *et al.*, 2003), y presenta una topología con seis hélices transmembranales, quedando los extremos amino y carboxilo en el citoplasma, aunque ninguno de los dos extremos por sí solos son suficientes para interaccionar con CarQ (Bernal-Bernal, 2018) (Figura 12B). En los ensayos mediante el sistema del doble híbrido bacteriano, CarR muestra interacción física consigo misma, con CarF y con CarQ (Galbis-Martínez *et al.*, 2008). La estequiometría de CarQ y CarR es crítica para la regulación de la expresión de *carQRS*, lo que apoya que CarQ y CarR formen un complejo en la membrana en condiciones de oscuridad (Browning *et al.*, 2003; Gorham *et al.*, 1996; Martínez-Laborda & Murillo, 1989).

CarR es un factor anti- σ atípico que, a diferencia de DdvA, presenta seis hélices transmembranales, en vez de una, carece del motivo ZAS presente en muchos factores anti- σ (Galbis-Martínez *et al.*, 2012) y no parece utilizar, al menos exclusivamente, la región N-terminal para interaccionar con CarQ. Algunos experimentos han llegado a sugerir que CarR, como algunos factores anti- σ estudiados, podría inactivarse por un proceso de proteólisis. Por ello, se ha propuesto un modelo de acción para la pareja de factores σ -ECF/anti- σ CarQ/CarR según el cual, en la oscuridad, CarR mantendría secuestrado a CarQ en la membrana, de forma que no podría activar a sus promotores diana. En la luz, la generación de ¹O₂, detectado de alguna forma por CarF, podría conducir a la degradación de CarR, liberando así a CarQ, que se uniría a la RNAP y activaría la transcripción de los genes de la carotenogénesis (Browning *et al.*, 2003; Gorham *et al.*, 1996). No obstante, la

inactivación de CarR mediante un proceso de proteólisis no está firmemente demostrada, por lo que cabe otro posible modo de inactivación para CarR, que podría ser novedoso o corresponderse con alguno de los observados para otros factores anti- σ .

I.3.1.3 Factores σ -ECF sin anti- σ : CorE y CorE2

Entre los factores σ -ECF de *M. xanthus* estudiados se encuentran también CorE y CorE2, que se caracterizan por carecer de un factor anti- σ y por presentar, en su lugar, una extensión C-terminal reguladora de pequeño tamaño con un dominio rico en cisteínas (CRD). Tanto CorE como CorE2 juegan un papel importante en la detección de metales pesados. CorE está implicado en la homeostasis del cobre, y su actividad está regulada por el estado redox de dicho metal y por su interacción con el CRD: cuando el cobre está como Cu(I), CorE se encuentra inactivo, pero cuando está como Cu(II), CorE se activa y se une al DNA. Por otro lado, CorE2 media la resistencia al cadmio y al zinc, y la especificidad del ión metálico también está determinada por el CRD de la extensión C-terminal (Gómez-Santos *et al.*, 2011; Marcos-Torres *et al.*, 2016; Pinto *et al.*, 2019).

I.3.2 Mecanismos de regulación de los factores σ -ECF

Muchas veces los cambios en el entorno tienen lugar de forma brusca, por lo que se requiere una respuesta rápida para sobrevivir. Por ello, los factores σ -ECF suelen estar sometidos a una regulación a nivel postraduccional, aunque también pueden estarlo a nivel transcripcional. A continuación, se describen ocho modos diferentes de regulación de los factores σ -ECF.

A. Proteólisis regulada de factores anti- σ anclados a la membrana

Este mecanismo se ha estudiado en detalle para dos parejas de factores σ -ECF/anti- σ , σ^E /RseA de *E. coli* y σ^W /RsiW de *Bacillus subtilis*, que responden a estímulos relacionados con estrés en la envoltura celular (Mascher, 2013). En ambos casos, el factor anti- σ es degradado completamente en respuesta al estímulo por la acción secuencial de dos proteasas transmembranales, seguidas de proteasas citoplásmicas. Tras el estímulo inicial, la primera proteasa rompe el dominio periplásmico del factor anti- σ . La liberación del dominio periplásmico elimina interacciones inhibitorias permitiendo que la segunda proteasa corte al factor anti- σ en la región transmembranal, liberando el dominio amino terminal unido al factor σ al citoplasma. El fragmento que queda del factor anti- σ es degradado por proteasas citoplásmicas, principalmente ClpXP, dejando libre al factor σ que ya puede unirse a la

RNAP e iniciar la transcripción (Ho & Ellermeier, 2012; Sineva *et al.*, 2017) (Figura 13A).

B. Cambios conformacionales de los factores anti- σ

Algunos factores σ -ECF están regulados por factores anti- σ citoplásmicos cuya inactivación se basa en un cambio conformacional, como ocurre en las parejas σ^R /RsrA de *Streptomyces coelicolor* y σ^E /ChrR de *R. sphaeroides* (Figura 13B). En *S. coelicolor*, el factor anti- σ RsrA en estado reducido une un átomo de zinc a través de su motivo ZAS e inhibe la actividad transcripcional de σ^R . Cuando se produce un estrés redox, la formación de enlaces disulfuro intramoleculares en RsrA da lugar a la expulsión del átomo de zinc, resultando en un cambio conformacional que conlleva la liberación de σ^R y posterior activación de un regulón de al menos 30 genes, entre los que se incluyen una tiorredoxina y una tiorredoxina reductasa. Cuando RsrA en estado oxidado es reducido por tiorredoxina, se asocia de nuevo a σ^R (Heo *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2014; Zdanowski *et al.*, 2006). En *R. sphaeroides*, la inactivación del factor anti- σ no se produce por la formación de puentes disulfuro. En este caso, ChrR, a través de su dominio N-terminal ZAS, une zinc e inhibe la transcripción dependiente de σ^E (RpoE), mientras que el dominio C-terminal *cupin-like* une otro átomo de zinc y es necesario para que ChrR libere a σ^E en respuesta al 1O_2 , sufriendo un cambio conformacional. Se ha observado que los aminoácidos conservados que coordinan el átomo de zinc en el dominio *cupin-like* son necesarios para responder al 1O_2 , pero la liberación de zinc no es necesaria. ChrR también podría inactivarse a través de proteólisis regulada (Campbell *et al.*, 2007; Greenwell *et al.*, 2011; Mascher, 2013; Sineva *et al.*, 2017).

Los factores anti- σ de membrana también pueden regularse a través de cambios conformacionales. Por ejemplo, en *Bradyrhizobium japonicum*, redefinido desde 2013 como *Bradyrhizobium diazoefficiens* (Delamuta *et al.*, 2013), el factor anti- σ OsrA que, como CarR, presenta seis hélices transmembranales, tiene dos residuos de cisteína muy conservados que son necesarios para la activación génica dependiente de σ^{EcFF} en respuesta a ROS. Es posible, por tanto, que un cambio conformacional asociado a la formación de puentes disulfuro sea lo que desencadena la liberación de este σ -ECF (Mascher, 2013; Masloboeva *et al.*, 2012).

En *Mycobacterium tuberculosis* se ha descrito otro modo de regulación, en el cual el factor σ -ECF σ^C , que carece de un factor anti- σ , se activa o inactiva a través de cambios conformacionales (Thakur *et al.*, 2007).

C. Cascada de interacciones proteína-proteína

En este grupo se encuentran las parejas de factores FecI/FecR que suelen estar implicadas en la regulación de la captación de hierro (Figura 13C). En *E. coli*, la ausencia de citrato férrico conlleva que FecI sea inactivado por su factor anti- σ FecR, localizado en la membrana interna. La cascada de interacciones proteína-proteína se inicia cuando se produce la unión de citrato férrico a la proteína de la membrana externa FecA, que transmite la señal a FecR. Posteriormente, FecR induce la activación de FecI, que se une a la RNAP para promover la expresión de los genes del operón *fec*, que están relacionados con la captación de hierro (Braun & Mahren, 2005; Brooks & Buchanan, 2008; Starón *et al.*, 2009).

D. Intercambio de pareja por imitación del factor σ

En Alphaproteobacteria como *Methylobacterium extorquens* y *C. crescentus*, existe un mecanismo para controlar la respuesta general al estrés que relaciona un sistema de dos componentes con una pareja σ -ECF/anti- σ (Figura 13D). *M. extorquens* presenta un regulador, PhyR, que combina dominios de ambos sistemas. En la región N-terminal tiene un dominio de tipo σ -ECF (*ECF-like*), mientras que en la región C-terminal presenta un dominio receptor de un regulador de la respuesta. Cuando las células no están sometidas a estrés, PhyR está inactivo, y el factor σ -ECF σ^G está secuestrado por su factor anti- σ , NepR. Cuando se produce un estrés, las señales pueden ser percibidas por una o varias quinasas, que se autofosforilan. El grupo fosfato es transferido a PhyR, activándose e interaccionando con NepR a través de su dominio *ECF-like*. De esta forma, σ^G es liberado y se asocia con la RNAP, promoviendo la transcripción de genes de respuesta a estrés (Francez-Charlot *et al.*, 2009; Francez-Charlot *et al.*, 2015; Paget, 2015).

E. Regulación a través del dominio C-terminal del factor σ

Algunos grupos de factores σ -ECF que carecen de un factor anti- σ están regulados por extensiones reguladoras en su extremo N- o C-terminal, siendo este último el más común (Figura 13E). Por ejemplo, el factor σ^J de *M. tuberculosis* presenta una extensión en el extremo C-terminal que contiene un dominio conservado SnoL_2. Esta prolongación tiene un papel doble en la regulación de la actividad. Por un lado, podría funcionar como un factor anti- σ , impidiendo la interacción entre el factor σ y la RNAP en ausencia del estímulo. Por otro lado, una parte de la extensión es necesaria para la actividad del factor σ (Goutam *et al.*, 2017; Pinto *et al.*, 2019;

Wecke *et al.*, 2012). Dentro de este grupo también se encuentran los factores σ -ECF CorE y CorE2 de *M. xanthus*, comentados previamente.

F. Activación transcripcional de la expresión de un factor σ por un sistema de dos componentes

Es un mecanismo poco común en el que el factor σ -ECF tampoco depende de un factor anti- σ (Figura 13F). En *S. coelicolor*, la expresión de σ^E se induce por el sistema de dos componentes CseB/CseC en respuesta al estrés de la envoltura celular (Hong *et al.*, 2002; Paget *et al.*, 1999).

G. Regulación por quinasas de serina/treonina

Otros grupos de ECFs, que también carecen de factor anti- σ , presentan genes cercanos que codifican quinasas de serina/treonina. Esta observación sugiere un mecanismo de señalización en el que estas quinasas podrían funcionar como sensores que fosforilan y activan al factor σ -ECF (Jogler *et al.*, 2012) (Figura 13G). En el patógeno de plantas *Xanthomonas citri*, σ^{EcfK} es activado por un mecanismo que implica a una quinasa de serina/treonina durante la interacción con la ameba del suelo *Dictyostelium discoideum*, que representa una fuerte presión selectiva para estas bacterias. La activación de σ^{EcfK} conlleva la activación de genes que favorecen la resistencia de *X. citri* frente a *D. discoideum* (Bayer-Santos *et al.*, 2018).

H. Degradación del factor σ -ECF

En este caso, el factor anti- σ no contrarresta la actividad del factor σ , sino que lo estabiliza en ausencia del estímulo (Figura 13H). En *S. coelicolor*, σ^T es completamente dependiente de su factor anti- σ RstA. En ausencia de las condiciones inductoras, σ^T /RstA forman un complejo que afecta negativamente a la diferenciación celular y a la producción de metabolitos secundarios y proteasas. La presencia del estímulo adecuado da lugar a la degradación de RstA. Como consecuencia, se producen metabolitos secundarios, que a su vez favorecen la producción de proteasas, resultando en una rápida degradación del factor σ (Mao *et al.*, 2013).

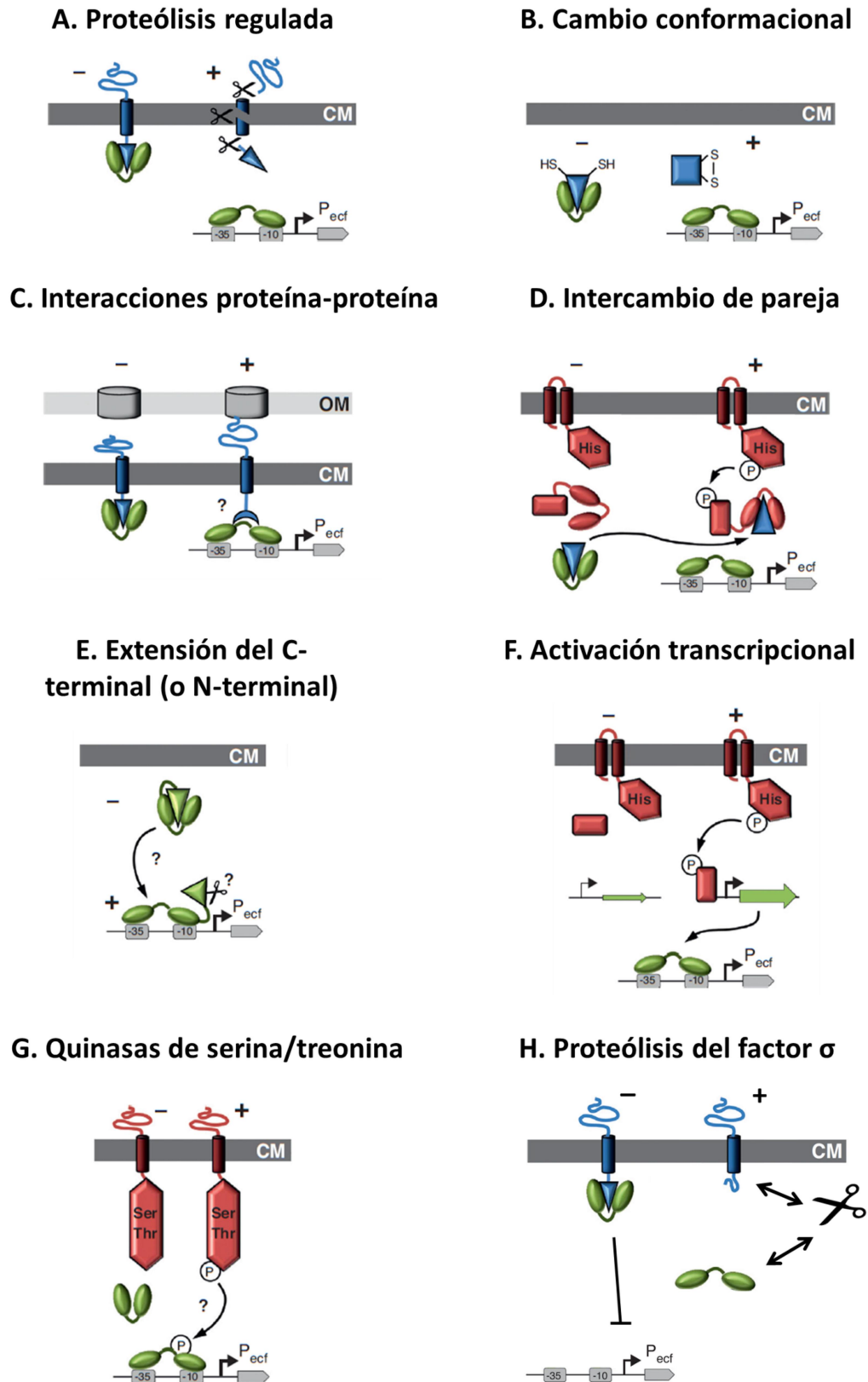


Figura 13. Diferentes modos de regulación de los factores σ -ECF. Los factores σ -ECF están coloreados en verde, los anti- σ en azul, las proteínas reguladoras implicadas en procesos de señalización dependiente de fosforilación se muestran en rojo. “-” o “+” indica ausencia o presencia de las condiciones inductoras, respectivamente. OM indica membrana externa y CM membrana citoplasmática. Modificada de Mascher (2013).

I.4 Microdominios funcionales de membrana

Como se ha comentado anteriormente, la vía principal de recepción y transducción de la luz en *M. xanthus* tiene lugar a través de las proteínas CarF, CarR y CarQ. Dado que CarF interacciona con CarR y CarR con CarQ (Galbis-Martínez *et al.*, 2008), las tres proteínas podrían constituir un complejo multiproteico de señalización en la membrana que podría estar asociado a los denominados microdominios funcionales de membrana (FMMs), análogos a las balsas lipídicas de eucariotas.

I.4.1 Características generales de las balsas lipídicas y los FMMs

Descubrimientos recientes han demostrado que los componentes de las membranas biológicas no se encuentran homogéneamente distribuidos por toda la membrana plasmática, sino que tienden a segregar lateralmente en regiones discretas (Lingwood & Simons, 2010; Simons & Sampaio, 2011), generando una organización de lípidos y proteínas en microdominios de membrana (Owen *et al.*, 2010; Spira *et al.*, 2012).

En eucariotas, se ha descrito que las balsas lipídicas, o microdominios enriquecidos en lípidos como colesterol y esfingolípidos, concentran proteínas relacionadas con la transducción de señales y el tráfico membranal (Bramkamp & López, 2015; Simons & Ikonen, 1997). Las balsas lipídicas también están enriquecidas en plasmalógenos (Pike *et al.*, 2002; Rodemer *et al.*, 2003), un tipo particular de fosfolípidos caracterizado por la presencia de un enlace vinil éter que, debido a sus propiedades físico-químicas, afecta a la fluidez, señalización y función de la membrana (Braverman & Moser, 2012; Dean & Lodhi, 2018). Asociadas también a las balsas lipídicas hay una clase de proteínas denominadas flotilinas. Estas proteínas funcionan a modo de chaperonas reclutando a otras proteínas que necesitan estar en las balsas lipídicas para ser activas, facilitando así su interacción y oligomerización (Browman *et al.*, 2007; Lang *et al.*, 1998). La perturbación de la actividad de las flotilinas causa problemas en la transducción de señales y el tráfico membranal, que parece estar relacionado con enfermedades como el Alzheimer y el Parkinson (Michel & Bakovic, 2007).

I.4.2 Balsas lipídicas y FMMs en bacterias

La existencia de las balsas lipídicas suele asociarse exclusivamente a células eucarióticas porque su ensamblaje depende de la presencia de colesterol, que está ausente en las membranas de la mayoría de las bacterias y arqueas. Por ello, la presencia de las balsas lipídicas se ha considerado como un paso fundamental durante la evolución de la complejidad celular (Bramkamp & López, 2015; López & Koch, 2017). Sin embargo, recientemente se ha descubierto que las bacterias también son capaces de compartimentar ciertos procesos celulares en los FMMs (López & Kolter, 2010). En estos FMMs, como en las balsas lipídicas, se concentran proteínas asociadas con la transducción de señales, el tráfico membranal y la regulación del metabolismo, incrementándose así la probabilidad de interacción y la eficiencia de dichos procesos celulares (Bach & Bramkamp, 2013; López & Kolter, 2010; Mielichsüss *et al.*, 2013). El ensamblaje de los FMMs conlleva la biosíntesis de lípidos poliisoprenoides en la membrana y su colocación con proteínas similares a las flotilinas de eucariotas (Tavernarakis *et al.*, 1999). Las flotilinas bacterianas reclutan proteínas que requieren estar en los FMMs para ser activas y facilitan su interacción y oligomerización (Good *et al.*, 2011; Langhorst *et al.*, 2005). Es posible que la existencia de los FMMs sea universal en bacterias, ya que casi todas las especies bacterianas tienen al menos un gen que determina una proteína similar a flotilinas en su genoma (Bramkamp & López, 2015).

Los FMMs bacterianos se descubrieron de forma inesperada, investigando la formación de *biofilms* en *B. subtilis*, cuando se observó que la quinasa sensora KinC, una proteína membranal responsable de la formación de *biofilms* (LeDeaux *et al.*, 1995; López *et al.*, 2009), pierde su funcionalidad al inhibir la síntesis de unos lípidos poliisoprenoides asociados a la membrana (López & Kolter, 2010). Esto también afecta a la actividad de otras proteínas asociadas a la membrana (López & Kolter, 2010), sosteniendo la hipótesis de que las bacterias pueden compartimentar las quinasas sensoras de membrana en FMMs, cuya composición lipídica es diferente al resto de la membrana (Bramkamp & López, 2015). Con esta idea, se pudo obtener una fracción de membrana enriquecida en FMMs basándose en que estas regiones membranales son más resistentes a la desagregación por detergentes no iónicos. Su composición lipídica las hace más compactas e hidrofóbicas que el resto de la membrana, de forma que tras solubilizarlas dan lugar a fragmentos de membrana más grandes (Brown, 2002; Shah & Sehgal, 2007). En *B. subtilis*, la fracción de membrana resistente a los detergentes, denominada DRM (*detergent-resistant membrane fraction*), contiene a KinC, a proteínas relacionadas con la señalización celular y la secreción de proteínas,

y dos proteínas similares a las flotilinas (FloA y FloT). Se ha observado, por microscopía de fluorescencia, que KinC, FloA y FloT colocalizan en regiones de membrana discretas (Donovan & Bramkamp, 2009; López & Kolter, 2010), y esa colocalización desaparece al inhibir la producción de lípidos poliisoprenoides (López & Kolter, 2010). La ausencia de FloA y FloT afecta negativamente a la actividad de KinC, lo que apunta a la importancia de las flotilinas en el correcto funcionamiento de las proteínas asociadas a los FMMs, al igual que sucede en las balsas lipídicas de eucariotas (López & Kolter, 2010).

I.4.3 Componentes de los FMMs en bacterias

La organización de los FMMs se asemeja a las balsas lipídicas de eucariotas, aunque su papel biológico podría ser diferente (Bramkamp & López, 2015; López, 2015). Dos de los tres componentes principales de los FMMs, los lípidos y las flotilinas, tienen un papel estructural y confieren consistencia y estabilidad a los FMMs. El tercer componente, que se correspondería con las proteínas reclutadas (la “carga proteica”), tiene un papel funcional y determina la importancia biológica de los FMMs, ya que su composición proteica varía en función del estado fisiológico de las células (Bramkamp & López, 2015; López, 2015) (Figura 14).

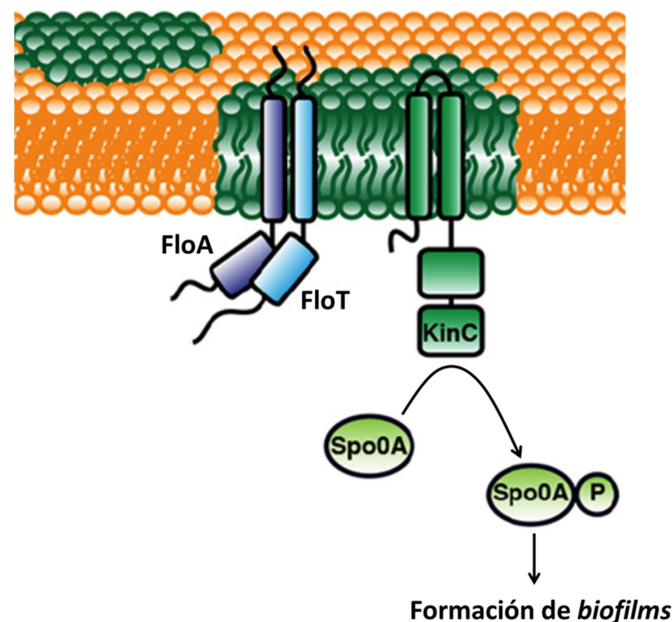


Figura 14. Modelo de organización de un FMM en *B. subtilis*. Se muestran los componentes estructurales (los lípidos del FMM en verde, y las flotilinas FloA y FloT en morado y azul, respectivamente) y la carga proteica (KinC) de un FMM de *B. subtilis* implicado en la formación de *biofilms*. La histidina quinasa KinC fosforila al regulador Spo0A, que desencadenará la activación de genes relacionados con la formación de *biofilms*. En naranja se representa el resto de los lípidos de la membrana, no pertenecientes a un FMM. Modificada de Bramkamp & López (2015).

Lípidos

Numerosos ensayos genéticos y moleculares sugieren que los lípidos que componen los FMMs son poliisoprenoides similares al colesterol (López & Kolter, 2010), como es el caso de los hopanoides (Figura 15A). Estos poliisoprenoides cíclicos son importantes para la integridad de la membrana, la adaptación a condiciones de estrés, la transducción de señales y la división celular (López & Koch, 2017). Otros lípidos que podrían formar parte de los FMMs son los carotenoides (López & Kolter, 2010) (Figura 15B) que, aunque son poliisoprenoides lineales, presentan propiedades físico-químicas similares a los hopanoides (Bramkamp & López, 2015). Los hopanoides y los carotenoides tienen una estructura molecular más hidrofóbica que los fosfolípidos anfipáticos. La región hidrofóbica de los fosfolípidos contiene dos cadenas de ácidos grasos largas y flexibles, mientras que los hopanoides tienen una región hidrofóbica plana y rígida de varios anillos aromáticos que podría ayudar a estabilizar los FMMs bacterianos (Bramkamp & López, 2015; Sohlenkamp & Geiger, 2016). Otro posible lípido constituyente de los FMMs es la cardiolipina (Figura 15C), que es un difosfatidilglicerol localizado en las membranas bacterianas y en las de mitocondrias y cloroplastos (López, 2015).

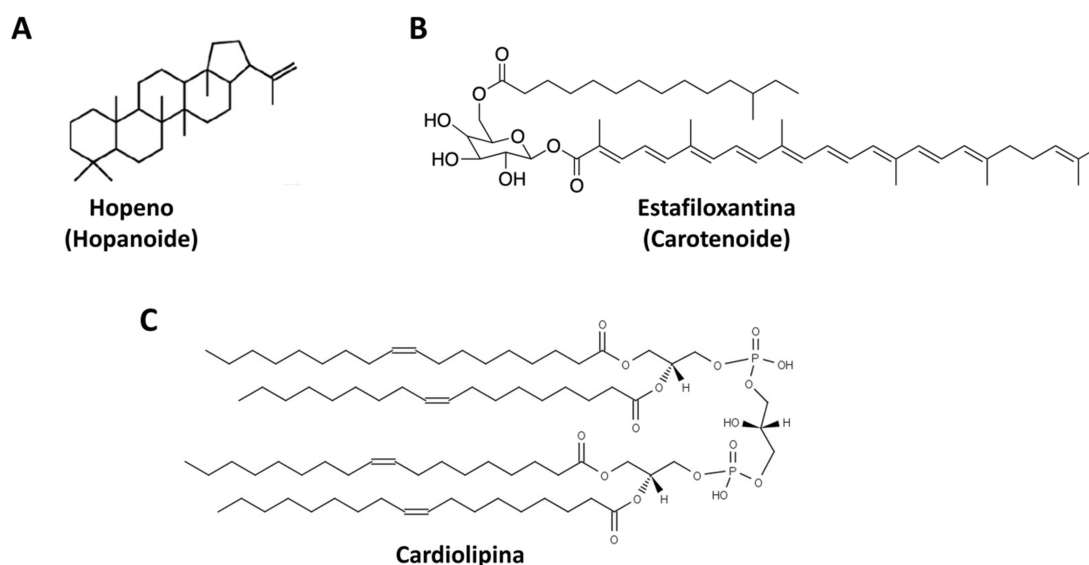


Figura 15. Estructura molecular de los lípidos constituyentes de los FMMs. A) Hopanoide. Tomada de López (2015). **B)** Carotenoide. Tomada de Beavers & Skaar (2016). **C)** Cardiolipina. Tomada de Hsu *et al.* (2013).

Flotilinas

Las balsas lipídicas de eucariotas presentan dos miembros homólogos de las flotilinas, denominados FLO-1 y FLO-2 (Schulte *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2011), que se unen a la membrana por sus regiones N-terminales a través de miristoilo y palmitoilo, respectivamente (Neumann-Giesen *et al.*, 2004). Las flotilinas pertenecen a la familia de proteínas conocida como SPFH (*stomatin, prohibitin, flotillin, and HflK/C*). Todos los miembros de esta familia presentan el dominio prohibitina (PHB), que es necesario para la actividad de la flotilina, aunque se desconoce su función (Rivera-Milla *et al.*, 2006; Tavernarakis *et al.*, 1999). La región C-terminal es una hélice superenrollada (*coil-coiled*) que presenta varias repeticiones de ácido glutámico (E) y alanina (A), que tienen un papel importante en el proceso de oligomerización (López, 2015).

Las flotilinas bacterianas también pertenecen a la familia de proteínas SPFH y presentan un dominio PHB. A diferencia de las flotilinas de eucariotas, las de procariotas se asocian a la membrana a través de regiones transmembranales o de una horquilla (*hairpin loop*) insertada en la bicapa lipídica. La región C-terminal de las flotilinas bacterianas también contiene repeticiones EA dentro de una hélice superenrollada. Además, esta región parece ser importante para la formación de homo- y hetero- oligómeros, como se ha observado en *B. subtilis* (Schneider *et al.*, 2015). Normalmente, el gen que determina la flotilina es el segundo gen de un operón de tres genes, en el cual el primero determina un homólogo de la proteasa NfeD, que interacciona físicamente con la flotilina en bacterias y arqueas. El tercer gen del operón no muestra homología y está ausente en los operones de algunas especies bacterianas (Green *et al.*, 2009; López & Koch, 2017).

La formación de FMMs se ha estudiado sobre todo en bacterias Gram positivas. *B. subtilis* es actualmente el modelo más consolidado para el estudio de las flotilinas bacterianas. Como se ha comentado, *B. subtilis* produce dos proteínas diferentes de tipo flotilinas, que se han denominado FloA y FloT (López & Kolter, 2010). Ambas flotilinas comparten una estructura molecular similar, con una posible región transmembrana adyacente al dominio PHB (Figura 16), y se distribuyen en la membrana formando parches proteicos, aunque FloT (que es más grande que FloA) constituye parches con un contenido de proteínas mayor (Schneider *et al.*, 2015).

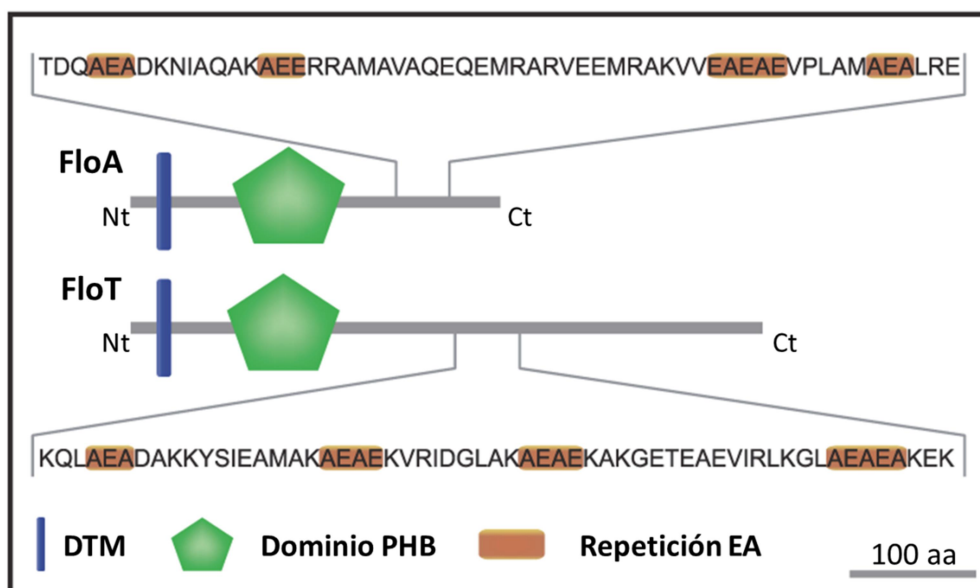


Figura 16. Estructura de las flotilinas FloA y FloT de *B. subtilis*. La región transmembranal está representada en azul (DTM). El dominio PHB (prohibitina) está representado en verde. Se muestra una ampliación de la hélice superenrollada y las repeticiones EA, que están coloreadas en naranja. aa, aminoácidos. Tomada de Schneider *et al.* (2015).

Otra bacteria Gram positiva que presenta un gen que determina una flotilina es *Staphylococcus aureus*. Se ha demostrado que esta flotilina favorece el ensamblaje del degradosoma, un complejo proteico que activa la expresión de genes de virulencia en *S. aureus*. Se han identificado varios compuestos que alteran la oligomerización de la flotilina, afectando a la actividad del degradosoma y reduciendo la virulencia de *S. aureus*. Por lo tanto, las flotilinas podrían ser una diana interesante para desarrollar nuevas terapias antimicrobianas contra bacterias multirresistentes (Koch *et al.*, 2017).

La formación de los FMMs apenas se ha estudiado en bacterias Gram negativas. Aun así, diversos estudios empiezan a demostrar que los FMMs también están presentes en estas bacterias. Por ejemplo, la proteobacteria *Campylobacter jejuni* presenta una flotilina que forma parte del sistema flagelar (Gao *et al.*, 2014). Por otro lado, en la cianobacteria *Synechocystis* sp., la flotilina tiene un papel en el ensamblaje del aparato fotosintético (Bryan *et al.*, 2011).

Carga proteica

La carga proteica es un conjunto de proteínas asociadas a los FMMs que oligomerizan en complejos funcionales y en cascadas de transducción de la señal, cuya actividad depende de la estabilidad y la integridad de los FMMs (Bramkamp & López, 2015). Entre las proteínas que componen la carga proteica se han observado quinasas sensoras, proteínas que forman parte de sistemas de secreción y proteasas

(López & Koch, 2017). La quinasa KinC, como se ha comentado, formaría parte de la carga proteica de un FMM de *B. subtilis* implicado en la formación de *biofilms* (López & Kolter, 2010) (Figura 14).

I.5 Objetivos

Uno de los objetivos generales de esta tesis doctoral ha sido profundizar en el conocimiento de la vía principal para la percepción y transducción del estímulo luminoso mediada por el oxígeno singlete, y las proteínas CarF, CarR y CarQ. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la localización subcelular de CarF.
- Analizar la posible actividad desaturasa de ácidos grasos de CarF.
- Estudiar la localización subcelular de CarQ y CarR en oscuridad y en luz.
- Determinar si CarR se inactiva mediante un mecanismo de proteólisis dependiente de luz.
- Determinar si CarR forma parte de un FMM.
- Determinar la posible presencia de flotilinas en *M. xanthus* y estudiar su localización subcelular.

El otro objetivo general de esta tesis doctoral ha sido profundizar en nuestro conocimiento de la respuesta de *M. xanthus* al estrés foto-oxidativo mediante análisis a escala global. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Realizar análisis transcriptómicos para determinar el conjunto de genes (regulón) cuya expresión cambia en respuesta a la luz, más allá de los ya conocidos.
- Determinar si estos nuevos genes implicados en la respuesta a la luz dependen o no de CarQ para su expresión.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Estirpes y plásmidos

II.1.1 Estirpes de *M. xanthus*

Las estirpes de *M. xanthus* utilizadas en este trabajo derivan de DK1050, que presenta una coloración amarilla estable en la oscuridad y contiene la mutación *pilQ1* que afecta a la movilidad social (Ruiz-Vázquez & Murillo, 1984). La Tabla 2 recoge las estirpes de *M. xanthus* utilizadas en este trabajo, indicando su descripción y origen. Las estirpes generadas en nuestro laboratorio se nombran con las letras MR seguidas de un número de aislamiento, y los plásmidos con las letras pMR seguidas de un número (las aclaraciones acerca del genotipo y fenotipo de algunas estirpes se pueden encontrar en la sección de Resultados).

Tabla 2. Estirpes de *M. xanthus*.

Estirpe	Descripción	Origen o fuente
DK1050	Estirpe silvestre	(Ruiz-Vázquez & Murillo, 1984)
MR418	<i>carB::lacZ</i> (Q418); Tc ^R	(Martínez-Laborda <i>et al.</i> , 1990)
MR992	$\Delta carF$	(Fontes <i>et al.</i> , 2003)
MR1418	$\Delta carQRS$	(Galbis-Martínez, 2005)
MR3019	$\Delta carF$; P _{van::carF-YFP} ; Km ^R	MR992 x pMR4527
MR3081	$\Delta carQ$	DK1050 x pMR4560
MR3082	$\Delta carR$	DK1050 x pMR4561
MR3109	$\Delta carQ$; P _{van::carQ-YFP} ; Km ^R	MR3081 x pMR4562
MR3110	$\Delta carQ$; P _{van::YFP-carQ} ; Km ^R	MR3081 x pMR4563
MR3111	$\Delta carR$; P _{van::carR} ; Km ^R	MR3082 x pMR4558
MR3112	$\Delta carR$; P _{van::carR-mCherry} ; Km ^R	MR3082 x pMR4543
MR3113	$\Delta carR$; P _{van::mCherry-carR} ; Km ^R	MR3082 x pMR4544
MR3124	$\Delta carR$; P _{van::flag-carR} ; Km ^R	MR3082 x pMR4596
MR3125	$\Delta carR$; P _{van::carR-flag} ; Km ^R	MR3082 x pMR4597
MR3129	$\Delta carF$; P _{van::carF} ; Km ^R	(Gallego-García <i>et al.</i> , 2019)
MR3267	$\Delta elbD$	(Gallego-García <i>et al.</i> , 2019)
MR3297	$\Delta floB$	DK1050 x pMR4805

MR3316	$\Delta carF \Delta elbD \Delta 1676$	(Gallego-García <i>et al.</i> , 2019)
MR3320	$\Delta elbD \Delta 1676$	(Gallego-García <i>et al.</i> , 2019)
MR3321	$\Delta elbD carB::lacZ$ (Q418); Tc ^R	(Gallego-García <i>et al.</i> , 2019)
MR3346	$\Delta elbD \Delta 1676$; P _{van} :: <i>elbD</i> ; Km ^R	(Gallego-García <i>et al.</i> , 2019)
MR3347	$\Delta carF$; P _{van} :: <i>YFP</i> ; Km ^R	MR992 x pMR3561
MR3348	$\Delta 1676$	(Gallego-García <i>et al.</i> , 2019)
MR3354	$\Delta 1676 carB::lacZ$ (Q418); Tc ^R	(Gallego-García <i>et al.</i> , 2019)
MR3355	$\Delta elbD \Delta 1676 carB::lacZ$ (Q418); Tc ^R	(Gallego-García <i>et al.</i> , 2019)
MR3356	$\Delta floA$	DK1050 x pMR4866
MR3357	$\Delta floA \Delta floB$	MR3297 x pMR4866
MR3370	$\Delta floB$; P _{van} :: <i>floB-YFP</i> ; Km ^R	MR3297 x pMR4889
MR3373	$\Delta floA$; P _{van} :: <i>YFP-floA</i> ; Km ^R	MR3356 x pMR4861
MR3374	$\Delta floA$; P _{van} :: <i>floA-YFP</i> ; Km ^R	MR3356 x pMR4884
MR3390	$\Delta elbD \Delta 1676$; P _{van} :: <i>1676</i> ; Km ^R	(Gallego-García <i>et al.</i> , 2019)

P_{van}, promotor inducible por vanilato; Km^R, resistencia a kanamicina; Tc^R, resistencia a oxitetraciclina.

II.1.2 Estirpes de *E. coli*

Se ha utilizado la estirpe de *E. coli* DH5 α (Hanahan, 1983) que es deficiente en recombinación (*recA*⁻), favoreciendo la estabilidad de los plásmidos y convirtiéndola en un hospedador idóneo en los experimentos de clonación.

En la Tabla 3 se recogen los plásmidos utilizados en este trabajo, indicando sus marcadores de selección, utilidad y origen.

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción/Utilidad	Origen o fuente
Plásmidos de uso general		
pBJ113	Vector para generar deleciones génicas en <i>M. xanthus</i> ; Km ^R Gal ^S	(Julien <i>et al.</i> , 2000)
pBJ114	Vector para generar deleciones génicas en <i>M. xanthus</i> ; Km ^R Gal ^S	(Julien <i>et al.</i> , 2000)
pMAR975	pBJ113 al que se le eliminó el punto de corte EcoRI; Km ^R Gal ^S	(Fontes <i>et al.</i> , 2003)

pMAR976	pBJ114 al que se le eliminó el punto de corte EcoRI; Km ^R Gal ^S	(Fontes <i>et al.</i> , 2003)
pMR3561	Vector para fusionar la proteína de interés por su extremo C-terminal a la proteína fluorescente YFP bajo un promotor inducible por vanilato. Se integra en el genoma de <i>M. xanthus</i> a través de un fragmento de 1,38 kb; Km ^R	(Iniesta <i>et al.</i> , 2012)
pMR3679	Vector que permite la expresión de una proteína de interés bajo un promotor inducible por vanilato. Se integra en el genoma de <i>M. xanthus</i> a través de un fragmento de 1,38 kb; Km ^R	(Iniesta <i>et al.</i> , 2012)
pMR3722	Derivado de pMR3679 con <i>YFP</i> para fusionar la proteína de interés por su extremo N-terminal a la proteína fluorescente YFP; Km ^R	Antonio A. Iniesta
pMR4414	Derivado de pMR3679 con <i>mCherry</i> para fusionar la proteína de interés por su extremo N-terminal a la proteína fluorescente mCherry; Km ^R	Antonio A. Iniesta
pMR4542	Derivado de pMR3679 con <i>mCherry</i> para fusionar la proteína de interés por su extremo C-terminal a la proteína fluorescente mCherry; Km ^R	Este trabajo
Plásmidos empleados para estudiar la caracterización funcional de CarF		
pMR4527	Derivado de pMR3561 para expresar $P_{van::carF}$ -YFP; Km ^R	Este trabajo
pMR4615	Derivado de pMR3679 con $P_{van::carF}$; Km ^R	(Gallego-García <i>et al.</i> , 2019)
pMR4783	Derivado de pBJ114 para generar la delección de <i>elbD</i> ; Km ^R Gal ^S	(Gallego-García <i>et al.</i> , 2019)
pMR4828	Derivado de pMR3679 con $P_{van::elbD}$; Km ^R	(Gallego-García <i>et al.</i> , 2019)
pMR4832	Derivado de pBJ114 para generar la delección del gen <i>MXAN_1676</i> ; Km ^R Gal ^S	(Gallego-García <i>et al.</i> , 2019)
pMR4903	Derivado de pMR3679 con $P_{van::1676}$; Km ^R	(Gallego-García <i>et al.</i> , 2019)
Plásmidos empleados para estudiar la caracterización subcelular y molecular de CarR en condiciones de oscuridad y luz		
pMR4543	Derivado de pMR4542 para expresar $P_{van::carR}$ -mCherry; Km ^R	Este trabajo
pMR4544	Derivado de pMR4414 para expresar $P_{van::mCherry-carR}$; Km ^R	Este trabajo
pMR4558	Derivado de pMR3679 para expresar $P_{van::carR}$; Km ^R	Este trabajo

pMR4560	Derivado de pMAR975 para generar la delección de <i>carQ</i> ; Km ^R Gal ^S	Este trabajo
pMR4561	Derivado de pMAR975 para generar la delección de <i>carR</i> ; Km ^R Gal ^S	Este trabajo
pMR4562	Derivado de pMR3561 para expresar <i>P_{van}::carQ-YFP</i> ; Km ^R	Este trabajo
pMR4563	Derivado de pMR3722 para expresar <i>P_{van}::YFP-carQ</i> ; Km ^R	Este trabajo
pMR4596	Derivado de pMR3679 para expresar <i>P_{van}::flag-carR</i> ; Km ^R	Este trabajo
pMR4597	Derivado de pMR3679 para expresar <i>P_{van}::carR-flag</i> ; Km ^R	Este trabajo
pMR4805	Derivado de pBJ113 para generar la delección de <i>floB</i> ; Km ^R Gal ^S	Este trabajo
pMR4861	Derivado de pMR3722 para expresar <i>P_{van}::YFP-floA</i> ; Km ^R	Este trabajo
pMR4866	Derivado de pBJ113 para generar la delección de <i>floA</i> ; Km ^R Gal ^S	Este trabajo
pMR4884	Derivado de pMR3561 para expresar <i>P_{van}::floA-YFP</i> ; Km ^R	Este trabajo
pMR4889	Derivado de pMR3561 para expresar <i>P_{van}::floB-YFP</i> ; Km ^R	Este trabajo

El fragmento de 1,38 kb se corresponde a la zona del genoma de *M. xanthus* localizada entre la posición 8498672 y 8500048. *P_{van}*, promotor inducible por vanilato; Km^R, resistencia a kanamicina; Gal^S, sensibilidad a galactosa conferida por el gen *galk*.

II.1.3 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 4, indicando su nombre, secuencia, temperatura de hibridación (T_m) y aplicación.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5´-3´)	T _m (°C)	Aplicación
E31_Mxan6122.for	AGGACTTCCACGCCATCAAC	66,3	RT-qPCR MXAN_6122
E32_Mxan6122.rev	TGCCGTCATCCAACCTGGAG	67,5	RT-qPCR MXAN_6122
E33_Mxan1696.for	CGTCATGCTCTATGGGTTCGA	67,2	RT-qPCR MXAN_1696
E34_Mxan1696.rev	CGCCAGGGCCATTCCT	67,5	RT-qPCR MXAN_1696
E64_mxan5394.for	TGCTCGACAAGCCCATAC	67	RT-qPCR MXAN_5394
E65_mxan5394.rev	CCCCCGGGAGACACACA	68,7	RT-qPCR MXAN_5394

E66_mxan5435.for	CTGGGAGTCATCCGTGGATT	66,2	RT-qPCR <i>MXAN_5435</i>
E67_mxan5435.rev	CCACCGCAGAAGTGATCGTT	67,4	RT-qPCR <i>MXAN_5435</i>
E68_mxan4277.for	CGCCCCCATGGAATCA	67,1	RT-qPCR <i>MXAN_4277</i>
E69_mxan4277.rev	TTGTAACCAGCCCCGAACA	66,4	RT-qPCR <i>MXAN_4277</i>
E70_mxan5845.for	GGCAAGGACCCAGAACGC	68,2	RT-qPCR <i>MXAN_5845</i>
E71_mxan5845.rev	TCCAGCTTGTCGTCGAGCT	66,4	RT-qPCR <i>MXAN_5845</i>
PBqPCR1	GCCGTCACGTCGGTCTTG	60,7	RT-qPCR <i>crtE</i>
PBqPCRR1	GCCTTGCCAGCGACGTT	57,2	RT-qPCR <i>crtE</i>
vegAqPCR-F	TGTCCGTGGATAAAGCGTTTC	65,9	RT-qPCR <i>vegA</i>
vegAqPCR-R	GCTTGAGCTGGACCTCGATT	65,7	RT-qPCR <i>vegA</i>

II.2 Medios de crecimiento

II.2.1 Medios ricos para *M. xanthus*

- **CTT** (Bretscher & Kaiser, 1978)
 - Bacto-casitona (Difco) 1%
 - Tampón Tris-HCl (pH 7,6) 10 mM
 - MgSO₄ 8 mM
 - Tampón fosfato (pH 7,6) 1 mM

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

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

En la Tabla 5 se detallan las soluciones y concentraciones de antibióticos utilizadas en este trabajo. La forma de preparación consistió en la esterilización de las soluciones por filtración a través de un filtro Millipore de 0,22 µm de diámetro de poro para, posteriormente, añadirlas al medio CTT una vez esterilizado y enfriado hasta 50 °C.

Tabla 5. Antibióticos utilizados en *M. xanthus*.

Antibiótico	Stock (concentración y solvente)	Concentración final en medio líquido/sólido
Kanamicina	10 mg/ml en agua	40 µg/ml
Oxitetraciclina	10 mg/ml en 50% etanol	2,5/10 µg/ml

- **CTT + Van**

CTT más ácido vanílico (vanilato) (Sigma-Aldrich) a diferentes concentraciones (desde 1 µM hasta 500 µM). Una vez esterilizado el medio CTT y enfriado hasta 50 °C, se añadió el vanilato correspondiente. El stock de vanilato se preparó por separado en agua, a pH 7,6 y una concentración de 50 mM, y fue esterilizado mediante filtración (Filtro Millipore, 0,22 µm Ø).

- **CTT + Gal**

CTT más galactosa (Panreac) al 2%. Una vez esterilizado el medio CTT y enfriado hasta 50 °C, se añadió la disolución de galactosa, previamente preparada en agua y esterilizada mediante filtración (Filtro Millipore, 0,22 µm Ø).

II.2.2 Medios ricos para *E. coli*

- **Luria (LB)** (Miller, 1972)

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

Antes de la esterilización en autoclave, se ajustó el pH entre 7,2 y 7,4.

Las soluciones y concentraciones de antibióticos utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 6. Se prepararon mediante esterilización por filtración (Filtro Millipore, 0,22 µm Ø) y se añadieron al medio LB una vez esterilizado y enfriado hasta 50 °C.

Tabla 6. Antibióticos utilizados en *E. coli*.

Antibiótico	Stock (concentración y solvente)	Concentración final en medio líquido/sólido
Kanamicina	10 mg/ml en agua	40 µg/ml
Oxitetraciclina	10 mg/ml en 50% etanol	10-12 µg/ml
Ampicilina	100 mg/ml en agua	100 µg/ml

II.3 Condiciones de cultivo

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

En general, los cultivos en medio líquido se realizaron inoculando una colonia en 10 ml de medio nutritivo contenido en un matraz con capacidad máxima de 50 ml. En los cultivos a mayor escala se añadieron 50 o 100 ml de medio nutritivo contenidos en matraces con capacidad máxima de 250 o 500 ml, respectivamente. Los cultivos se incubaron en un agitador orbital a 300 rpm y 33 °C (excepto para los experimentos de obtención de las fracciones DRM/DSM, en los que se usó 250 rpm y 30 °C). La inoculación en medio nutritivo sólido tras la transformación de *M. xanthus* se realizó con ayuda de 4 ml de agar de cobertera. Las cajas Petri se incubaron a 33 °C.

El crecimiento, a no ser que se indique lo contrario, fue realizado en condiciones de oscuridad. En condiciones de luz, los cultivos de las diferentes estirpes en medio líquido o sólido se iluminaron con lámparas fluorescentes de 18 W a una distancia de unos 50 cm. El número de lámparas fluorescentes fue variable según el experimento, utilizando 2 (experimentos de RT-qPCR, localización subcelular y β -galactosidasa), 4 (experimentos de *western blot*) o 6 (iluminación de estirpes en medio sólido).

II.3.2 Condiciones de cultivo para *E. coli*

En general, los cultivos en medio líquido se realizaron inoculando una colonia en un matraz de 50 ml con 10 ml de medio nutritivo. Para los cultivos a mayor escala se utilizaron matraces de 250 ml con 50 ml de medio nutritivo. Los cultivos se incubaron a 250 rpm y 37 °C. Las cajas de Petri se incubaron a 37 °C en oscuridad.

II.4 Tampones y soluciones

II.4.1 Purificación de DNA plasmídico

- **TE**
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)
- **Tampón de carga 10X**
Suministrado por Fermentas
- **Marcadores de tamaño 100 pb y 1 kb**
Suministrado por ThermoFisher Scientific

II.4.3 Electroforesis de RNA

- **TAE 1X** (Sambrook & Russell, 2001)
40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA (pH 8,0), H₂O tratada con DEPC (dietil-pirocarbonato)
- **Tampón de carga 10X**
Suministrado por Fermentas

II.4.4 Electroforesis de proteínas

- **Tampón de carga/ruptura para geles de poliacrilamida-SDS 1X**
50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% glicerol, 2% SDS, 100 mM β -mercaptoetanol, 0,1% azul de bromofenol
- **Tampón de electroforesis para geles de poliacrilamida-SDS**
50 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS
- **Solución de tinción Coomassie**
PageBlue Protein Staining Solution de Thermo Scientific
- **Geles de poliacrilamida-SDS**
Preparados según Sambrook *et al.* (1989)

II.4.5 Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos

- **Tampón fosfato salino (PBS)**

10 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 bloqueo (PBS-TB)**

PBS-T, 5% leche

- **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 10,4

- **Tampón de transferencia para el cátodo**

25 mM Tris, 40 mM ácido aminocapróico, 20% metanol, pH 9,4

II.4.6 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

- **Solución Na_2CO_3**

250 mM Na_2CO_3

- **Solución B1**

40 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

- **Solución B2**

70 mM tartrato sódico

II.4.7 Metilación de ácidos grasos

- **Sustancia metilante**

1% H_2SO_4 en metanol

- **Solución de yodo para la tinción de ácidos grasos**

1% yodo en cloroformo

II.4.8 Aislamiento de las fracciones DRM y DSM

- **Tampón de lisis**

20 mM Tris (pH 7,4), 100 mM NaCl, 0,5 mM Tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP),

10% glicerol

II.5 Extracción de DNA

El aislamiento de DNA cromosómico de *M. xanthus* se realizó mediante el uso del kit de purificación de DNA genómico de *Wizard*TM (Promega). En algunos casos, se utilizó la matriz de *Instagene* de Bio-Rad para neutralizar los productos de la lisis celular, ya que pueden interferir con la PCR. Para el aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* se utilizó el kit de purificación de DNA plasmídico *Illustra* de GE Healthcare o *QIAprep*TM *Spin Miniprep* de QIAGEN.

II.6 Transferencia de DNA

II.6.1 Transformación de *E. coli*

Para la obtención de células competentes de *E. coli* y su posterior transformación con 1-10 ng de DNA por choque térmico se siguió el protocolo de Sambrook & Russell (2001). Cuando fue necesario obtener un gran número de transformantes, el proceso se llevó a cabo mediante electroporación (Sambrook & Russell, 2001), utilizándose cubetas de electroporación de 0,1 cm y las siguientes condiciones: 1,5 kV, 25 μ F y 200 Ω .

II.6.2 Transformación de *M. xanthus*

Se llevó a cabo mediante electroporación siguiendo el proceso descrito por Kashefi & Hartzell (1995). Para la obtención de células “electrocompetentes” de *M. xanthus* se centrifugaron (2 min, 15000 g) 3 ml de un cultivo en fase exponencial de crecimiento ($DO_{550} \sim 0,7-1,1$). El precipitado celular se lavó tres veces con 1 ml de agua bidestilada estéril y se resuspendió en 160 μ l de agua bidestilada. Tras añadir el DNA correspondiente (0,5-1 μ g de DNA) a las células electrocompetentes, se transfirieron 120 μ l de la mezcla a una cubeta de electroporación de 0,1 cm y se sometieron a un pulso eléctrico con el electroporador Bio-Rad Gene Pulser II (0,65 kV, 25 μ F y 400 Ω). Tras el pulso eléctrico se añadió 1 ml de CTT a la cubeta para recoger las células y se transfirieron a un matraz de 50 ml que contenía 4 o 9 ml de CTT según si las células se cultivaban 5 horas o toda la noche, respectivamente. Posteriormente, se sembraron diferentes diluciones de las células en cajas de CTT con el antibiótico al que confiere resistencia el plásmido introducido y se incubaron a 33 °C. Una vez aparecieron las colonias de los transformantes, generalmente a los 5 días de incubación, se purificaron en placas de CTT con el antibiótico correspondiente. Finalmente, para comprobar si el

plásmido se había integrado correctamente en el locus esperado se realizó PCR o secuenciación.

II.7 Tratamiento enzimático del DNA

Los tratamientos enzimáticos más habituales realizados al DNA fueron:

- **Digestión** con enzimas de restricción (Takara), que se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del suministrador.
- **Desfosforilación** de extremos 5' con la enzima *rAPid Alkaline Phosphatase* (Roche) para evitar la autoligación de los vectores. Se realizó conforme a las indicaciones del suministrador.
- **Ligación** de fragmentos de DNA, que se realizó en tampón de ligación (con ATP a 1 mM), y una unidad (U) de ligasa T4 de New England Biolabs. La cantidad de DNA añadida a la mezcla fue variable (50-100 ng) según el experimento. Las mezclas de ligación se incubaron a 25 °C durante 2 horas o a 16 °C durante toda la noche.

II.8 Amplificación de DNA mediante PCR

Las reacciones de amplificación de DNA mediante PCR se llevaron a cabo en un termociclador *Eppendorf Mastercycler® nexus* a partir de 10-100 ng de DNA molde. Se utilizaron dos polimerasas de DNA: *Pfu* (Promega) y *KOD* (Novagen). En las reacciones en las que se utilizó la polimerasa *Pfu* se añadieron oligonucleótidos a una concentración final de 0,2 µM cada uno, una mezcla de los cuatro dNTPs (200 µM cada uno), DMSO (5%, ya que el genoma de *M. xanthus* es rico en pares G+C), tampón de reacción y 1,5 U de *Pfu*. En las reacciones en las que se utilizó la polimerasa *KOD* se añadieron oligonucleótidos a una concentración final de 0,3 µM cada uno, DMSO (5%) y 1 U de la polimerasa, que está mezclada con los dNTPs y el tampón de reacción. Para fines diagnósticos se utilizaron bolitas para PCR *PuReTaq™ Ready-To-Go™* (GE Healthcare), que contienen la polimerasa de DNA *Taq*, su tampón de reacción y los dNTPs. Los productos obtenidos tras la PCR se purificaron con el kit *High Pure™ PCR Product purification* (Roche). En algunos casos, el producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (Pronadisa), recortándose la banda de interés y purificándola posteriormente con el mismo kit de purificación siguiendo las especificaciones del fabricante.

II.9 Secuenciación de 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* de Roche y los plásmidos con el kit *QIAprep™ Spin Miniprep* de QIAGEN. La secuenciación se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Murcia.

II.10 Extracción, cuantificación y análisis de la calidad de RNA

Se crecieron cultivos de diferentes estirpes de *M. xanthus* en 100 ml de CTT hasta una $DO_{550} \sim 0,8-0,9$. Posteriormente, se separaron en seis cultivos de 10 ml, de los cuales tres se mantuvieron en oscuridad; mientras que los tres restantes se expusieron a la luz durante 1, 3 y 8 horas. Transcurrido el tiempo correspondiente, se recogieron 5 ml de cada cultivo mediante centrifugación y los pellets celulares se guardaron a -80 °C hasta su procesamiento.

El proceso de extracción y cuantificación de RNA fue el mismo para las muestras analizadas por *microarrays*, *RNA-seq* y RT-qPCR. Para extraer el RNA total, cada precipitado celular se resuspendió en 1 ml de *TRIzol® Reagent* y se incubó durante 10 minutos a 65 °C. Se le añadieron 0,2 ml de cloroformo y se mezclaron durante 15 segundos por inversión. Posteriormente, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 minutos a 4 °C. Tras centrifugar, las mezclas se separaron en tres fases: una fase inferior roja (trizol-cloroformo), una fase intermedia (proteínas) y una fase superior transparente acuosa (RNA). Se recogió la fase superior y se precipitó el RNA añadiendo 0,5 ml de 2-propanol. Las muestras se congelaron a -80 °C durante toda la noche. Posteriormente, las muestras ya descongeladas se centrifugaron a máxima velocidad durante 30 minutos a 4 °C, formándose un pellet correspondiente al RNA. El pellet se lavó con 1 ml de etanol al 75%, mezclando mediante vórtex y centrifugando nuevamente a máxima velocidad durante 5 minutos a 4 °C. El pellet se secó a temperatura ambiente durante 10-15 minutos y se resuspendió en 87,5 µl de H₂O tratada con DEPC.

Para eliminar completamente el DNA genómico, el RNA extraído se trató con 4 U *TURBO™ DNase* de Ambion durante 3 horas a 37 °C añadiendo también 1X *Buffer*

TURBO™ DNase y 20 U *Protector RNase Inhibitor* (Roche). Después, se purificó con el kit *PureLink® RNA Mini* de Ambion, que elimina los restos de DNasa y de tampón, y se eluyó en un volumen final de 40 µl.

El RNA se cuantificó en un Espectrofotómetro *NanoDrop* de Thermo Scientific mediante la medida de la absorbancia a 260 nm. Además, el *NanoDrop* ofrece dos medidas más, indicativas de la calidad del RNA purificado. Por un lado, el cociente de absorbancia 260/280 indica posibles contaminaciones por proteínas o fenol que absorben fuertemente en torno a 280 nm, siendo valores próximos a 2 indicativos de la alta pureza de la muestra de RNA; mientras que valores inferiores indicarían la presencia de contaminantes. Por otro lado, el cociente de absorbancia 260/230 indica posibles contaminaciones con sales u otros contaminantes que absorben a 230, siendo valores entre 2-2,2 indicativos de una alta pureza de la muestra. La integridad del RNA se comprobó mediante electroforesis de 1 µl de RNA purificado en un gel de agarosa al 1%, que nos permite ver los RNAs ribosómicos bacterianos (23S, 16S y 5S) y determinar si el RNA está o no degradado.

El cálculo del *RNA integrity number* (RIN) de las muestras a analizar por *RNA-seq* se realizó en el sistema electroforético capilar 2100 *Bioanalyzer* (Agilent Technologies) de la sección de Biología Molecular de la Universidad de Murcia.

II.11 Generación de estirpes de *M. xanthus* portadoras de una delección

Para la obtención de mutantes portadores de la delección completa de un gen, en primer lugar, se amplificaron por PCR en torno a 1 kb de las regiones inmediatamente aguas arriba y abajo del gen de interés, y se clonaron en los plásmidos pBJ113 o pBJ114, que se diferencian en la orientación de la región de clonación múltiple. Estos vectores presentan un marcador que confiere resistencia a kanamicina (*km^R*) y un gen que genera sensibilidad a galactosa (*galK*). La estirpe de interés de *M. xanthus* se electroporó con el plásmido portador de la delección, obteniendo bacterias resistentes a kanamicina debido a la incorporación del plásmido en su cromosoma mediante un primer hecho de recombinación homóloga que genera merodiploides (Figura 17). Algunos de los merodiploides resultantes se crecieron en ausencia del antibiótico para permitir la pérdida del plásmido por un segundo hecho de recombinación homóloga. Los haploides resultantes se seleccionaron en cajas de CTT suplementadas con galactosa al 2%. Se realizó PCR de varias de las colonias crecidas

en este medio para diferenciar las células que presentaban el alelo silvestre de aquellas que tenían el alelo deleciónado.

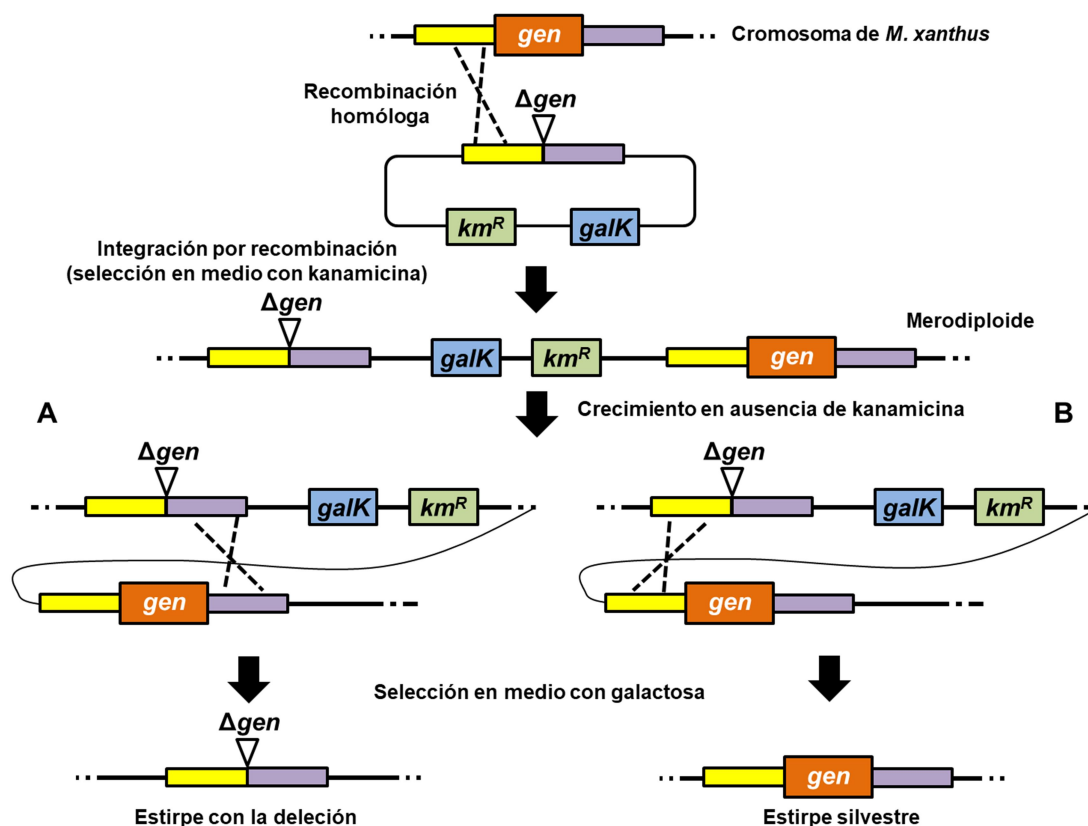


Figura 17. Esquema del proceso de obtención de una estirpe portadora de una deleción en *M. xanthus*. **A)** Proceso de recombinación que daría lugar a la estirpe haploide con el alelo deleciónado. **B)** Proceso de recombinación que daría lugar a la estirpe haploide con el alelo silvestre. Aunque no se representa, el primer hecho de recombinación, que lleva a la integración del plásmido, podría ocurrir también por la región aguas abajo del gen.

II.12 Técnicas electroforéticas

II.12.1 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa (Sigma-Aldrich o Pronadisa) de diferentes concentraciones, preparados en tampón TAE 1X. Para poder visualizar el DNA se realizó una tinción con *RealSafe Nucleic Staining Solution* (Promega) y se iluminó con luz ultravioleta. La purificación de fragmentos de restricción se llevó a cabo tras su separación en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Pronadisa). Las secciones de agarosa con el DNA de interés se recortaron del gel con un bisturí y el DNA se purificó con el kit *High PureTM PCR Product Purification* (Roche).

II.12.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS

La separación de las proteínas presentes en diferentes muestras en función del tamaño se realizó mediante electroforesis en geles verticales de poliacrilamida-SDS, utilizando equipos de Bio-Rad, y siguiendo el método de Laemmli (1970). Los marcadores de tamaño molecular utilizados (*Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*) fueron suministrados por Thermo Scientific. Antes de cargar las muestras en el gel, se incubaron durante 5 minutos a 100 °C. La electroforesis se realizó a 120-200 V durante 1-2 horas.

II.13 Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos (*Western blot*)

La obtención de extractos celulares de *M. xanthus* para la detección de proteínas con anticuerpos específicos se realizó incubando el cultivo hasta una $DO_{550} \sim 0,6-1$. Se recogió 1 ml de cada cultivo mediante centrifugación y los pellets celulares se guardaron a -80 °C hasta su procesamiento. Tras descongelar los pellets a 4 °C, se resuspendieron en 200 μ l de ácido tricloroacético al 20% (TCA, Sigma-Aldrich) con *cOmplete™ EDTA-free protease inhibitor* a 1X (Roche), se incubaron en hielo durante 5 minutos y se resuspendieron en 400 μ l de TCA al 5%. Después, se centrifugaron a máxima velocidad durante 5 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de TCA al 0,1%. Se centrifugaron nuevamente a máxima velocidad durante 5 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado resultante se resuspendió en 70 μ l de tampón de carga y 40 μ l de 1 M Tris-HCl (pH 8,0). Se hirvieron 10-30 μ l de muestra durante 5 minutos y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12%.

En el caso de muestras líquidas (para la obtención de las fracciones DRM y DSM), la precipitación con TCA se realizó de la siguiente forma. En primer lugar, las muestras se resuspendieron en TCA al 10% y se incubaron durante 1 h a 4 °C. Posteriormente, se centrifugaron a máxima velocidad durante 30 minutos a 4 °C y se les quitó el sobrenadante. Se lavaron 4 veces con acetona (añadiendo 1 ml de acetona sin resuspender y centrifugando a máxima velocidad durante 10 minutos a 4 °C). Tras el último lavado, se les quitó el sobrenadante y se dejaron secar a 37 °C durante 15-30 minutos. Finalmente, el precipitado se resuspendió en PBS 1X y tampón de carga

(cantidades variables según la muestra). Se hirvieron 9-15 µl de muestra durante 5 minutos y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12%.

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se detectaron con anticuerpos específicos mediante la técnica de *Western blot* (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1979). Se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) o de PVDF (*Inmobilon-P* de Millipore™) a través de un sistema semiseco, utilizando el equipo *Trans-Blot® Turbo™ Blotting System* de Bio-rad. Para seguir la transferencia visualmente se utilizaron los marcadores de tamaño molecular coloreados *Recombinant Proteins Molecular Weight Markers Full-range Rainbow* (Amersham Biosciences). Las condiciones de la transferencia fueron 30 minutos a 25 V y 1,0 A. Tras realizar la transferencia, la membrana se sumergió durante 1 hora en tampón PBS-T con 5% de leche desnatada como agente bloqueante (PBS-TB). La membrana se incubó durante toda la noche con 3-10 µl del anticuerpo primario diluido en 15-20 ml de PBS-TB. El exceso de anticuerpo primario se eliminó mediante 3 lavados de 10 minutos con PBS-T. Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 hora con una dilución 1:4000 (anti-*mouse*) o 1:2000 (anti-*rabbit*) del anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano en 15-20 ml de PBS-TB. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó con 3 lavados de 10 minutos con PBS-T. Los lavados y las incubaciones con los anticuerpos se realizaron en agitación suave y constante, y a temperatura ambiente para periodos cortos (entre 1-2 horas) o a 4 °C para periodos largos (toda la noche). Para revelar se utilizó el sistema *ECL Prime* (GE Healthcare). Tras añadir el reactivo que presenta el sustrato quimioluminiscente para la peroxidasa conjugada al anticuerpo, la membrana se expuso a una película *Amersham Hyperfilm™ ECL* (GE Healthcare) durante 1-5 minutos.

II.14 Cuantificación relativa de los cambios en la expresión génica mediante RT-qPCR (reverse transcription quantitative PCR)

El RNA de la estirpe de interés se obtuvo según el protocolo descrito en el apartado II.10. Para obtener el cDNA se incubaron 2-5 µg de RNA, 2,5 µg de hexanucleótidos aleatorios y 2,5 mM dNTPs durante 5 minutos a 65 °C en un volumen de 13 µl completado con agua MilliQ tratada con DPEC al 0,2%. Tras la incubación, las reacciones se pasaron a hielo y se añadió el tampón de la transcriptasa inversa (1X), 5 mM DTT, 40 U de *Protector RNase Inhibitor* (Roche) y 10 U de *SuperScript® IV Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Las mezclas se incubaron 10 minutos a 23 °C, 10

minutos a 50 °C y 10 minutos a 80 °C. Debido a que la reacción de retrotranscripción es lineal, la cantidad de µg de cDNA total obtenidos se corresponde con la cantidad de RNA añadido.

Para el diseño de oligonucleótidos capaces de detectar RNAs mensajeros específicos se utilizó Primer3Plus (programa con licencia GNU) (Untergasser *et al.*, 2007), siguiendo las opciones estándar que proporciona el programa. Las reacciones de amplificación y detección se realizaron en el termociclador *StepOne™* de Applied Biosystems con capacidad para placas de 48 pocillos (*MicroAmp® Optical 48-Well Reaction Plate*). La detección del “amplicón” se llevó a cabo con el fluoróforo *SYBR® Green I*, ya que emite fluorescencia cuando se une al DNA de doble cadena. La reacción de amplificación estaba formada por: *iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix* (BIO-RAD), 2 µl de cDNA (0,01-100 ng), oligonucleótidos a una concentración final entre 100 y 400 nM y agua hasta un volumen final de 20 µl. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 10 minutos a 95 °C (activa la *iTaq™ DNA polymerase*, contenida en la *Master Mix*), 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

Se comprobó la eficiencia de amplificación de cada uno de los amplicones generados con cada pareja de oligonucleótidos para elegir el método de cuantificación relativa más adecuado. Para ello se construyó una recta patrón de amplificación mediante diluciones seriadas del cDNA (factor de dilución 1:10) y depositando las siguientes cantidades (ng) en los pocillos de las placas: 100, 10, 1, 0,1, 0,01 (cada reacción se realizó por triplicado). Después de la reacción de amplificación, se representó en el eje de abscisas la cantidad de cDNA y en el eje de ordenadas los valores de Ct (ciclo de amplificación en el que la fluorescencia captada por el detector supera la línea basal durante la fase exponencial de amplificación). Valores de Ct comprendidos entre 10 y 30 se consideran fiables, mientras que fuera de este intervalo la variabilidad de los resultados es muy alta. Tras representar los datos, se calcula el factor de ajuste de los mismos a la recta obtenida, R^2 , que debe estar entre 0,978 y 0,99 para que el ajuste sea considerado bueno. Por último, se calcula la eficiencia de la amplificación (E), utilizando la siguiente fórmula:

$$E = (10^{(-1/\text{pendiente})} - 1) \times 100$$

En aquellas muestras que tenían una concentración muy baja de mensajero, se aplicó un factor en las diluciones seriadas de 1:2, manteniendo la cantidad de 100 ng de cDNA como primer punto de la recta patrón. Independientemente del método de cuantificación relativa empleado, se requiere un gen de referencia, que sería el control

endógeno, cuya expresión se mantiene constante en las condiciones utilizadas para todas las muestras, normalizando el nivel de expresión de las muestras del ensayo. En este trabajo se utilizó el gen *vegA*, que no varía en fase estacionaria (Komano *et al.*, 1987; Ueki & Inouye, 2003) y que mostró una eficiencia superior al 98%.

Tras la realización de los análisis anteriores, se dispusieron en los pocillos las diferentes muestras. Para cada muestra se midió tanto el gen problema como el gen endógeno, ambos por triplicado; y se procedió al análisis de los datos. En todos los casos analizados, el valor de la eficiencia estuvo entre 95% y 100%, permitiendo realizar la cuantificación relativa con el método $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl, 2001). Para ello, se utilizaron las siguientes fórmulas:

- **Normalización de la muestra problema:** $C_t \text{ gen diana} - C_t \text{ gen endógeno} = \Delta C_t$
- **Normalización de la muestra control:** $C_t \text{ gen diana (condición control)} - C_t \text{ gen endógeno (condición control)} = \Delta C_t$
- **Diferencia entre problema y control:** $\Delta C_t \text{ muestra problema} - \Delta C_t \text{ muestra control} = \Delta\Delta C_t$
- **Variación de la expresión (*Fold change*):** $2^{-\Delta\Delta C_t}$

El fluoróforo utilizado presenta unión inespecífica al DNA. Por ello, se realizó una curva de disociación del producto de PCR para comprobar si aparecía más de un pico, indicando la amplificación de más de un fragmento o la hibridación entre los cebadores. Esta curva se llevó a cabo en el mismo termociclador que la reacción de amplificación utilizando un programa estándar.

II.15 Análisis globales de la expresión génica mediante *microarrays*

Se utilizó la plataforma de *microarrays* desarrollada por Agilent Technologies. Los *microarrays* empleados presentan sondas para 7316 *orfs* de *M. xanthus* (del total de 7441 *orfs* anotados), y excluyen los genes para RNAs estructurales (79), pseudogenes (43) y algunos genes que aparecen duplicados en la anotación. Para este número de genes, la disposición óptima del soporte fue de 8 x 15 k, es decir, 8 *microarrays* por soporte, presentando cada uno de ellos una capacidad para 15000 sondas (Figura 18A). Se utilizó el programa web *eArray* de Agilent para el diseño del *microarray* y la elección de las sondas (60-mer). Cada *microarray* contiene dos sondas iguales para cada gen que están distribuidas al azar a lo largo de su superficie, además de varias sondas que sirven de control del propio sistema de Agilent.

Se extrajo el RNA de las muestras correspondientes siguiendo el protocolo del apartado II.10. Para comparar una muestra problema con su control, el experimento se repitió dos veces, cambiando el fluoróforo utilizado para marcar uno u otro cDNA. Todo ello se repitió, a su vez, al menos dos veces.

Tras analizar la calidad de los RNAs (RIN>8), se llevó a cabo el ensayo de expresión según las indicaciones del fabricante de los *microarrays*. A continuación, se describen brevemente los pasos seguidos (Figura 18B). El procesamiento y análisis de los *microarrays* lo llevó a cabo la empresa BIOARRAY, S. L., (Polígono Industrial de Crevillente, Alicante). Tras sintetizar el cDNA a partir de 5 µg de RNA, se eliminó el RNA mediante un tratamiento con NaOH y calor. El cDNA se purificó siguiendo las indicaciones del protocolo, se etiquetó con Cy3 o Cy5, y se volvió a purificar con el kit *RNeasy* de Qiagen. Posteriormente, se cuantificó el cDNA con el *NanoDrop* para determinar la eficacia del proceso de etiquetado y la cantidad de cDNA. Cuando la cantidad fue menor de 650 ng y su actividad específica (eficacia del marcaje) no alcanzó los 40 pmoles de Cy3 o Cy5 se descartó la muestra y se realizó de nuevo el proceso de etiquetado. Cuando los parámetros fueron los adecuados, se preparó la hibridación del cDNA marcado con el *microarray* incubándolo en un horno a 65 °C durante 17 horas en agitación continua (10 rpm). Después de la incubación, se realizaron varios lavados y se escanearon de forma inmediata.

Una vez escaneada la fluorescencia de los *microarrays* se analizaron los datos mediante el *software* Feature Extraction v.10.7 (Agilent), el cual permite cuantificar la intensidad de cada punto y de cada canal (Cy3 y Cy5). Este *software* también permite realizar un análisis de calidad de la señal y así descartar las sondas con baja calidad. El análisis de los datos se realizó utilizando Bioconductor e incluyó una evaluación global de la calidad de los *microarrays* y una normalización tanto intra- como inter-*microarray*, sustrayendo el fondo de señal. Tras normalizar, se llevó a cabo el análisis de expresión estableciendo el umbral de confianza en las sondas que presentaban un valor p inferior al 0,01 y un *Fold change* (FC) ≥ 2 o ≤ -1 .

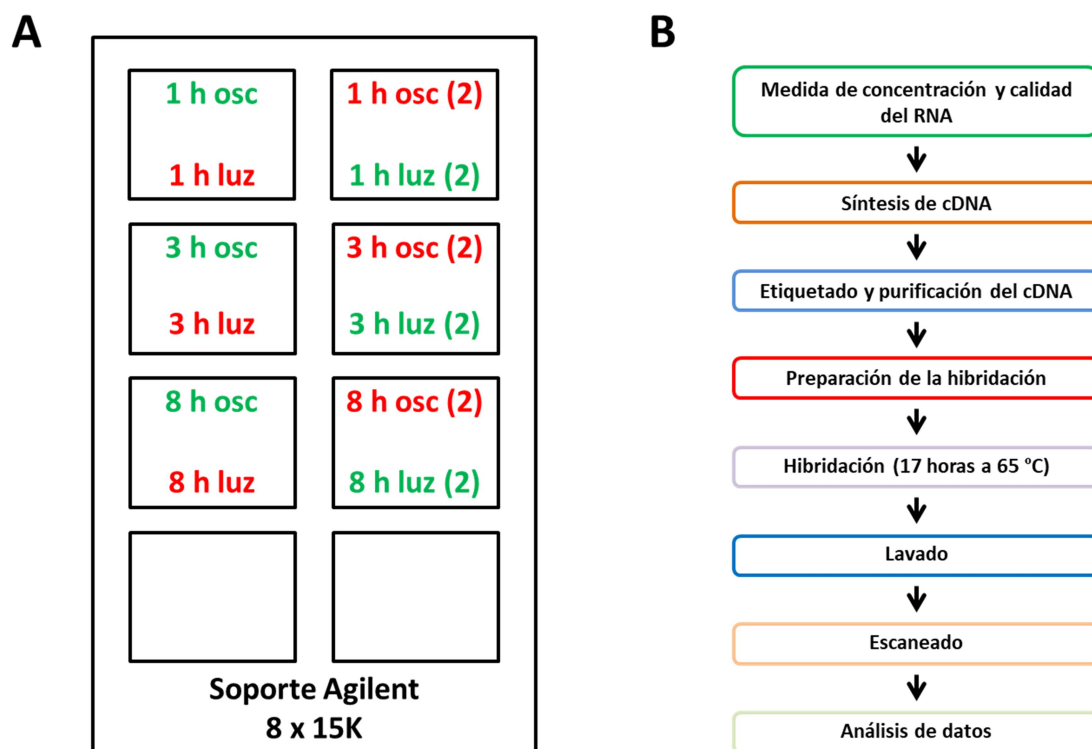


Figura 18. Protocolo seguido en los experimentos de *microarrays*. A) Esquema del experimento de expresión global realizado con la estirpe silvestre y la estirpe MR1418 ($\Delta carQRS$) crecidas en oscuridad y luz a diferentes tiempos (1, 3 y 8 horas). Se muestra la disposición de las muestras en el soporte de Agilent 8 x 15K. Las muestras indicadas con un 2 son la réplica biológica de la muestra correspondiente. El experimento se realizó por duplicado. B) Pasos generales en un experimento de hibridación por *microarrays*.

II.16 Análisis globales de la expresión génica mediante secuenciación de RNA (*RNA-seq*)

Se extrajo y cuantificó el RNA de las muestras correspondientes (siguiendo el protocolo del apartado II.10) y, tras comprobar que las muestras presentaban un RIN mayor de 8, se llevó a cabo el análisis por *RNA-seq* en la empresa Novogene. A continuación, se describen brevemente los pasos seguidos en dicho análisis (Figura 19A). Nuevamente, se comprobó la cantidad y calidad del RNA total y se llevó a cabo la construcción de la librería (detallado en la Figura 19B). Posteriormente, se midió la concentración de la librería mediante Qubit 2.0 *fluorometer* (Life Technologies) y el tamaño del inserto se comprobó en el sistema electroforético capilar 2100 *Bioanalyzer* (Agilent Technologies) y se cuantificó utilizando qPCR. La secuenciación de las librerías se llevó a cabo en plataformas Illumina. Finalmente, se realizó el procesamiento bioinformático.

El procesamiento de los datos para su análisis bioinformático se describe brevemente a continuación (Figura 19C). En primer lugar, los datos brutos se convirtieron en lecturas secuenciadas. Posteriormente, se realizó un control de calidad de los datos en los que las lecturas brutas se filtraron para quitar aquellas que presentasen contaminación de adaptadores o fueran de baja calidad, entre otras cosas, de forma que solo las “lecturas limpias” se utilizaron en los análisis posteriores. Las lecturas se mapearon con el genoma de referencia de *M. xanthus* y se procedió a la cuantificación. Para estimar el nivel de expresión génica se contaron las lecturas que se asignan a los genes correspondientes. Para que los niveles de expresión génica estimados de diferentes genes y experimentos fuesen comparables se utilizó como método de normalización el FPKM (*Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*), que tiene en cuenta el número de lecturas, la longitud del gen en cuestión y la profundidad de secuenciación. El análisis de expresión diferencial se realizó utilizando el *software* DESeq2. Se consideró que los genes mostraban una expresión significativa si presentaban un valor p ajustado menor de 0,05.

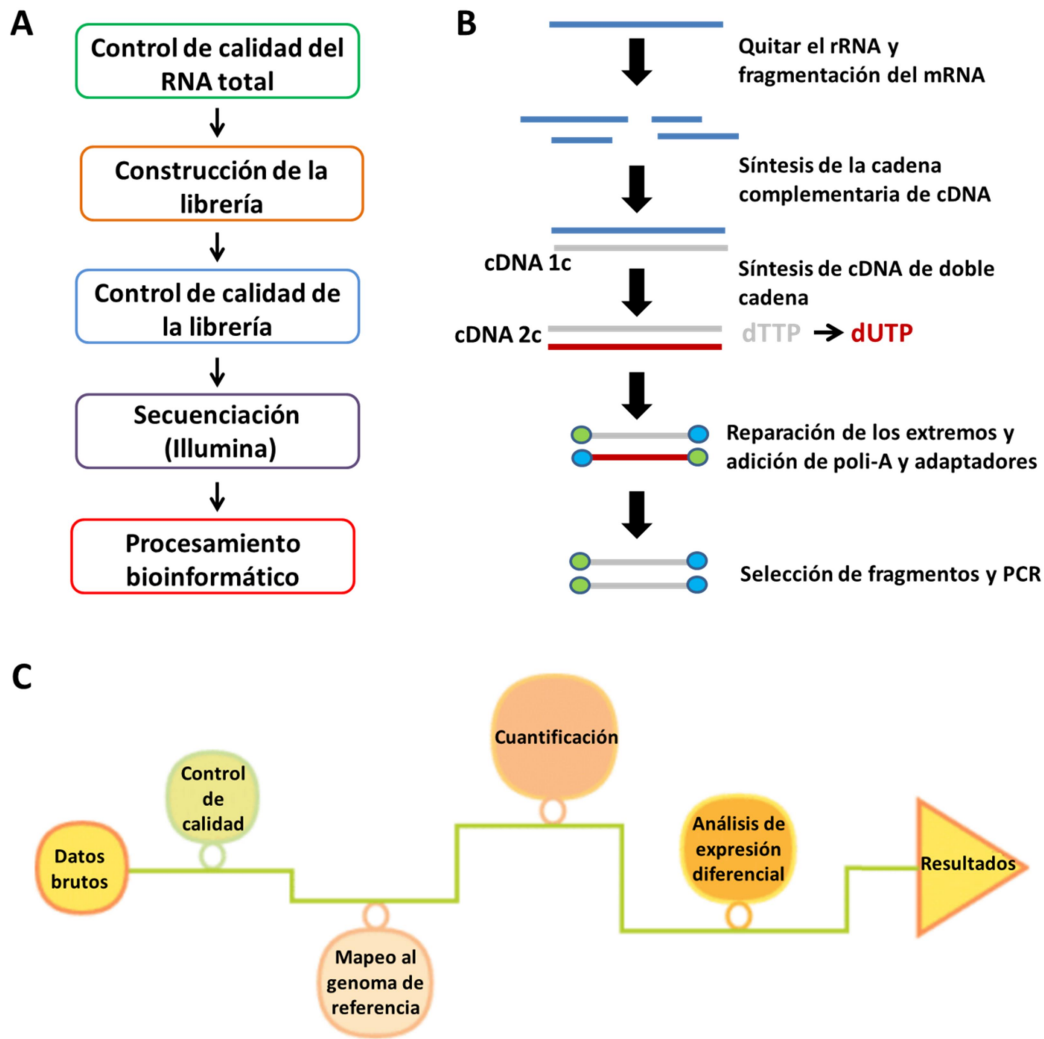


Figura 19. Protocolo seguido en el análisis de RNA-seq. **A)** Pasos generales en un experimento de RNA-seq. **B)** Preparación de la librería. En primer lugar, se quitaron los rRNAs y se fragmentaron los mRNAs. Posteriormente, se retrotranscribieron los RNAs, obteniendo cDNAs de una cadena (cDNA 1c). Tras ello, se sintetizaron las cadenas complementarias de los cDNAs dando lugar a cDNAs de doble cadena (cDNA 2c) cuya nueva cadena presenta uracilo en lugar de timina, y se purificaron utilizando *AMPure XP beads*. Los extremos de los cDNAs fueron reparados y poliadenilados y se les añadieron secuencias adaptadoras. Después, se seleccionaron por tamaño (250-300 pb) mediante *AMPure XP beads* y las cadenas de uracilo fueron degradadas por la enzima USER. Finalmente, las cadenas restantes se amplificaron por PCR y se purificaron mediante *AMPure XP beads*. **C)** Procesamiento bioinformático para la obtención de los datos de RNA-seq.

II.17 Ensayo de β -galactosidasa

Para cuantificar la actividad β -galactosidasa específica en una estirpe determinada de *M. xanthus*, se crecieron cultivos en la oscuridad hasta una $DO_{550} \sim 0,4$ en 10 ml de CTT más el antibiótico y el inductor correspondientes, y se expusieron a la luz durante 8-24 h. Se recogió 1 ml de cada cultivo mediante centrifugación y los

pellets celulares se resuspendieron en tampón Z y se guardaron a -80 °C hasta su procesamiento. Justo antes de ser procesadas, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se pusieron en hielo. Las células se rompieron mediante un tratamiento con SDS/cloroformo (Griffith & Wolf, 2002). El ensayo de actividad β -galactosidasa se llevó a cabo a 33 °C (Miller, 1972). La concentración de proteínas se midió según Lowry *et al.* (1951). La actividad β -galactosidasa específica se expresa en nanomoles de o-nitrofenol (que se genera por rotura enzimática del sustrato ONPG) producidos por minuto y miligramo de proteína, siguiendo la ecuación:

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

El coeficiente de extinción del σ -nitrofenol es 213, que 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* es el tiempo de incubación en minutos a 33 °C antes de parar la reacción.

II.18 Extracción de lípidos totales y análisis por LC-MS/MS

Para extraer los lípidos totales de una estirpe determinada de *M. xanthus* se crecieron cultivos en 250 ml de CTT hasta una $DO_{550} \sim 0,7-1$. Las células se recogieron por centrifugación a 22000 g durante 20 min a 4 °C y se guardaron a -80 °C hasta su utilización. Los lípidos totales se extrajeron según el método de Bligh & Dyer (1959). Los pellets celulares se transfirieron a tubos de cristal Pyrex, se resuspendieron en 8 ml de cloroformo:metanol (2:1 v/v) mezclando mediante vórtex y se incubaron durante 1 h en hielo. Transcurrido ese tiempo, se mezclaron con 2 ml de 0,12 M KCl mediante vórtex durante 10 segundos y se centrifugaron durante 5 minutos a 400 g a 4 °C, separándose en tres fases: una fase superior acuosa, una fase intermedia con proteínas y una fase inferior con los lípidos. La fase superior/intermedia se eliminó mediante aspiración con una bomba de vacío, mientras que la fase inferior con los lípidos se pasó a través de un papel de filtro Whatman No. 1 a un nuevo tubo de cristal Pyrex previamente pesado y se secó con nitrógeno (N_2) a 35 °C. Tras ello, el tubo se pesó nuevamente para determinar la masa de los lípidos totales. Los lípidos secos se resuspendieron en cloroformo:metanol (2:1 v/v) hasta una concentración de 10 mg/ml, añadiendo butilhidroxitolueno (BHT; Scharlab) al 0,01% para minimizar la oxidación, y se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

Para analizar las muestras por LC-MS/MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem), tras la extracción de los lípidos totales, los lípidos secos se resuspendieron en 400 µl de cloroformo:metanol (2:1 v/v) con BHT al 0,01%. Posteriormente, se filtraron a través de filtros de PVDF de 0,22 µm (Scharlab). Finalmente, se transfirieron 50 µl de la reacción final a un tubo de cristal color ámbar (1,5 ml *SureStop amber vials*, Thermo Fisher Scientific). El análisis por LC-MS/MS se llevó a cabo en el Servicio de Biología Molecular de la Universidad de Murcia. Para el análisis por LC-MS/MS se utilizó un sistema Agilent que incluye una columna *ZORBAX EclipsePlus C18 reversed-phase* (100 x 2,1 mm, 1,8 µm) y un sistema HPLC 1290 *Infinity II* acoplado a un Q-TOF MS 6550 *iFunnel* con fuente de iones *Jet Stream Technology*. Para la correcta separación e identificación de fosfolípidos, los análisis se realizaron en modo de ionización negativo. Se utilizaron las fases móviles A y B que se corresponden con 60:40 (v/v) acetonitrilo:agua y 90:10 (v/v) isopropanol:acetonitrilo, respectivamente. Además, ambas fases presentan 10 mM de acetato de amonio. Para el análisis de las diferentes especies lipídicas comprendidas en el rango de 100 a 1700 *m/z* se utilizó el *software MassHunter B.05.00*. Los lípidos objeto de estudio se cuantificaron a partir del área bajo la curva del pico correspondiente utilizando *MassHunter*.

II.19 Metilación y siliación de ácidos grasos para su análisis por GC-MS

Para generar los FAMES (*Fatty acid methyl esters*), 1,5 mg de lípidos totales se secaron con N₂ a 35 °C y se sometieron a hidrólisis ácida toda la noche a 55 °C con 1 ml de tolueno y 2 ml de sustancia metilante (1% H₂SO₄ en metanol). Las muestras presentaban una cantidad fija (65 µg) del ácido heptadecanoico (17:0) (Sigma-Aldrich) utilizado como estándar interno, ya que no se encuentra presente en *M. xanthus* (Lorenzen, Ahrendt, *et al.*, 2014). Tras dejar las muestras a temperatura ambiente durante unos minutos, se añadieron 2 ml de solución 0,2 M KHCO₃ para neutralizar el ácido y se mezclaron suavemente con 5 ml de hexano:dietiléter (1:1 v/v) con BHT al 0,01%. Tras ello, se centrifugaron a 500 g durante 2 minutos a 4 °C. La fase de arriba (hexano:éter) se transfirió a un nuevo tubo. La fase de abajo se mezcló nuevamente con 5 ml de hexano:dietiléter (1:1 v/v) y se repitió el proceso, juntando la nueva fase de arriba obtenida con la otra extraída previamente y secándose la mezcla resultante con N₂ a 35 °C. Posteriormente, se procesaron utilizando uno de los dos procedimientos para analizarlas por GC-MS (cromatografía de gases-espectrometría

de masas). En uno de los procedimientos, las muestras se resuspendieron en 100 μ l de hexano y se cargaron en una placa de Cromatografía en capa fina (TLC Silica gel 60, 20 x 20 cm, Merck KGaA) para separar los FAMES del resto de lípidos, utilizando 90:10:1 (por volumen) de hexano:dietiléter:ácido acético glacial como solvente durante 1 h. Después, los lípidos se detectaron mediante tinción con yodo (1% yodo en cloroformo), raspando con una cuchilla la región en la que se encontraban los ácidos grasos y pasándolos inmediatamente a través de un papel de filtro Whatman No. 1. Las muestras se eluyeron con 1 ml de hexano:dietiléter (1:1 v/v) con BHT al 0,01% y 9 ml de hexano:dietiléter (1:1 v/v) en un tubo de cristal limpio, y se secaron con N_2 a 35 °C, resuspendiéndose en 400 μ l de hexano. En el segundo procedimiento (para analizar simultáneamente los O-alkilglicerol (OAGs) derivados de los lípidos éter), las muestras secas (en este caso no se cargan en la placa de TLC) se resuspendieron en 325 μ l de hexano y 75 μ l de *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37 °C durante 1 h. En ambos procedimientos se transfirieron 100 μ l de la reacción final a un tubo de cristal color ámbar (1,5 ml *SureStop amber vials*, Thermo Fisher Scientific). El análisis por GC-MS se llevó a cabo en el Servicio de Instrumentación Científica de la Universidad de Murcia. Para el análisis por GC-MS se utilizó un sistema Agilent 7890B con una columna HP-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m) y un detector selectivo de masas por impacto de electrones 5977B. Los datos obtenidos por GC-MS se analizaron utilizando el *software* Agilent MSD ChemStation (v. F.01.00.1903) con niveles estimados relativos al estándar interno 17:0.

II.20 Complementación química

La complementación química en placa se realizó con el plasmalógeno comercial HsVEPE1 y el lípido éter precursor HsAEPE1 (el cual se sintetizó por encargo). Stocks de estos compuestos en cloroformo (2 mg/ml) se diluyeron en el mismo solvente. Posteriormente, a partir de estas diluciones se añadieron gotas de 10 μ l con 0,25, 1, 5 o 20 nmoles (como control, se añadieron 10 μ l de cloroformo) a placas de CTT. Tras esperar 15 minutos a que se evapore el cloroformo, sobre cada gota se depositaron 6 μ l ($\sim 6 \times 10^7$ células) de la estirpe de *M. xanthus* correspondiente (los cultivos se crecieron hasta una DO_{550} de $\sim 0,9$ y se concentraron 10 veces), y las placas se incubaron durante 24-48 horas en la luz.

Para probar la conversión de HsAEPE1 a HsVEPE1 *in vivo* se realizó complementación química en líquido. Las estirpes de *M. xanthus* correspondientes se

crecieron hasta una $DO_{550} \sim 0,7-0,8$. Posteriormente, se “alimentaron” con HsAEPE1 transfiriendo 10 ml de cada cultivo a un matraz con 274 nmoles de HsAEPE1 (previamente secado con N_2 a 35 °C para eliminar el cloroformo). Tras 8 horas de incubación a 33 °C en la oscuridad, las células se recogieron por centrifugación y se guardaron a -80 °C hasta su posterior análisis mediante LC-MS/MS o GC-MS (para GC-MS se procesaron con una cantidad fija (30 µg) del estándar interno 17:0).

II.21 Aislamiento de las fracciones DRM y DSM

Para aislar las fracciones DRM (*detergent-resistant membrane*) y DSM (*detergent-sensitive membrane*) de una estirpe determinada de *M. xanthus* se crecieron cultivos en 120 ml de CTT a 30 °C y en agitación a 250 rpm hasta una $DO_{550} \sim 0,7-1$. Las células se recogieron por centrifugación a 22000 g durante 20 minutos a 4 °C y se guardaron a -80 °C hasta su utilización. Los pellets celulares se resuspendieron en 12,5 ml de tampón A con 1 mM aminobenzamidina, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y *cOmplete™ EDTA free Protease Inhibitor Cocktail* (una pastilla/25 ml de buffer de lisis, Roche). Tras añadir lisozima a una concentración final de 0,04 mg/ml se incubaron 30 minutos a 37 °C. Después, se pasaron cuatro veces por la prensa (*French Press*) y, mediante centrifugación (45 min, 15000 g, 4 °C), se separaron la fracción soluble (FS) del *debris* (restos celulares y proteínas insolubles). Posteriormente, la FS se ultracentrifugó a 200000 g durante 2 h a 4 °C para separar la fracción citosólica (FC) de la fracción membranal (FM). Para la separación de las fracciones DRM/DSM se utilizó el kit *CelLytic MEM Protein extraction* (Sigma-Aldrich). En primer lugar, la FM se resuspendió en 600 µl de tampón de lisis (contiene detergentes como Triton X-100, Brij) y se incubó en un agitador rotativo a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se incubó a 37 °C durante media hora y se centrifugó 3 minutos a 3000 g, separándose las fases en las fracciones DRM y DSM. La DSM se guardó en un eppendorf nuevo y se procedió al lavado de la DRM para quitarle los restos de DSM. Para ello, la DRM se resuspendió en 400 µl de tampón de lavado, se incubó 15 minutos en hielo y otros 15 minutos a 37 °C, se centrifugó a 3000 g y se quitó la fase de arriba correspondiente al tampón de lavado. Este proceso se repitió tres veces. La DSM, los tres lavados y la DRM se guardaron a -20 °C hasta su posterior análisis mediante *Western blot*.

II.22 Microscopía

II.22.1 Preparación y visualización de muestras para microscopía de fluorescencia y DIC

La observación microscópica se llevó a cabo con una muestra de 1 μ l de suspensión celular de la estirpe de *M. xanthus* de interés inmovilizada en una fina capa de TPM (Bretscher & Kaiser, 1978) (10 mM tampón Tris-HCl pH 7,6 - 8 mM MgSO_4 - 1 mM tampón fosfato pH 7,6) con agarosa al 1% (Pronadisa). A algunas muestras, antes de la visualización al microscopio, se les añadió el colorante FM4-64, que tiñe la membrana de las células, a una concentración final de 1 ng/ μ l. Para visualizar la proteína amarilla fluorescente (YFP) se utilizó un filtro con longitudes de onda de excitación/emisión (Ex/Em) de 495/520 nm, mientras que para mCherry o FM4-64 se utilizó un filtro con Ex/Em: 562/624 nm. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital Hamamatsu ORCA-ER, utilizando un microscopio Nikon Eclipse 80i. Las muestras también se visualizaron mediante DIC (*Differential Interference Contrast*) a través de un objetivo 100X Nikon Plan Apo VC DIC. Las imágenes de microscopía de fluorescencia y DIC se procesaron con MetaMorph 4.5 (Universal Imaging Group).

II.22.2 Preparación y visualización de muestras para microscopía confocal

A 1 ml de cultivo de la estirpe de *M. xanthus* de interés se le añadieron 400 μ l de paraformaldehído (PFA) al 4%, incubándose a 4 °C durante 10-20 minutos para fijar las células. Se centrifugaron a máxima velocidad durante 5 minutos, se quitó el PFA y se resuspendieron en 1 ml de PBS 1X. Posteriormente, se centrifugaron a máxima velocidad durante 1 minuto, se quitó el sobrenadante y se repitió el lavado con PBS 1X. Después, se resuspendieron en 50-100 μ l de PBS 1X y se les añadió el colorante fluorescente Hoechst (para teñir el DNA) a una concentración final de 0,001-0,0015 mg/ml, incubando durante 5-15 minutos. Posteriormente, se lavaron dos veces con 1 ml de PBS 1X y, finalmente, se resuspendieron en 50-100 μ l de PBS 1X. La observación al microscopio se realizó con una muestra de 4 μ l de la suspensión celular inmovilizada en una fina capa de agarosa al 0,8-1%.

Las imágenes confocales se realizaron utilizando un microscopio Leica SP8 TCS STED 3X (Leica Microsystems) del servicio de Microscopía Óptica Avanzada del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), con *software* LAS X v 2.0.1. (Leica

Microsystems) para el control de adquisición. Se realizaron cortes ópticos con un objetivo de aceite HC PL APO CS2 100x/1.40 NA (Leica Microsystems), un formato de escaneo de 1024 px x 1024 px, muestreo de 12 bits y zoom 6x. Se obtuvieron imágenes con un láser de luz blanca pulsada; las longitudes de onda utilizadas para la excitación del colorante Hoechst y la proteína YFP fueron 405 y 510, respectivamente. La emisión de la YFP fue detectada por detectores híbridos de tiempo limitado (0,8-6 ns), con un rango de *520-580 nm, mientras que para la detección de Hoechst se utilizó un detector PMT con un rango de detección de 415-495 nm. Las imágenes de Microscopía confocal se procesaron utilizando el *software* FIJI (<https://fiji.sc/>).

II.23 Análisis bioinformático

El contexto genómico y los genes objeto de estudio se analizaron utilizando el *software* Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/Artemis>). La búsqueda regular de proteínas similares a las proteínas objeto de estudio se realizó con el programa BLASTP (Altschul *et al.*, 1997) del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los análisis de comparación de secuencias se llevaron a cabo mediante el programa ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007) del EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/>). Para visualizar y analizar las secuencias obtenidas tras la secuenciación de DNA se utilizó el *software* Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>). Para el análisis del grado de conservación o similitud de las proteínas o secuencia de DNA de interés se utilizó el programa BoxShade (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html). Para realizar la predicción de la topología en la membrana se utilizaron los programas bioinformáticos Tmpred (https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html) y SOSUI (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>). Para la búsqueda de posibles péptidos señal se utilizaron los programas Phobius (<http://phobius.sbc.su.se>), Philius (<http://www.yeastrc.org/philius/pages/philius/runPhilius.jsp>), y SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). Para comparar y encontrar los genes comunes y exclusivos de diferentes muestras procedentes de análisis transcriptómicos se utilizó el *software* Serial List 2.3 (http://serialbasics.free.fr/Serial_List.html). Para realizar un diagrama de Venn a partir de los datos obtenidos con Serial List se utilizó la herramienta *online Venn Diagram Maker Online* (<https://www.meta-chart.com/venn>). Para representar diferentes compuestos químicos se utilizó el programa ChemDraw (<https://www.perkinelmer.com/es/category/chemdraw>). Para analizar los dominios proteicos se utilizó el programa SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Para obtener el logo derivado del alineamiento de varias secuencias se utilizó la herramienta weblogo (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) (Crooks *et al.*, 2004).

III. RESULTADOS

III.1 Caracterización de CarF

El contenido de este apartado deriva del artículo publicado por Gallego-García, Monera-Girona, **Pajares-Martínez et al.** en **Science** (2019), 366(6461), 128-132, doi: 10.1126/science.aay1436, en el que figuro como coautora principal.

Como se comentó en la Introducción, de los elementos conocidos hasta la fecha, CarF es el que muestra una acción más temprana en la respuesta a la luz (Fontes *et al.*, 2003; Galbis-Martínez *et al.*, 2008). Se desconoce cómo CarF contribuye a la detección de la presencia de $^1\text{O}_2$ y de qué manera transduce dicha señal a CarR para provocar su inactivación y la liberación de CarQ. El papel de CarF en la regulación de la carotenogénesis podría estar relacionado con algún cambio en la composición de ácidos grasos de la membrana debido a su similitud, aunque baja, con ciertas desaturasas de ácidos grasos (Fontes *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2009; Shanklin *et al.*, 1997). Uno de los objetivos de esta tesis ha sido profundizar en la vía principal para la percepción y transducción del estímulo luminoso mediada por el $^1\text{O}_2$, y las proteínas CarF, CarR y CarQ.

III.1.1 Análisis de la localización subcelular de CarF mediante microscopía de fluorescencia

Los programas de predicción de dominios transmembranales apuntan a una localización membranal para CarF y, al menos en *E. coli*, la proteína se detecta en la membrana cuando se sobreexpresa (Galbis-Martínez *et al.*, 2008). Sin embargo, los intentos previos de estudiar la localización subcelular de CarF en el propio *M. xanthus* no resultaron exitosos. Así, en los ensayos mediante *Western blot* con anticuerpos policlonales anti-CarF no se detectó ninguna banda en ninguna de las fracciones celulares analizadas (Galbis-Martínez, 2005). Por otro lado, las proteínas quiméricas EGFP-CarF o CarF-EGFP (con la proteína verde fluorescente EGFP fusionada al extremo amino o carboxilo de CarF, respectivamente) expresadas en *M. xanthus* a partir del promotor de la pilina mostraron niveles bajos de fluorescencia y una aparente localización citoplásmica (Galbis-Martínez, 2005). En este trabajo se ha abordado el estudio de la localización subcelular de CarF en *M. xanthus* utilizando una fusión de la proteína amarilla fluorescente (YFP) al extremo C-terminal de CarF (CarF-YFP), expresada bajo el control de un promotor inducible por vanilato (P_{van}) (Iniesta *et al.*, 2012) en un fondo con *carF* delecionado ($\Delta carF$). Como no se dispone de plásmidos autorreplicativos en *M. xanthus*, para la obtención de la estirpe en cuestión es

necesario que el plásmido que expresa la proteína de interés se integre en el genoma por recombinación homóloga a través de un sitio heterólogo (Figura 20A). Para comprobar que la proteína de fusión es funcional, se estudió la capacidad de la estirpe correspondiente de responder o no a la luz, analizando el fenotipo de color en medio sin vanilato y con 0,5 mM vanilato. Mientras que la estirpe parental $\Delta carF$ se mantuvo amarilla en la luz (fenotipo Car^-), la estirpe portadora de la fusión CarF-YFP respondió a la luz sintetizando carotenoides, al igual que la estirpe silvestre, incluso en ausencia de vanilato (Figura 20B). Por lo tanto, CarF-YFP es funcional y basta con los bajos niveles de expresión basal que se producen en ausencia del inductor para que se rescate el fenotipo silvestre.

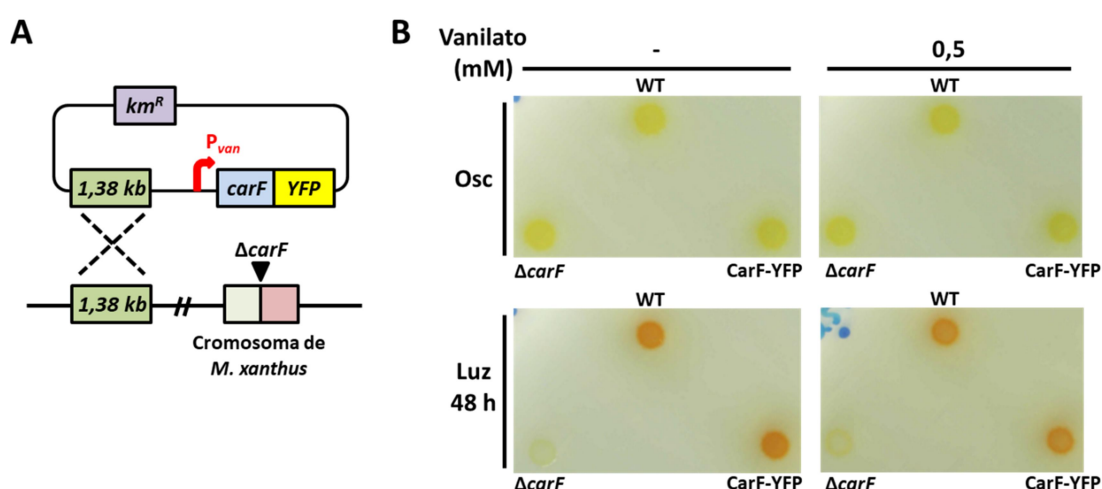


Figura 20. Generación de la estirpe que expresa CarF-YFP y análisis de su funcionalidad. **A)** Esquema del plásmido que expresa CarF-YFP bajo el promotor inducible por vanilato (P_{van}) y de su integración en *M. xanthus* por recombinación homóloga (líneas discontinuas) a través de un sitio heterólogo (región 1,38 kb). Este plásmido también contiene un gen que confiere resistencia al antibiótico kanamicina (km^R). **B)** Análisis de complementación por CarF-YFP. Se muestra el fenotipo de color en oscuridad y en luz, con y sin vanilato, de las estirpes indicadas.

Además, se generó una estirpe control que expresa YFP a partir del promotor P_{van} en el fondo genético $\Delta carF$. Para realizar los estudios de localización subcelular mediante microscopía de fluorescencia, las estirpes que expresan YFP y CarF-YFP se crecieron durante toda la noche sin vanilato. Al día siguiente, cuando se encontraban a una $DO_{550} \sim 0,6$, se añadió vanilato a una concentración final de 0,5 mM. Antes de observar las células al microscopio, se les añadió FM4-64 (a una concentración final de 1 ng/ μ l), un colorante que permite marcar la membrana de las células con fluorescencia roja. A los 30 minutos de incubación, ya pudo observarse la fluorescencia emitida por CarF-YFP, que mostró un patrón de localización subcelular similar al del colorante FM4-64 (Figura 21). Dicha localización membranal debe ser

atribuible a CarF, puesto que la proteína YFP sin fusionar mostró un patrón de localización claramente citoplásmico (en este caso, se necesitaron 6 horas de incubación con el inductor para poder observar una señal de fluorescencia significativa) (Figura 21). Estos resultados permiten demostrar experimentalmente, por primera vez, la localización membranar de CarF en el propio *M. xanthus*.

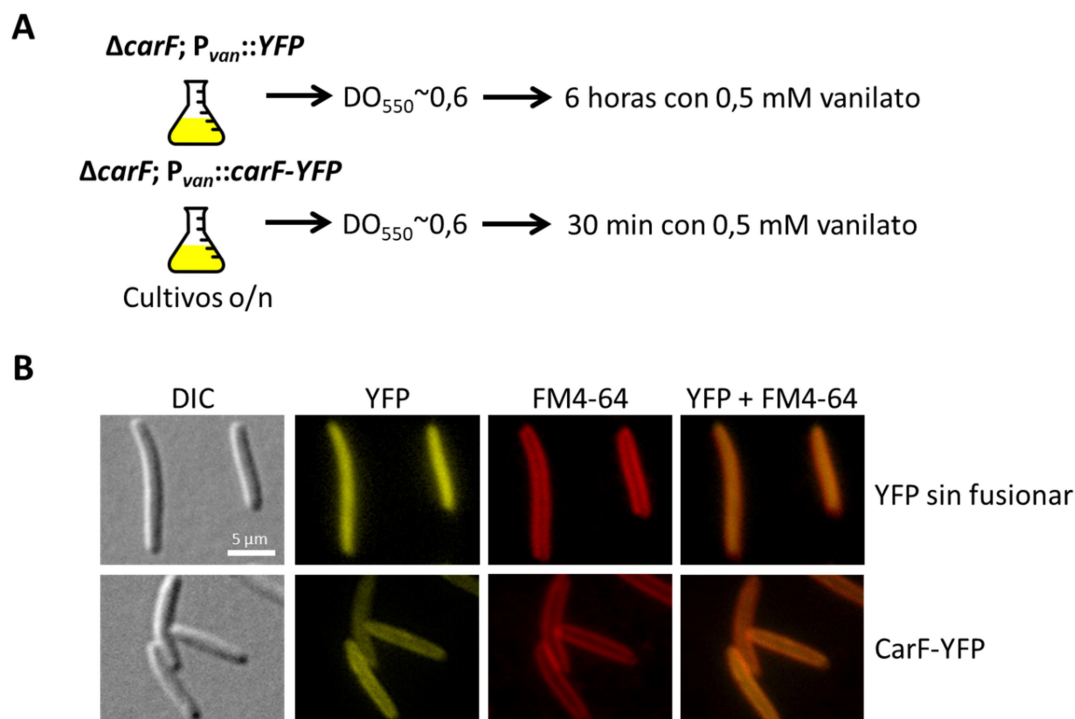


Figura 21. Localización subcelular de CarF. **A)** Protocolo seguido para la obtención de las muestras. Se crecieron cultivos de las estirpes que expresan YFP y CarF-YFP en medio líquido durante toda la noche (*overnight*: o/n). Al día siguiente, cuando alcanzaron una DO₅₅₀ ~0,6, se mantuvieron durante 30 minutos (CarF-YFP) o 6 horas (YFP) con vanilato a una concentración final de 0,5 mM. **B)** Imágenes de DIC (*differential interference contrast*) y de microscopía de fluorescencia de células de las estirpes que expresan YFP (imágenes superiores) y CarF-YFP (imágenes inferiores). En las imágenes de fluorescencia se observa (de izquierda a derecha) YFP o CarF-YFP (en amarillo), FM4-64 (en rojo), y la superposición de ambas fluorescencias.

III.1.2 Análisis de la composición de ácidos grasos en una estirpe carente de CarF

La posición de CarF al principio de la cascada reguladora de la respuesta a la luz, su aparente interacción con CarR (en el sistema del doble híbrido bacteriano), y el fenotipo “ciego” de los mutantes de falta de función en *carF* nos llevó inicialmente a proponer un modelo de acción en el que CarF podría jugar un papel directo en la percepción de la señal luminosa (o del ¹O₂ generado), quizás a través de un mecanismo en el que podrían participar las histidinas conservadas y/o su posible unión a hierro. CarF no se asemeja a ningún fotorreceptor conocido, pero guarda una

III. Resultados

similitud notable (~60%) con las proteínas eucarióticas TMEM189 o Kua presentes en animales, de función desconocida, y una similitud algo menor (~45%) con las proteínas homólogas de plantas (Figura 22).

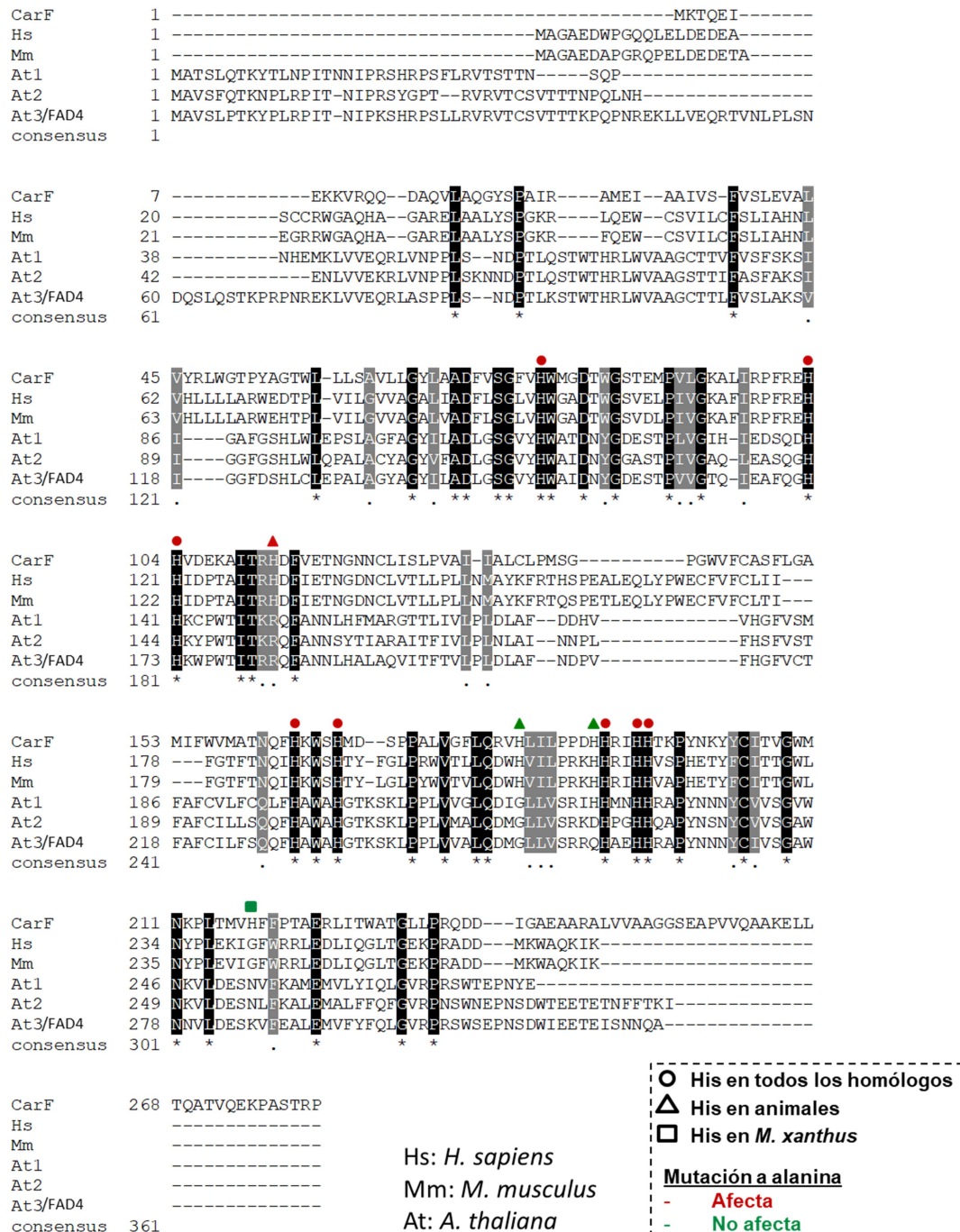


Figura 22. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de CarF con algunos de sus homólogos en animales y plantas: *Homo sapiens* (Hs), *Mus musculus* (Mm) y *Arabidopsis thaliana* (At). Se muestran las histidinas conservadas en todos los homólogos (círculos), aquellas conservadas en CarF y animales (triángulos) y aquellas exclusivas de CarF (cuadrado), especificando si su mutación a alanina afecta (rojo) o no (verde) a la función de CarF.

Como se comentó en la Introducción, un rasgo llamativo de CarF es la presencia de doce histidinas que, en base a su topología de cuatro hélices transmembranales, estarían localizadas en el citoplasma. Nuestro trabajo ha puesto de manifiesto que, de las doce histidinas, nueve de ellas (conservadas en todos los homólogos de animales) son necesarias para la función de CarF (Galbis-Martínez *et al.*, 2008; Gallego-García *et al.*, 2019) (Figura 22). Además, cinco de estas histidinas muestran una disposición que recuerda a los motivos HxxxH (His¹⁶⁴/His¹⁶⁸ en CarF) y HxxHH (His¹⁹¹/His¹⁹⁴/His¹⁹⁵ en CarF) de unión a hierro propios de ciertas desaturasas/hidroxilasas de ácidos grasos (Fontes *et al.*, 2003; Galbis-Martínez *et al.*, 2008; Galbis-Martínez *et al.*, 2012; Thomson *et al.*, 2000). Por otro lado, en los últimos años se ha demostrado que el único homólogo de plantas estudiado, la proteína FAD4 de *A. thaliana*, es una desaturasa de ácidos grasos localizada en el cloroplasto, que genera un doble enlace *trans* en la cadena de ácido graso que ocupa la posición *sn*-2 de un fosfatidilglicerol (Gao *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos la posibilidad de que CarF también funcione como una desaturasa de ácidos grasos. No obstante, de ser así, cabría esperar una especificidad para CarF diferente a la de FAD4, puesto que en *M. xanthus* no se ha descrito el tipo de doble enlace *trans* ni de fosfatidilglicerol generados en *A. thaliana*.

En el genoma de *M. xanthus* se han anotado 16 genes (no se incluye *carF*) como candidatos a determinar desaturasas de ácidos grasos, de acuerdo con su similitud de secuencia con otras desaturasas conocidas (Goldman *et al.*, 2006). La posible redundancia en *M. xanthus* llevó a utilizar un sistema heterólogo, la bacteria *Pseudomonas putida*, para estudiar de manera exitosa la especificidad de varias de estas posibles desaturasas (Ring *et al.*, 2009). Por ello, en un trabajo previo del grupo se probó esta misma estrategia para abordar el estudio de CarF. Sin embargo, no se observó expresión de CarF en *P. putida* con ninguno de los vectores de expresión utilizados, ni siquiera mediante *Western blot*. Ello nos llevó a plantearnos, como un objetivo de este trabajo, su estudio en la propia *M. xanthus*.

Como primera aproximación para determinar si CarF muestra una actividad desaturasa se extrajeron los lípidos totales (apartado II.18) de una estirpe silvestre (WT) y de una estirpe que carece de CarF (Δ *carF*) crecidas en oscuridad. Tras la extracción de los lípidos totales, se procedió a la generación y aislamiento de los ácidos grasos metilados (*fatty acid methyl esters*: FAMES) mediante un proceso de hidrólisis ácida, metilación y cromatografía (apartado II.19). Posteriormente, las muestras se analizaron por GC-MS. Los resultados obtenidos mostraron la ausencia de un pico en la estirpe Δ *carF* que reaparecía en la estirpe WT cuando se

expresaba *carF* bajo el promotor inducible por vanilato (Figura 23A). El análisis del espectro de masas correspondiente a dicho pico reveló que se trataba del compuesto iso15:0-dimetilacetal (i15:0-DMA). El i15:0-DMA deriva de la rotura, durante el proceso de metilación bajo condiciones ácidas, de un tipo especial de lípidos conocidos como plasmalógenos. Los plasmalógenos pertenecen a la clase de fosfoglicerolípidos denominados lípidos éter, porque unen la cadena hidrocarbonada en la posición *sn*-1 del esqueleto del glicerol mediante un enlace éter, en vez del enlace éster de los fosfolípidos convencionales (Figura 23B). Existen dos tipos de lípidos éter: los que presentan un enlace éter (alquil/plasmanil) y los plasmalógenos, que presentan un enlace vinil éter (alquenil/plasmenil), derivado de la desaturación del enlace éter en el precursor plasmanil (Dean & Lodhi, 2018; Oberg *et al.*, 2012) (Figura 23B). Durante el proceso de obtención de los FAMES, el enlace vinil éter se hidroliza para formar un aldehído, que reacciona rápidamente dando lugar a un dimetil acetal (DMA) (Oberg *et al.*, 2012). En general, el espectro de masas de los DMAs obtenido mediante ionización por impacto de electrones muestra dos picos característicos resultantes de su fragmentación, representados en función de su relación masa/carga (m/z). El ión más abundante ($m/z=75$) se corresponde con el grupo DMA escindido de la cadena hidrocarbonada. Dicho pico iónico es el principal identificativo de los DMAs (Timmons *et al.*, 2009). El otro producto importante de la fragmentación de los DMAs se corresponde con la masa molecular del ión parental menos 31 (representado como M-31), que resulta de la pérdida de un grupo metoxi (Oberg *et al.*, 2012). El espectro de masas del compuesto ausente en la estirpe $\Delta carF$ mostró el pico característico de 75 y un pico de 241 (M-31) resultante de restar el grupo metoxi a 272, la masa molecular del i15:0-DMA, un compuesto que deriva del único plasmalógeno que sintetiza *M. xanthus* (Lorenzen, Ahrendt, *et al.*, 2014; Ring *et al.*, 2006). Dicho plasmalógeno, en adelante MxVEPE (de *M. xanthus* vinyl ether phosphoethanolamine o VEPE), contiene una cadena ramificada de 15 carbonos unida por el enlace vinil éter en la posición *sn*-1 [i15(Plasm)], una cadena también ramificada de 15 carbonos unida por un enlace éster en la posición *sn*-2 (i15:0), y fosfoetanolamina (PE) en la posición *sn*-3 (Figura 23C). Así pues, estos resultados indican que CarF es esencial para que se produzca i15:0-DMA en el análisis de FAMES y, por tanto, que se requiere para la producción de plasmalógenos. Además, ponen de manifiesto un papel de los plasmalógenos, hasta ahora desconocido, en la respuesta a la luz de *M. xanthus*.

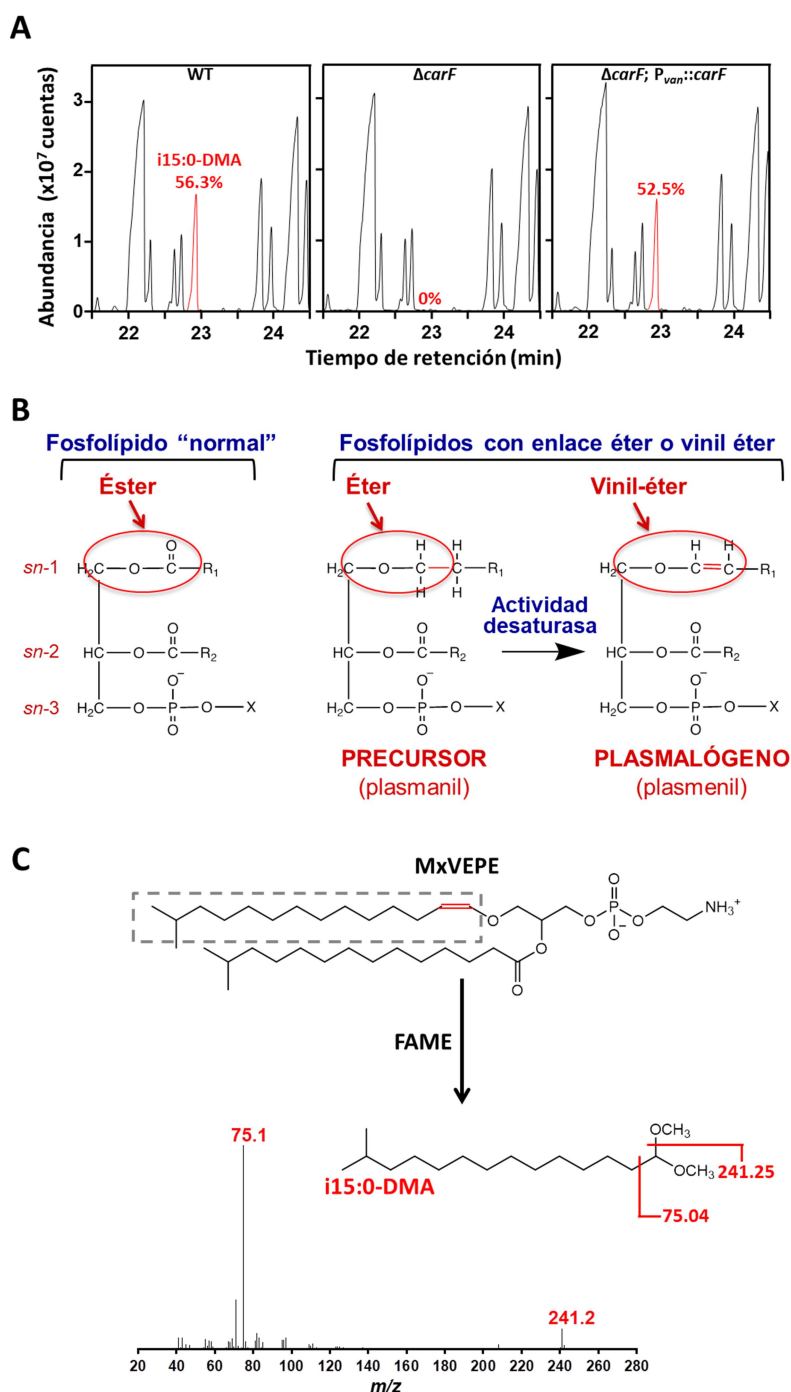


Figura 23. CarF es esencial para la producción del plasmalógeno MxVEPE. **A)** Captura parcial de los cromatogramas obtenidos por GC-MS en los análisis de FAMES a partir de extractos lipídicos totales de las estirpes indicadas de *M. xanthus*. Se marca en rojo el pico correspondiente al i15:0-DMA, indicando su nivel (en porcentaje) relativo a una cantidad fija del estándar interno 17:0. **B)** Comparación de la estructura de un fosfolípido convencional con la de los plasmalógenos, con el enlace vinil éter en la posición *sn*-1, y sus precursores con el enlace éter en dicha posición. **C)** Espectro de masas por impacto de electrones del i15:0-DMA, que deriva del plasmalógeno MxVEPE. El recuadro gris con líneas discontinuas indica la región del MxVEPE que da lugar al i15:0-DMA tras el proceso de metilación. Se muestran los picos característicos resultantes de la fragmentación del i15:0-DMA en función de su relación masa/carga (*m/z*): 75.1 y 241.2. Modificada de Gallego-García *et al.* (2019).

III.1.3 Estudio del papel de ElbD y MXAN_1676 en la biosíntesis de los lípidos con enlace éter y en la respuesta a la luz

Los plasmalógenos se encuentran en animales y algunas bacterias anaerobias pero no están presentes en plantas, hongos, o la mayoría de bacterias aerobias (Braverman & Moser, 2012; Dean & Lodhi, 2018; Goldfine, 2017), exceptuando las mixobacterias (Lorenzen, Ahrendt, *et al.*, 2014; Ring *et al.*, 2006; Stein & Budzikiewicz, 1987). Durante aproximadamente una década, se pensó que las bacterias anaerobias y los animales sintetizaban los plasmalógenos mediante el mismo mecanismo (Goldfine, 2017), pero esto se descartó tras el descubrimiento de que los plasmalógenos de animales se generan por una desaturación dependiente de oxígeno a partir de un precursor con enlace éter (Paltauf & Holasek, 1973; Snyder *et al.*, 1971). Este paso dependiente de oxígeno en la síntesis de los plasmalógenos se conoce desde hace casi 50 años (Wykle *et al.*, 1972), pero la desaturasa de plasmaniletanolamina implicada no había sido identificada (Harayama & Riezman, 2018; Watschinger & Werner, 2013). En las bacterias anaerobias, el enlace vinil éter se genera tras la formación de diacilglicerofoetanolaminas a través de un mecanismo desconocido (Goldfine, 2017). Teniendo en cuenta que *M. xanthus* es una bacteria aerobia, y que la generación del enlace vinil éter de los plasmalógenos en animales requiere una desaturasa y oxígeno, es probable que la ruta de síntesis de plasmalógenos de *M. xanthus* se asemeje en mayor medida a la observada en animales que a la de bacterias anaerobias. De ser así, CarF, que muestra cierta similitud con desaturasas de ácidos grasos y es esencial para la síntesis del plasmalógeno MxVEPE, podría ser la desaturasa que genera el enlace vinil éter a partir del precursor con enlace éter en *M. xanthus*. Cabría esperar, entonces, que la falta de CarF provocase una acumulación del precursor y que mutaciones en genes implicados en pasos anteriores de la ruta, al evitar la síntesis de plasmalógenos, resultasen (al igual que las mutaciones en *carF*) en un fenotipo defectuoso en la respuesta a la luz.

Aunque se han descifrado algunos de los pasos involucrados en la síntesis de lípidos éter en *M. xanthus*, aún quedan muchos otros por determinar. Su biosíntesis requiere la generación previa de ácidos grasos ramificados (iso-FAs), que son la familia dominante de ácidos grasos en las mixobacterias. Los iso-FAs y los lípidos éter están implicados en la formación de los cuerpos fructíferos y la esporulación en *M. xanthus* (Ring *et al.*, 2006). *M. xanthus* presenta dos rutas para llegar al precursor de los iso-FAs, el isovaleril-CoA (Figura 24A). Por un lado, existe una ruta en la que

participa el complejo Bkd (*branched-chain keto acid dehydrogenase*), que degrada aminoácidos ramificados como la leucina, generando isovaleril-CoA (Ring *et al.*, 2006). Por otro lado, *M. xanthus* también produce isovaleril-CoA utilizando una segunda ruta a través del 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) (Bode *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2013; Mahmud *et al.*, 2005). La presencia de mutaciones en ambas rutas resulta en un doble mutante que no puede formar ni agregados ni mixosporas (Bode *et al.*, 2009). Tras la generación del isovaleril-CoA tiene lugar la síntesis de ácidos grasos, generándose el ácido graso ramificado 13-metiltetradecanoico (i15:0) (Figura 24A). A partir del i15:0, y tras una serie de reacciones no del todo conocidas, se ha especulado que podría generarse el precursor lípido éter o alquil éter fosfatidiletanolamina (AEPE) o plasmaniletanolamina (en adelante MxAEPE) que, por acción de una desaturasa por determinar, daría lugar a MxVEPE (Ring *et al.*, 2006) (Figura 24A). A partir de MxAEPE se produciría también la biosíntesis de triglicéridos con enlace éter como el TG-1, que señala la formación de los cuerpos fructíferos y la esporulación, y que solo es sintetizado bajo condiciones de ayuno (Lorenzen, Ahrendt, *et al.*, 2014; Ring *et al.*, 2006) (Figura 24A).

En mamíferos, los pasos específicos que llevan a la formación del enlace éter tienen lugar en el peroxisoma y la desaturación que genera el enlace vinil éter ocurre en el retículo endoplasmático (Dean & Lodhi, 2018) (Figura 24B). En el peroxisoma, la enzima DHAPAT (*dihydroxyacetone phosphate acyltransferase*) convierte el fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) en 1-acil-DHAP, que por acción de ADHAPS (*alkyldihydroxyacetone phosphate synthase*) se convierte en 1-O-alquil-DHAP, ya con el enlace éter. Para ello, ADHAPS utiliza un alcohol graso generado por FAR1 (*fatty acyl-coA reductase*) a partir de un ácido graso. El 1-O-alquil-DHAP es traslocado al retículo endoplasmático, donde tienen lugar varios pasos hasta generar los glicerolípidos éter con fosfoetanolamina y la posterior desaturación que produce los plasmalógenos.

La búsqueda en el genoma de *M. xanthus* de genes cuyos productos mostrasen similitud con los de los genes humanos implicados en la síntesis de lípidos éter suministró como primer candidato al gen *MXAN_1676* (cuyo producto, una proteína de 631 aminoácidos, muestra un 46% de identidad con la enzima humana ADHAPS). Sin embargo, la mutación por interrupción génica de *MXAN_1676* apenas produjo reducción en el contenido de lípidos éter, lo que sugirió la existencia de una ruta alternativa (Lorenzen, Ahrendt, *et al.*, 2014) (Figura 24A). Una nueva búsqueda, centrada en dominios aciltransferasa, llevó al descubrimiento de otro gen, *MXAN_1528* o *elbD* (de *ether lipid biosynthesis*), cuya mutación por interrupción génica sí provocó

una disminución significativa en la cantidad de lípidos éter (Lorenzen, Ahrendt, *et al.*, 2014) (Figura 24A). ElbD es una proteína multifuncional de 1470 aminoácidos que consta de cuatro dominios: un dominio *FAR-like*, un dominio *long-chain fatty acid CoA synthase*, un dominio *acyl carrier protein* y un dominio *DHAPAT-like* (Lorenzen, Ahrendt, *et al.*, 2014) (Figura 24C). Además de atribuirle un papel en la síntesis de los lípidos éter, se ha especulado que ElbD también podría ser la enzima encargada de generar el enlace vinil éter (Lorenzen, Ahrendt, *et al.*, 2014). En *M. xanthus*, el gen *elbD* se encuentra formando parte de un operón (*MXAN_1531-1527* o *elbA-elbE*) con otros cuatro genes, cuyo papel en la formación de lípidos éter no está claro (Lorenzen, Ahrendt, *et al.*, 2014). Por otro lado, el gen *MXAN_1676* se encuentra formando parte de un operón (*MXAN_1676-1674*) con otros dos genes, cuya función se desconoce (Figura 24C).

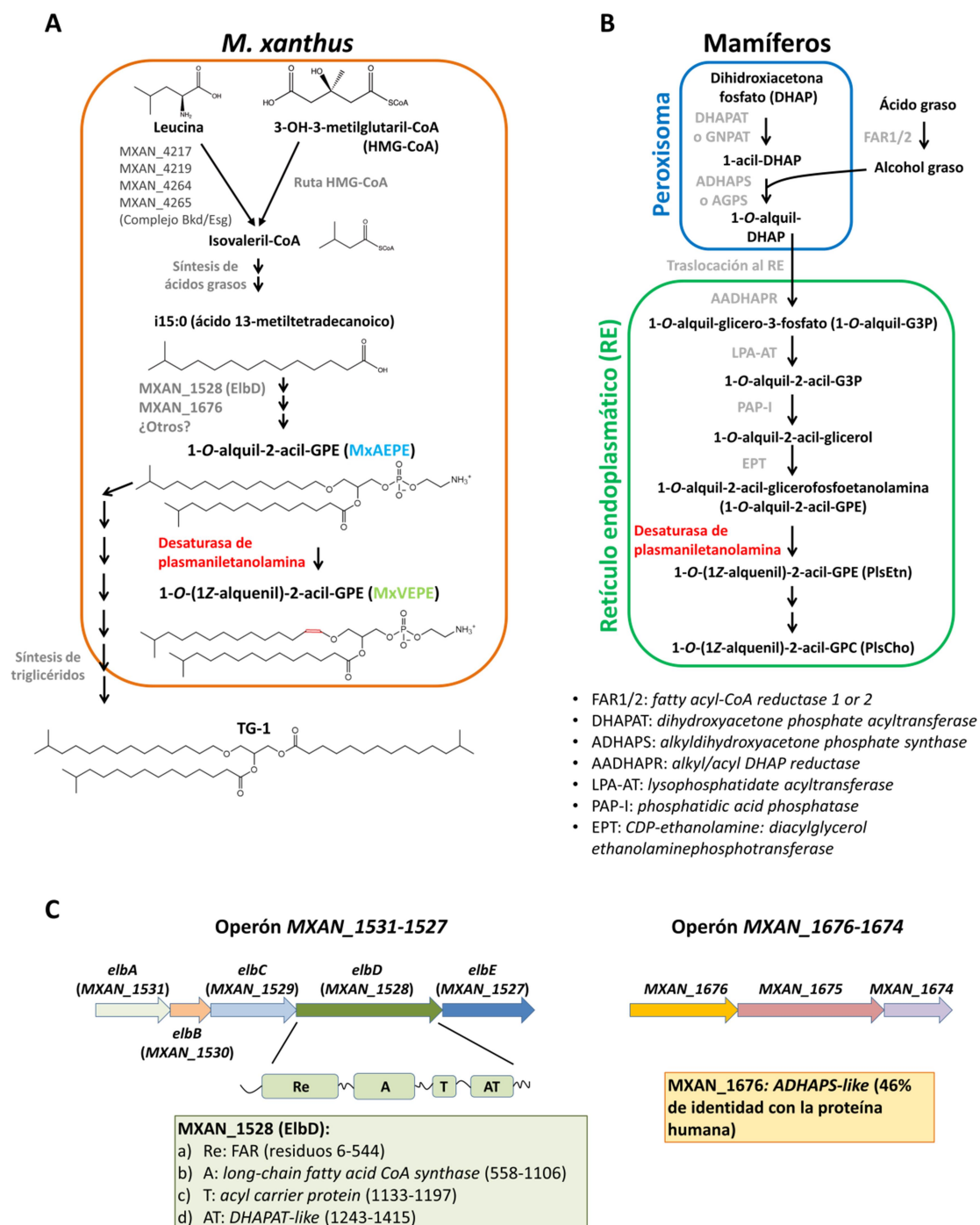


Figura 24. Biosíntesis de lípidos éter y plasmalógenos en *M. xanthus* y en mamíferos. A) Rutas de síntesis a partir de leucina o HMG-CoA del precursor de los ácidos grasos iso (iso-FAs), el isovaleril-CoA, a partir del cual se genera el i15:0, y participación de ElbD y MXAN_1676 en la síntesis de MxAEPE, el supuesto precursor de MxVEPE. La generación de MxVEPE a partir de MxAEPE requeriría la acción de una desaturasa de plasmaniletanolamina. También se muestra el lípido éter TG-1, que se genera supuestamente a partir de MxAEPE. Modificada de Gallego-García *et al.* (2019). **B)** Ruta de síntesis de los lípidos éter y los plasmalógenos en mamíferos. Modificada de Gallego-García *et al.* (2019). **C)** Contexto genómico de los genes *elbD* y MXAN_1676. Se muestran los dominios característicos de ElbD y MXAN_1676. Modificada de Lorenzen, Ahrendt, *et al.* (2014).

III.1.3.1 Generación y análisis fenotípico de los mutantes $\Delta elbD$ y $\Delta 1676$

Puesto que el gen *elbD* y, en menor medida, *MXAN_1676*, participan en la ruta de biosíntesis de MxVEPE, a través de dos rutas paralelas, y nuestros datos apuntan a que MxVEPE se requiere para la respuesta a la luz, se investigó la implicación de *elbD* y *MXAN_1676* en dicha respuesta. En lugar de las interrupciones génicas usadas en el estudio previo (Lorenzen, Ahrendt, *et al.*, 2014), que pueden tener efectos polares sobre los genes contiguos del operón, se realizaron delecciones en fase de *elbD* ($\Delta elbD$), *MXAN_1676* ($\Delta 1676$) o ambos ($\Delta elbD \Delta 1676$). En el diseño de las delecciones, se amplificaron las regiones aguas arriba y abajo de la región a deleccionar, incluyendo los 30 primeros nucleótidos de la región codificante de *elbD* (que consta de 4413 nucleótidos), y los 30 primeros nucleótidos del inicio y del final de la región codificante de *MXAN_1676* (que consta de 1896 nucleótidos). Una vez obtenidos los plásmidos correspondientes (portadores de las regiones aguas arriba y aguas abajo del gen a deleccionar más los nucleótidos del gen no eliminados) (Figura 25A), se procedió a la obtención de las estirpes mutantes siguiendo el procedimiento explicado en el apartado II.11, que implica un primer paso de obtención de merodiploides. Tras la generación de los tres mutantes, se compararon sus fenotipos en oscuridad y en luz con el de la estirpe silvestre (WT) y el de la estirpe mutante $\Delta carF$. Para ello, en primer lugar, se realizó un ensayo cualitativo mediante el análisis del cambio de color de los cultivos en medio sólido. Mientras que los mutantes con las delecciones individuales ($\Delta elbD$ y $\Delta 1676$) mostraron un color rojizo en la luz, que parecía algo menos intenso para $\Delta elbD$ que para $\Delta 1676$ o la estirpe silvestre, el doble mutante $\Delta elbD \Delta 1676$ fue incapaz de responder a la luz (fenotipo Car^-), como sucede con la estirpe $\Delta carF$ (Figura 25B). Resultados similares se obtuvieron en los ensayos cuantitativos de la respuesta a la luz, basados en la medida de la actividad β -galactosidasa derivada de la expresión de la fusión *carB::lacZ*, en la que el gen *lacZ* se encuentra bajo el control del promotor P_B , que regula la expresión de los genes carotenogénicos. Relativo al WT, el mutante $\Delta elbD$ mostró una actividad un ~60% menor; el mutante $\Delta 1676$, un 20% menor; y el doble mutante $\Delta elbD \Delta 1676$ presentó una actividad tan baja como la estirpe $\Delta carF$, mostrando niveles basales de expresión (no fotoinducción) (Figura 25C).

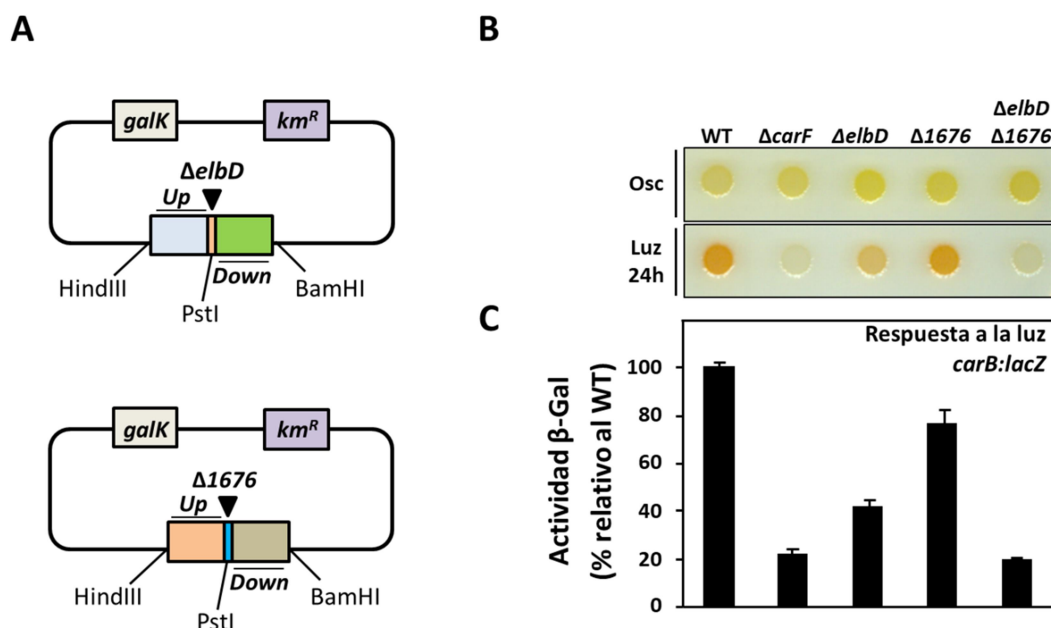


Figura 25. Generación y análisis fenotípico de los mutantes *ΔelbD*, *Δ1676* y del doble mutante *ΔelbD* *Δ1676*. **A)** Esquemas de los plásmidos para deletar *elbD* y *MXAN_1676*. Se muestra la región aguas arriba (*up*) y aguas abajo (*down*) de los genes *elbD* y *MXAN_1676*. Estos plásmidos también presentan un gen que proporciona resistencia a kanamicina (*km^R*), y el gen *galK* utilizado para la selección negativa (véase Materiales y Métodos). Se indican los sitios de restricción empleados. **B)** Fenotipo de color de las estirpes de *M. xanthus* indicadas crecidas en oscuridad y en luz durante 24 horas. **C)** Medida de la actividad β-galactosidasa (β-Gal) del promotor P_B (fusión *carB::lacZ*) en condiciones de luz de las estirpes de *M. xanthus* indicadas. La actividad β-Gal se muestra como la media y los errores estándar de tres réplicas biológicas. Los niveles se muestran relativos a los del WT, que se ajustaron al 100%. Modificada de Gallego-García *et al.* (2019).

III.1.3.2 Estudio de la síntesis de lípidos éter por GC-MS en los mutantes *ΔelbD* y *Δ1676*

Para correlacionar los datos anteriores con los contenidos de lípidos éter y MxVEPE, y para inferir el paso en la biosíntesis de plasmalógenos en el que actúa CarF, se analizaron los FAMES de los mutantes sencillos *ΔelbD* y *Δ1676*, y del doble mutante *ΔelbD* *Δ1676*, por GC-MS. En este tipo de análisis, como se ha comentado anteriormente, el MxVEPE se detecta a través de su derivado i15:0-DMA. Por otro lado, todos los glicerolípidos que presenten un i15:0 unido por enlace éter en la posición *sn*-1 generarán un iso15:0-O-alkilglicerol (i15:0-OAG) tras el proceso de hidrólisis ácida y metilación, que se detecta como un iso15:0-O-alkilglicerol bistrimetilsilil éter (i15:0-OAG-bisTMS) tras un paso de bistrimetilsililación (Figura 26A). Mientras que el i15:0-DMA detectado en el análisis de FAMES procede exclusivamente del MxVEPE, el i15:0-OAG-bisTMS puede proceder del MxAEPE y de otros glicerolípidos con enlace éter como el TG-1 (Hoiczyk *et al.*, 2009; Lorenzen, Ahrendt,

et al., 2014; Lorenzen, Bozhüyük, et al., 2014; Ring et al., 2006). Los resultados obtenidos por GC-MS mostraron que el doble mutante $\Delta elbD \Delta 1676$ no presenta ni i15:0-DMA ni i15:0-OAG-bisTMS. Sin embargo, ambos compuestos se observaron en niveles bajos en la estirpe $\Delta elbD$, y en cantidades cercanas a un silvestre en la estirpe $\Delta 1676$. Por último, en la estirpe $\Delta carF$ la falta de i15:0-DMA fue acompañada de un aumento en la cantidad de i15:0-OAG-bisTMS (Figura 26B). Estos resultados indican que la respuesta a la luz correlaciona con los niveles de plasmalógenos y que CarF actúa aguas abajo de ElbD y MXAN_1676 en la ruta de biosíntesis de plasmalógenos.

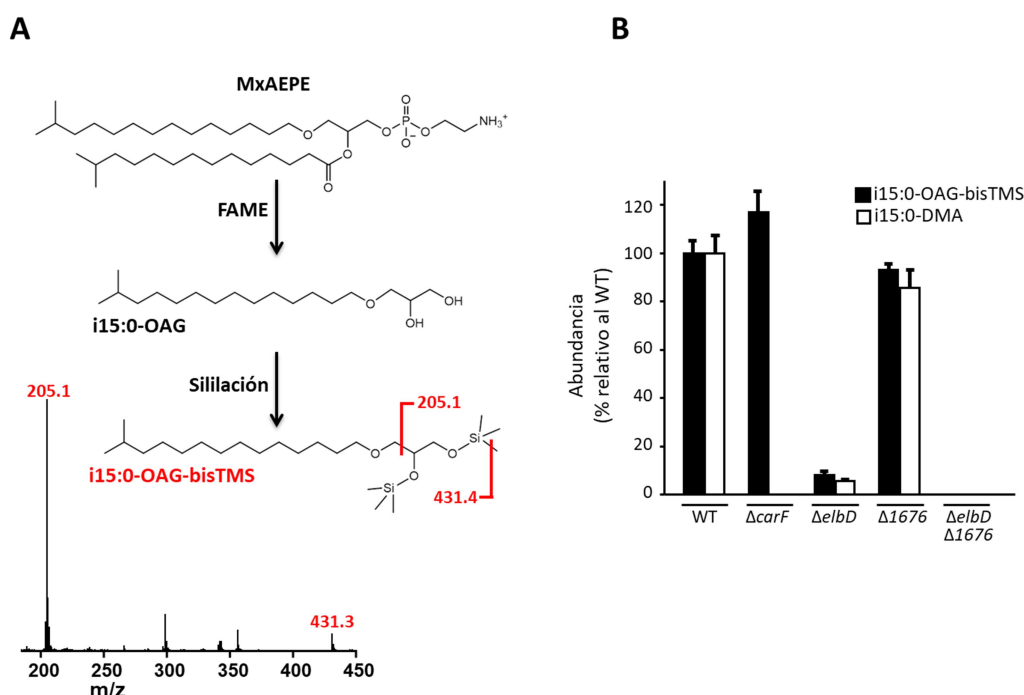


Figura 26. Análisis de la implicación de ElbD y MXAN_1676 en la síntesis de lípidos éter por GC-MS. A) Espectro de masas por impacto de electrones del i15:0-OAG-bisTMS, que puede derivar de MxAEPE u otros glicerolípidos con enlace éter. Se muestran los picos característicos resultantes de la fragmentación del i15:0-OAG-bisTMS en función de su relación masa/carga (m/z): 205 y 431. **B)** Análisis de FAMES de las estirpes de *M. xanthus* indicadas, representando la abundancia relativa del i15:0-DMA (MxVEPE) y del i15:0-OAG-bisTMS (glicerolípidos con enlace éter). La abundancia relativa de i15:0-OAG-bisTMS y de i15:0-DMA se muestra como la media y los errores estándar de tres réplicas biológicas. Los datos se han normalizado en base a una cantidad fija del estándar interno 17:0 y los niveles del WT se ajustaron al 100%. Modificada de Gallego-García et al. (2019).

III.1.3.3 Estudios de complementación de los mutantes $\Delta elbD$ y $\Delta 1676$

Para corroborar que los fenotipos observados en los mutantes se debían a la falta exclusivamente del gen deletado y no a un efecto polar, se generaron estirpes de *M. xanthus* que expresan ElbD o MXAN_1676, bajo un promotor inducible por

vanilato, en el fondo genético $\Delta elbD \Delta 1676$ (Figura 27A). Con dichas estirpes se estudió la capacidad de responder o no a la luz analizando el fenotipo de color en presencia de vanilato (para inducir la expresión de ElbD y MXAN_1676) y, como puede observarse en la Figura 27B, ambas estirpes mostraron una coloración rojiza en la luz. Que tanto la expresión de ElbD como la de MXAN_1676 complementen el fenotipo Car⁻ del doble mutante es consistente con que cada una de las dos enzimas participe en una ruta independiente para la síntesis de lípidos éter. También en el análisis de FAMES, la expresión de ElbD o de MXAN_1676 en el doble mutante $\Delta elbD \Delta 1676$ dio lugar a la reaparición de los glicerolípidos con enlace éter y de los plasmalógenos (Figura 27C). Por lo tanto, cabe concluir que los fenotipos asociados a las deleciones se deben exclusivamente a la falta del gen delecionado.

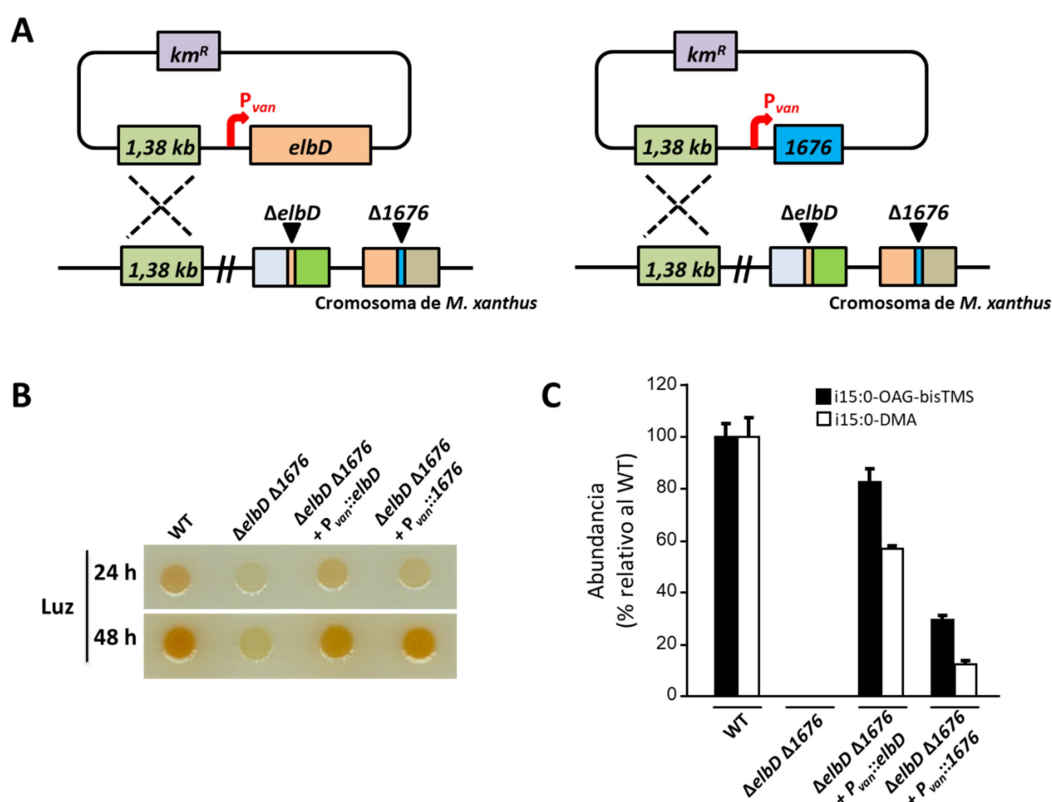


Figura 27. Generación de las estirpes que expresan ElbD y MXAN_1676 en el doble mutante $\Delta elbD \Delta 1676$ y análisis de complementación. **A)** Esquemas de los plásmidos que expresan ElbD y MXAN_1676 bajo el promotor inducible por vanilato (P_{van}) y de su integración en *M. xanthus* por recombinación homóloga (líneas discontinuas) a través de la región 1,38 kb. **B)** Análisis del fenotipo de color de las estirpes de *M. xanthus* indicadas crecidas en luz durante 24 y 48 horas en placas con 0,5 mM de vanilato. **C)** Análisis de FAMES de las estirpes indicadas. La abundancia relativa del i15:0-DMA y del i15:0-OAG-bisTMS se muestra como la media y los errores estándar de tres réplicas biológicas. Los datos se han normalizado en base a una cantidad fija del estándar interno 17:0 y los niveles del WT se ajustaron al 100%. Modificada de Gallego-García *et al.* (2019).

III.1.3.4 Estudio de la síntesis de lípidos éter por LC-MS/MS en los mutantes $\Delta elbD$ y $\Delta 1676$

Para analizar directamente los compuestos MxVEPE y MxAEPE (sin contaminación por el resto de glicerolípidos con enlace éter) en los mutantes en *elbD* o *MXAN_1676*, se utilizó la técnica de LC-MS/MS (Figura 28; apartado II.18). Se analizaron extractos de lípidos totales de la estirpe silvestre, del mutante $\Delta carF$, del doble mutante $\Delta elbD \Delta 1676$ y del triple mutante $\Delta carF \Delta elbD \Delta 1676$. Los resultados obtenidos mostraron la pérdida de MxVEPE y MxAEPE en el doble mutante $\Delta elbD \Delta 1676$ y en el triple mutante $\Delta carF \Delta elbD \Delta 1676$. Sin embargo, en la estirpe $\Delta carF$ solo desapareció MxVEPE, y los niveles de MxAEPE aumentaron diez veces en comparación con la estirpe silvestre (Figura 28C).

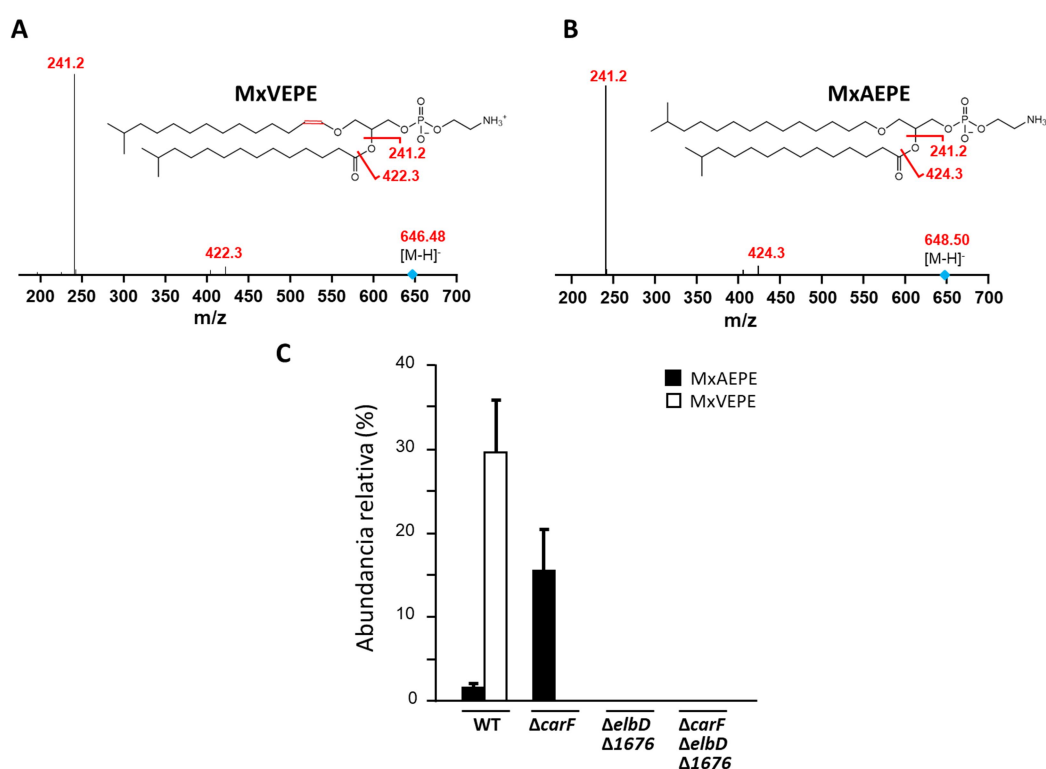


Figura 28. Análisis por LC-MS/MS de MxVEPE y MxAEPE en *M. xanthus*. Espectros de fragmentación de MxVEPE (A) y MxAEPE (B) obtenidos de extractos de lípidos totales de *M. xanthus* analizados por LC-MS/MS. Se indica la posición del ión parental mediante un diamante azul. C) Abundancia relativa de MxVEPE y MxAEPE para las estirpes de *M. xanthus* indicadas y mostrada como la media y los errores estándar de tres réplicas biológicas, que se han calculado a partir del área del pico correspondiente respecto al área del pico mayoritario (i15:0 PE). Modificada de Gallego-García *et al.* (2019).

Estos resultados corroboran los datos obtenidos en el análisis por GC-MS y confirman la implicación de *ElbD* y *MXAN_1676* en la biosíntesis de los lípidos éter.

Por otro lado, demuestran que CarF se requiere específicamente para la síntesis de los plasmalógenos, lo que supone un fuerte apoyo a la hipótesis de que CarF es la desaturasa de plasmaniletanolamina, es decir, la desaturasa que genera el enlace vinil éter.

III.1.3.5. Estudio de complementación química con lípidos éter humanos

Los resultados mostrados hasta ahora sugieren que los plasmalógenos, pero no sus precursores con enlace éter, juegan un papel clave en la respuesta a la luz de *M. xanthus* y que CarF se requiere en dicha respuesta porque se trata de la enzima que convierte el enlace éter en vinil éter. Para demostrar que la respuesta a la luz depende directamente de la presencia de los plasmalógenos, se realizaron experimentos de complementación química, utilizando un plasmalógeno comercial que normalmente se produce en el ser humano. Dicho plasmalógeno (en adelante, HsVEPE1) contiene una cadena 18(Plasm) en la posición *sn*-1 (una cadena de 18 carbonos unida por el enlace vinil éter), una cadena 18:1 en la posición *sn*-2 (una cadena de 18 carbonos, con un doble enlace interno, unida por el enlace éster) y PE (fosfoetanolamina) en la posición *sn*-3 (Figura 29A). Además del HsVEPE1, se utilizó el que debería ser su compuesto precursor inmediato en humanos, HsAEPE1, sintetizado por encargo (Avanti Lipids) y que presenta el enlace éter en lugar del enlace vinil éter en la posición *sn*-1 (Figura 29A).

Los experimentos de complementación química para analizar el fenotipo de color se realizaron depositando alícuotas con concentraciones crecientes de HsVEPE1 o HsAEPE1 (disueltos en cloroformo) sobre el medio sólido. Una vez evaporado el cloroformo (15 minutos fueron suficientes), se depositaron en la misma posición alícuotas de cultivos de las estirpes $\Delta carF$, $\Delta elbD \Delta 1676$ y $\Delta carF \Delta elbD \Delta 1676$ de *M. xanthus*. Como puede observarse en la Figura 29B, la adición de HsVEPE1 fue capaz de rescatar el fenotipo silvestre en las tres estirpes analizadas. Estos resultados indican que *M. xanthus* es capaz de incorporar el plasmalógeno humano y utilizarlo como el suyo propio en la respuesta a la luz, a pesar de las diferencias entre HsVEPE1 y MxVEPE en la longitud (18 carbonos en humanos frente a 15 en *M. xanthus*) y en la estructura de las cadenas hidrocarbonadas de la posición *sn*-1 y *sn*-2. Por otro lado, cuando se añadió HsAEPE1, solo la estirpe $\Delta elbD \Delta 1676$ (que tiene el gen *carF* funcional) recuperó la capacidad de responder a la luz (Figura 29C). Además, en los análisis por GC-MS de las estirpes “alimentadas” en medio líquido con HsAEPE1, se observó la presencia tanto de 18:0-DMA como de 18:0-OAG (ninguno

de los cuales están presentes de manera natural en *M. xanthus*) en la estirpe $\Delta elbD \Delta 1676$, pero solo de 18:0-OAG en la estirpe $\Delta carF \Delta elbD \Delta 1676$ (Figura 29D); y en el análisis por LC-MS/MS se observó la presencia de un compuesto con las características del HsAEPE1 tanto en la estirpe $\Delta elbD \Delta 1676$ como en la estirpe $\Delta carF \Delta elbD \Delta 1676$, pero solo se observó un compuesto con las características del HsVEPE1 en la estirpe $\Delta elbD \Delta 1676$ (Figura 29E y F). Así pues, *M. xanthus* es capaz de captar el precursor con enlace éter humano y convertirlo, solo si CarF está presente, en el correspondiente plasmalógeno, a pesar de las diferencias entre el precursor endógeno y el suministrado exógenamente. En su conjunto, estos resultados confirman que los plasmalógenos son directamente responsables de que *M. xanthus* pueda responder a la luz, poniendo de manifiesto un papel señalizador para estos lípidos desconocido hasta la fecha. Además, suponen una prueba contundente de que CarF es la enzima que introduce el doble enlace en los lípidos con un enlace éter. Estas observaciones, junto con los resultados derivados de experimentos realizados por otros investigadores en el grupo, han permitido determinar que CarF es, desde bacterias hasta humanos, la desaturasa de plasmaniletanolamina buscada durante décadas (Gallego-García *et al.*, 2019).

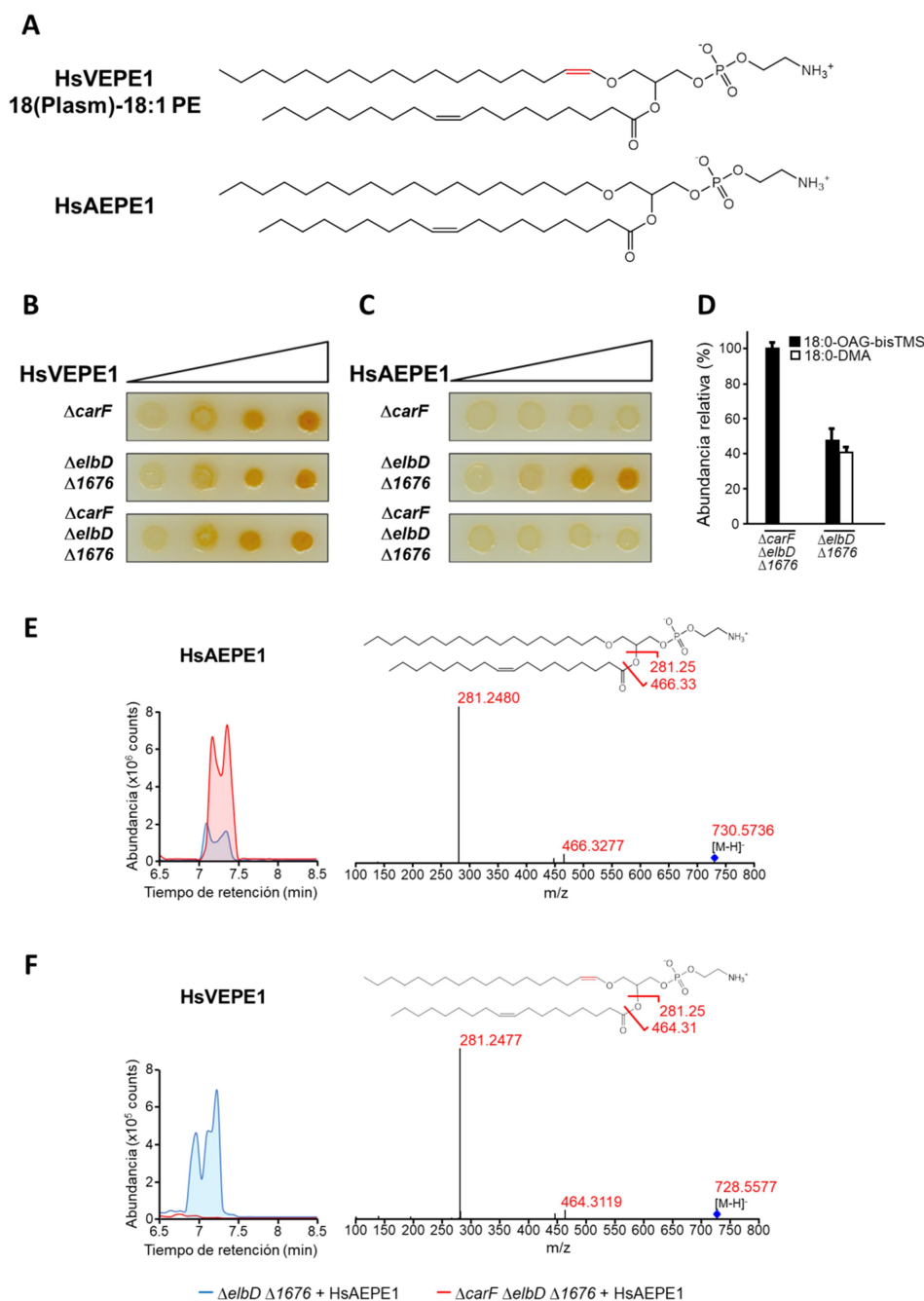


Figura 29. La respuesta a la luz de *M. xanthus* depende directamente de los plasmalógenos, y *M. xanthus* es capaz de utilizar los plasmalógenos humanos para responder a la luz. A) Estructuras químicas de HsVEPE1 y HsAEPE1. **B y C)** Análisis de la respuesta a la luz de diferentes estirpes de *M. xanthus* complementadas con HsVEPE1 (**B**) y HsAEPE1 (**C**). **D)** Análisis de FAMES de las estirpes indicadas. La abundancia relativa del 18:0-DMA y del 18:0-OAG-bisTMS se muestra como la media y los errores estándar de tres réplicas biológicas. Los datos se han normalizado en base a una cantidad fija del estándar interno 17:0 y los niveles del WT se ajustaron al 100%. **E y F)** Análisis de LC-MS/MS de estirpes de *M. xanthus* complementadas con HsAEPE1. Cromatograma de ión extraído (izquierda) y espectro de fragmentación (derecha) de HsAEPE1 (**E**) y HsVEPE1 (**F**) obtenidos utilizando extractos de lípidos totales de las estirpes de *M. xanthus* $\Delta elbD \Delta 1676$ o $\Delta carF \Delta elbD \Delta 1676$ complementadas con HsAEPE1. La posición del ión parental se indica mediante un diamante azul. Modificada de Gallego-García *et al.* (2019).

III.2 Caracterización de CarQ y CarR

Como se ha comentado en la Introducción, CarR es un factor anti- σ atípico en cuanto a que contiene seis hélices transmembranales y carece del motivo ZAS característico de muchos factores anti- σ (Galbis-Martínez *et al.*, 2012). Aunque no se ha demostrado, algunos trabajos han sugerido que CarR se inactiva en la luz mediante un proceso de proteólisis, liberando a CarQ y activando la transcripción de los genes carotenogénicos (Browning *et al.*, 2003; Gorham *et al.*, 1996). Por ello, uno de los objetivos de la tesis ha sido estudiar si la liberación de CarQ ocurre por la inactivación de CarR mediante un proceso de degradación, como ocurre con algunos factores anti- σ . Para ello, se ha analizado la localización subcelular de CarQ y CarR mediante el uso de fusiones a proteínas fluorescentes, así como la estabilidad de CarR, en oscuridad y luz.

III.2.1 Generación de los mutantes $\Delta carQ$ y $\Delta carR$

Antes de realizar los estudios de localización subcelular y de estabilidad, se consideró conveniente generar mutantes que presentasen deleciones en fase de *carQ* o de *carR*, pues los estudios previos sobre la función de dichos genes se han basado en mutantes por inserción de un transposón, o con mutaciones puntuales aleatorias (Balsalobre *et al.*, 1987; Fontes *et al.*, 1993; Hodgson & Murillo, 1993; Martínez-Laborda *et al.*, 1986; Martínez-Laborda & Murillo, 1989). Para no afectar al resto de genes del operón *carQRS*, ya que los tres genes se encuentran acoplados traducionalmente, se construyeron plásmidos con las regiones aguas arriba y aguas abajo de *carQ* o *carR*, incluyendo los primeros 18 y los últimos 21 nucleótidos de dichos genes (Figura 30A). Posteriormente, el proceso de delección se realizó siguiendo el mismo procedimiento explicado en el apartado II.11. Tras la generación de los mutantes $\Delta carQ$ y $\Delta carR$, se comparó su fenotipo en oscuridad y en luz con el de la estirpe silvestre y una estirpe mutante $\Delta carF$. Para ello, se realizó un ensayo cualitativo mediante el análisis del cambio de color de los cultivos en medio sólido. Como cabía esperar, se observó que la estirpe $\Delta carQ$ mostró un fenotipo Car⁻, mientras que la estirpe $\Delta carR$ mostró síntesis constitutiva de carotenos (fenotipo Car^C) (Figura 30B).

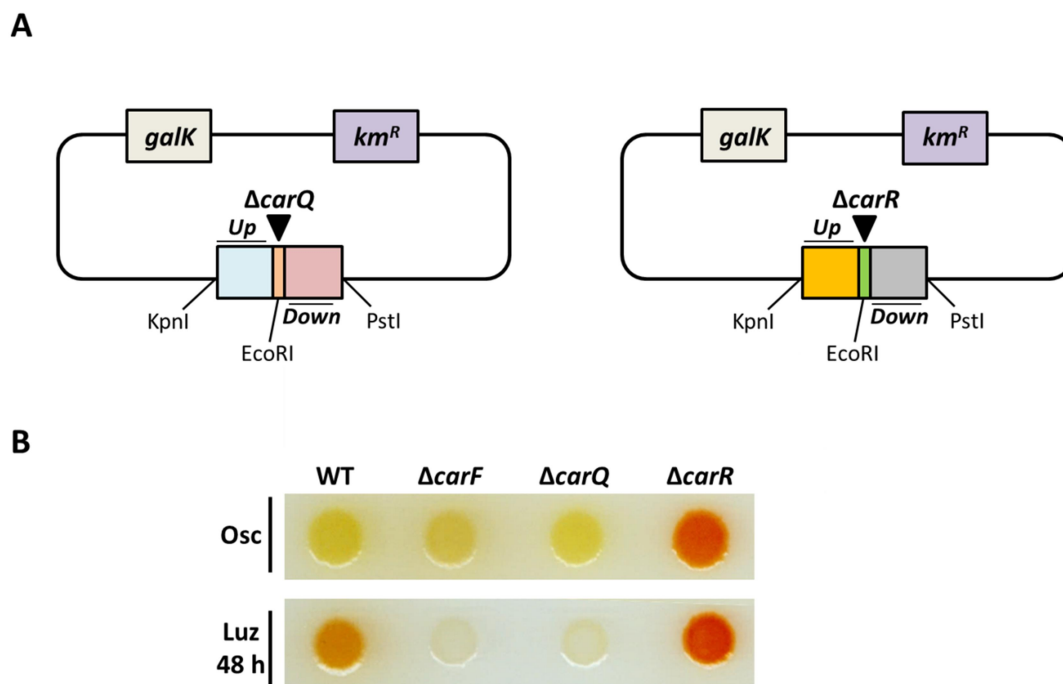


Figura 30. Generación y análisis fenotípico de los mutantes $\Delta carQ$ y $\Delta carR$. A) Esquemas de los plásmidos para deletar $carQ$ y $carR$. Se muestra la región aguas arriba (*up*) y aguas abajo (*down*) de los genes $carQ$ y $carR$. Se indican los sitios de restricción empleados. B) Estudio del fenotipo de las estirpes de *M. xanthus* indicadas crecidas en oscuridad y en luz durante 48 horas.

III.2.2 Análisis de la localización subcelular de CarR en oscuridad y en luz

Para estudiar la localización subcelular de CarR y determinar si dicha localización cambia en condiciones de iluminación, se generaron estirpes de *M. xanthus* que expresan CarR fusionada a la proteína fluorescente mCherry en el extremo N-terminal (mCherry-CarR) o en el extremo C-terminal (CarR-mCherry), bajo el control del promotor P_{van} , y en el fondo genético $\Delta carR$ descrito en el apartado anterior (Figura 31A). Antes de realizar los análisis de localización subcelular, se comprobó si las proteínas de fusión son funcionales, estudiando la capacidad de las diferentes estirpes de responder o no a la luz en presencia de diferentes concentraciones del inductor vanilato. La estirpe que expresa mCherry-CarR mostró un color amarillo en la oscuridad incluso en el medio sin vanilato, lo que indica que ya a los niveles bajos de proteína que deben producirse en estas condiciones es capaz de secuestrar a CarQ; sin embargo, dicha estirpe no respondió a la luz ni siquiera en ausencia de vanilato, quizás porque los niveles de mCherry-CarR exceden a los niveles habituales de CarR en la célula, provocando un desajuste en la relación estequiométrica entre CarR y CarQ. Por otro lado, la estirpe que expresa CarR-

III. Resultados

mCherry no mostró represión de la carotenogénesis ni en ausencia ni en presencia de 0,001 mM de vanilato, pero sí cuando se añadieron cantidades mayores del inductor, mostrando un fenotipo “silvestre” en presencia de 0,005 mM de vanilato. La adición de más inductor ya se tradujo en una incapacidad de responder a la luz, lo que refleja que el comportamiento silvestre depende de un fino equilibrio entre los niveles de CarR y CarQ (Figura 31B).

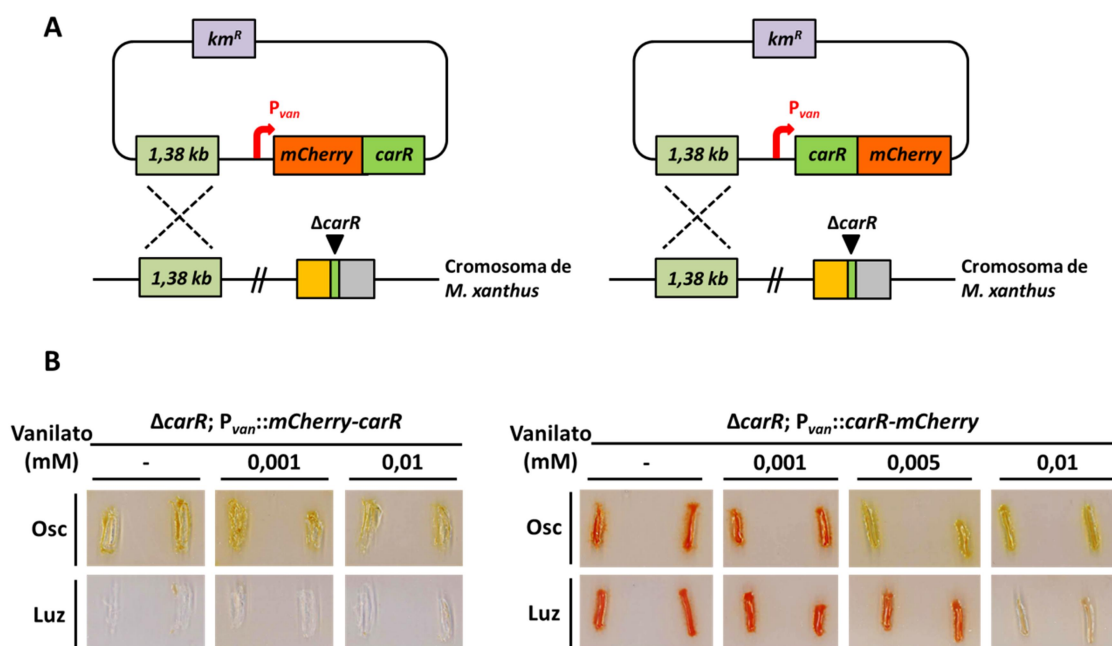


Figura 31. Generación de las estirpes que expresan mCherry-CarR y CarR-mCherry, y análisis de su funcionalidad. A) Esquemas de los plásmidos que expresan mCherry-CarR y CarR-mCherry bajo el promotor inducible por vanilato (P_{van}) y de su integración en *M. xanthus* por recombinación homóloga (líneas discontinuas) a través de la región 1,38 kb. **B)** Estudio de la funcionalidad de mCherry-CarR y CarR-mCherry mediante el análisis del fenotipo de color en oscuridad y en luz a diferentes concentraciones de vanilato.

A la vista de los resultados, se optó por utilizar la estirpe que expresa la fusión CarR-mCherry crecida en presencia de 0,005 mM de vanilato para los estudios de localización subcelular por microscopía de fluorescencia. Para ello, se creció un cultivo de dicha estirpe sin vanilato durante toda la noche. Al día siguiente, el cultivo se ajustó a una $DO_{550} \sim 0,8/0,9$ y se separó en dos alícuotas, una se mantuvo en oscuridad y otra en luz. A las 3 horas, tras realizar una primera fotografía, se añadió vanilato a una concentración final de 0,005 mM, y transcurridas 1 y 6 horas tras añadir el inductor (4 y 9 horas tras separar los cultivos en oscuridad y luz, respectivamente) se realizaron nuevamente fotografías (Figura 32). En las muestras de las 6 horas pudo observarse la localización de CarR en la membrana, aunque no se observaron diferencias claras entre las células crecidas en la oscuridad o en la luz (Figura 32B).

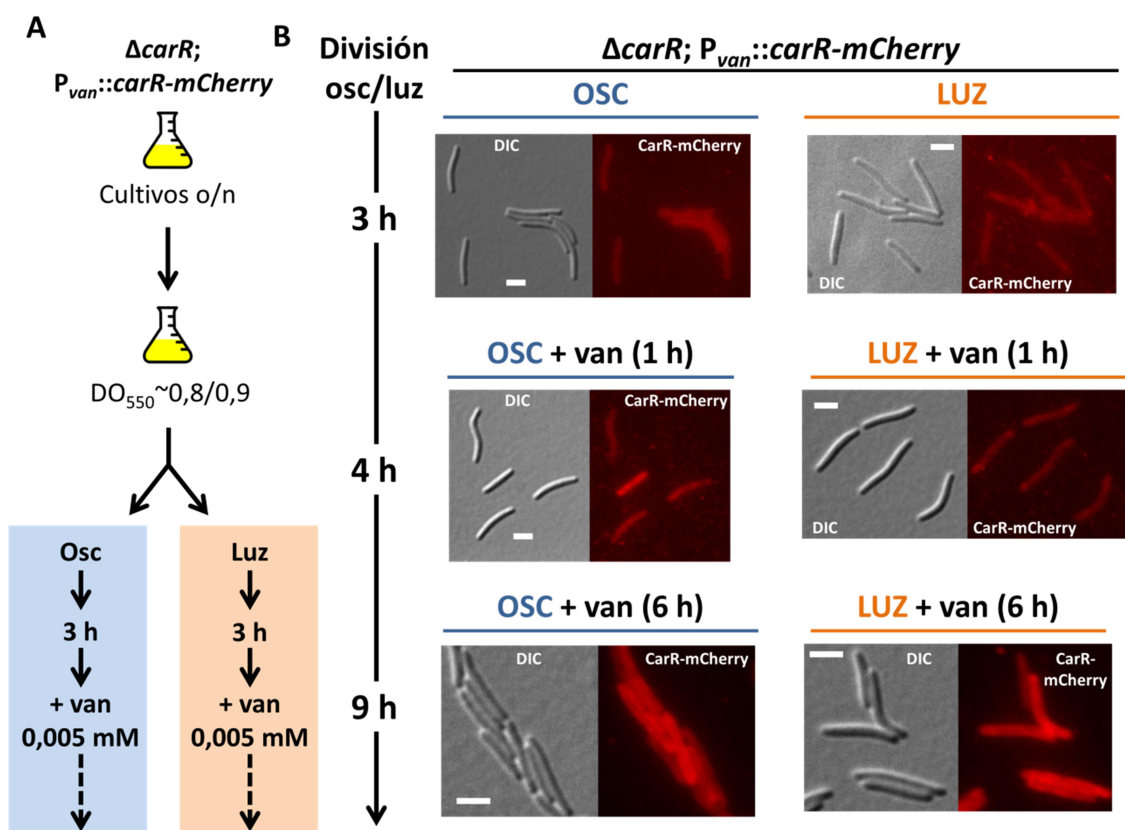


Figura 32. Localización subcelular de CarR. **A)** Protocolo seguido para la obtención de las muestras. **B)** Imágenes de DIC y de microscopía de fluorescencia en oscuridad y en luz a diferentes tiempos de células de la estirpe que expresa CarR-mCherry. La barra de escala indica 5 μ m.

III.2.3 Análisis de la localización subcelular de CarQ en oscuridad y en luz

En base al modelo sobre la respuesta a la luz de *M. xanthus*, CarQ debería presentar una localización membranal en la oscuridad, al estar secuestrada por CarR, y una localización citoplásmica en la luz, al ser liberada por la inactivación de CarR. Para estudiar la localización subcelular de CarQ se generaron estirpes de *M. xanthus* que expresasen CarQ fusionada a YFP en el extremo N-terminal (YFP-CarQ) o en el extremo C-terminal (CarQ-YFP), bajo el control del promotor P_{van} , y en el fondo genético $\Delta carQ$ generado en este trabajo (Figura 33A). Para comprobar si las proteínas de fusión son funcionales, se estudió la capacidad de las diferentes estirpes de responder o no a la luz, analizando el fenotipo de color en medio sólido con diferentes concentraciones de vanilato. Con la estirpe que expresa CarQ-YFP no se observó el rescate de la respuesta a la luz ni siquiera a concentraciones altas de vanilato, a las que la inducción de la expresión se empieza a saturar (Iniesta *et al.*, 2012), lo que sugiere que la proteína de fusión no es funcional o es inestable (Figura

33B). Por otro lado, con la estirpe que expresa YFP-CarQ sí se observó una respuesta carotenogénica, aunque a concentraciones altas de vanilato (Figura 33B).

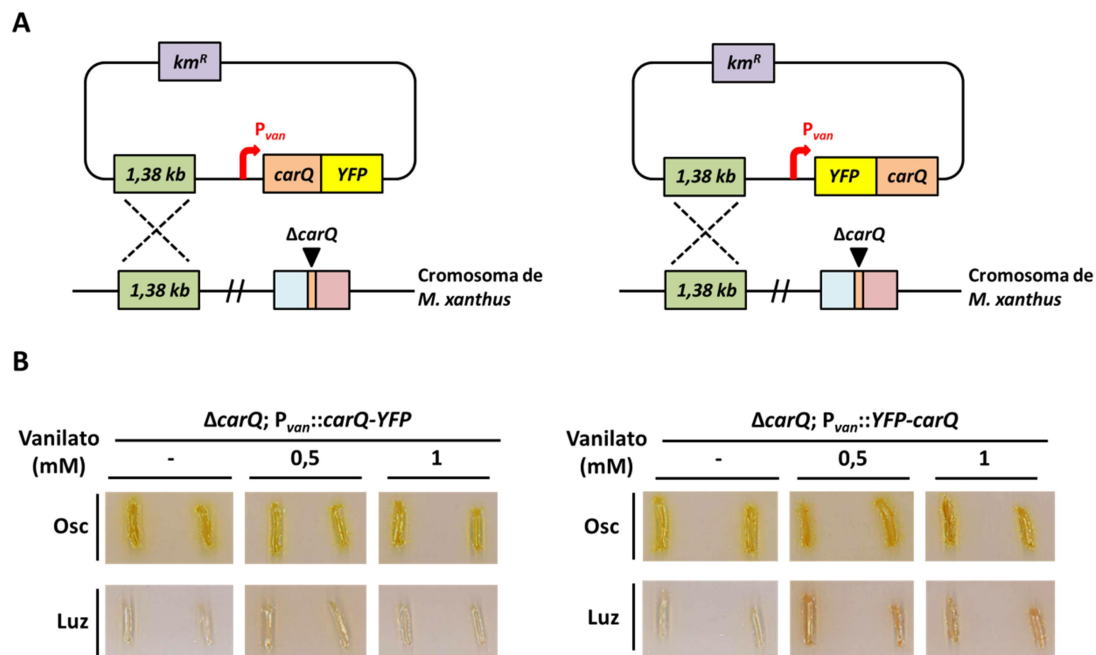


Figura 33. Generación de las estirpes que expresan CarQ-YFP e YFP-CarQ, y análisis de su funcionalidad. A) Esquemas de los plásmidos que expresan CarQ-YFP e YFP-CarQ bajo el promotor inducible por vanilato (P_{van}) y de su integración en *M. xanthus* por recombinação homóloga (líneas discontinuas) a través de la región 1,38 kb. **B)** Estudio de la funcionalidad de CarQ-YFP e YFP-CarQ mediante el análisis del fenotipo de color en oscuridad y en luz a diferentes concentraciones de vanilato.

Teniendo en cuenta los resultados de las pruebas de complementación, para los estudios de localización subcelular mediante microscopía de fluorescencia se utilizó la estirpe que expresa YFP-CarQ. Para ello, se creció un cultivo de dicha estirpe con vanilato a una concentración final de 0,5 mM durante toda la noche. Al día siguiente, se ajustó a una $DO_{550} \sim 0,8/0,9$ y se distribuyó en dos alícuotas, una se mantuvo en oscuridad y la otra en condiciones de iluminación (Figura 34A). No se observó una localización subcelular definida de CarQ ni en oscuridad ni en luz, ni siquiera después de inducir con vanilato durante 8 horas, lo que sugiere que la proteína se expresa a niveles muy bajos, o que tiene una escasa estabilidad, lo que dificulta su correcta detección (Figura 34B). Además, en las condiciones ensayadas, parecen generarse agregados.

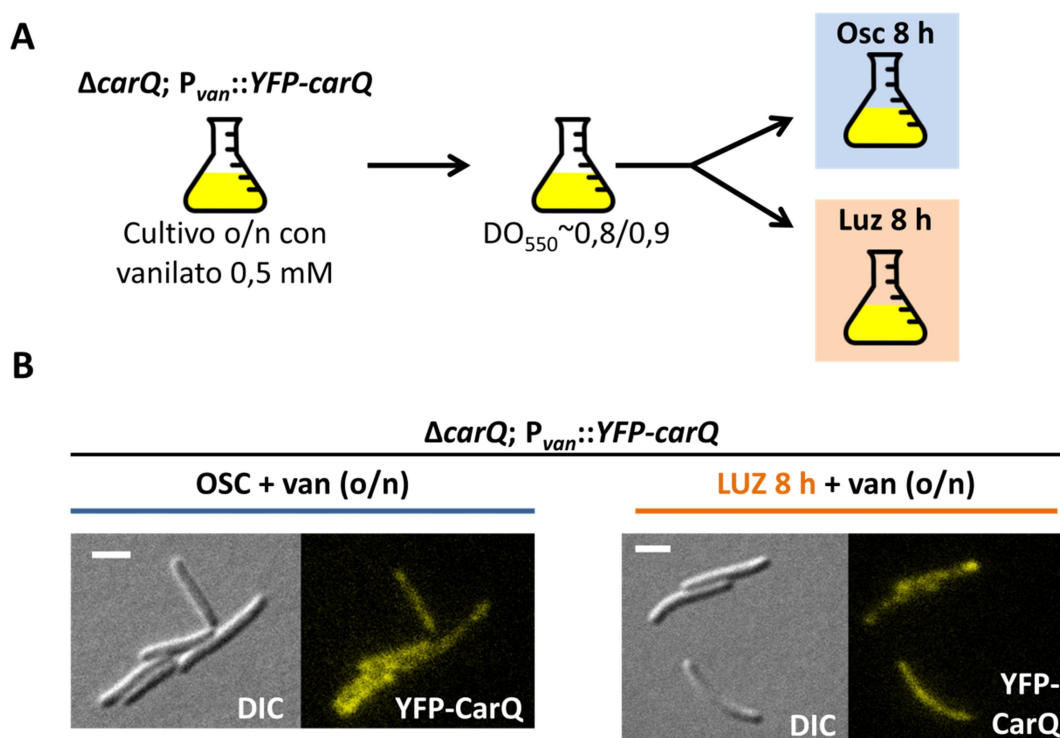


Figura 34. Localización subcelular de CarQ. **A)** Protocolo seguido para la obtención de las muestras. **B)** Imágenes de DIC y de microscopía de fluorescencia en oscuridad y en luz de células de la estirpe que expresa YFP-CarQ. La barra de escala indica 5 μ m.

III.2.4 Análisis de la estabilidad de CarR en oscuridad y en luz

Una manera de analizar si CarR se inactiva por un proceso de degradación dependiente de luz es el estudio de su estabilidad *in vivo* mediante inmunodetección. Para abordarlo, en primer lugar, se generó una estirpe de *M. xanthus* que expresa CarR bajo el promotor P_{van} en el fondo genético $\Delta carR$ (Figura 35A). El análisis de la respuesta a la luz de dicha estirpe en presencia de diferentes concentraciones de vanilato indicó que el rango óptimo del inductor para restablecer el fenotipo silvestre se sitúa entre 0,0025 mM y 0,005 mM. Por encima de estos valores, la fotoinducción es ya defectuosa (Figura 35B).

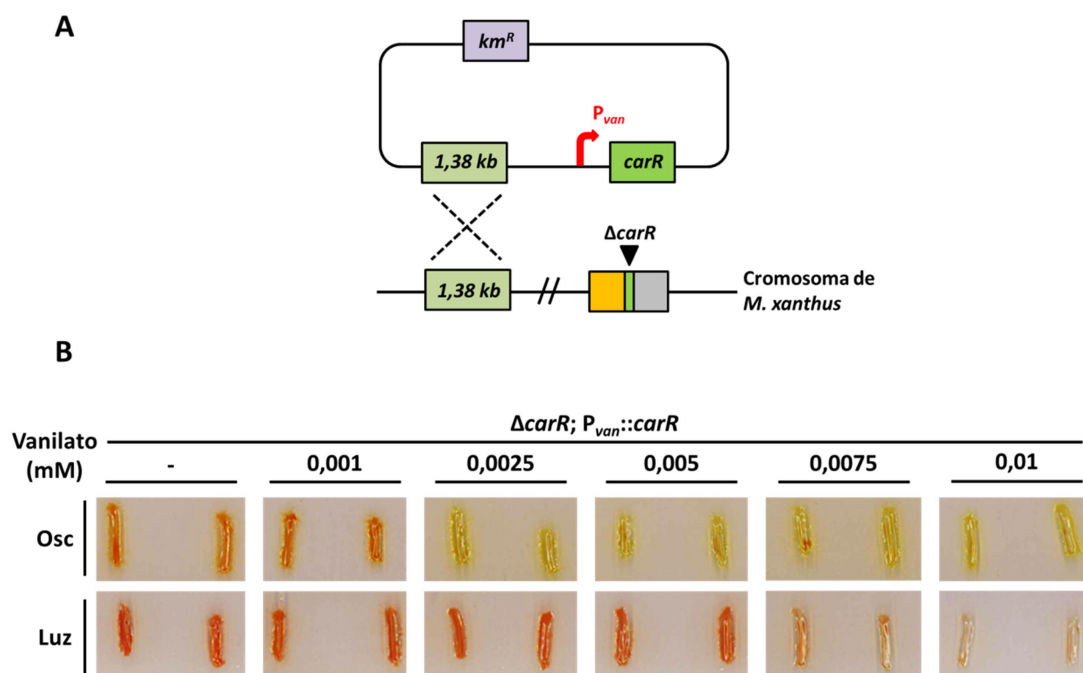


Figura 35. Generación de la estirpe que expresa CarR y análisis de su funcionalidad. A) Esquema del plásmido que expresa CarR bajo el promotor inducible por vanilato (P_{van}) y de su integración en *M. xanthus* por recombinación homóloga (líneas discontinuas) a través de la región 1,38 kb. **B)** Estudio de la funcionalidad de CarR mediante el análisis del fenotipo de color en oscuridad y en luz a diferentes concentraciones de vanilato.

Para realizar los ensayos de detección de CarR mediante *Western blot* se utilizaron tres anticuerpos policlonales obtenidos por encargo, anti-CarR-1, anti-CarR-2 y anti-CarR-3, diseñados para unirse a la región N-terminal, a la región transmembranal, y a la región C-terminal de CarR, respectivamente, por considerarse las más inmunogénicas (Figura 36).

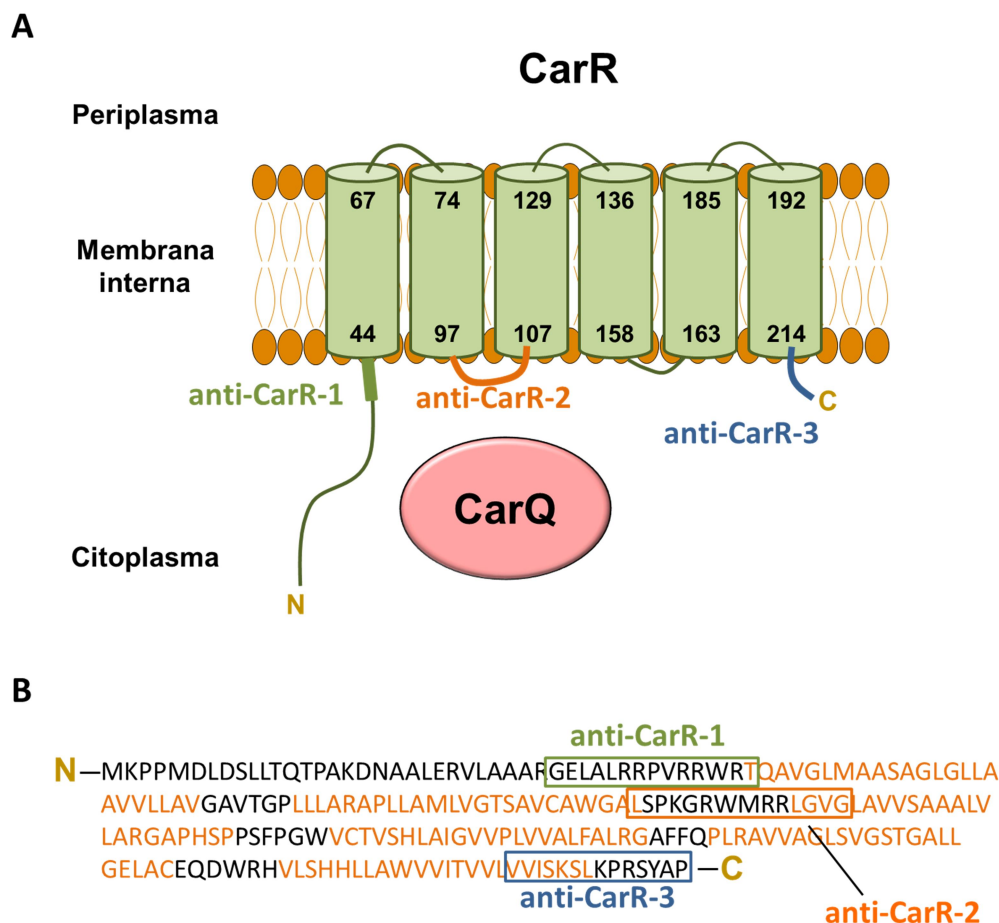


Figura 36. Regiones de unión de los anticuerpos anti-CarR. **A)** Topología de CarR en la membrana. Se muestran, en colores verde, naranja y azul, los sitios esperados de unión de CarR a cada uno de los anticuerpos diseñados. **B)** Secuencia de aminoácidos de CarR. Se señalan los aminoácidos, en principio, reconocidos por cada uno de los anticuerpos. Los aminoácidos marcados en naranja se corresponden con las regiones transmembranales de CarR.

En primer lugar, se comprobó si alguno de los tres anticuerpos detectaba CarR (con una masa de 22,9 kDa), creciendo la estirpe a distintas concentraciones de vanilato y comparando los resultados con los de la estirpe silvestre y la estirpe $\Delta carR$ (control negativo). Con los tres anticuerpos se detectaron varias bandas en la estirpe silvestre y en la estirpe que expresa $P_{van}::carR$, que al estar presentes también en la estirpe $\Delta carR$, deben tener su origen en reacciones cruzadas. Solo cuando la estirpe que expresa $P_{van}::carR$ se creció en presencia de 0,5 mM de vanilato (pero no a concentraciones más bajas; datos no mostrados) se observó una banda específica con los tres anticuerpos, que no estaba presente en el carril del control negativo, y con el tamaño esperado para CarR (Figura 37). Sin embargo, ninguno de los anticuerpos detectó CarR en la estirpe silvestre, lo que sugiere que en condiciones normales los niveles celulares de CarR se encuentran por debajo del límite de detección, debido a

la baja expresión del promotor P_{QRS} en la oscuridad y/o a la baja estabilidad de CarR, como ya observaron Browning *et al.* (2003). Así pues, los tres anticuerpos fueron capaces de detectar CarR en la estirpe que expresa $P_{van}::carR$, pero su uso exige utilizar condiciones en las que la respuesta a la luz no ocurre con normalidad.

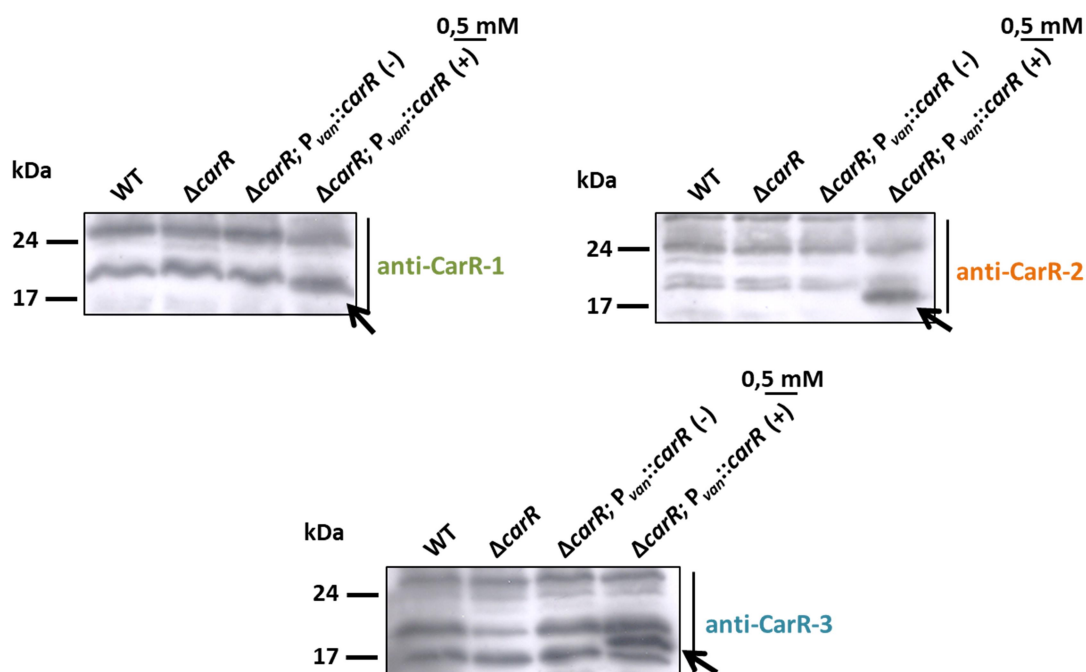


Figura 37. Detección de CarR utilizando los anticuerpos anti-CarR de manera individual. Análisis mediante *Western blot* (utilizando anticuerpos policlonales anti-CarR) de extractos celulares de diferentes estirpes de *M. xanthus*. Las flechas señalan la posición de la única banda específica observada con los tres anticuerpos probados.

A continuación, se probó si la adición conjunta de los tres anticuerpos anti-CarR permitiría aumentar la sensibilidad de detección y trabajar en condiciones en las que la respuesta a la luz funciona con normalidad, ya sea utilizando la estirpe silvestre o la estirpe que expresa $P_{van}::carR$ a concentraciones de vanilato por debajo de 0,0075 mM. En este caso, en el ensayo de *Western blot* se usó como control negativo la estirpe $\Delta carQRS$; además, la estirpe silvestre se analizó también en la luz, que provoca un aumento de la expresión del operón *carQRS*, que podría traducirse en un aumento en los niveles de CarR (siempre que no se degrade en la luz); por otro lado, la estirpe que expresa $P_{van}::carR$ se creció en presencia de 0,005 mM de vanilato y, como control positivo, también en presencia de 0,5 mM del inductor. Como puede observarse en la Figura 38, no se detectó CarR en la estirpe silvestre ni en la luz ni en la oscuridad, lo que indica que los niveles de CarR son muy bajos en ambas condiciones. Tampoco se detectó CarR en la estirpe inducida con 0,005 mM de vanilato, lo que sugiere que el comportamiento silvestre para la respuesta a la luz

requiere cantidades de CarR demasiado bajas para que puedan ser detectadas con los anticuerpos anti-CarR disponibles, utilizados ya sea de manera individual o conjunta (Figura 38).

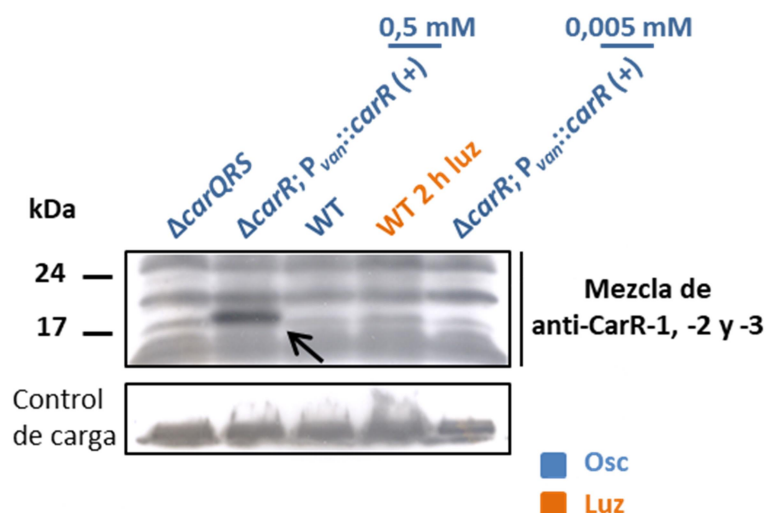


Figura 38. Detección de CarR utilizando los anticuerpos anti-CarR de manera conjunta. Análisis mediante *Western blot* (utilizando una mezcla de los tres anticuerpos policlonales anti-CarR) de extractos celulares de diferentes estirpes de *M. xanthus*. Se utilizaron anticuerpos anti- β -RNAP como control de carga.

Dado que los anticuerpos anti-CarR generan varias bandas inespecíficas y no detectan CarR en las condiciones de interés, se optó por probar el uso de fusiones de CarR al epítipo Flag, para el cual existen anticuerpos comerciales muy específicos. Así pues, se generaron estirpes de *M. xanthus* que expresan CarR con la etiqueta Flag en el extremo N-terminal (Flag-CarR) o C-terminal (CarR-Flag), bajo el promotor P_{van} , y en el fondo genético $\Delta carR$ (Figura 39A). Cuando se analizó el fenotipo de color en medio sólido con diferentes concentraciones de vanilato, la estirpe que expresa CarR-Flag mostró una coloración roja tanto en oscuridad como en luz, en las diferentes concentraciones de vanilato probadas, indicando que la proteína de fusión no es funcional y es incapaz de secuestrar a CarQ (Figura 39B). Por otro lado, la estirpe que expresa Flag-CarR mostró un fenotipo “silvestre” incluso sin añadir vanilato y dicho fenotipo se mantuvo hasta concentraciones de vanilato en torno a 0,005 mM (Figura 39B). Este comportamiento es muy similar al que se observó con la estirpe que expresa $P_{van::carR}$, lo que indica que la fusión de la etiqueta Flag al extremo N-terminal de CarR no tiene ninguna consecuencia negativa sobre su funcionalidad.

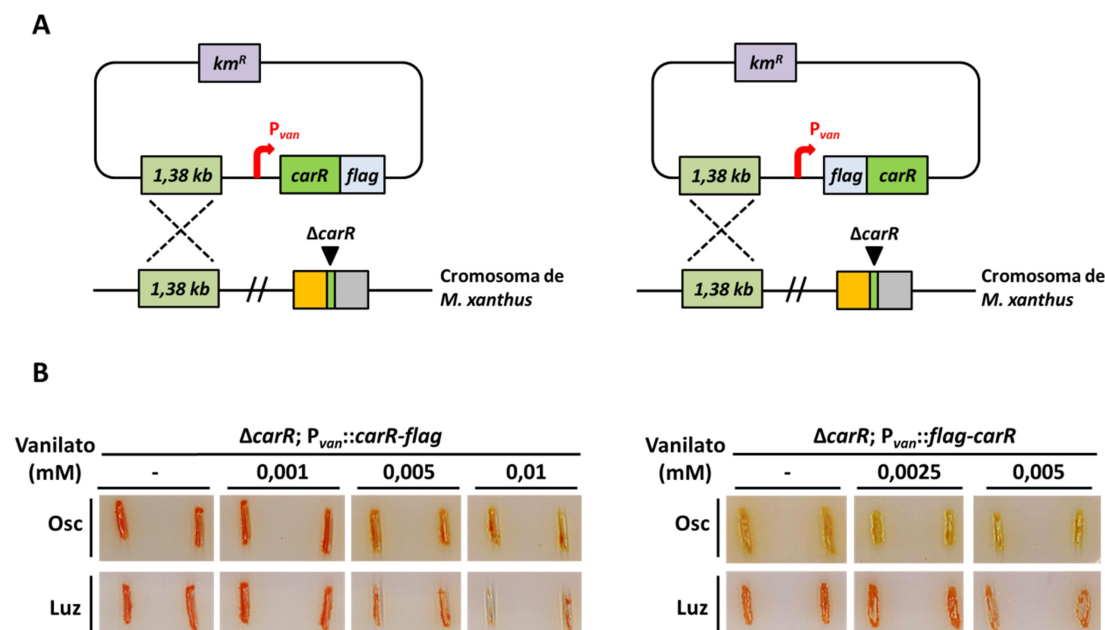


Figura 39. Generación de las estirpes que expresan CarR-Flag y Flag-CarR, y análisis de su funcionalidad. A) Esquemas de los plásmidos que expresan CarR-Flag y Flag-CarR bajo el promotor inducible por vanilato (P_{van}) y de su integración en *M. xanthus* por recombinación homóloga (líneas discontinuas) a través de la región 1,38 kb. **B)** Estudio de la funcionalidad de CarR-Flag y Flag-CarR mediante el análisis del fenotipo de color en oscuridad y en luz a diferentes concentraciones de vanilato.

A continuación, se realizaron ensayos de *Western blot* con la estirpe que expresa Flag-CarR, de 24 kDa, utilizando anticuerpos monoclonales anti-Flag, para comparar los niveles de CarR en oscuridad y en luz a diferentes concentraciones de vanilato. Para ello, se creció un cultivo de la estirpe Flag-CarR sin vanilato durante toda la noche. Cuando el cultivo alcanzó una $DO_{550} \sim 0,8$, se añadieron 200 μ l de este cultivo a matraces que contenían 10 ml de medio de cultivo suplementado con diferentes concentraciones de vanilato, y los cultivos se dejaron creciendo durante toda la noche. Al día siguiente, se ajustaron a una $DO_{550} \sim 0,3$ y se separaron en oscuridad y en luz durante 8 horas y, finalmente, se recogieron las muestras (Figura 40A). En el *Western blot*, se observó un aumento de la cantidad de CarR en oscuridad y en luz conforme aumentó la concentración de vanilato y, en esta ocasión, sí se detectó CarR a una concentración de vanilato de 0,005 mM. Sin embargo, al comparar la cantidad de CarR a una misma concentración de vanilato en oscuridad y luz, no se observaron diferencias significativas ni a 0,005 mM de vanilato ni a las otras concentraciones probadas (Figura 40B).

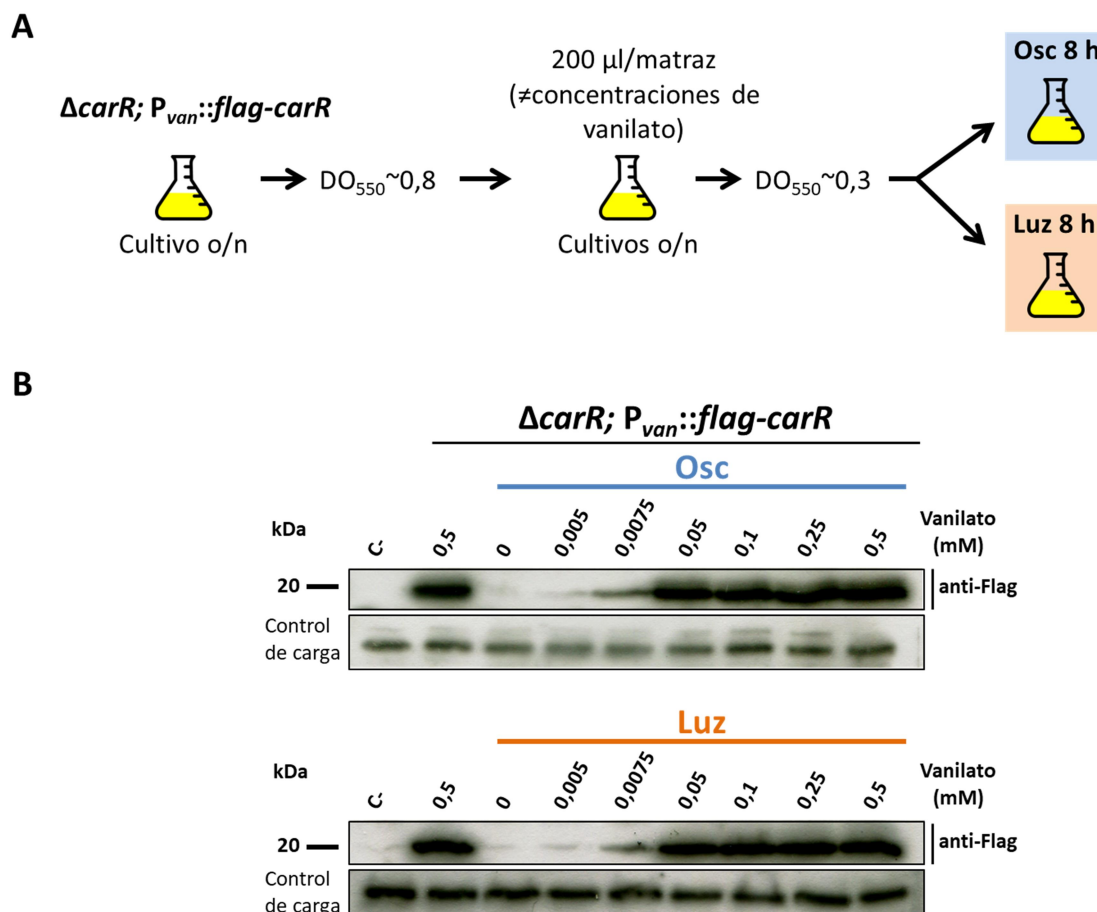


Figura 40. Estudio de la acumulación de CarR en oscuridad y en luz a diferentes concentraciones de vanilato. A) Protocolo seguido para la obtención de las muestras. B) Análisis mediante *Western blot* de extractos celulares de la estirpe que expresa Flag-CarR crecida con diferentes concentraciones de vanilato en oscuridad y en luz. Se utilizaron anticuerpos que reconocen a CdnL (una proteína que se expresa constitutivamente) como control de carga.

La falta de diferencias en los niveles de CarR en luz y en oscuridad podría deberse a que, al estar el inductor siempre presente, se genera proteína de forma constante, pudiendo enmascarar el supuesto proceso proteolítico de CarR en la luz. Por si fuese así, se varió el protocolo de toma de muestras para eliminar el vanilato antes de separar el cultivo y someterlo a las dos condiciones distintas. En este caso, se creció la estirpe que expresa Flag-CarR con dos concentraciones de vanilato, 0,005 mM o 0,0075 mM, durante toda la noche. Al día siguiente, se eliminó el vanilato mediante sucesivos lavados y el cultivo se separó en dos alícuotas. Una de ellas se mantuvo en oscuridad y la otra en luz, y se recogieron muestras a tiempo 0 (T_0), a 1 hora, a 2,5 horas y a 3,5 horas (Figura 41A). La modificación introducida en el protocolo tampoco se tradujo en la observación de diferencias en los niveles de CarR entre las muestras en oscuridad o en luz a ninguno de los tiempos estudiados (Figura

41B). Estos resultados, junto con los de la localización subcelular de CarR, sugieren que la inactivación de CarR no se lleva a cabo mediante proteólisis.

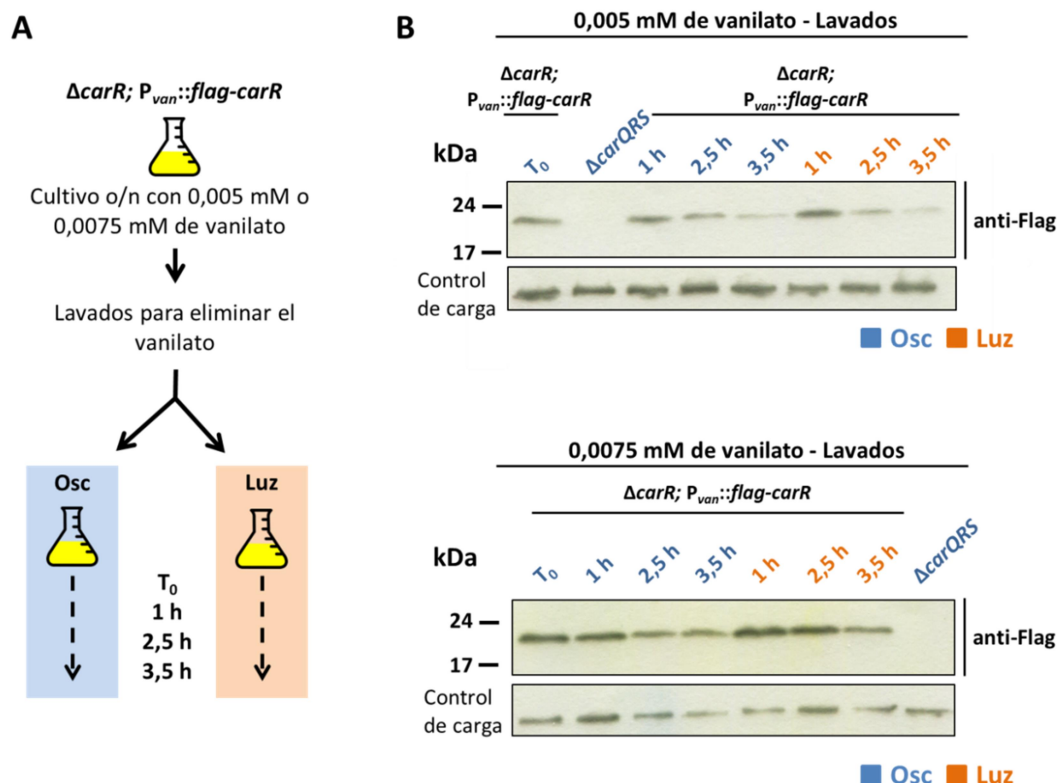


Figura 41. Estudio de la acumulación de CarR en oscuridad y en luz tras eliminar el inductor. **A)** Protocolo seguido para la obtención de las muestras. **B)** Análisis mediante *Western blot* (utilizando anticuerpos monoclonales anti-Flag) de extractos celulares de la estirpe $\Delta carQRS$ y la estirpe que expresa Flag-CarR. Se utilizaron anticuerpos anti- β -RNAP como control de carga.

III.2.5 Análisis de la posible localización de CarR en los microdominios funcionales de membrana

Experimentos previos han demostrado que CarF interacciona con CarR y CarR con CarQ (Galbis-Martínez *et al.*, 2008), de forma que las tres proteínas podrían constituir un complejo multiproteico de señalización asociado a los FMMs que, como se comentó previamente (véase apartado I.4), muestran cierta analogía con las balsas lipídicas eucarióticas.

Es posible aislar e identificar proteínas de membrana que están asociadas con FMMs debido a que esas regiones membranales son más resistentes a la desagregación por detergentes no iónicos, lo que permite una separación física de la membrana en dos fracciones: la fracción DSM, que es sensible a los detergentes, y la fracción DRM, que es más resistente a los detergentes, genera fragmentos de

membrana más grandes, y está enriquecida en FMMs (Bramkamp & López, 2015). La posible formación de FMMs en bacterias Gram negativas es un tema muy poco explorado y, hasta la fecha, nunca se había abordado su estudio en *M. xanthus*. Para determinar si CarR se asocia a FMMs, el primer paso consistió en poner a punto la separación de las fracciones DSM/DRM en la estirpe de *M. xanthus* que expresa Flag-CarR. Esta tarea se llevó a cabo durante una estancia corta en Madrid en el laboratorio del Dr. Daniel López Serrano en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB), experto en el tema de los FMMs bacterianos. En primer lugar, se creció un cultivo de dicha estirpe con 0,5 mM de vanilato, y se obtuvo la fracción membranal, a partir de la cual (siguiendo el protocolo descrito en el apartado II.21) se obtuvieron las fracciones DSM y DRM. Después, se realizó un ensayo *Western blot* utilizando anticuerpos monoclonales anti-Flag para detectar la proteína de fusión Flag-CarR (24 kDa) en la fracción total (FT), la fracción soluble (FS), la fracción citosólica (FC), la DSM, la DSM precipitada con ácido tricloroacético (TCA), la DRM precipitada con TCA y la fracción membranal (Figura 42). Como control negativo y control positivo, respectivamente, se analizó el extracto celular de la estirpe que expresa Flag-CarR sin inducir e induciendo con 0,5 mM de vanilato. Paralelamente, las mismas muestras se analizaron en un gel teñido con Coomassie para tener una estimación (cualitativa) del contenido proteico de cada muestra (Figura 42). Como puede observarse en la Figura 42, CarR no apareció en la FC y sí en la fracción membranal, consistente con su localización subcelular en la membrana. Por otro lado, apareció enriquecida en la DRM, lo que sugiere que podría formar parte de un FMM.

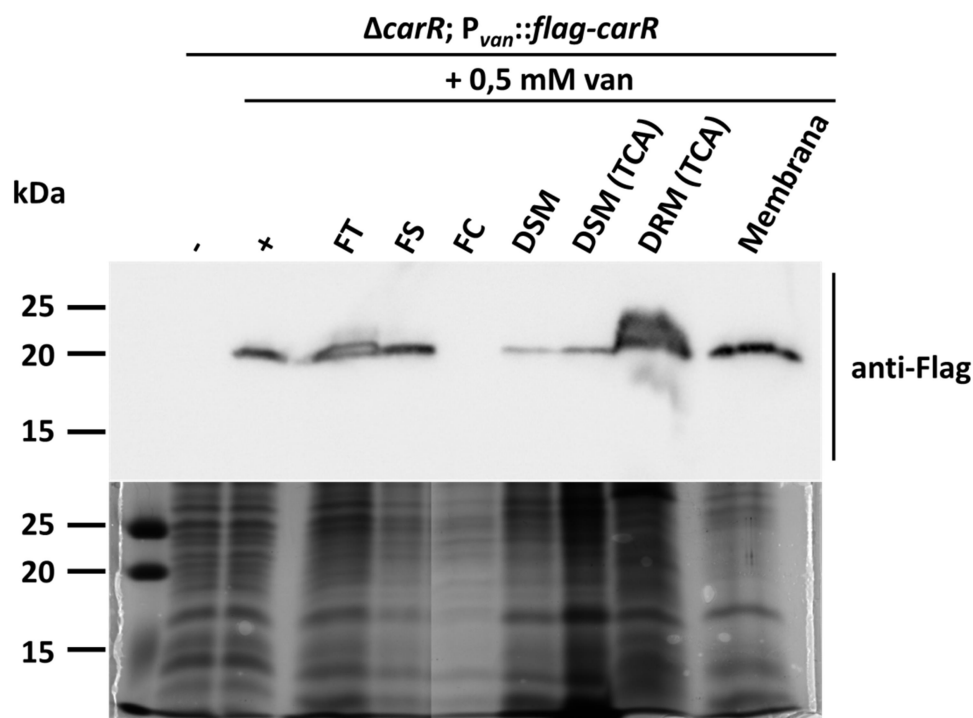


Figura 42. Fraccionamiento de la membrana de *M. xanthus* y detección de CarR. Análisis mediante *Western blot* (parte superior) (utilizando anticuerpos monoclonales anti-Flag) de diferentes muestras procedentes de la estirpe que expresa Flag-CarR. Gel teñido con Coomassie (parte inferior) para analizar las proteínas asociadas a cada fracción. -, control negativo; +, control positivo; FT, fracción total; FS, fracción soluble; FC, fracción citosólica; DSM, *detergent-sensitive membrane*; DSM (TCA), DSM precipitada con TCA; DRM (TCA), *detergent-resistant membrane* precipitada con TCA.

III.2.5.1 Búsqueda de posibles flotilinas en *M. xanthus*

Uno de los componentes principales tanto de las balsas lipídicas eucarióticas como de los FMMs bacterianos son las flotilinas, un tipo de proteínas que juegan un papel estructural y funcional en estas plataformas lipídicas, reclutando a otras proteínas y favoreciendo su interacción y la formación de complejos multiproteicos de señalización en la membrana (véase apartado I.4). Por ello, paralelamente al análisis de las fracciones DRM y DSM en la estirpe que expresa Flag-CarR, se estudió la presencia de flotilinas en *M. xanthus*. Las flotilinas bacterianas se engloban dentro de la familia de proteínas SPFH, tienen un dominio PHB y regiones transmembranales a través de las cuales se asocian a la membrana. Generalmente, se encuentran en un operón de tres genes en el que el primero determina un homólogo de la proteasa NfeD, el segundo determina la flotilina y el tercero, a veces ausente, determina una proteína de función desconocida (Green *et al.*, 2009; Lopez & Koch, 2017; Schneider *et al.*, 2015). Para encontrar posibles candidatos a flotilinas en *M. xanthus*, se buscaron genes que determinaran proteínas de la familia SPFH mediante el *software*

Artemis, lo que permitió identificar siete proteínas. Para delimitar el número de candidatos, se analizó el contexto genómico teniendo en cuenta las características anteriormente comentadas. Además, con la herramienta bioinformática SMART, se analizó la presencia del dominio PHB y de regiones transmembranales en las posibles flotilinas. Se encontraron dos genes candidatos, *MXAN_0779* (al que nos referiremos como *floA*) y *MXAN_3984* (al que nos referiremos como *floB*). El gen *floA* determina una proteína de 31,38 kDa, con un dominio PHB y una región transmembranal. Este gen se encuentra formando parte de un operón de tres genes que muestra una distribución ligeramente diferente a la descrita para otras flotilinas, ya que el primer gen, que determina una sintasa de trehalosa, no parece estar relacionado con los FMMs; el segundo, determina la proteasa NfeD; y el tercero, daría lugar a FloA (Figura 43A). El gen *floB* determina una proteína de 40 kDa, con un dominio PHB y una región transmembranal. Este gen se encuentra formando parte de un operón de dos genes en el que el primer gen determinaría la proteasa NfeD y el segundo daría lugar a FloB (Figura 43B).

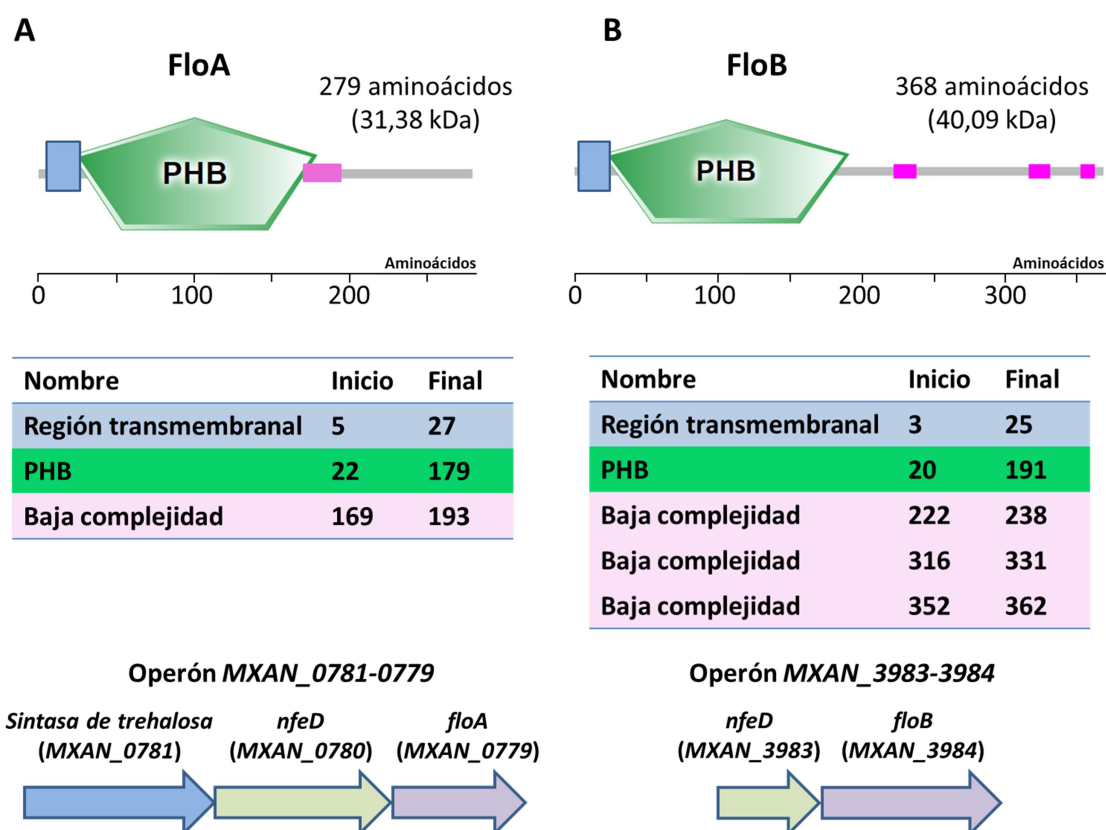


Figura 43. Posibles flotilinas de *M. xanthus*. **A)** Dominios característicos de FloA y su contexto genómico. **B)** Dominios característicos de FloB y su contexto genómico.

III.2.5.2 Generación de los mutantes $\Delta floA$ y $\Delta floB$ y análisis fenotípico de la respuesta a la luz

Dado que CarR se asocia preferentemente a la fracción DRM, podría formar parte de un complejo de señalización de la luz dependiente de las flotilinas y los FMMs. Para estudiar si la ausencia de las posibles flotilinas identificadas en el análisis del genoma afectaba a la carotenogénesis, se generaron estirpes de *M. xanthus* con la delección de *floA* ($\Delta floA$), *floB* ($\Delta floB$) o ambos ($\Delta floA \Delta floB$) (*floA* consta de 840 nucleótidos y *floB* de 1107). Para minimizar los efectos polares, se construyeron plásmidos para generar delecciones en fase que mantuviesen los 24 primeros y los 24 últimos nucleótidos del gen (Figura 44A). Tras la generación de los tres mutantes, se comparó su fenotipo en oscuridad y en luz con el de la estirpe silvestre y una estirpe mutante $\Delta carF$. Para ello, se realizó un ensayo cualitativo mediante el análisis del cambio de color en medio sólido. Tanto los mutantes sencillos $\Delta floA$ y $\Delta floB$ como el doble mutante $\Delta floA \Delta floB$ fueron capaces de producir carotenoides en la luz de forma similar a la estirpe silvestre (Figura 44B), lo que no sustenta la hipótesis de que las flotilinas participen en el ensamblaje de un FMM relacionado con la respuesta a la luz. No obstante, no podemos descartar que la falta de FloA y/o FloB sea suplida por cualquiera de las otras cinco proteínas candidatas identificadas *in silico* y que, en un principio, fueron descartadas por no cumplir alguno de los criterios de filtro aplicados.

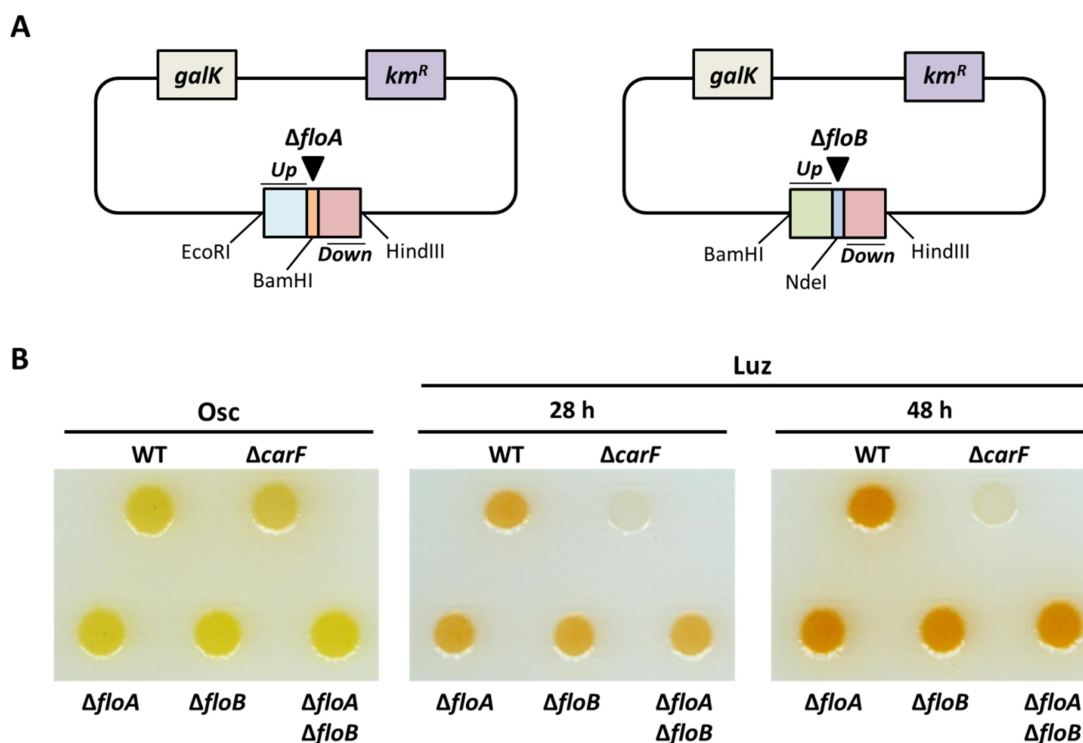


Figura 44. Generación y análisis fenotípico de los mutantes sencillos $\Delta floA$, $\Delta floB$ y del doble mutante $\Delta floA \Delta floB$. **A)** Esquemas de los plásmidos para deletar *floA* y *floB*. Se muestra la región aguas arriba (*up*) y aguas abajo (*down*) de los genes *floA* y *floB*. Se indican los sitios de restricción. **B)** Estudio del fenotipo de las estirpes de *M. xanthus* indicadas crecidas en oscuridad y en luz.

III.2.5.3 Análisis de la localización subcelular de FloA

Las flotilinas de *B. subtilis* se distribuyen en la membrana celular formando unos “parches proteicos” característicos (Schneider *et al.*, 2015). Por ello, una vez identificados dos posibles candidatos a flotilinas en *M. xanthus*, se estudió la localización subcelular de los mismos. Para estudiar la localización subcelular de FloA se generaron estirpes de *M. xanthus* que expresan FloA fusionada a YFP tanto en el extremo N-terminal (YFP-FloA) como en el extremo C-terminal (FloA-YFP), bajo el control del promotor P_{van} , y en el fondo genético $\Delta floA$ (Figura 45A). En una primera aproximación, las estirpes generadas se observaron en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i) disponible en el laboratorio. Para ello, se crecieron cultivos de dichas estirpes durante toda la noche sin vanilato. Al día siguiente, cuando se encontraban a una $DO_{550} \sim 0,6$, se les añadió vanilato a una concentración final de 0,5 mM y se dejaron crecer durante 30 minutos (Figura 45B). Debido a una baja expresión o estabilidad de la proteína de fusión YFP-FloA no se observó suficiente fluorescencia para determinar su localización celular. Sin embargo, FloA-YFP sí

mostró una distribución subcelular “parcheada” en la membrana (Figura 45C), al igual que ocurre con las flotilinas de *B. subtilis*, lo que apoya que FloA sea una flotilina.

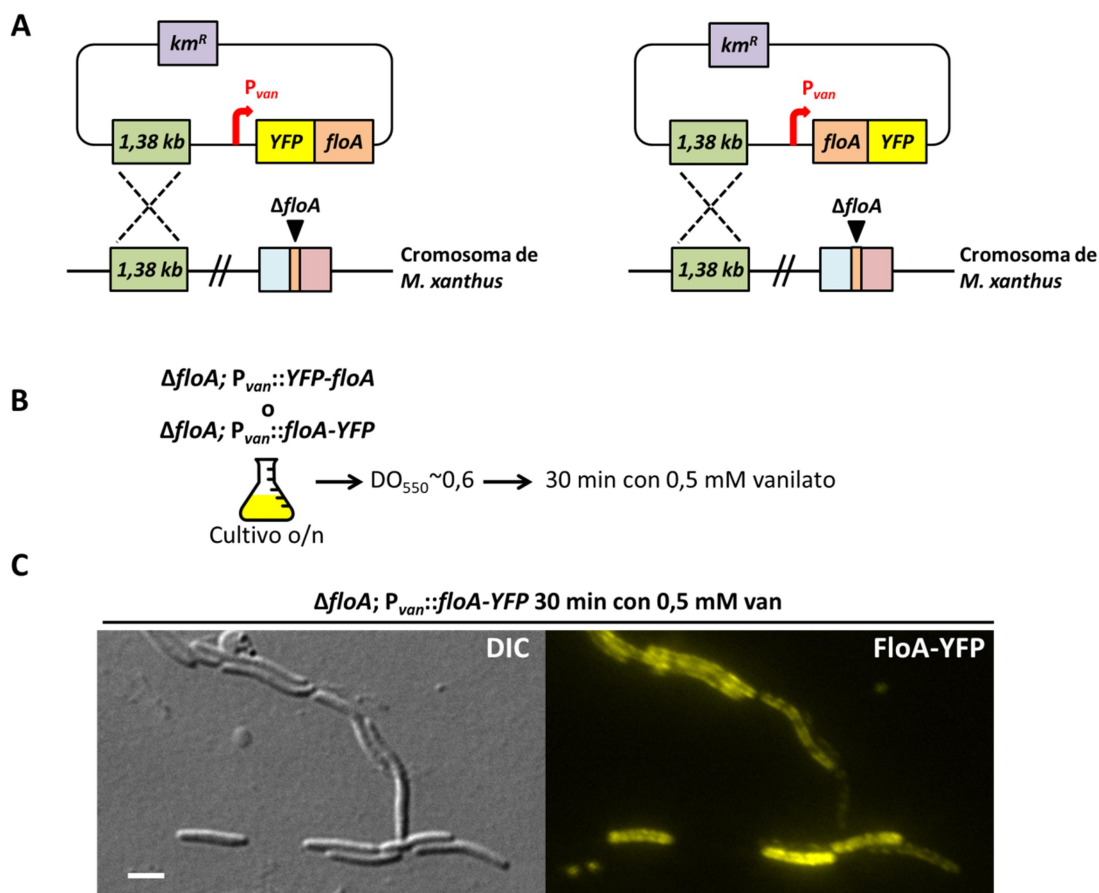


Figura 45. Localización subcelular de FloA. **A)** Esquemas de los plásmidos que expresan YFP-FloA y FloA-YFP bajo el promotor inducible por vanilato (P_{van}) y de su integración en *M. xanthus* por recombinación homóloga (líneas discontinuas) a través de la región 1,38 kb. **B)** Protocolo seguido para la obtención de las muestras. **C)** Imágenes de DIC y de microscopía de fluorescencia de células de la estirpe que expresa FloA-YFP. La barra de escala indica 5 μm .

Para obtener imágenes de mayor resolución y confirmar los resultados anteriores, se aprovechó la estancia corta en el laboratorio del Dr. Daniel López Serrano en el CNB. Para ello, se creció un cultivo de la estirpe que expresa FloA-YFP sin vanilato durante toda la noche. Al día siguiente, el cultivo se ajustó a una $DO_{550} \sim 0,6$ y, tras añadir vanilato a una concentración final de 0,5 mM, se creció durante 2 horas (Figura 46A). Posteriormente, se procesaron las células para su observación con un microscopio confocal provisto de un módulo de súper resolución (*Confocal multispectral Leica TCS SP8 system with a 3X Stimulated Emission Depletion (STED) module for super-resolution*) siguiendo el protocolo que se ha comentado en el apartado II.22.2. Las imágenes obtenidas permitieron confirmar que

FloA presenta una localización en la membrana formando agrupaciones o “parches” (Figura 46B).

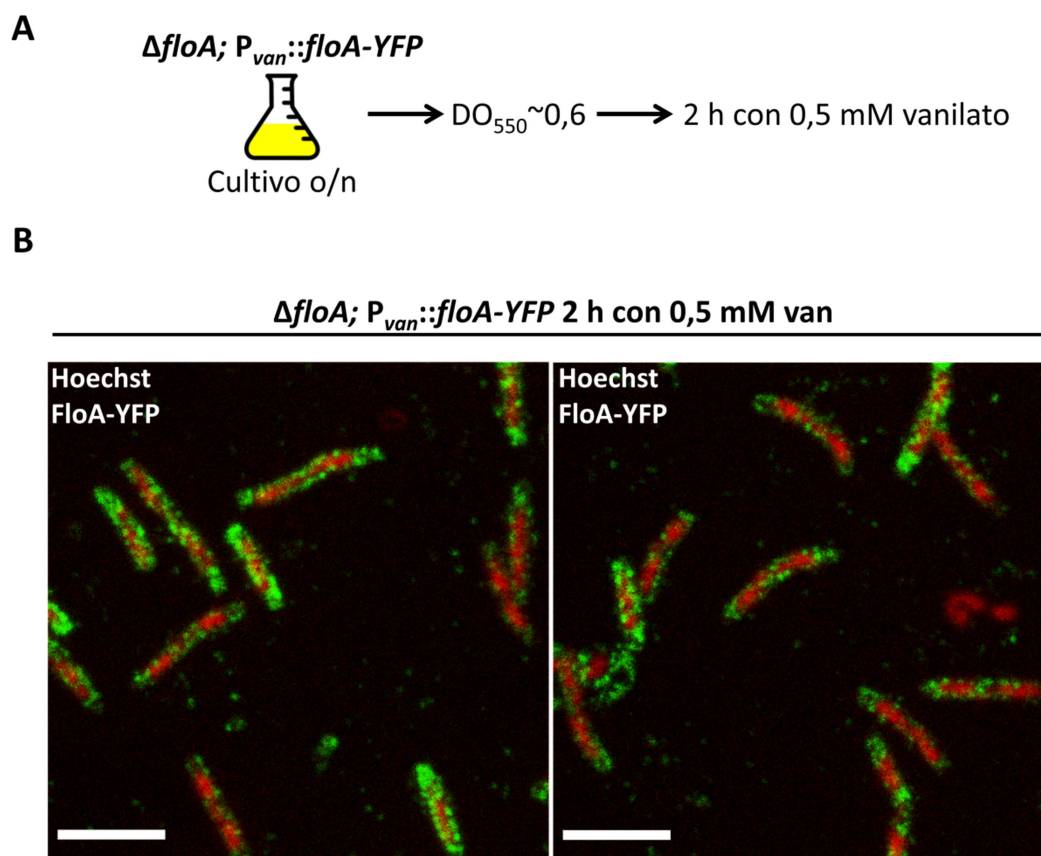


Figura 46. Localización subcelular de FloA mediante microscopía confocal. A) Protocolo seguido para la obtención de las muestras. **B)** Dos imágenes de microscopía confocal (no se ha empleado el módulo de súper resolución) de células de la estirpe que expresa FloA-YFP (en verde). El DNA se visualiza mediante Hoechst (en rojo). La barra de escala indica 5 μ m.

III.2.5.4 Análisis de la localización subcelular de FloB

Para estudiar la localización subcelular de FloB se generó una estirpe de *M. xanthus* que expresa FloB fusionada a YFP en el extremo C-terminal (FloB-YFP), bajo un promotor inducible por vanilato, y en un fondo $\Delta floB$ (Figura 47A). Las imágenes se tomaron con el microscopio confocal mencionado en el apartado anterior y siguiendo el mismo protocolo de procesamiento y crecimiento de las muestras, excepto que hubo que incubar el cultivo en presencia de vanilato durante 4 horas (Figura 47B). Al igual que FloA de *M. xanthus* y que las flotilinas de *B. subtilis*, FloB presentó una localización en la membrana a modo de “parches” (Figura 47C), lo que apoya que podría tratarse de una flotilina.

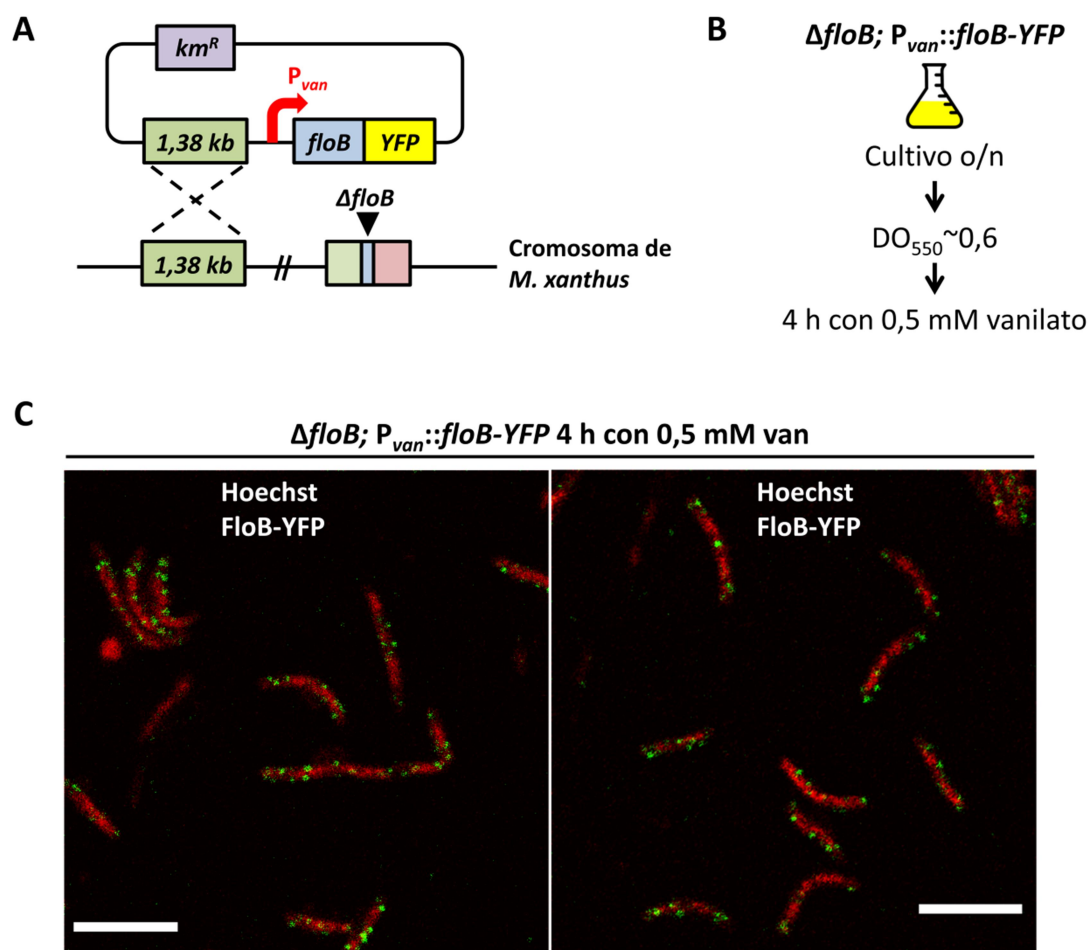


Figura 47. Localización subcelular de FloB mediante microscopía confocal. **A)** Esquema del plásmido que expresa FloB-YFP bajo el promotor inducible por vanilato (P_{van}) y de su integración en *M. xanthus* por recombinación homóloga (líneas discontinuas) a través de la región 1,38 kb. **B)** Protocolo seguido para la obtención de las muestras de la estirpe que expresa FloB-YFP. **C)** Dos imágenes de microscopía confocal (no se ha empleado el módulo de súper resolución) de células de la estirpe que expresa FloB-YFP (en verde). El DNA se visualiza mediante Hoechst (en rojo). La barra de escala indica 5 μm .

III.3 Estudio de la respuesta global al estrés foto-oxidativo en *M. xanthus*

La luz es necesaria para numerosos procesos biológicos, pero en exceso puede generar 1O_2 , causando estrés foto-oxidativo. El 1O_2 es una especie muy reactiva que daña numerosos componentes de la célula como lípidos, proteínas, DNA y RNA (Ryter & Tyrrell, 1998; Ziegelhoffer & Donohue, 2009), por lo que los organismos han desarrollado diferentes mecanismos para hacer frente al estrés foto-oxidativo. En la bacteria *M. xanthus*, la única respuesta a la luz conocida hasta la fecha consiste en la síntesis de carotenoides. Dos mecanismos independientes se encargan de percibir la presencia o no de luz y de regular que dicha respuesta fotoprotectora ocurra solo

cuando es necesaria: uno dependiente del fotorreceptor CarH y de su asociación con AdoB₁₂, y otro dependiente de CarF, de la pareja de factores σ -ECF/anti- σ CarQ/CarR y de otros factores reguladores como CarD/CarG, IHF, CarS y CarA (Figura 9). La luz regula la expresión y/o la actividad de varios de dichos factores y, de ese modo, regula la expresión fotoinducible de los genes estructurales que determinan las enzimas carotenogénicas (Elías-Arnanz *et al.*, 2011). En la vía principal para la percepción de la luz, la que depende de CarF, la misma molécula que provoca el daño foto-oxidativo, el ¹O₂, es a su vez la señal que dispara la cascada de regulación que culmina con la síntesis de carotenoides. En este trabajo se ha demostrado que, sorprendentemente, CarF es necesaria para transducir la señal del ¹O₂ porque se requiere para la síntesis de los plasmalógenos. Desconocemos cómo este tipo particular de glicerofosfolípidos canaliza la señalización del estrés foto-oxidativo y si se requiere algún factor proteico adicional que actúe entre los plasmalógenos y CarR que, de existir, quizás podría identificarse en estudios de expresión a escala global. También desconocemos si, además de la respuesta carotenogénica, *M. xanthus* pone en marcha otros mecanismos para paliar el estrés provocado por la luz, que conlleven cambios en la expresión génica, más allá de los ya conocidos. Por ello, uno de los objetivos de esta tesis ha sido profundizar en nuestro conocimiento del regulón asociado a la respuesta a la luz, ya sea dependiente o no de CarQ, mediante el análisis a escala global de los cambios de expresión génica provocados por la exposición a dicho agente ambiental.

III.3.1 Análisis transcriptómicos en oscuridad y en luz

En una primera aproximación, utilizando la técnica de hibridación con *microarrays* (Agilent, sintetizados por encargo), se determinaron los perfiles de expresión de la estirpe silvestre y los de una estirpe que carece de CarQ en oscuridad versus (vs.) luz a distintos tiempos (1, 3 y 8 horas). Además, dado el avance en las técnicas de secuenciación masiva que se ha producido en los últimos años, se optó por complementar los datos obtenidos por *microarrays* con datos transcriptómicos obtenidos por *RNA-seq*. El alineamiento de las secuencias con un genoma de referencia en el que se basa el *RNA-seq* suele ser más preciso que la hibridación entre oligonucleótidos de los *microarrays*, lo que permite que la transcripción se estudie a mucha más resolución. Además, la cuantificación de la expresión génica por *RNA-seq* no presenta los problemas de interferencia entre genes debido a una hibridación no específica del cDNA con las sondas (Cloonan & Grimmond, 2008; Kane *et al.*, 2000). Por otro lado, en los análisis de *microarrays* los niveles de expresión génica se miden a través de la detección de fluorescencia, mientras que en los análisis de *RNA-seq* la expresión génica se estima contando las lecturas que se asignan a los

genes. Para que los niveles de expresión génica estimados por *RNA-seq* de diferentes genes y experimentos sean comparables se utilizan métodos de normalización como el RPKM (*Reads Per Kilobase per Million mapped reads*) o el FPKM (*Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*) que tienen en cuenta el número de lecturas, la longitud del gen y la profundidad de secuenciación. La ventaja de medir la expresión génica mediante RPKM/FPKM es que los valores no pueden saturarse, mientras que en el método de detección de fluorescencia de los *microarrays* sí se produce saturación. Por tanto, la técnica de *RNA-seq* permite medir rangos de expresión mucho mayores, siendo más discriminadora a niveles altos de expresión y más sensible a niveles bajos (Croucher & Thomson, 2010; Guo *et al.*, 2013).

Para obtener las muestras de cultivo para la extracción del RNA, se partió de la estirpe silvestre o de la estirpe carente de CarQ (MR1418, portadora de la delección de *carQRS*, en los experimentos de *microarrays*; MR3081, generada en este trabajo y portadora de la delección solo de *carQ*, en los experimentos de *RNA-seq*) crecidas durante 1, 3 y 8 horas en oscuridad o luz, a partir de un cultivo de la estirpe correspondiente crecido en la oscuridad hasta una $DO_{550} \sim 0,8/0,9$ (Figura 48). En los análisis de *microarrays*, este proceso se realizó por duplicado con muestras derivadas de otro cultivo independiente para analizar dos réplicas biológicas de cada estirpe. En los análisis de *RNA-seq*, dicho proceso se llevó a cabo por duplicado para las muestras de la estirpe silvestre y la muestra de 1 hora de la estirpe $\Delta carQ$ (de las muestras de 3 y 8 horas solo se analizó una réplica biológica).

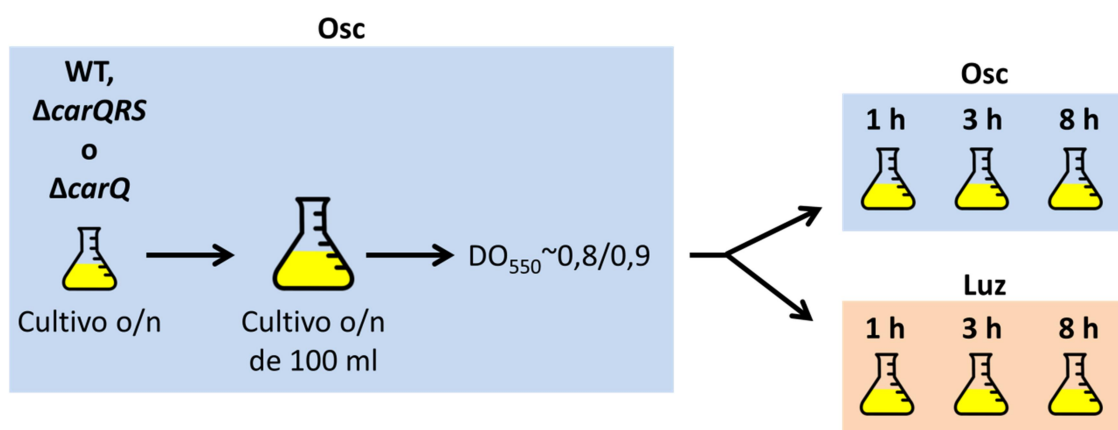


Figura 48. Protocolo seguido para la obtención de las muestras de cultivo para la extracción de RNA. Se crecieron cultivos de 10 ml de las estirpes de *M. xanthus* indicadas en la oscuridad durante toda la noche (o/n, *overnight*). Al día siguiente, cada cultivo se pasó a un volumen final de medio de cultivo de 100 ml y se dejó creciendo o/n. Cuando se alcanzó una $DO_{550} \sim 0,8/0,9$, cada cultivo se dividió en seis, dejando tres de ellos en la oscuridad y los otros tres en la luz, para la recolección de muestras a 1, 3 y 8 horas.

A continuación, se extrajo y cuantificó el RNA de las muestras y, tras comprobar que las muestras presentaban un RIN mayor de 8, se llevó a cabo el análisis de expresión génica por *microarrays* (empresa BIOARRAY) o por *RNA-seq* (empresa Novogene). Para estudiar qué genes muestran una expresión diferencial en la luz se compararon los transcriptomas de la estirpe silvestre o de la estirpe carente de CarQ en oscuridad (condición control) a 1, 3 y 8 horas con los de la estirpe silvestre o de la estirpe carente de CarQ en luz a 1, 3 y 8 horas, respectivamente. En los análisis de *RNA-seq*, solo se consideraron significativos aquellos genes con un valor p ajustado inferior a 0,05 (95% de confianza estadística) y, en los análisis de *microarrays*, con un valor de expresión diferencial (*fold change* o FC) ≥ 2 o ≤ -1 y un valor p inferior a 0,01. En el análisis de los datos de *RNA-seq*, se detectaron: 58 genes con expresión más alta en la luz que en la oscuridad y 29 genes con expresión más baja, en las muestras de 1 hora; 144 genes con expresión más alta en luz que en oscuridad y 40 genes con expresión más baja, en las muestras de 3 horas; y 785 genes con expresión más alta en luz que en oscuridad y 426 genes con expresión más baja, en las muestras de 8 horas (Figura 49A). Aunque el número de genes activados y reprimidos fue mayor conforme aumentó la exposición a la luz, la proporción (expresada en %) de genes que se activaban respecto a los que se reprimían no mostró variaciones notables a los distintos tiempos (Figura 49A). Igualmente, en el análisis de los datos de *microarrays*, se detectaron: 96 genes con expresión más alta en la luz que en la oscuridad y 135 genes con expresión más baja, en las muestras de 1 hora; 72 genes con expresión más alta en luz que en oscuridad y 37 genes con expresión más baja, en las muestras de 3 horas; y 317 genes con expresión más alta en luz que en oscuridad y 590 genes con expresión más baja, en las muestras de 8 horas (Figura 49B). Nuevamente, el número de genes activados y reprimidos fue mayor a las 8 horas de exposición a la luz (Figura 49B).

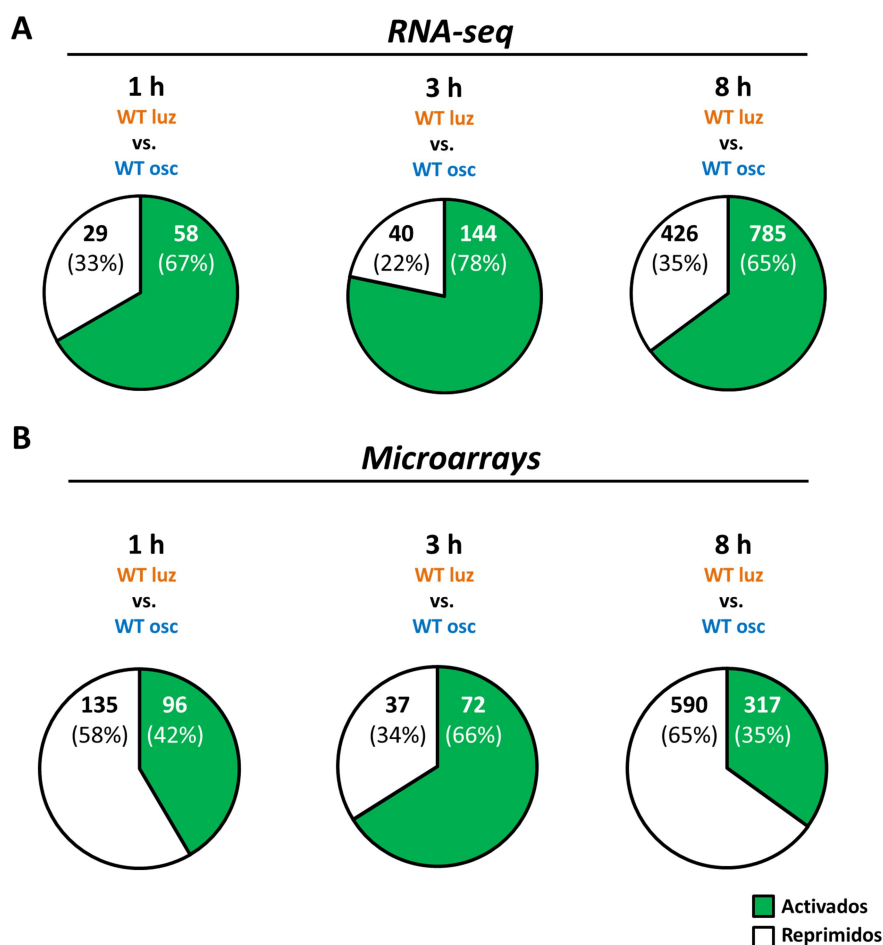


Figura 49. Número de genes activados y reprimidos en los análisis transcriptómicos. Se muestra el número y el porcentaje (entre paréntesis) de los genes activados (en verde) o reprimidos (en blanco) al comparar por *RNA-seq* (A) o *microarrays* (B) la estirpe silvestre (WT) en oscuridad y en luz a los tiempos indicados.

Este trabajo se ha centrado en el estudio de aquellos genes cuya expresión aumenta en respuesta a la luz, diferenciando dos grandes grupos: genes dependientes e independientes de CarQ. Para facilitar el análisis se realizó la agrupación jerárquica de los datos obtenidos a distintos tiempos en los ensayos de *RNA-seq* y de *microarrays*, comparando la estirpe silvestre con la estirpe carente de CarQ (la agrupación jerárquica ha sido realizada en colaboración con el Dr. Miguel Ángel Hernández Prieto, Universidad de Sídney).

III.3.1.1 Genes dependientes de CarQ

Uno de los objetivos del análisis global de la respuesta a la luz ha sido determinar si el regulón de CarQ se extiende más allá de los genes ya conocidos, implicados en la síntesis de carotenos. Dichos nuevos genes deberían mostrar un patrón de expresión dependiente de CarQ, es decir, fotoinducción en la estirpe

silvestre pero no en la estirpe que carece de CarQ, y cabría esperar que se agrupasen con los genes carotenogénicos (si sus niveles de expresión son similares). Como puede observarse en la Figura 50, el *cluster* en el que aparecen la mayoría de los genes carotenogénicos engloba otros genes relevantes que se comentarán más adelante. Además, el análisis de toda la agrupación jerárquica reveló algún gen adicional con un patrón de expresión similar, pero incluido en otro *cluster* (Figura 50). El futuro procesamiento de más réplicas biológicas de la estirpe $\Delta carQ$ permitirá realizar una clasificación de los genes más refinada.

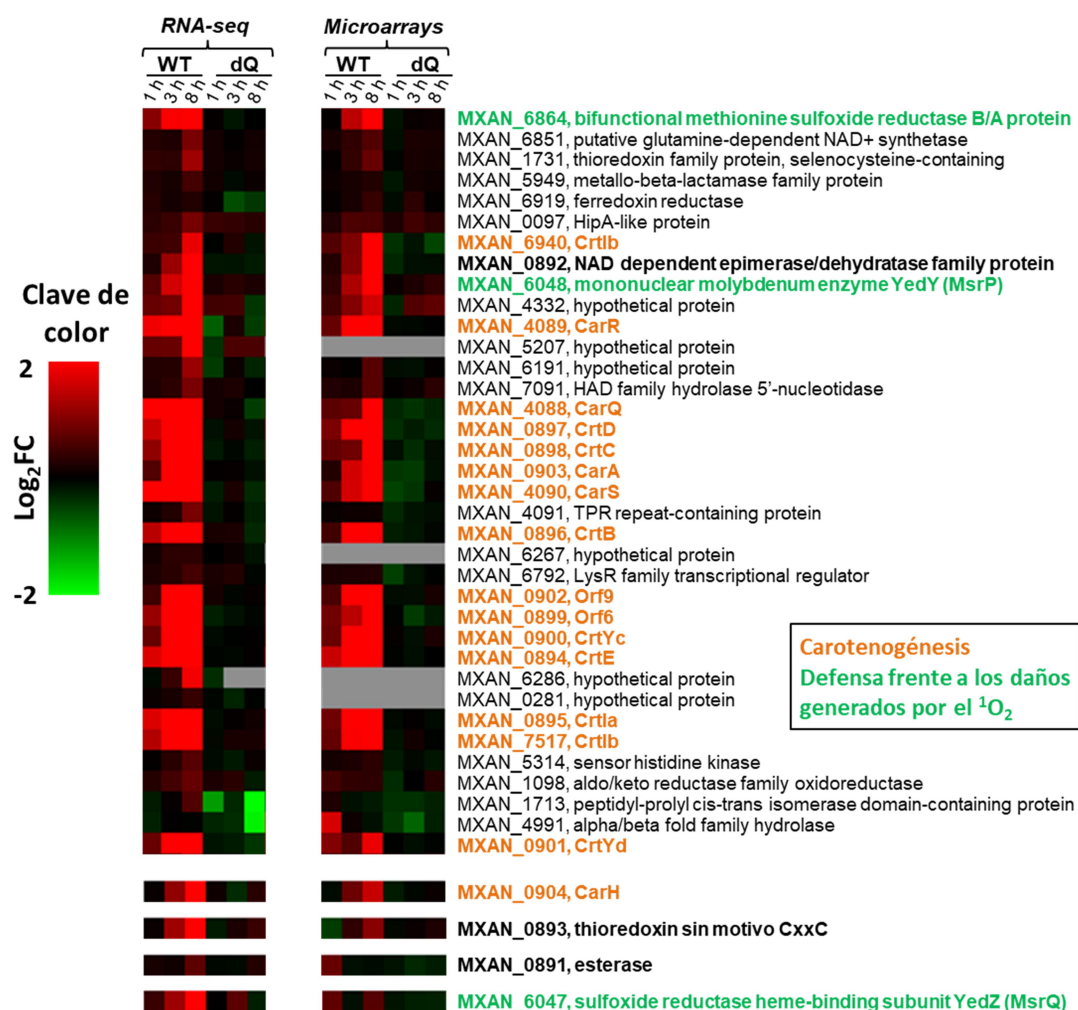


Figura 50. Genes dependientes de CarQ. Se muestran los genes que presentan un patrón de expresión dependiente de CarQ. Cada fila representa un gen y cada columna una comparación (luz vs. oscuridad a un tiempo determinado) indicada en la parte superior. El color rojo indica un incremento de la expresión y el color verde una bajada de la expresión, siendo la intensidad del color proporcional al cambio de expresión. WT: estirpe silvestre; dQ: estirpe carente de CarQ. Los nombres de los genes se encuentran en naranja o verde en función de si están relacionados con la carotenogénesis o la defensa frente a los daños generados por el ¹O₂, respectivamente. En negrita se destacan otros genes de interés.

III.3.1.1.1 Genes relacionados con la carotenogénesis

El análisis de expresión diferencial puso de manifiesto la fotoinducción en la estirpe silvestre, pero no en la estirpe carente de CarQ, de la mayoría de los genes reguladores y estructurales implicados en la síntesis de carotenos (recuérdese que la expresión de *carF*, *ihfA* y de *carD/carG* es constitutiva; Figura 51A), quedando así validado tanto el procedimiento experimental seguido como el análisis bioinformático de los datos. Todos los genes carotenogénicos, menos *carH*, se agrupan en varios subgrupos dentro de un mismo *cluster* (Figura 50 y 51A). En general, el análisis por *RNA-seq* se mostró más sensible que el análisis por *microarrays* (Figura 51A y B). Así pues, en los datos de *RNA-seq* de la estirpe silvestre, ya tras 1 hora de exposición a la luz se observó un aumento de la expresión de casi todos los genes carotenogénicos (exceptuando *orf9*, *carA* y *carH*, que son precisamente los que se encuentran al final del súper-operón *carB-carA*; Figura 51C); a las 3 horas ya se detectaron todos los genes, con niveles de fotoinducción mayores que a la hora; y a las 8 horas siguieron detectándose todos ellos, con niveles de fotoinducción aún superiores. En el caso de los *microarrays*, también se observó el aumento en los niveles de fotoinducción con el tiempo de exposición a luz, pero solo se detectó fotoinducción de todos los genes a las 8 horas (Figura 51A y B).

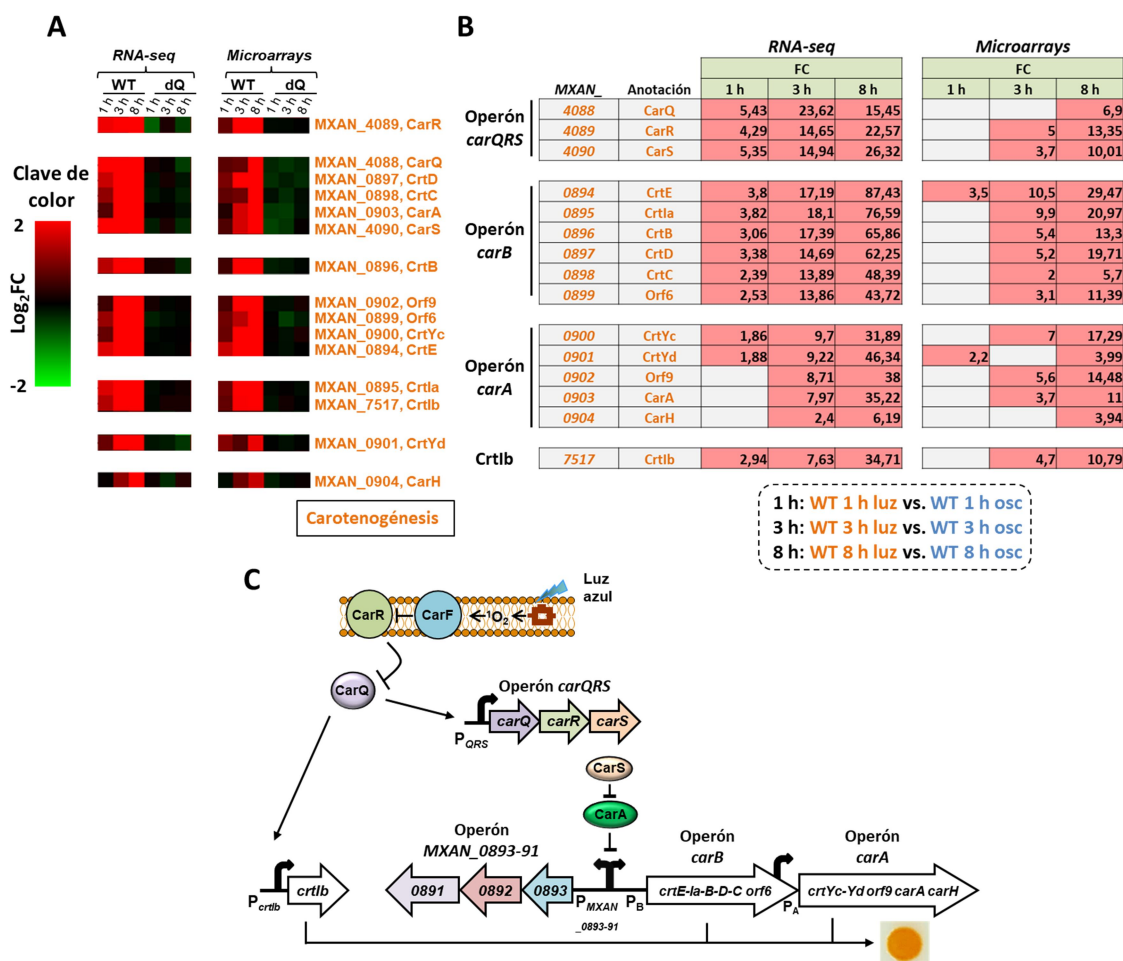


Figura 51. Análisis de expresión de los genes relacionados con la carotenogénesis. A) Expresión diferencial de los genes carotenogénicos y su dependencia de CarQ. WT: estirpe silvestre; dQ: estirpe carente de CarQ. **B)** Tabla comparativa de los resultados obtenidos por *microarrays* y *RNA-seq* al comparar la estirpe silvestre en luz vs. oscuridad a 1, 3 y 8 horas. Las celdas rojas indican fotoinducción, especificando el valor de FC. **C)** Esquema recordatorio del modelo de regulación de la carotenogénesis y de la organización en operones de los genes reguladores y estructurales implicados (se omiten los genes *carF*, *ihfA* y *carD/carG*, cuya expresión no es fotoinducible); el esquema incluye el operón *MXAN_0893-0891*, adyacente al súper-operón *carB-carA*, que se expresa de manera divergente y que se discute en el siguiente apartado.

III.3.1.1.2 Identificación de nuevos genes dependientes de CarQ

De entre los genes incluidos en el mismo *cluster* que los carotenogénicos, nos llamaron la atención tres de ellos: *MXAN_6864*, *MXAN_6048* y *MXAN_0892*, que muestran una fotoinducción clara, dependiente de CarQ, a las 3 y 8 horas (*MXAN_6864* también a 1 hora) (Figura 50 y 52). Cabe destacar que tanto *MXAN_6864* como *MXAN_6048* determinan posibles reductasas de sulfóxidos de metionina, un tipo de enzimas que protegen a las proteínas del daño oxidativo originado por los ROS, reduciendo los residuos de metionina oxidados para restaurar

su actividad biológica (Han *et al.*, 2016; Weissbach *et al.*, 2002). Es sabido que la oxidación de la metionina puede generar dos estereoisómeros: sulfóxido-*S* de metionina (Met-*S*-O) y sulfóxido-*R* de metionina (Met-*R*-O), y que hay reductasas que basan su modo de acción en el uso de tioles (MSRs) y otras que son dependientes de molibdeno (YedY/MsrP) (Han *et al.*, 2016; Kappler *et al.*, 2019).

Las MSRs, cuyo mecanismo de acción está basado en una cascada redox en la que participa la tiorredoxina, a su vez se clasifican en de tipo MsrA o de tipo MsrB en función de si revierten el estereoisómero *S* o *R*, respectivamente. Cuando la MSR ejerce su función reductora sobre los residuos de metionina oxidados, se origina un puente disulfuro entre dos de sus residuos de cisteína, y la acción reductora de una tiorredoxina permite la regeneración de la enzima para el siguiente ciclo de reacción (Han *et al.*, 2016; Kappler *et al.*, 2019). En algunas bacterias, aparecen versiones MSR bifuncionales, producto de la fusión de MsrA y MsrB, ya sea en el orden A/B (las mejor estudiadas) o B/A. El análisis del producto del gen *MXAN_6864* sugiere que se trataría precisamente de una MSR de tipo B/A (MsrB/A), capaz de reducir ambos estereoisómeros. En bacterias, las MSRs bifuncionales pueden ser citoplásmicas o extracitoplásmicas. Diferentes programas predictivos (SignalP, Phobius, Philius) sugieren la presencia de un péptido señal en *MXAN_6864* que apuntaría a una localización en el periplasma de esta MSR bifuncional.

Por otro lado, el análisis del producto de *MXAN_6048* reveló homología con YdeY/MsrP, un tipo de proteínas bacterianas periplásmicas poco caracterizadas que recientemente se han relacionado con una actividad reductasa nueva, tanto de Met-*S*-O como de Met-*R*-O, dependiente de molibdeno (Gennaris *et al.*, 2015). Acorde con una posible localización periplásmica de *MXAN_6048*, los programas predictivos (SignalP, Phobius, Philius) sugieren la presencia de un péptido señal en dicha proteína. Está descrito que YdeY/MsrP funciona acoplada a YedZ/MsrQ, una proteína de unión a hemo con seis dominios transmembranales, que actúa como donador de electrones a la reductasa y cuyo gen suele formar un operón con el de la subunidad catalítica (Gennaris *et al.*, 2015). El análisis del contexto genómico de *MXAN_6048* reveló un gen inmediatamente aguas abajo, ***MXAN_6047***, que precisamente determina una proteína similar a YedZ/MsrQ, para la que se predicen los seis dominios transmembranales esperados. Además, aunque en la agrupación jerárquica de los patrones de expresión, *MXAN_6047* no aparece en el mismo *cluster* que *MXAN_6048*, su patrón de expresión es también fotoinducible y dependiente de CarQ (Figura 50 y 52). Estos datos indican que la luz, a través de CarQ, activa no solo una MSR bifuncional sino también un sistema MsrPQ. Ello sugiere que la oxidación de las

metioninas proteicas debe ser uno de los principales daños provocados por el estrés luminoso en *M. xanthus* y que, para paliarlo, no basta con la síntesis de carotenos, sino que se requiere la expresión de una batería de enzimas capaces de revertir dicho daño.

El otro gen englobado en el *cluster* de los genes carotenogénicos que nos llamó la atención, **MXAN_0892**, es el segundo gen de un posible operón localizado justo al lado del operón *carB*, pero que se transcribe en sentido opuesto (Figura 51C). El supuesto operón contiene otros dos genes, **MXAN_0893** y **MXAN_0891**, que cabría esperar mostrasen un patrón de expresión similar al de **MXAN_0892**. Aunque **MXAN_0893** (el primer gen del operón) se agrupa en otro *cluster* en el análisis jerárquico de los datos transcriptómicos, el patrón de expresión mostrado por dicho gen se asemeja bastante al de **MXAN_0892**, sobre todo en los datos de *RNA-seq* (Figura 50 y 52). Por el contrario, **MXAN_0891** apenas mostró fotoinducción ni en los datos de *RNA-seq* ni en los de *microarrays*, ya sea porque se trata del último gen del supuesto operón y presenta niveles de expresión inferiores o porque realmente no forma parte de dicho operón. El gen **MXAN_0893** determina una proteína que se asemeja a las tioredoxinas, pero que carece del motivo característico CxxC, por lo que debe estar realizando otra función. Los genes **MXAN_0892** y **MXAN_0891** determinan una posible epimerasa y esterasa, respectivamente. Por el momento, desconocemos qué relación puede tener la fotoinducción de estos genes con la defensa frente al estrés foto-oxidativo.

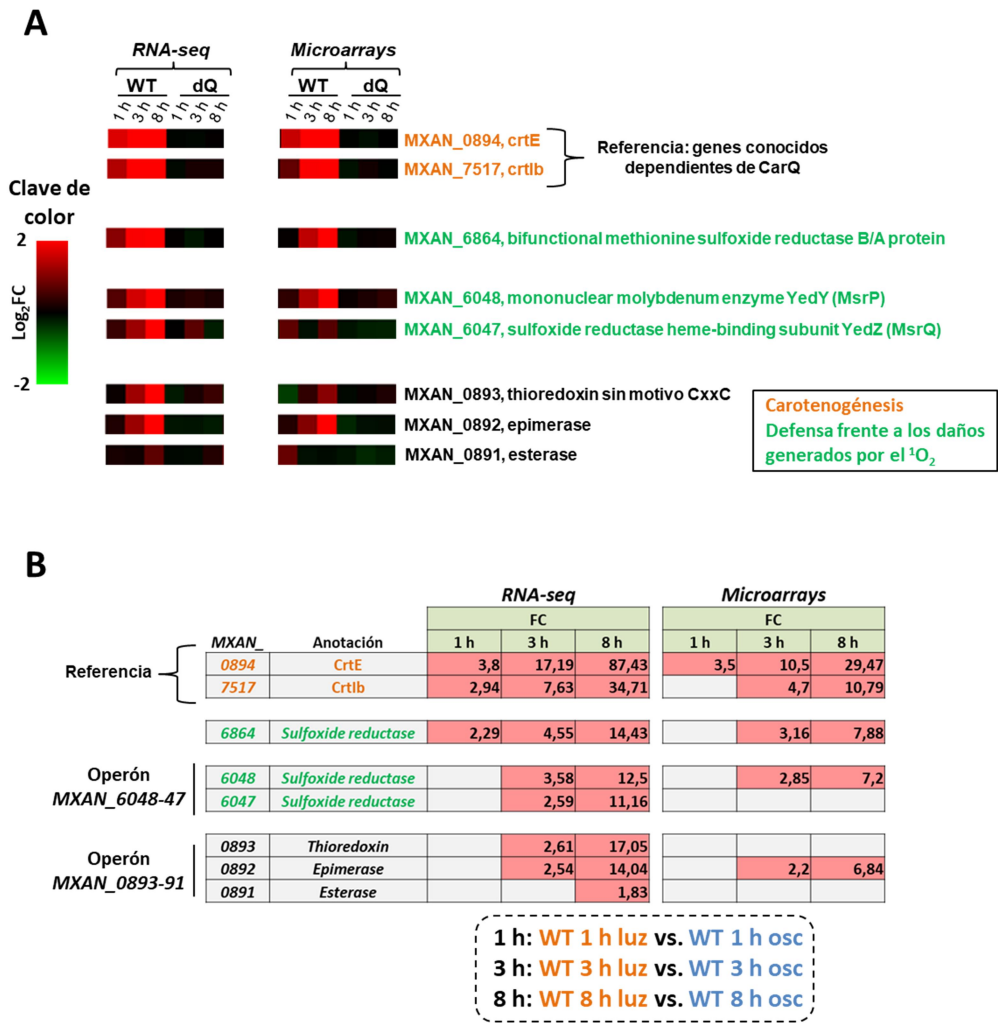


Figura 52. Análisis de expresión de nuevos genes dependientes de CarQ. **A)** Expresión diferencial de los nuevos genes identificados cuya expresión depende de CarQ. WT: estirpe silvestre; dQ: estirpe carente de CarQ. Los nombres de los genes se encuentran en naranja o verde en función de si están relacionados con la carotenogénesis o la defensa frente a los daños generados por el ¹O₂, respectivamente. **B)** Tabla comparativa de los resultados obtenidos por *microarrays* y *RNA-seq* al comparar la estirpe silvestre en luz vs. oscuridad a 1, 3 y 8 horas. Las celdas rojas indican fotoinducción, especificando el valor de FC. Como referencia de genes dependientes de CarQ se han utilizado *crtE* y *crtIb*.

La fotoinducción de los nuevos genes dependientes de CarQ identificados podría estar mediada por el reconocimiento directo de los correspondientes promotores por CarQ, como ocurre en P_{QRS} y P_{crtIb} o, indirectamente, por la fotoinducción dependiente de CarQ de una proteína reguladora, como ocurre en el promotor P_B (Figura 51C). Los dos promotores dependientes de CarQ conocidos tienen un par de motivos que suelen estar presentes en otros promotores dependientes de factores σ-ECF: un 'AAC' en la región -35 y un 'CGT' en la región -10 (separados por 16 pb en P_{QRS} y por 17 pb en P_{crtIb}) (Abellón-Ruiz *et al.*, 2014; Helmann, 2002; Lane & Darst, 2006). El alineamiento de P_{QRS} y P_{crtIb} indica la

conservación, además, de varias G's entre ambos promotores (Figura 53). Utilizando como referencia estas características comunes, se procedió a inspeccionar visualmente las regiones aguas arriba de los nuevos genes en busca de posibles sitios de unión de CarQ. Tanto aguas arriba de *MXAN_6864* como de *MXAN_6048-47* se observó un posible sitio de unión de CarQ, con los motivos 'AAC' y 'CGT' separados por 17 pb, como en P_{ctrlb} (Figura 53). El alineamiento de los dos sitios conocidos con el de los dos posibles nuevos sitios produjo una secuencia logo en la que destacan, además de los motivos 'AAC' y 'CGT', cuatro G's conservadas entre los cuatro promotores (una está aguas arriba del 'AAC' y las otras tres en el espaciador entre ambos motivos; Figura 53). A falta de confirmación experimental, estas observaciones apuntan a que, en efecto, la expresión de *MXAN_6864* y de *MXAN_6048-47* depende directamente de CarQ. La secuencia consenso mostrada en la Figura 53 reflejaría entonces las características distintivas del sitio de reconocimiento de CarQ, que permiten la unión selectiva de este factor σ -ECF frente a otros que también reconocen los motivos 'AAC' y 'CGT'.

En la región aguas arriba de *MXAN_0893-91*, sin embargo, no se observó ninguna secuencia que se ajuste a las características mencionadas en el párrafo anterior, sino más bien un posible promotor dependiente de σ^A (el factor σ principal), sugiriendo que en este caso la dependencia de CarQ es indirecta. Puesto que la región -35 del promotor P_B , que depende de σ^A (López-Rubio *et al.*, 2004), solapa con la posible región -35 del promotor de *MXAN_0893-91*, es probable que la regulación por CarQ se ejerza a través del antirrepresor CarS (Figura 51C). Cabe esperar que la unión de CarA a su operador en P_B bloquee no solo el acceso de la RNAP a dicho promotor sino también al de *MXAN_0893-91*, y que la acción antagonista de CarS resulte en la desrepresión de ambos promotores.

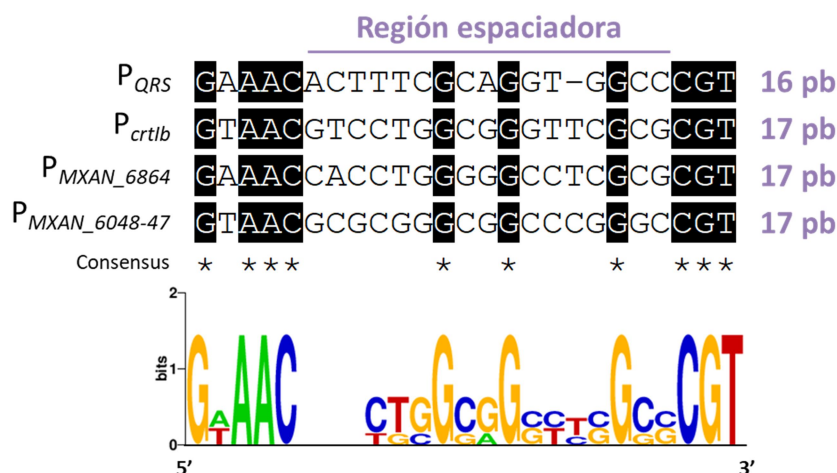


Figura 53. Análisis de promotores dependientes de CarQ. Alineamiento de P_{QRS} , P_{crtIb} , P_{MXAN_6864} y $P_{MXAN_6048-47}$ y su representación Weblogo resultante. pb, pares de bases.

III.3.1.2 Genes independientes o semi-independientes de CarQ

Además de los genes mencionados en el apartado anterior, el análisis de los datos transcriptómicos reveló otros genes no identificados previamente cuya expresión se incrementa en la luz, pero de una manera independiente o semi-independiente de CarQ. En este trabajo nos hemos centrado en el análisis de genes que determinan proteínas relacionadas con la defensa frente a los daños generados por el 1O_2 , así como mecanismos reguladores en respuesta a este ROS. Para su presentación en este apartado, dichos genes se han agrupado en función de su cinética de expresión, diferenciando genes de inducción temprana, intermedia o tardía.

III.3.1.2.1 Genes con una cinética de expresión temprana

Entre los genes independientes de CarQ que presentan un aumento de expresión a partir de 1 hora de exposición a la luz destaca el operón ***MXAN_0665-67*** (Figura 54A). En la estirpe silvestre, los niveles de fotoinducción de estos genes se mantienen más o menos constantes a los tres tiempos de exposición a la luz en los datos de *RNA-seq* (en los de *microarray* no se observan a la hora) presentando unos niveles de fotoinducción similares a los de los genes carotenogénicos a la hora, pero más bajos a las 3 y 8 horas (Figura 54B).

El gen *MXAN_0665* determina un regulador transcripcional de la familia TetR, una clase de sistemas de un componente formados por un único polipéptido que presenta un dominio sensor y un dominio de unión al DNA. La familia de reguladores TetR se relaciona con la resistencia a antibióticos y la regulación de genes que codifican exportadores de pequeñas moléculas. Además, también regulan genes

relacionados con el metabolismo, la producción de antibióticos, el *quorum sensing*, y otros muchos aspectos de la fisiología procariótica. Generalmente, funcionan como represores que presentan el dominio de unión al DNA en la región N-terminal y el dominio sensor en la región C-terminal. La interacción con uno o más ligandos altera la unión del regulador al DNA (Cuthbertson & Nodwell, 2013). El gen *MXAN_0667* determina un transportador de la familia RND (*Resistance-Nodulation-Division*) que proporciona resistencia a múltiples fármacos (y otros compuestos) en bacterias Gram negativas (Nikaido & Takatsuka, 2009). Las bombas RND utilizan los protones como fuente de energía y siempre están asociadas con otras dos proteínas para su correcto funcionamiento: un canal de la membrana externa perteneciente a la familia de proteínas OMF (*outer membrane factor*) y una proteína adaptadora periplásmica clasificada dentro de la familia MFP (*membrane fusion protein*) (Blanco *et al.*, 2016; Nikaido & Takatsuka, 2009). Curiosamente, el otro gen del operón, *MXAN_0666*, determina una proteína MFP. Quizás el propio *MXAN_0665* perciba de algún modo el estrés oxidativo y sea el responsable de regular su propia expresión y la de los genes contiguos.

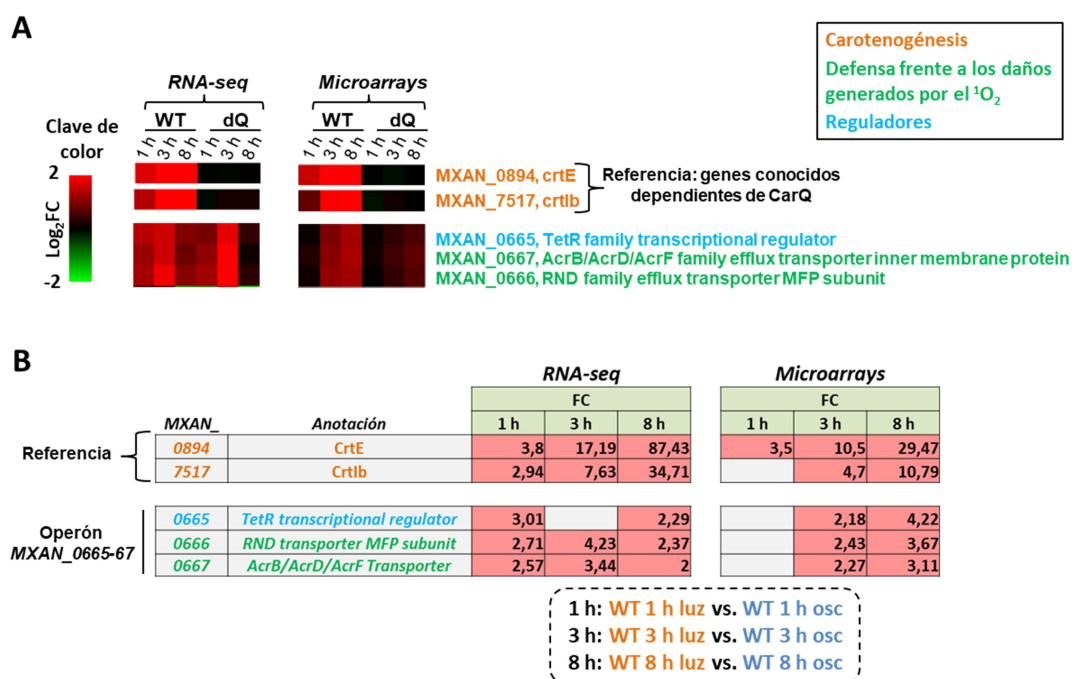


Figura 54. Análisis de expresión del operón *MXAN_0665-67*. **A)** Patrón de expresión diferencial del operón *MXAN_0665-67*. WT: estirpe silvestre; dQ: estirpe carente de CarQ. Los nombres de los genes se encuentran en naranja, verde o azul en función de si están relacionados con la carotenogénesis, la defensa frente a los daños generados por el ¹O₂ o mecanismos reguladores en respuesta al ¹O₂, respectivamente. **B)** Tabla comparativa de los resultados obtenidos por *microarrays* y *RNA-seq* al comparar la estirpe silvestre en luz vs. oscuridad a 1, 3 y 8 horas. Las celdas rojas indican fotoinducción, especificando el valor de FC. Como referencia de genes dependientes de CarQ se han utilizado *crtE* y *crtIb*.

III.3.1.2.2 Genes con una cinética de expresión intermedia

Otro grupo de genes independientes de CarQ, muchos de ellos clasificados dentro de un mismo *cluster*, se caracteriza por presentar un aumento de expresión a partir de 3 horas de exposición a la luz (Figura 55A). Dentro de este grupo se encuentran los genes **MXAN_5311**, **MXAN_5845** y **MXAN_5313** que podrían formar parte de los sistemas de dos componentes (S2C) (Figura 55A). Estos sistemas están constituidos por una quinasa de histidinas, que es la encargada de percibir el estímulo y regular la ruta de señalización, y un regulador de la respuesta, que promueve la respuesta celular. En general, la quinasa de histidinas se autofosforila en un residuo de histidina, el grupo fosforilo se transfiere a un residuo de aspártico localizado en el dominio receptor del regulador de la respuesta e induce un cambio conformacional que lo activa para responder al estímulo (Gao & Stock, 2009). El gen **MXAN_5313** determina un posible regulador de la respuesta con un dominio efector de unión al DNA de tipo CpxR y forma parte de un operón con el gen **MXAN_5314**, el cual determina una quinasa de histidinas. Por tanto, el operón **MXAN_5313-14** podría constituir un S2C. Por otro lado, los genes **MXAN_5311** y **MXAN_5845** determinan una proteína con un posible dominio CpxP. En bacterias Gram negativas como *E. coli*, se ha observado que dichas proteínas funcionan como un regulador negativo del S2C CpxA (quinasa de histidinas)/CpxR (regulador de la respuesta) relacionado con la respuesta frente a estreses de la envoltura celular, tales como la presencia de proteínas mal plegadas. En ausencia del estímulo, CpxP inhibe a CpxA. Cuando se detectan proteínas mal plegadas, CpxP deja de inactivar a CpxA, que transmite la señal a CpxR, activando así la respuesta del regulón *cpx* (del que forma parte *cpxP*). Cuando el daño es reparado, CpxP se acumula y vuelve a apagar el sistema. Además, diversos estudios han propuesto que CpxP también podría actuar como un adaptador o chaperona, asociándose con proteínas de la envoltura celular mal plegadas y facilitando su degradación o plegamiento por la proteasa DegP (Isaac *et al.*, 2005; Thede *et al.*, 2011). **MXAN_5311** se encuentra justo aguas arriba de **MXAN_5313-14**, y es posible que estén relacionados funcionalmente, pero es improbable que formen parte del mismo operón, dada la distancia intergénica de casi 300 pb entre el extremo 3' de **MXAN_5311** y el extremo 5' de **MXAN_5313**. Por su parte, **MXAN_5845** se encuentra aguas arriba de **MXAN_5846**, que determina una posible metalocarboxipeptidasa, quizás formando un operón (distancia intergénica de 93 pb). No obstante, en los datos transcriptómicos solo se observa un FC para **MXAN_5846** entre 1,5 y 2, a las 3 y 8 horas, y únicamente en los ensayos de *RNA-seq*.

Los genes **MXAN_1696** y **MXAN_1697** también aumentan su expresión a partir de 3 horas y alcanzan niveles de fotoinducción similares a algunos de los genes carotenogénicos (Figura 55). Aunque contiguos y organizados en el mismo sentido (**MXAN_1697** se encuentra aguas arriba de **MXAN_1696**) es improbable que formen parte de un mismo operón, dada la distancia intergénica de 321 pb. Por un lado, **MXAN_1696** determina un producto con un posible dominio inmunoglobulina (*Ig-like*). Este dominio suele encontrarse asociado a proteínas que median la adhesión bacteriana, aunque también se ha observado en enzimas implicadas en procesos celulares tales como la defensa frente al estrés oxidativo y el plegamiento de proteínas, formando parte de oxidorreductasas y chaperonas del espacio periplásmico, respectivamente (Bodelón *et al.*, 2013). Por otro lado, **MXAN_1697** determina una proteína con un posible dominio *ferritin-like*, que puede estar asociado a proteínas con función protectora frente al estrés oxidativo derivado de un exceso de hierro, oxidando el exceso de iones ferrosos y convirtiéndolos en iones férricos, los cuales almacena. Por tanto, también podría actuar como reservorio de hierro para la célula (Smith, 2004).

Otros genes incluidos en este grupo son **MXAN_4277**, **MXAN_5394** y **MXAN_5435**, que muestran niveles similares de fotoinducción, y más altos a las 8 que a las tres horas. Los tres genes determinan posibles proteasas de serina de la familia S1 (*trypsin-like*) (Figura 55A). Este tipo de proteasas presentan una serina nucleofílica en su sitio activo, que ataca al carbonilo del enlace peptídico del sustrato (Page & Di Cera, 2008). Concretamente, la familia S1 constituye el grupo más grande de enzimas proteolíticas, las cuales funcionan como endopeptidasas. Estas proteínas se caracterizan por presentar una tríada catalítica formada por aspártico, histidina y serina, y por mostrar preferencia por arginina o lisina en el sitio P1 del sustrato (Tripathi & Sowdhamini, 2008). Los genes **MXAN_4277**, **MXAN_5394** y **MXAN_5435** podrían estar relacionados con proteólisis general destinada a la eliminación de proteínas dañadas por el estrés foto-oxidativo. También podrían estar relacionados con procesos de proteólisis regulada; o el proceso de lisis celular que a veces va asociado a la exposición a la luz, sobre todo en fase estacionaria.

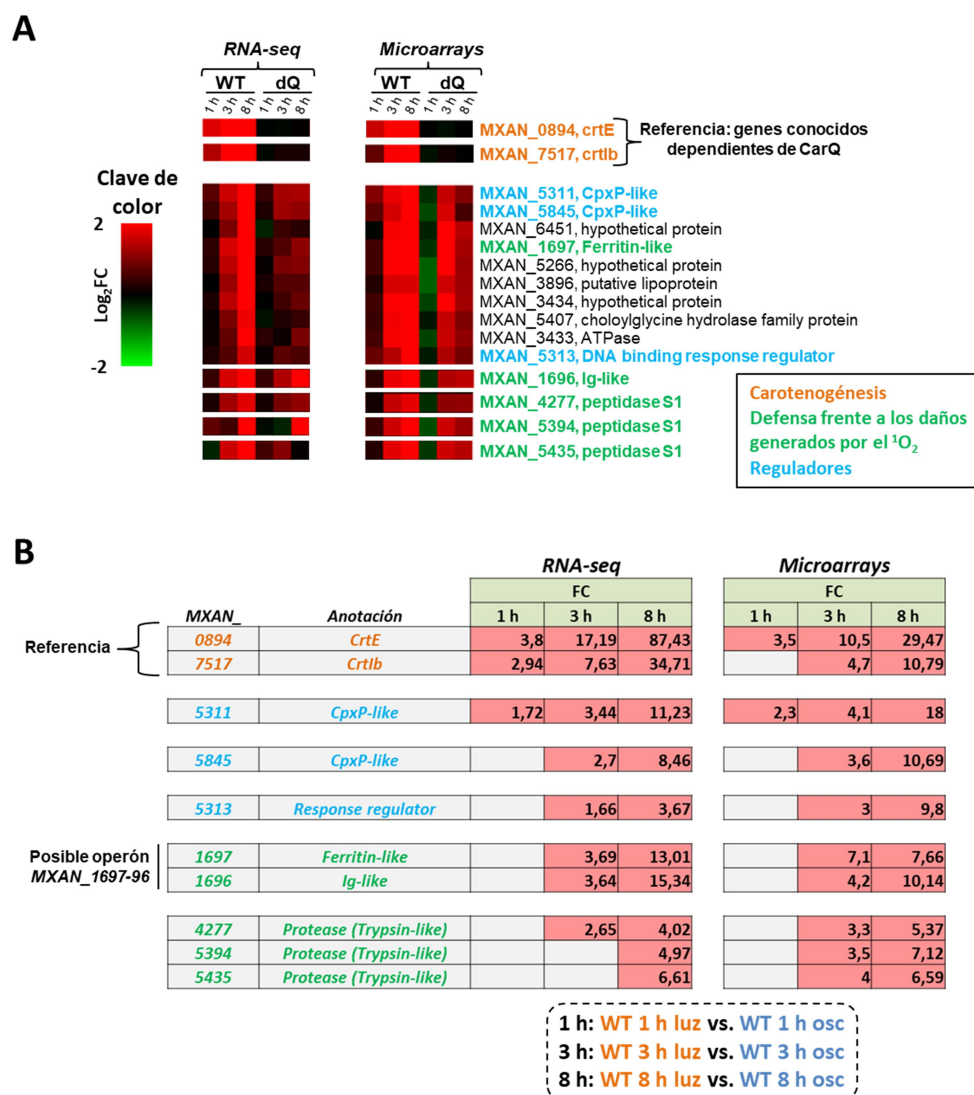


Figura 55. Análisis de expresión de genes independientes de CarQ con una cinética de expresión intermedia. A) Patrón de expresión diferencial. WT: estirpe silvestre; dQ: estirpe carente de CarQ. Los nombres de los genes se encuentran en naranja, verde o azul en función de si están relacionados con la carotenogénesis, la defensa frente a los daños generados por el ¹O₂ o mecanismos reguladores en respuesta al ¹O₂, respectivamente. **B)** Tabla comparativa de los resultados obtenidos por *microarrays* y *RNA-seq* al comparar la estirpe silvestre en luz vs. oscuridad a 1, 3 y 8 horas. Las celdas rojas indican fotoinducción, especificando el valor de FC. Como referencia de genes dependientes de CarQ se han utilizado *crtE* y *crtIb*.

III.3.1.2.3 Genes con una cinética de expresión tardía

Por último, se ha analizado un grupo de genes que a las 8 horas muestran un FC entre 2 y 5, pero apenas muestran fotoinducción a las 3 horas, y cuya fotoinducción en los análisis globales parece parcialmente independiente de CarQ (Figura 56A). Dentro de este grupo destaca el operón **MXAN_6025-26**. El gen *MXAN_6026* determina una posible subunidad ClpA de la proteasa dependiente de ATP ClpAP, que es responsable de la degradación selectiva de diversas proteínas,

controlando la calidad de las proteínas y la regulación de muchos procesos celulares. Concretamente, ClpA es una chaperona que pertenece a la familia de ATPasas AAA (*ATPases associated with various cellular activities*) (Kress *et al.*, 2009). ClpA es la encargada de reconocer el sustrato; tras ello, los sustratos son desnaturalizados y llevados a través de la ATPasa hacia el núcleo catalítico, en el que se produce la rotura (Battesti & Gottesman, 2013). El otro gen del operón, *MXAN_6025*, determina una posible proteína ClpS, que es un adaptador de la proteasa ClpAP. Las proteínas adaptadoras mejoran el reconocimiento del sustrato mediante interacción directa con el sustrato y con el dominio ATPasa de la proteasa (Battesti & Gottesman, 2013). ClpS también puede usarse como un adaptador para proteínas agregadas, e inhibe la degradación de otros sustratos de ClpAP al bloquear su unión a ClpA (Dougan *et al.*, 2002).

Otros genes a destacar forman el operón *MXAN_0554-53* que determina un posible transportador de la familia ABC, constituida por transportadores multidroga que utilizan la hidrólisis del ATP para expulsar los sustratos correspondientes (Blanco *et al.*, 2016). Están formados por dos dominios citosólicos, denominados NBD (*nucleotide-binding domain*), que unen e hidrolizan el ATP, y dos dominios transmembrana, denominados MD (*membrane-domain*), por los que pasan los sustratos (Du *et al.*, 2015). El gen *MXAN_0553* determina la región transmembranal del transportador ABC, mientras que el gen *MXAN_0554* determina el componente ATPasa.

El gen *MXAN_6931*, también incluido en este grupo, determina una posible tiorredoxina. Como se ha comentado en la Introducción, las tiorredoxinas son reductasas de pequeño tamaño (unos 12 kDa) implicadas en la protección frente al estrés oxidativo. Se caracterizan por tener el dominio conservado CxxC (Lu & Holmgren, 2014), también presente en *MXAN_6931*, necesario para su actividad biológica (Mustacich & Powis, 2000). Juegan un papel importante en la síntesis de DNA y la reparación de proteínas, reduciendo enzimas como la reductasa de ribonucleótidos y la reductasa de sulfóxidos de metionina, respectivamente. Además, también pueden reducir directamente el H_2O_2 , desactivar el 1O_2 y eliminar radicales hidroxilo, entre otras funciones (Zeller & Klug, 2006). Una vez realizada su función, la tiorredoxina en estado oxidado es reducida por una tiorredoxina reductasa mediante el empleo de NADPH; estos tres componentes constituyen el sistema tiorredoxina (Lu & Holmgren, 2014; Zeller & Klug, 2006). La fotoinducción de *MXAN_6931* podría ayudar a la regeneración de *MXAN_6864*, la reductasa de sulfóxidos de metionina de tipo MSR y, por tanto, dependiente de tiorredoxina, comentada anteriormente.

III. Resultados

También se ha incluido en este grupo el operón **MXAN_6122-23** que está constituido por dos genes acoplados traducionalmente que determinan posibles proteínas con función detoxificadora. Concretamente, el gen *MXAN_6122* determina una posible S-transferasa de glutatión (GST) perteneciente a la familia de GSTs citosólicas, unas enzimas presentes en formas de vida aerobias. Como se comentó en la Introducción, metabolizan una gran variedad de sustratos electrofílicos a través de la conjugación con el glutatión (Allocati *et al.*, 2009). Por otro lado, el gen *MXAN_6123* determina una posible glioxalasa que podría estar implicada en la degradación del metilglioxal procedente del estrés oxidativo (Kalapos, 1999).

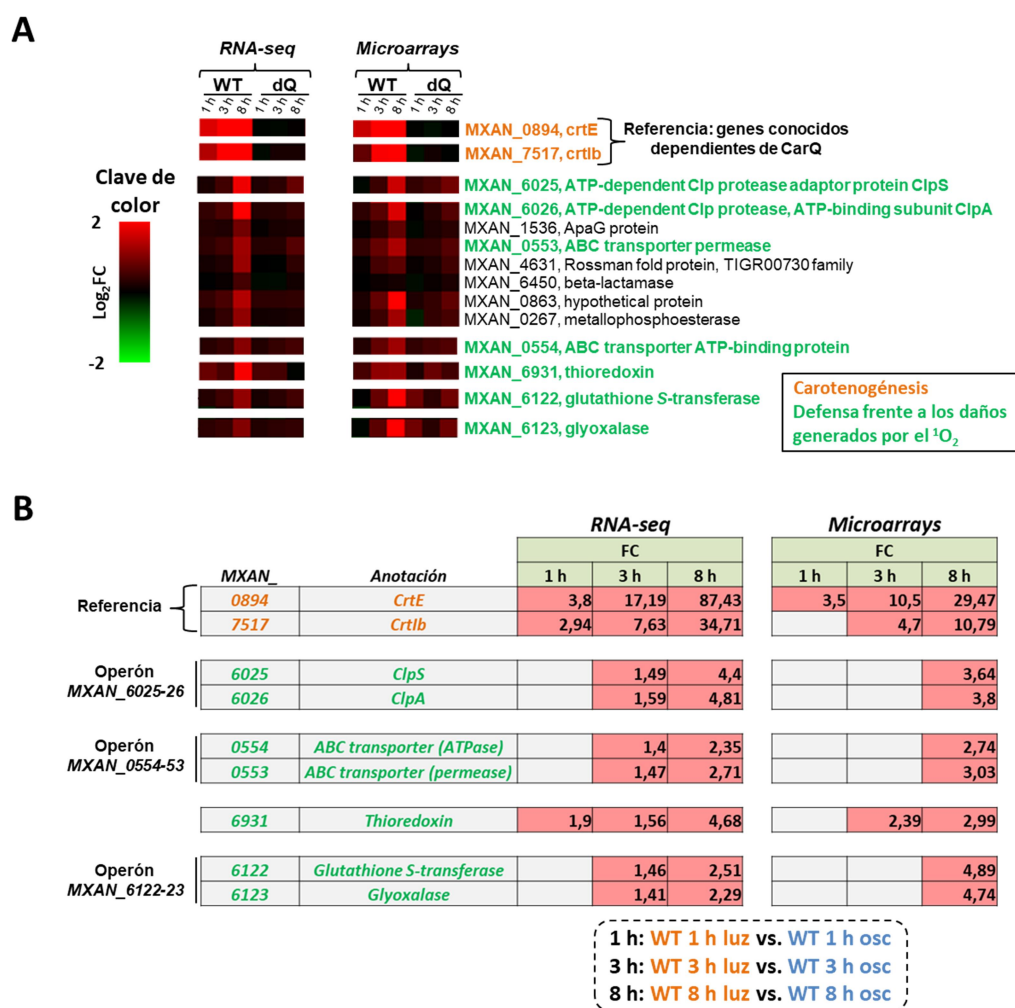


Figura 56. Análisis de expresión de genes semi-independientes de CarQ con una cinética de expresión tardía (a partir de 8 horas). **A)** Patrón de expresión diferencial. WT: estirpe silvestre; dQ: estirpe carente de CarQ. Los nombres de los genes se encuentran en naranja, verde o azul en función de si están relacionados con la carotenogénesis, la defensa frente a los daños generados por el 1O_2 o mecanismos reguladores en respuesta al 1O_2 , respectivamente. **B)** Tabla comparativa de los resultados obtenidos por *microarrays* y *RNA-seq* al comparar la estirpe silvestre en luz vs. oscuridad a 1, 3 y 8 horas. Las celdas rojas indican fotoinducción, especificando el valor de FC. Como referencia de genes dependientes de CarQ se han utilizado *crtE* y *crtIb*.

III.3.1.2.4 Validación por RT-qPCR de algunos de los genes fotoinducibles independientes de CarQ

Tras identificar nuevos genes fotoinducibles e independientes de CarQ en los análisis transcriptómicos, algunos de ellos se validaron por RT-qPCR. Para ello, se analizó su expresión en oscuridad y en luz en la estirpe silvestre y en la estirpe $\Delta carQ$. La recogida de las muestras se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo que en los análisis de expresión comentados anteriormente (Figura 48). El gen *crtE* se utilizó como control de gen fotoinducible y dependiente de CarQ (Figura 57). Los genes validados por RT-qPCR fueron: *MXAN_6122* (S-transferasa de glutatión), *MXAN_1696* (*Ig-like*), *MXAN_4277* (proteasa S1), *MXAN_5394* (proteasa S1), *MXAN_5435* (proteasa S1) y *MXAN_5845* (*CpxP-like*) (Figura 57). Se observó que todos los genes analizados responden a la luz en ausencia de CarQ, mostrando un marcado aumento de la expresión a las 8 horas de exposición, mayor al de la estirpe silvestre (Figura 57). Por tanto, en respuesta a la luz y de manera independiente de CarQ, se activa la expresión de una batería de genes, probablemente como consecuencia del estrés oxidativo causado por la iluminación continuada.

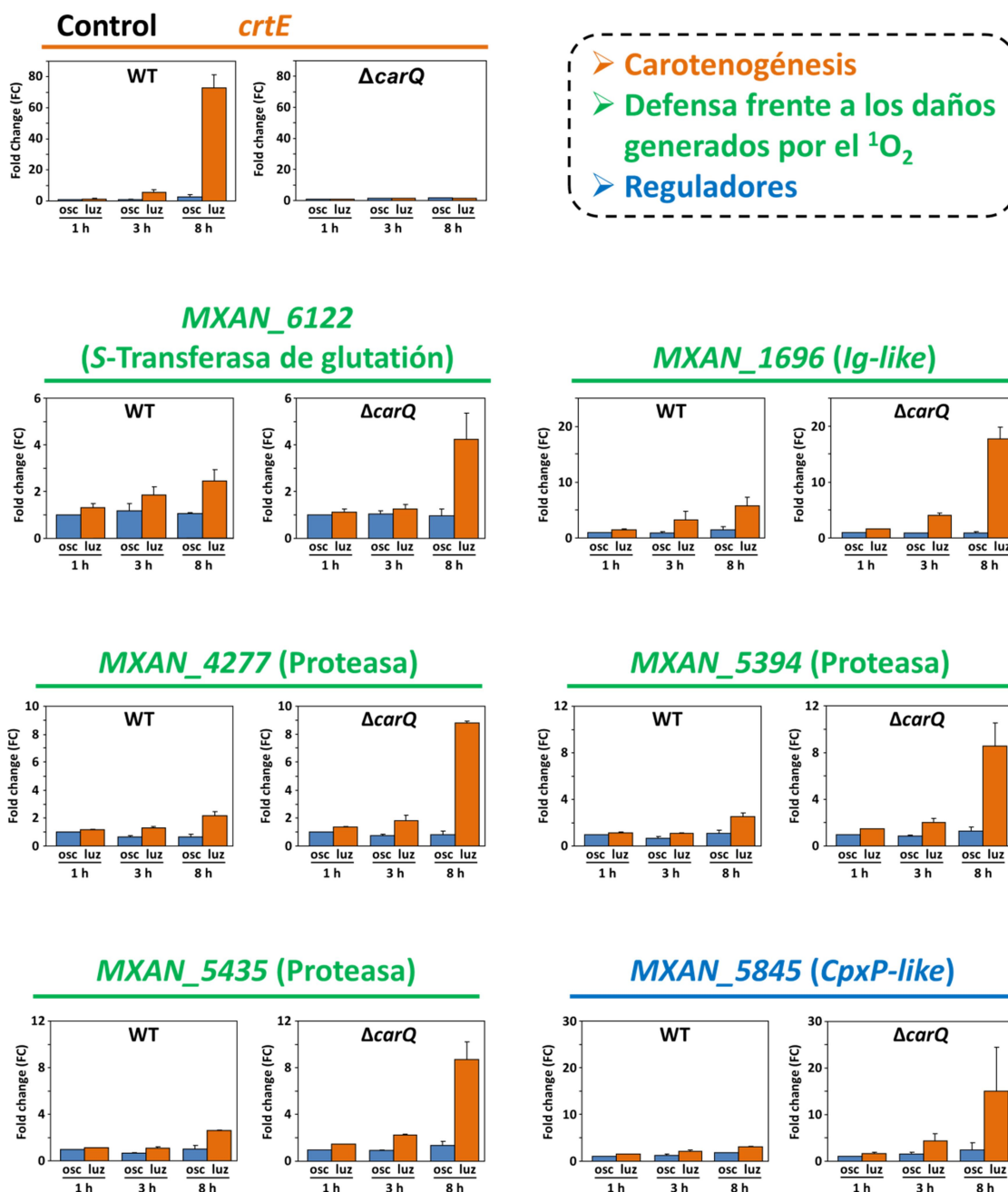


Figura 57. Validación por RT-qPCR de algunos de los genes independientes de CarQ en los análisis transcriptómicos. Se muestran las RT-qPCRs realizadas en el WT y en el mutante $\Delta carQ$ de los genes indicados. El gen *crtE* se utilizó como control de gen fotoinducible y dependiente de CarQ. El FC se muestra como la media y errores estándar de dos réplicas biológicas. En la estirpe WT se utilizó como muestra de referencia "WT 1 h oscuridad", mientras que en el mutante $\Delta carQ$ se utilizó la muestra " $\Delta carQ$ 1 h oscuridad". Como control endógeno se utilizó el gen *vegA*.

IV. DISCUSIÓN

IV.1 Respuesta a la luz en *M. xanthus* mediada por los plasmalógenos

En el mecanismo de respuesta a la luz independiente de B₁₂, CarF es el elemento proteico de acción más temprana identificado hasta la fecha (Fontes *et al.*, 2003). Sin embargo, no muestra similitud con ningún fotorreceptor de luz azul conocido, a pesar de jugar un papel crucial en la transducción de la señal luminosa que da lugar a la inactivación del factor anti- σ CarR en la luz (Elías-Arnanz *et al.*, 2011). La similitud (aunque baja) de CarF con ciertas desaturasas de ácidos grasos nos ha llevado a plantearnos la posibilidad de que el papel que desempeña en la respuesta a la luz esté relacionado con un cambio en la composición de ácidos grasos de la membrana que, de algún modo, redunde en la inactivación de CarR.

Los resultados obtenidos en este trabajo, junto con otros resultados del grupo, han permitido determinar que CarF es la desaturasa implicada en la formación del enlace vinil éter del plasmalógeno que produce *M. xanthus*, MxVEPE. Así pues, el papel de CarF en la respuesta a la luz no es otro que el de permitir la síntesis de MxVEPE, que es esencial para responder a la luz en *M. xanthus* (Gallego-García *et al.*, 2019). Otros experimentos realizados por el grupo y que forman parte del mismo trabajo han permitido concluir que los homólogos animales de CarF, TMEM189, tienen la misma función. Tanto CarF como las proteínas TMEM189 de animales, incluida la del ser humano, son las desaturasas de plasmaniletanolamina encargadas de generar el enlace vinil éter de los plasmalógenos, identificándose al fin, después de varias décadas, la enzima responsable de dicha reacción enzimática (Gallego-García *et al.*, 2019). La ausencia de plasmalógenos en células humanas con el gen *TMEM189* inactivado (y su posterior reaparición al expresar dicho gen), unido al hecho de que la falta de CarF en *M. xanthus* puede ser complementada por la proteína TMEM189 humana (o cualquiera de los homólogos de animales probados), demuestra que la proteína de humanos y la de *M. xanthus* funcionan de forma idéntica, a pesar de la enorme distancia evolutiva entre ambos organismos (Gallego-García *et al.*, 2019). La transferencia horizontal, un fenómeno al que se ha atribuido la presencia de ciertos genes típicamente eucarióticos en *M. xanthus*, podría también explicar cómo un grupo selecto de bacterias ha adquirido una desaturasa que es propia de animales.

CarF y las proteínas TMEM189 de animales presentan importantes diferencias con su homólogo de plantas, At3/FAD4. CarF/TMEM189 generan un doble enlace en posición *cis* muy cerca de un enlace éter (Gallego-García *et al.*, 2019), mientras que

FAD4 genera un doble enlace en posición *trans* muy cerca de un enlace éster (Gao *et al.*, 2009). Cabe señalar que tanto CarF/TMEM189 como FAD4 son dos tipos de desaturasas muy atípicos.

Las propiedades físico-químicas de los lípidos éter, que en mamíferos constituyen en torno a un 20% de los fosfolípidos totales (aunque su distribución varía entre tejidos), aportan características estructurales únicas a las membranas biológicas. La incorporación del ácido graso unido por un enlace éter altera las propiedades físicas de estas moléculas. Esto es debido en gran parte a la carencia del oxígeno carbonilo en la posición *sn*-1, lo que facilita la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares más fuertes entre las cabezas polares (Dean & Lodhi, 2018; Lohner, 1996). Además, el enlace vinil éter de los plasmalógenos hace que las cadenas hidrocarbonadas se encuentren más próximas entre sí y paralelas, dando lugar a un empaquetamiento mayor de los fosfolípidos, que es muy importante para la viabilidad e integridad de la membrana de algunos tipos celulares. Esto disminuye la fluidez de la membrana e incrementa su rigidez (Braverman & Moser, 2012; Dean & Lodhi, 2018). Estas propiedades de los plasmalógenos hacen que jueguen un papel importante en la consistencia y estabilidad de las balsas lipídicas, y en los procesos de fusión de membrana (Braverman & Moser, 2012; Dean & Lodhi, 2018; Marrink & Mark, 2004; Pike *et al.*, 2002; Rodemer *et al.*, 2003). Además de su papel estructural, los plasmalógenos y los precursores con enlace éter participan en procesos de señalización y diferenciación celular (Dean & Lodhi, 2018). Por ejemplo, la oxidación del enlace vinil éter puede generar segundos mensajeros que intervienen en procesos de señalización como ocurre en los eosinófilos, en los que actúan como quimioatrayentes para reclutar a otros leucocitos al sitio de la inflamación (Albert *et al.*, 2003; Thukkani *et al.*, 2002). También se ha observado que los plasmalógenos son importantes para la diferenciación y función de algunos tipos celulares como sucede en las células de Schwann (da Silva *et al.*, 2014). Además, se ha postulado que los plasmalógenos pueden actuar como antioxidantes celulares, debido a la susceptibilidad del enlace vinil éter a diferentes ROS (Braverman & Moser, 2012; Dean & Lodhi, 2018). Por tanto, los lípidos éter actúan en una gran diversidad de procesos, lo que implica que una desregulación de sus niveles puede originar diferentes problemas. Enfermedades genéticas que afectan al peroxisoma conllevan una deficiencia en los niveles de lípidos éter, resultando en enfermedades raras como la condrodisplasia rizomélica punctata y el síndrome de Zellweger (Braverman & Moser, 2012; Dean & Lodhi, 2018). Deficiencias en los niveles de plasmalógenos también se han correlacionado con enfermedades comunes como la enfermedad de Alzheimer o

distintos tipos de cáncer (Braverman & Moser, 2012; Dean & Lodhi, 2018; Messias *et al.*, 2018).

Hasta ahora, el desconocimiento del gen responsable de la desaturasa de plasmaniletanolamina ha impedido discernir de manera inequívoca qué funciones cumplen los plasmalógenos versus sus precursores con enlace éter. El hallazgo de que *TMEM189* determina la desaturasa tan buscada permitirá generar modelos animales con mutaciones de falta de función en *TMEM189* y evaluar el impacto de la falta específica de los plasmalógenos en la biología de las células y en las diferentes patologías asociadas a los plasmalógenos o a los lípidos éter, en general.

Dado que CarF está implicado en la respuesta a la luz debido a su papel en la síntesis de MxVEPE, era de suponer que aquellas proteínas que participen en pasos anteriores de la ruta de biosíntesis también se requiriesen para responder a la luz. Los resultados mostrados en este trabajo han permitido confirmar que ElbD y MXAN_1676 son importantes en la respuesta a la luz, formando parte de dos rutas paralelas en la síntesis de MxVEPE, una ruta mayoritaria y una minoritaria, respectivamente. Ambas proteínas participan de manera independiente en los pasos previos a la generación del enlace vinil éter por CarF, lo que explica que la falta simultánea, pero no individual, de ElbD y MXAN_1676 provoque un fenotipo tan defectuoso en la respuesta a la luz como el del mutante que carece de CarF (Gallego-García *et al.*, 2019). Que MXAN_1676 muestre una identidad notable (46%) con la proteína humana ADHAPS sugiere que podría actuar de manera similar, convirtiendo un enlace 1-acil en 1-O-alquil, generando así el enlace éter que precede al vinil éter. Para confirmarlo, será interesante analizar en el futuro qué compuestos acumula el mutante correspondiente y si dicho mutante puede ser complementado, como ocurre con el mutante en *carF*, por el gen humano correspondiente. Cabe esperar que MXAN_1676 requiera la participación de otros genes para ejercer su función. En la ruta de biosíntesis de plasmalógenos establecida en humanos, antes de que actúe ADHAPS se requiere la participación de otros dos genes, DHAPAT y FAR1 (Figura 24B). El análisis del contexto genómico de *MXAN_1676* sugiere que forma parte de un operón con otros dos genes, *MXAN_1675* y *MXAN_1674*. Al igual que DHAPAT, el producto del gen *MXAN_1675* presenta un posible dominio aciltransferasa y, como FAR1, un posible dominio reductasa, por lo que *MXAN_1675* podría ser una especie de fusión de las proteínas humanas DHAPAT y FAR1. Por su parte, *MXAN_1674* presenta también un posible dominio reductasa. La obtención de estirpes con deleciones de *MXAN_1674* o *MXAN_1675* (en un fondo genético que carezca de *elbD*, para facilitar el análisis fenotípico) así como el análisis de posibles interacciones proteína-proteína, permitirá

discernir si participan o no, junto con MXAN_1676, en una de las dos rutas de biosíntesis de lípidos éter presentes en *M. xanthus*. A diferencia de MXAN_1676, ElbD es una proteína multifuncional con cuatro dominios que, en conjunto, podrían cubrir las funciones de las proteínas humanas FAR1 y DHAPAT (y, quizás, ADHAPS, aunque ninguno de los dominios se asemeja a la proteína ADHAPS). No obstante, el contexto genómico de *elbD* sugiere un posible operón con tres genes aguas arriba de dicho gen y uno aguas abajo, que podrían participar también en la síntesis de lípidos éter. El análisis fenotípico de mutantes por delección en cada uno de los genes permitirá discernir si basta con ElbD o, por el contrario, se requieren otros genes del posible operón. Que exista redundancia entre las rutas en las que participan ElbD y MXAN_1676 podría explicar que ninguno de los dos genes se identificase en los escrutinios genéticos que llevaron al descubrimiento de *carF*, de varios reguladores positivos y de los genes estructurales.

Los resultados derivados de este trabajo han permitido determinar que el plasmalógeno MxVEPE, pero no su precursor con el enlace éter, presenta un papel crucial en la respuesta al $^1\text{O}_2$ procedente del estrés foto-oxidativo en *M. xanthus* (Gallego-García *et al.*, 2019). Además, la falta de MxVEPE pudo complementarse por la adición exógena de un plasmalógeno humano, pero no de su correspondiente precursor, a pesar de las diferencias entre ambos plasmalógenos tanto en la cadena hidrocarbonada que ocupa la posición *sn*-1 como en la que ocupa la posición *sn*-2. Estos resultados indican que la clave de su papel señalizador en la respuesta a la luz reside específicamente en el enlace vinil éter, y no en otras características de la molécula. Estudios previos han puesto de manifiesto que el $^1\text{O}_2$ provoca la rotura de los plasmalógenos en su enlace vinil éter (el enlace éter es mucho menos sensible) generando tres productos de reacción: un aldehído graso de tipo alcanal (sin dobles enlaces) con un carbono menos (*n*-1) que la cadena hidrocarbonada unida por el enlace vinil éter, formiato y 2-monoacilglicerofosfoetanolamina (lisofosfatidiletanolamina, liso-PE). Esta susceptibilidad del enlace vinil éter a la rotura, no solo por $^1\text{O}_2$ sino también por otros ROS, ha llevado a proponer que los plasmalógenos participan en la defensa frente al estrés oxidativo gracias a sus propiedades antioxidantes (Braverman & Moser, 2012; Dean & Lodhi, 2018; Morand *et al.*, 1988; Zoeller *et al.*, 1988).

Para explicar la aparición de los productos de reacción se ha propuesto un modelo en el que el $^1\text{O}_2$ reacciona con el plasmalógeno generando dioxetano, que se descompone bajo condiciones fisiológicas en los tres productos mencionados (Morand *et al.*, 1988; Stadelmann-Ingrand *et al.*, 2001) (Figura 58A). También se ha detectado

un cuarto producto de reacción que puede proceder de la rotura del plasmalógeno por el $^1\text{O}_2$ o radicales oxidativos. Dicho producto es un aldehído graso de tipo alquenal (con un doble enlace) y con el mismo número de carbonos (n) que la cadena hidrocarbonada unida por el enlace vinil éter (Morand *et al.*, 1988). Para explicar la aparición del alquenal se ha propuesto un segundo modelo en el que el $^1\text{O}_2$ (u otros radicales) reacciona con el plasmalógeno generando un hidroperóxido alílico que, mediante la acción de una peroxidasa, da lugar a liso-PE y un alquenal (Morand *et al.*, 1988) (Figura 58B).

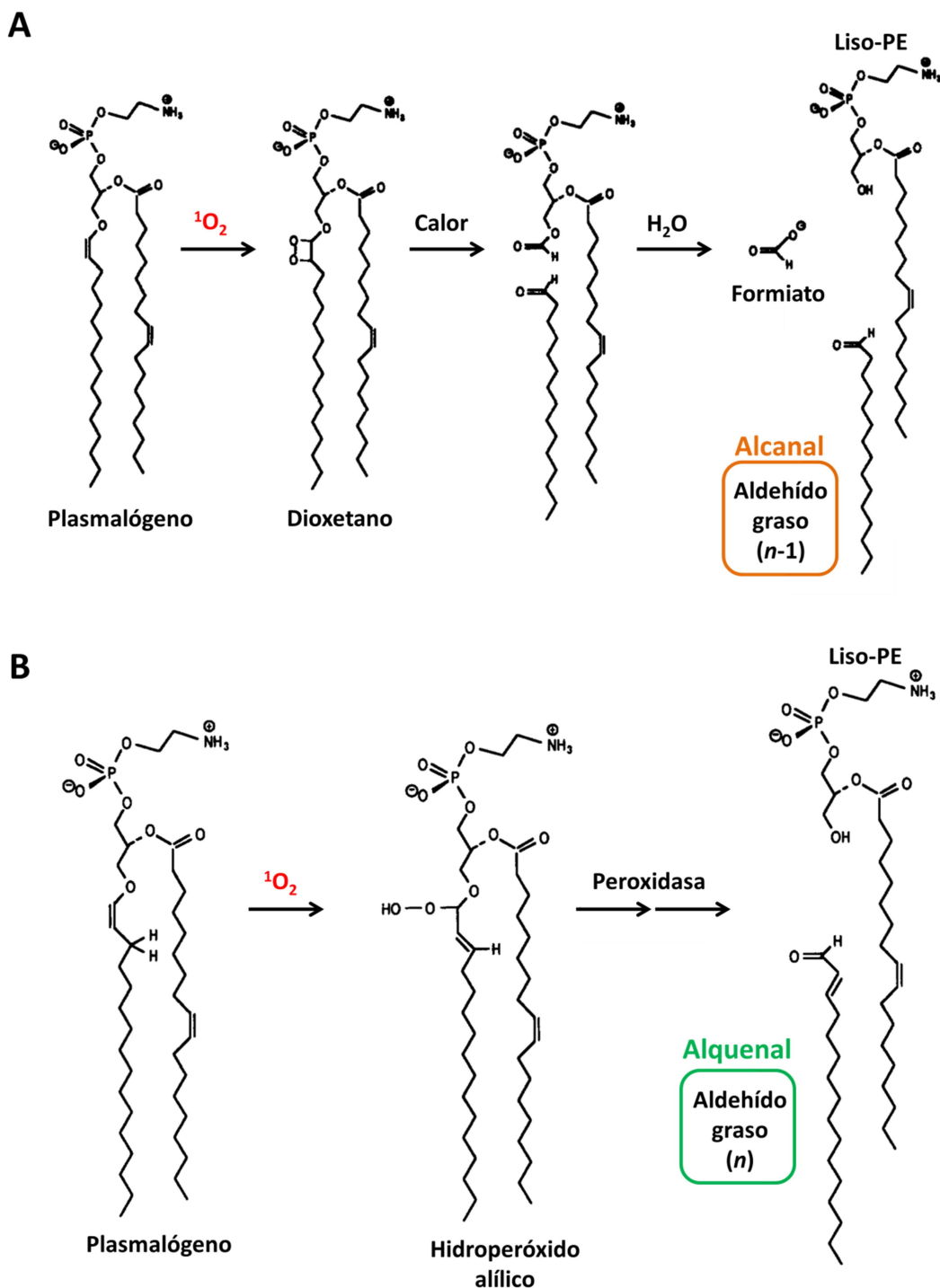
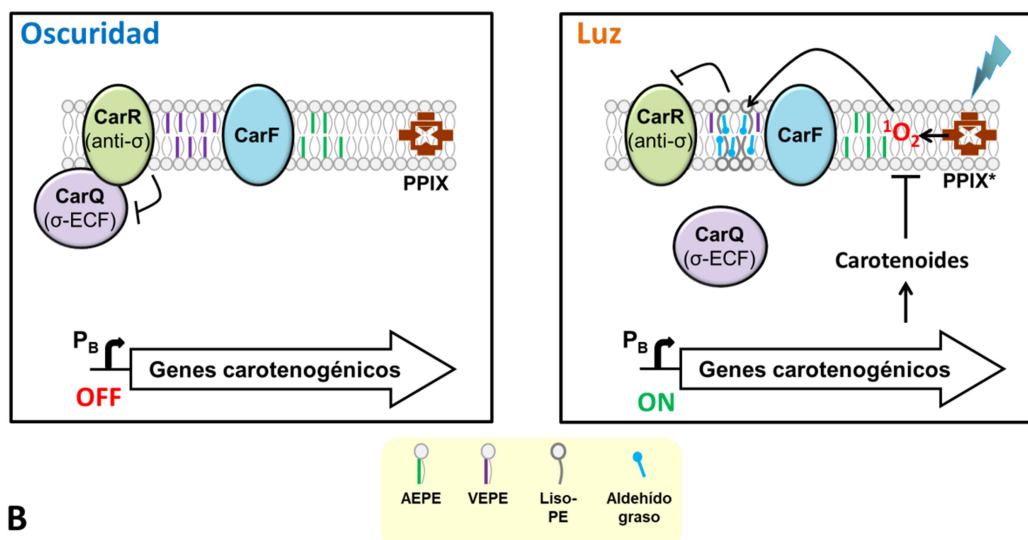


Figura 58. Rotura de plasmalógenos por 1O_2 . **A)** Modelo propuesto para explicar la aparición de un aldehído graso de tipo alcanal. El 1O_2 reacciona con el plasmalógeno y genera el intermediario dioxetano, que se descompone con calor y agua en lisofosfatidiletanolamina (liso-PE), formiato y un alcanal con un carbono menos ($n-1$) que la cadena hidrocarbonada de partida. **B)** Modelo propuesto para explicar la aparición de un aldehído graso de tipo alkenal. El 1O_2 reacciona con el plasmalógeno y genera el intermediario hidroperóxido alílico que, mediante la acción de una peroxidasa, se descompone en liso-PE y un alkenal con el mismo número de carbonos (n) que la cadena hidrocarbonada de partida. Modificada de Morand *et al.* (1988).

Los resultados obtenidos en este trabajo nos han llevado a reconsiderar el modelo sobre la respuesta a la luz y el papel que juega CarF en dicho modelo (Gallego-García *et al.*, 2019) (Figura 59). El nuevo modelo incorpora necesariamente la participación de los plasmalógenos, que se producen por la acción de CarF tanto en la oscuridad como en la luz. Para explicar que la señalización solo ocurra en la luz postulamos que la generación de $^1\text{O}_2$ por la fotoexcitación de la PPIX provocaría la rotura del enlace vinil éter del MxVEPE, generando liso-PE y un aldehído graso. Este último podría ser un alcanal con 14 carbonos ($n-1$) o un alquenal con 15 carbonos. El aumento de liso-PE a nivel local podría alterar la estructura y propiedades de la membrana, y el aldehído graso generado podría formar un aducto con CarR. Cualquiera de los dos sucesos o ambos podrían constituir el mecanismo de señalización de la respuesta al estrés foto-oxidativo que conlleva la inactivación de CarR, la liberación de CarQ y la activación de la síntesis de carotenoides en *M. xanthus* (Figura 59). Que los niveles de plasmalógenos de las células de *M. xanthus* experimenten una bajada, aunque leve, tras la exposición a la luz sugiere que al menos una fracción de los plasmalógenos experimenta rotura; además, *in vitro*, la iluminación con luz azul y en presencia de PPIX del plasmalógeno humano (que es capaz de complementar la falta de MxVEPE en *M. xanthus*) provoca la aparición de liso-PE y el correspondiente alcanal ($n-1$) (Gallego-García *et al.*, 2019). Aún así, no se puede descartar que *in vivo* sea otro el mecanismo y que no tenga lugar la rotura del plasmalógeno, o que exista un factor aguas arriba de CarR que sea la verdadera diana de los plasmalógenos. La detección o no del posible aldehído y liso-PE *in vivo* y el análisis de la formación de posibles aductos en CarR permitirá discernir con más precisión el mecanismo por el cual los plasmalógenos son capaces de señalizar el estrés foto-oxidativo en *M. xanthus*.

A



B

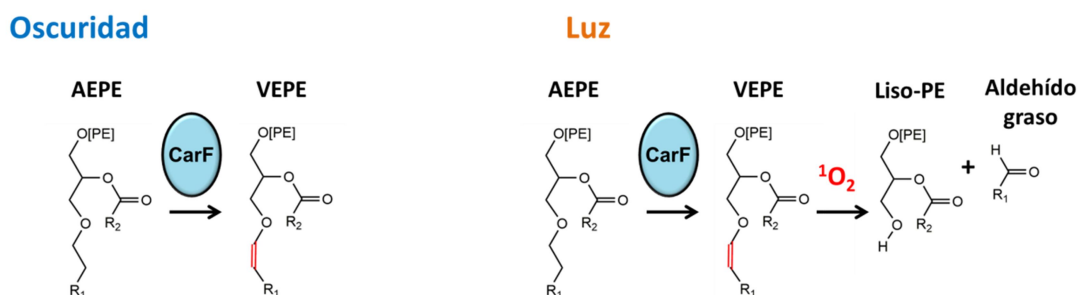


Figura 59. Respuesta a la luz en *M. xanthus* mediada por plasmalógenos. **A)** Nuevo modelo de respuesta a la luz en *M. xanthus*. En oscuridad y en luz, CarF genera el enlace vinil éter (en morado) del plasmalógeno VEPE a partir del precursor AEPE (enlace éter en verde). La exposición a la luz conlleva la excitación de la PPIX (PPIX*) que, por transferencia de energía al O_2 , da lugar a 1O_2 , que rompe el enlace vinil éter del plasmalógeno, generando liso-PE y un aldehído graso de tipo alcanal o alquenal de 14 y 15 carbonos, respectivamente. Esto podría desencadenar la inactivación del factor anti- σ CarR debido a una perturbación local de la membrana y/o formación de un aducto con el aldehído, dando lugar a la liberación del factor σ -ECF CarQ y la activación de la expresión de los genes carotenogénicos. Este proceso culminaría en la síntesis de carotenoides que constituyen una defensa directa frente al 1O_2 . **B)** La formación del enlace vinil éter requiere CarF. Se muestran las reacciones que tienen lugar en oscuridad y en luz y el paso en el que interviene CarF. PE, fosfoetanolamina. Modificada de Gallego-García *et al.* (2019).

Ciertos experimentos habían sugerido que el mecanismo de inactivación de CarR conlleva un proceso de proteólisis dependiente de luz (Browning *et al.*, 2003; Gorham *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos en este trabajo apuntan a que el mecanismo de inactivación de CarR no se debe a un proceso de degradación. La diferencia en la acumulación de CarR tanto en luz como en oscuridad, en las mismas condiciones de expresión génica, fue nula o indistinguible en todos los experimentos realizados, ya sea mediante detección con anticuerpos o mediante microscopía de

fluorescencia. Este resultado es consistente con que CarR sea un factor anti- σ muy distinto a los factores anti- σ típicos dependientes de proteólisis. CarR presenta seis hélices transmembranales y tanto su extremo amino como carboxilo se encuentran orientados hacia la región citosólica, mientras que los factores anti- σ dependientes de proteólisis presentan un dominio extracelular, una única región transmembranal y un dominio intracelular, que se suelen degradar de forma secuencial mediante diferentes proteasas (Ho & Ellermeier, 2012; Sineva *et al.*, 2017). Por tanto, parece improbable que CarR se inactive mediante proteólisis regulada.

El nuevo modelo de respuesta a la luz dependiente de plasmalógenos sugiere que la inactivación de CarR podría deberse a una perturbación local en la membrana y/o formación de un aducto con un aldehído graso (Gallego-García *et al.*, 2019). Esta última hipótesis adquiere especial importancia, ya que CarR presenta un buen número de aminoácidos que podrían interaccionar con aldehídos, tales como lisinas, argininas, cisteínas e histidinas (Domingues *et al.*, 2013) (Figura 60).

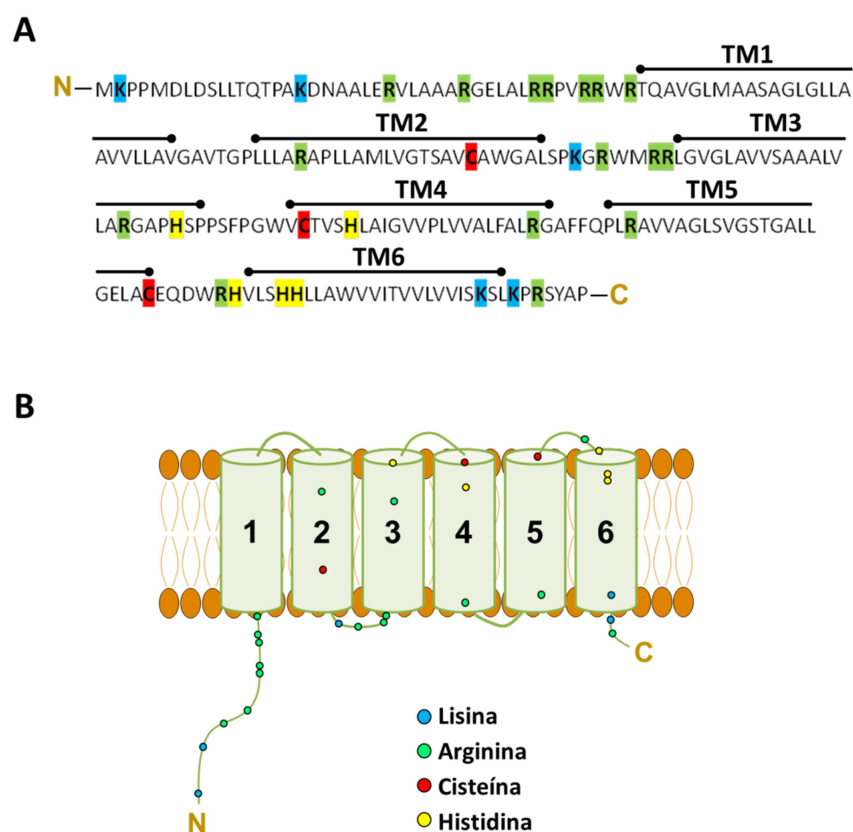
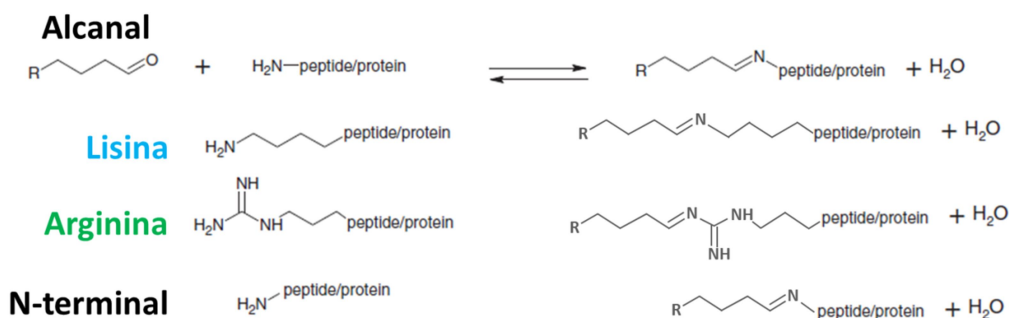


Figura 60. Aminoácidos de CarR que podrían formar aductos con aldehídos. A) Secuencia de aminoácidos de CarR, señalando lisina (K) en azul, arginina (R) en verde, cisteína (C) en rojo e histidina (H) en amarillo. Se señalan los aminoácidos que comprenden las hélices transmembranales (TM). **B)** Localización de los residuos de lisina, arginina, cisteína e histidina en CarR. Los números indican las hélices transmembranales.

Cabe esperar que el tipo de aldehído, de formarse, determine el posible tipo de aducto, puesto que los alquenos son más reactivos que los alcanos. Los alcanos pueden formar los aductos de Schiff, en los que el aldehído reacciona con lisina, arginina o el grupo amino terminal de la proteína; mientras que los alquenos pueden formar tanto aductos de Schiff como aductos de Michael (Figura 61). Estos últimos se caracterizan por ser más estables y se producen cuando el aldehído reacciona con lisina, arginina, cisteína, histidina o el grupo amino terminal de la proteína (Domingues *et al.*, 2013) (Figura 61). Tanto los aductos de Michael como los de Schiff son reversibles, pero estos últimos generalmente son más inestables. No obstante, cuando se produce un aducto de Michael a través de cisteínas casi siempre es irreversible (Domingues *et al.*, 2013). La formación de un aducto entre el aldehído graso y CarR podría conllevar un cambio conformacional en CarR que provocase su inactivación y la liberación de CarQ.

A

Aducto de Schiff



B

Aducto de Michael

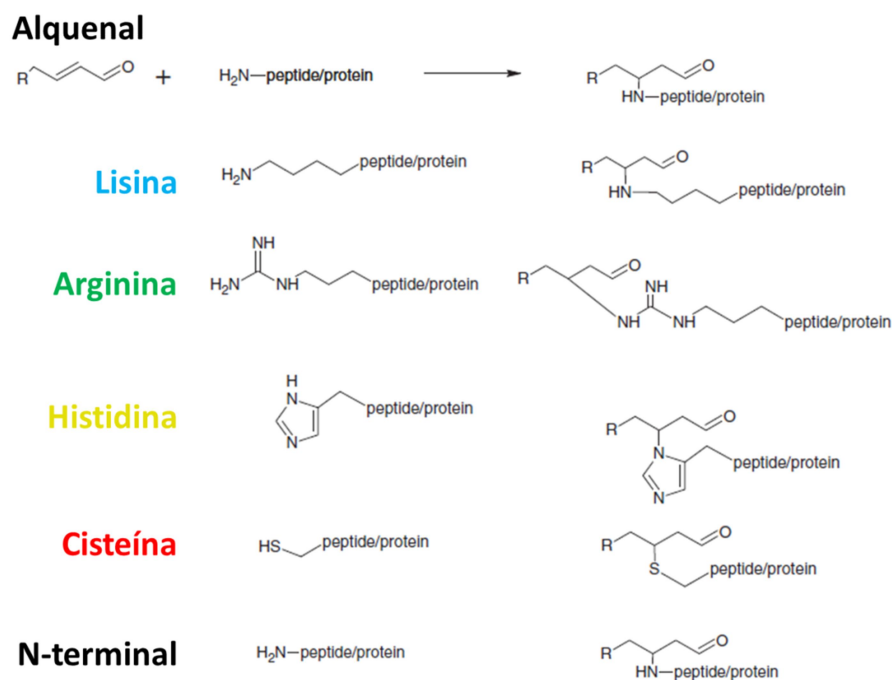


Figura 61. Formación de aductos entre aldehídos y proteínas. A) Aducto de Schiff. Se muestran los aductos resultantes de la reacción entre un alcanal con lisina, arginina o el N-terminal de las proteínas. **B)** Aducto de Michael. Se muestran los aductos resultantes de la reacción entre un alquenal con lisina, arginina, histidina, cisteína y el N-terminal de las proteínas. Modificada de Domingues *et al.* (2013).

Aún quedan muchas cuestiones por resolver en cuanto al modo de acción de la pareja de factores σ -ECF/anti- σ CarQ/CarR. Se desconoce si pertenecen a un grupo de factores σ -ECF conocido o si, por el contrario, constituyen un nuevo grupo. Curiosamente, dentro de la gran diversidad de factores σ -ECF que dependen de factores anti- σ asociados a la membrana existen dos grupos, el ECF16 y el ECF118,

controlados por factores anti- σ que, al igual que CarR, presentan seis hélices transmembranales (Pinto & Mascher, 2016). Se desconoce el mecanismo de inactivación de dichos grupos, aunque diversos estudios en diferentes microorganismos han comenzado a resolver algunas incógnitas (Álvarez-Martínez *et al.*, 2006; Kohler *et al.*, 2012; Masloboeva *et al.*, 2012; Stockwell *et al.*, 2012). De los dos grupos mencionados, el ECF16, en base a sus características, podría englobar a la pareja σ -ECF/anti- σ carQ/CarR. Los factores σ del grupo ECF16 solo se han encontrado en proteobacterias, como *C. crescentus* (Álvarez-Martínez *et al.*, 2006) y *B. diazoefficiens* (Masloboeva *et al.*, 2012). Las seis hélices del factor anti- σ correspondiente forman un dominio DUF1109 de función desconocida, también presente en CarR. Cabe destacar que diversos estudios han demostrado que dos residuos de cisteína, localizados en las caras extracitoplásmicas de las hélices transmembranales, se requieren para la actividad del factor anti- σ (Kohler *et al.*, 2012; Masloboeva *et al.*, 2012). *C. crescentus* presenta el factor σ -ECF SigF, que parece tener un papel en la respuesta al estrés oxidativo provocado por H₂O₂ en fase estacionaria y frente a estrés por metales pesados como cromo y cadmio. NrsF, el factor anti- σ de SigF, tiene dos residuos de cisteína conservados, C131 y C181, que median la respuesta frente a metales pesados. Mutantes sencillos en cualquiera de las cisteínas (o un doble mutante) resulta en la liberación de SigF. Se ha sugerido que los metales pesados podrían inducir un cambio conformacional del factor anti- σ , que provoca la posterior liberación de SigF (Kohler *et al.*, 2012). Por otro lado, *B. diazoefficiens*, un endosimbionte de la soja, presenta el factor σ EcfF, que se induce en respuesta a estrés oxidativo por H₂O₂ y ¹O₂. El factor anti- σ de EcfF es OsrA, que tiene dos residuos de cisteína conservados, C129 y C179, muy importantes para la interacción con EcfF y la percepción y/o transducción de la señal, respectivamente (Masloboeva *et al.*, 2012). *B. diazoefficiens* también presenta otro factor σ del grupo ECF16 denominado EcfS, que tiene un papel crítico en simbiosis. TmrS, el factor anti- σ de EcfS, es un regulador negativo de la simbiosis y también presenta dos residuos de cisteínas conservados, C130 y C180 (Masloboeva *et al.*, 2012; Stockwell *et al.*, 2012).

Para investigar si CarR también presenta las dos cisteínas conservadas, se realizó un alineamiento de su secuencia de aminoácidos con las secuencias de NrsF de *C. crescentus* y de OsrA y TmrS de *B. diazoefficiens*. Como puede observarse en la Figura 62A, CarR presenta las dos cisteínas conservadas, C137 y C185 en CarR, que además se localizan en la cara extracitoplásmica de las hélices transmembranales, al igual que en NrsF, OsrA y TmrS. Por tanto, estas cisteínas podrían tener un papel

importante en la interacción de CarR en la percepción de la señal originada tras la rotura de MxVEPE por el $^1\text{O}_2$, quizás a través de la formación de aductos con el aldehído, y/o en la percepción de la señal producida por el cobre que, como se ha comentado, también induce la carotenogénesis (aunque a temperaturas más bajas que las óptimas para el crecimiento). Es posible que la percepción de la señal a través de esas cisteínas conlleve un cambio conformacional en CarR que resulte en la liberación de CarQ. Cabe señalar que, en general, CarR presenta una topología en la membrana muy similar a NrsF, OsrA y TmrS. Además de las seis hélices transmembranales, NrsF, OsrA y TmrS también presentan la región N-terminal y C-terminal orientadas hacia el citoplasma, y las tres proteínas tienen un segmento N-terminal más largo que el C-terminal (Figura 62B). Concretamente, NrsF y OsrA presentan una región N-terminal de 25 y 23 aminoácidos, respectivamente (Kohler *et al.*, 2012; Masloboeva *et al.*, 2012). El análisis mediante el programa bioinformático TMpred predice que TmrS está constituido por 28 aminoácidos en su región N-terminal. Curiosamente, CarR presenta una región N-terminal mayor que la de los otros factores anti- σ , constituida por 43 aminoácidos. Al menos en CarR, dicha región parece insuficiente para retener a CarQ en la membrana (Bernal-Bernal, 2012).

Es de destacar que experimentos previos en nuestro laboratorio han mostrado que estas cisteínas conservadas son importantes para la función de CarR. La mutación de la cisteína 185 a alanina resultó en una producción de carotenoides de manera constitutiva, es decir, en el fenotipo Car^C típico de una falta de función de CarR. Por otro lado, una mutación doble en el triptófano 135 y la cisteína 137, que se cambiaron por alanina, dio lugar nuevamente a un fenotipo Car^C . Cabe esperar que estudios futuros aporten más información acerca del modo de acción de la pareja σ -ECF/anti- σ CarQ/CarR, dilucidando qué proceso conlleva su inactivación y la posterior liberación de CarQ, y si los residuos de CarR implicados son los mismos en la señalización mediada por plasmalógenos o por la presencia de cobre.

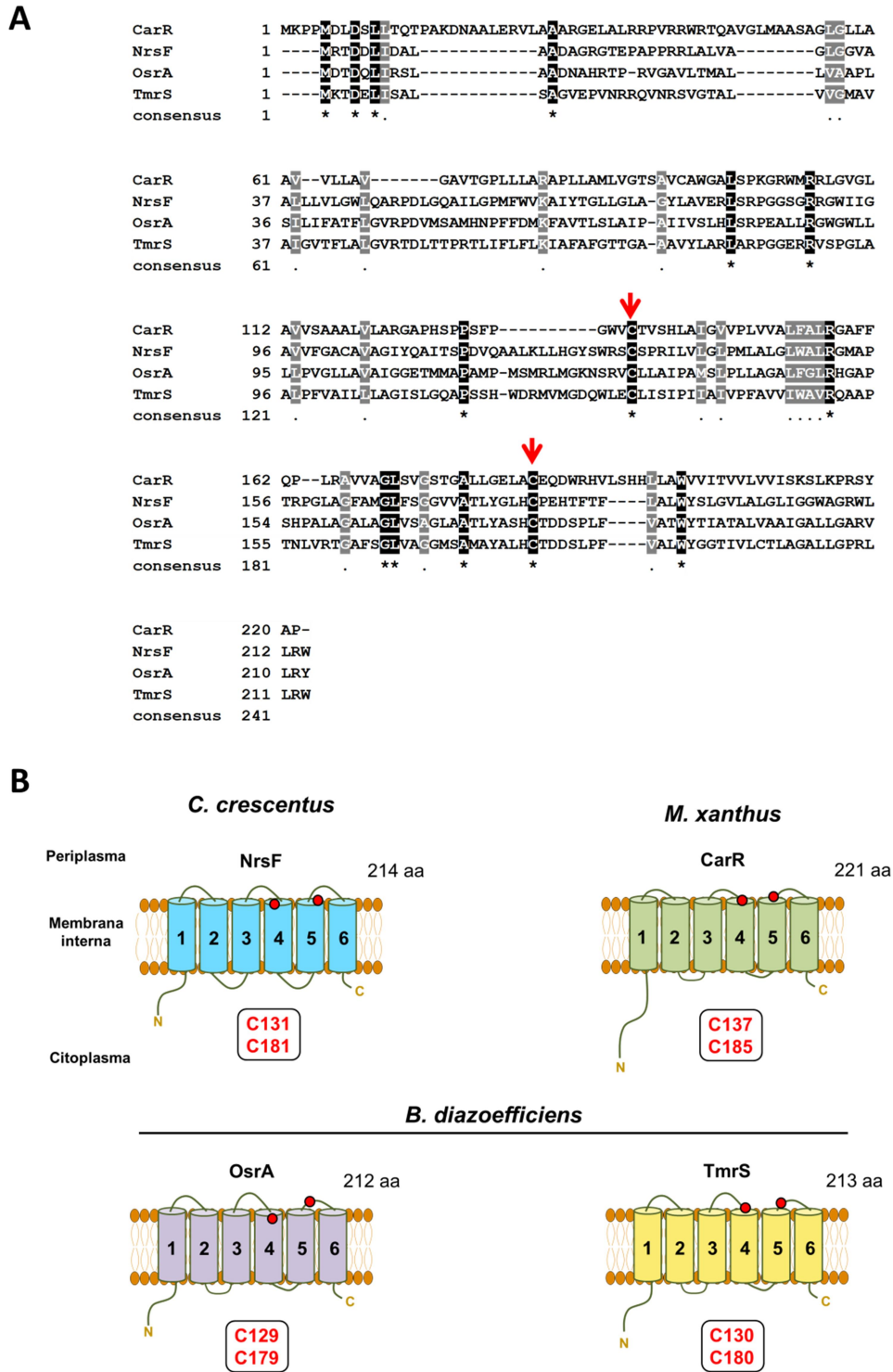


Figura 62. Similitud entre CarR y los factores anti- σ NrsF, OsrA y TmrS. A) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de CarR, NrsF, OsrA y TmrS. La flecha roja señala los residuos de cisteína conservados en NrsF, OsrA y TmrS, y que también están presentes en CarR. **B)** Topología en la membrana de NrsF, CarR, OsrA y TmrS. Los cuatro factores anti- σ presentan seis hélices transmembranales y los extremos N-terminal y C-terminal orientados hacia la región citosólica. Los círculos rojos indican la localización orientativa de las cisteínas conservadas en cada una de las proteínas, especificando las posiciones exactas de cada una en el recuadro negro inferior. aa, aminoácidos. Las imágenes de NrsF y OsrA se han realizado siguiendo el esquema de Kohler *et al.* (2012) y de Masloboeva *et al.* (2012), respectivamente.

IV.2 FMMs en *M. xanthus* y su posible relación con la respuesta a la luz

La presencia de balsas lipídicas en la membrana se ha considerado un paso importante durante la evolución de la complejidad celular, sugiriendo que bacterias y arqueas eran organismos demasiado simples para necesitar una organización tan sofisticada en sus membranas. Sin embargo, recientemente se ha descubierto que las bacterias organizan muchos procesos celulares en microdominios funcionales de membrana (FMM), análogos a las balsas lipídicas de eucariotas (Bramkamp & López, 2015; López & Koch, 2017). La utilización de herramientas bioinformáticas ha permitido realizar un análisis preliminar de la existencia de FMMs en bacterias a través del estudio de genes que determinan posibles flotilinas, uno de los componentes estructurales de los FMMs. Estos análisis han mostrado que casi todas las bacterias presentan al menos un gen que determina una posible flotilina en su genoma. Por tanto, es posible que la existencia de FMMs sea universal en bacterias (Bramkamp & López, 2015).

La mayoría de los estudios sobre FMMs se han realizado en bacterias Gram positivas. *B. subtilis*, el modelo más consolidado para su estudio, presenta las flotilinas FloA y FloT, que tienen una estructura similar, con una región transmembrana próxima al dominio PHB, aunque difieren en tamaño, siendo FloT más grande que FloA (Bramkamp & López, 2015; Schneider *et al.*, 2015) (Figura 63A). Respecto al contexto genómico, tanto FloA como FloT forman parte de un operón de tres genes, en el que el primer gen determina un homólogo de la proteasa NfeD, el segundo sería el de la flotilina y el tercer gen daría lugar a una proteína de función desconocida, que puede estar ausente en algunas bacterias (Green *et al.*, 2009; Lopez & Koch, 2017) (Figura 63B). Otras bacterias Gram positivas como *S. aureus* o *Bacillus cereus* determinan una única flotilina que se parece a FloA o FloT, respectivamente (Bramkamp & López, 2015) (Figura 63B).

Diversos estudios empiezan a demostrar que los FMMs también están presentes en bacterias Gram negativas. Por ejemplo, en la clase Gammaproteobacteria se han encontrado genes que determinan posibles flotilinas parecidas a FloA y FloT, mientras que en las clases Alpha-, Beta-, Delta- y Epsilonproteobacteria solo se han observado genes que determinan flotilinas parecidas a FloA (Bramkamp & López, 2015) (Figura 63B). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que *M. xanthus* presenta dos operones que determinan

posibles flotilinas, una de tipo FloA y otra de tipo FloT, a las que hemos denominado FloA y FloB, respectivamente (Figura 63C). Como se ha comentado, el gen *floA* forma parte de un operón de 3 genes, en el que el primer gen determina una sintasa de trehalosa, el segundo determina la proteasa NfeD y el tercero daría lugar a FloA. Por tanto, si lo comparamos con los operones típicos de flotilinas, este operón presentaría una distribución atípica, en cuanto a que presenta un gen aguas arriba del gen *nfeD* que parece formar parte del mismo operón. Por otro lado, el gen *floB* forma parte de un operón de dos genes, en el que el primero determina la proteasa NfeD y el segundo da lugar a la flotilina, mostrando una distribución similar a los operones típicos de flotilinas estudiados en otras bacterias (Figura 63C).

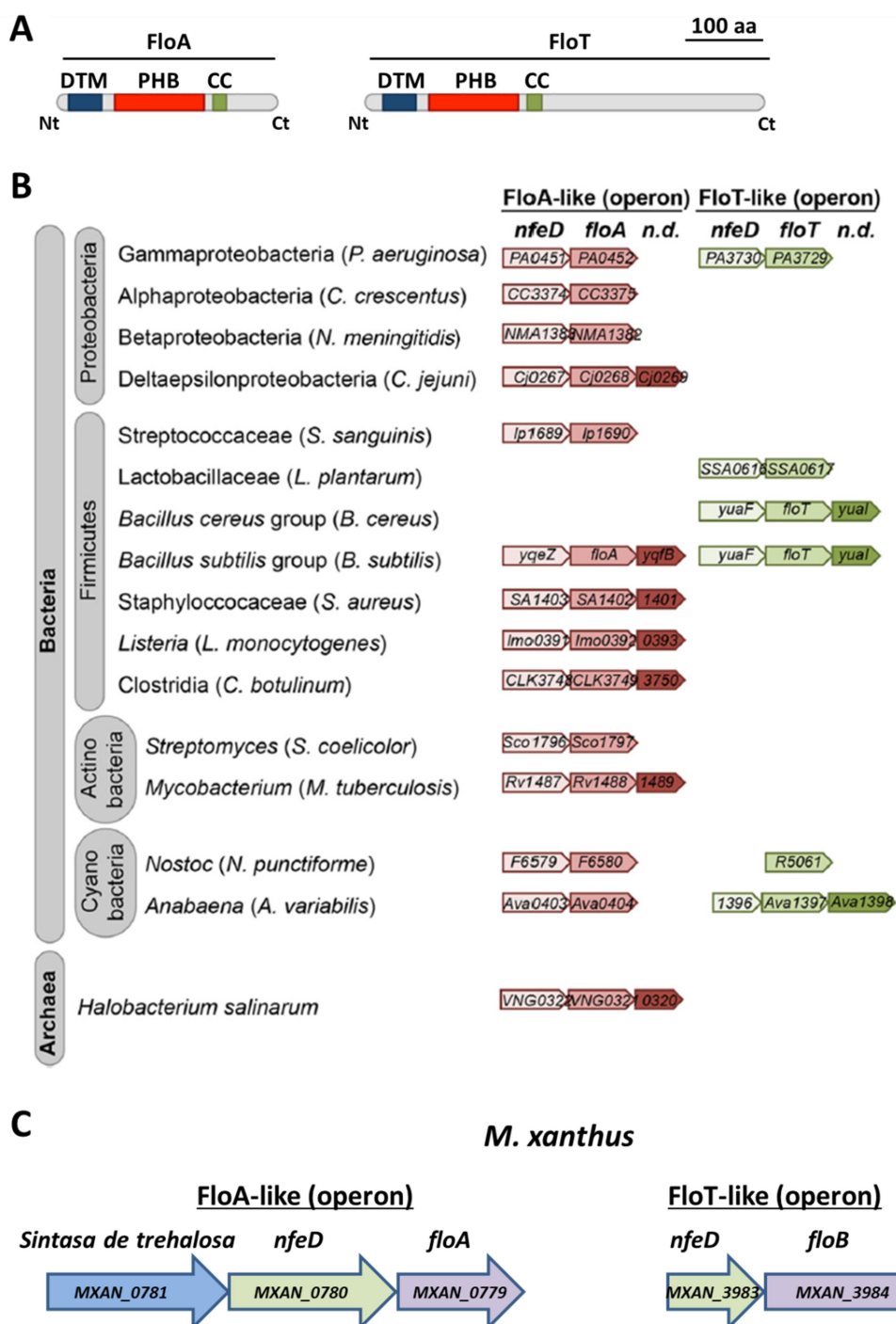


Figura 63. Distribución de FloA y FloT en bacterias. **A)** FloA y FloT de *B. subtilis*. La región transmembranal está representada en azul (DTM). El dominio PHB está representado en rojo. La hélice superenrollada está representada en verde (CC, *coil-coiled*). aa, aminoácidos. **B)** Distribución de los operones FloA y FloT en bacterias. El primer gen del operón determina un homólogo de la proteasa NfeD. El segundo gen determina una flotilina. El tercer gen determina una proteína de función desconocida, y está ausente en algunas especies. *P. aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*; *N. meningitidis*, *Neisseria meningitidis*; *S. sanguinis*, *Streptococcus sanguinis*; *L. plantarum*, *Lactobacillus plantarum*; *L. monocytogenes*, *Listeria monocytogenes*; *C. botulinum*, *Clostridium botulinum*; *N. punctiforme*, *Nostoc punctiforme*; *A. variabilis*, *Anabaena variabilis*; n.d.; *not determined*. Tomada de Bramkamp & López (2015). **C)** Posibles flotilinas de *M. xanthus* y su contexto genómico.

Los candidatos a flotilinas estudiados en este trabajo, FloA y FloB, se parecen estructuralmente a las flotilinas de *B. subtilis*, a pesar de presentar un bajo porcentaje de identidad y similitud. El análisis realizado sugiere que FloA y FloB presentan un dominio transmembranal y un dominio PHB, al igual que FloA y FloT de *B. subtilis* (Figura 64). También se ha observado la presencia de posibles repeticiones EA (ácido glutámico, alanina) en la región C-terminal, que podrían ser importantes para su oligomerización, como sucede en las flotilinas de eucariotas y de *B. subtilis* (Figura 64). Así pues, tanto FloA como FloB presentan cuatro repeticiones EA, aunque dos de las repeticiones en FloB están menos conservadas (Figura 64).

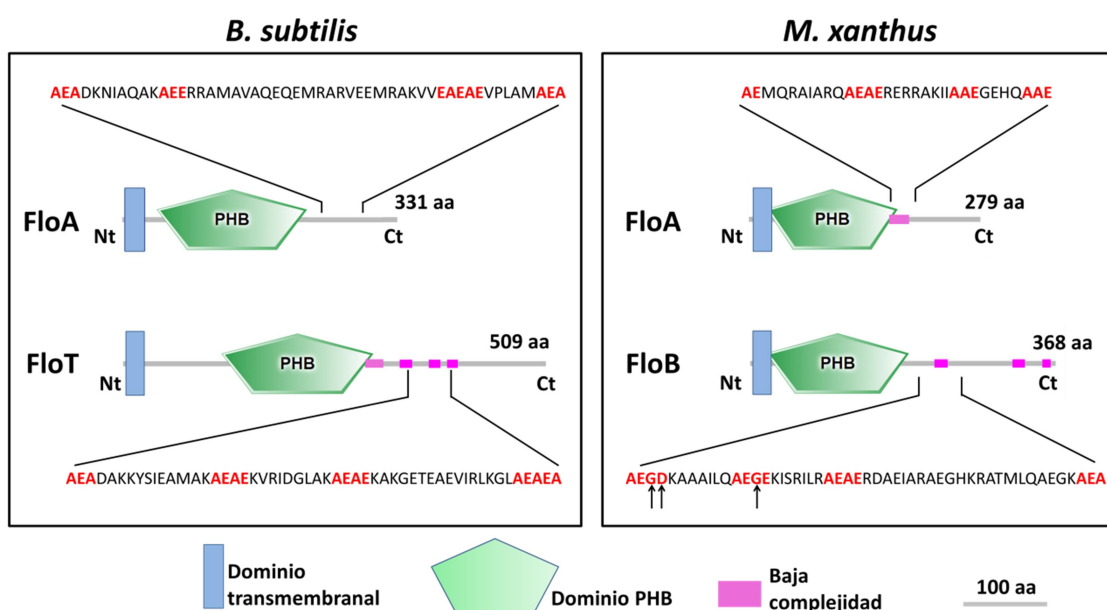


Figura 64. Comparación de las estructuras proteicas de las posibles flotilinas de *M. xanthus* con las de *B. subtilis*. Las flotilinas de *M. xanthus* (recuadro de la derecha) presentan una región de anclaje a la membrana, un dominio PHB y posibles repeticiones EA, al igual que las flotilinas de *B. subtilis* (recuadro de la izquierda). Se muestra una ampliación de la zona donde están las repeticiones EA, señaladas en rojo. Las flechas negras indican los posibles aminoácidos sustituidos en las repeticiones EA de FloB. aa, aminoácidos. La imagen de las flotilinas de *B. subtilis* se ha modificado de Schneider *et al.* (2015).

En *B. subtilis*, FloA y FloT se distribuyen en la membrana formando “parches proteicos” que difieren en el número de parches por célula y en la cantidad de proteínas que los constituyen. De media, FloA se distribuye en 13 parches por célula, mientras que FloT lo hace en 6 y con un contenido mayor de proteínas por parche (Schneider *et al.*, 2015). Estas diferencias en la distribución subcelular se deben a las repeticiones EA que, como se ha comentado, son importantes para la oligomerización. Mutaciones en algunas de estas repeticiones provocan una agregación defectuosa y una disminución del número de parches proteicos (Schneider *et al.*, 2015). FloA y FloT

son capaces de interaccionar formando hetero-oligómeros, aunque son más propensas a interaccionar consigo mismas para formar homo-oligómeros y es esta interacción la que probablemente juega un papel determinante en su distribución subcelular (Schneider *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que FloA y FloB de *M. xanthus* se distribuyen en la membrana celular formando parches proteicos, lo que refuerza la hipótesis de que se trate de verdaderas flotilinas (Figura 65). Además, como ocurre también en *B. subtilis*, las flotilinas de *M. xanthus* difieren en el número de parches proteicos por célula. FloB se organiza en un número menor de parches que FloA, por lo que su distribución subcelular se asemeja más a la de FloT; mientras que la distribución de FloA se parece más a la de FloA de *B. subtilis* (Figura 65). Además, FloB y FloT son de tamaño mayor respecto a sus respectivas FloA. Por tanto, al igual que sucede en *B. subtilis*, las diferencias observadas en la distribución subcelular de las flotilinas de *M. xanthus* podría deberse a diferencias en su región C-terminal determinadas por sus repeticiones EA.

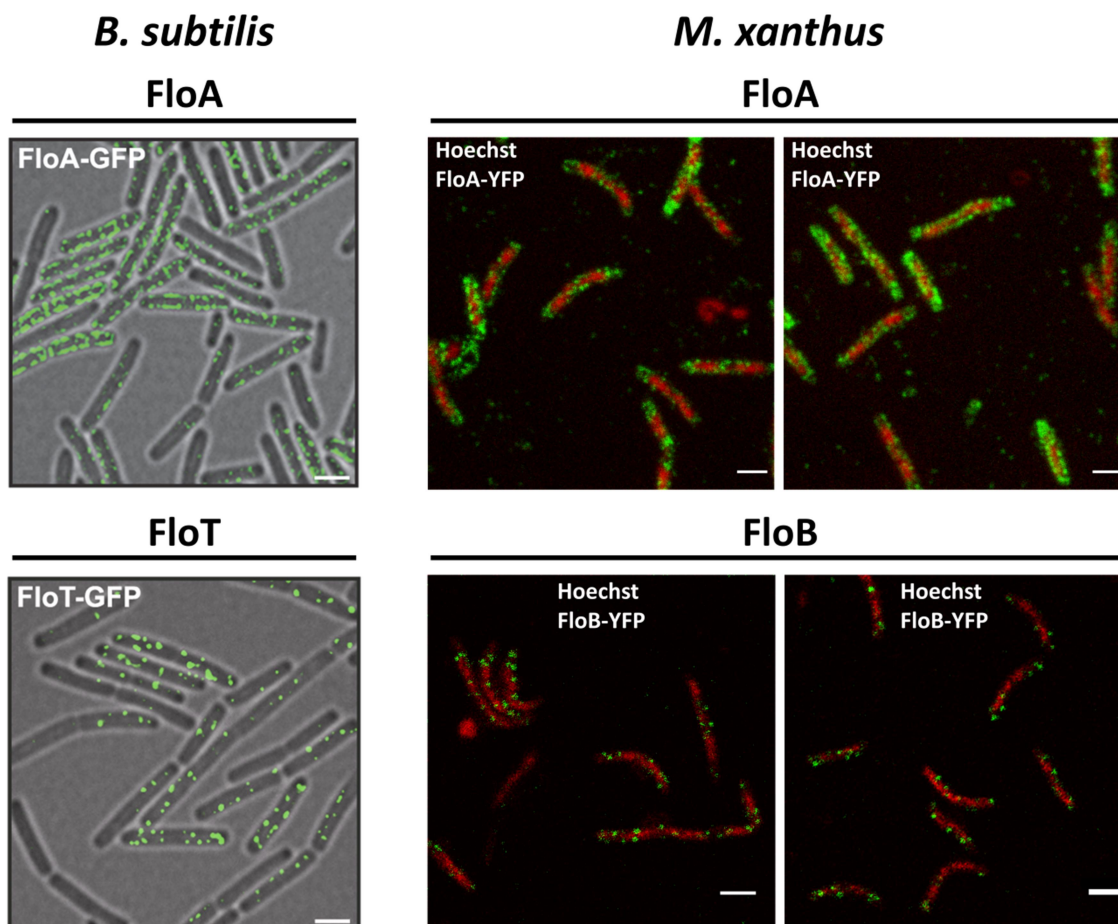


Figura 65. Comparación de la distribución subcelular de las posibles flotilinas de *M. xanthus* con las de *B. subtilis*. Se muestran imágenes de microscopía confocal de células de *M. xanthus* que expresan FloA-YFP (verde) o FloB-YFP (verde), y se comparan con imágenes de fluorescencia de células de *B. subtilis* que expresan FloA-GFP (verde) o FloT-GFP (verde). FloA de *M. xanthus* presenta una distribución subcelular más parecida a FloA de *B. subtilis* (imágenes superiores), mientras que FloB se asemeja más a FloT, constituyendo menos parches proteicos (imágenes inferiores). El DNA (rojo) se visualiza mediante Hoechst. La barra de escala indica 2 μ m. Las fotografías de *B. subtilis* se han modificado de Schneider *et al.* (2015).

Los resultados comentados en este apartado constituyen un primer paso en el estudio de la presencia de FMMs en *M. xanthus*. Todo apunta a que FloA y FloB son flotilinas y cabe esperar, por tanto, que estudios futuros permitan confirmar estos resultados preliminares. Dada la relación en otras bacterias entre los FMMs y la señalización de diversos procesos, en este trabajo nos planteamos la posibilidad de que exista un FMM asociado a la respuesta a la luz. Cabría esperar que dicha plataforma de señalización del estrés foto-oxidativo incorporase como proteínas de carga a CarF, CarR y CarQ, entre otras. Los resultados obtenidos indican que, al menos, CarR se encuentra preferentemente asociada a la fracción de membrana normalmente enriquecida en FMMs, la DRM. Además, se da la circunstancia de que

M. xanthus, a diferencia de la mayoría de las bacterias, produce plasmalógenos, que en eucariotas están precisamente enriquecidos en las balsas lipídicas (Braverman & Moser, 2012; Dean & Lodhi, 2018; Pike *et al.*, 2002; Rodemer *et al.*, 2003) y que los plasmalógenos son esenciales en la respuesta a la luz dependiente de CarQ/CarR. Por otro lado, resultados preliminares del grupo apuntan a que los plasmalógenos se localizan preferentemente en la fracción DRM. Por lo tanto, es posible que el proceso de señalización de la luz se vea favorecido por la formación de un FMM especializado. Estudios futuros permitirán profundizar en estos resultados y descubrir nuevos aspectos acerca de los FMMs en *M. xanthus*, así como si tienen alguna relación con la respuesta a la luz dependiente de CarF, CarR y CarQ.

IV.3 Respuesta global al estrés foto-oxidativo en *M. xanthus*

Aunque el conocimiento de la respuesta celular al $^1\text{O}_2$, el principal componente del estrés foto-oxidativo, ha mejorado durante los últimos años todavía quedan muchas preguntas por resolver (Glaeser *et al.*, 2011; Ziegelhoffer & Donohue, 2009). En *M. xanthus*, los estudios genéticos y moleculares sobre la respuesta a la luz han identificado varios genes estructurales y genes reguladores implicados en la síntesis de carotenoides y en su control, respectivamente. Además, dichos estudios han revelado que *M. xanthus* dispone de dos mecanismos para regular la carotenogénesis, uno dependiente de la vitamina B₁₂ y otro de la pareja de factores σ -ECF/anti- σ CarQ/CarR (Elías-Arnanz *et al.*, 2011). Cabe la posibilidad de que existan otros genes implicados en la respuesta a la luz de *M. xanthus* y una manera de averiguarlo podría ser la búsqueda de nuevos genes cuya expresión sea fotoinducible. Con este objetivo, en este trabajo nos propusimos realizar el primer estudio a escala global de la respuesta al estrés foto-oxidativo en *M. xanthus*. Ello ha implicado el análisis comparativo de los datos transcriptómicos, obtenidos tanto por *microarrays* como por *RNA-seq*, a lo largo del crecimiento celular en condiciones de luz versus oscuridad.

De este análisis destaca el hallazgo de que el regulón de CarQ parece incluir otros genes, *MXAN_6864*, el operón *MXAN_6048-47* y el operón *MXAN_0893-91*, además de los genes reguladores y estructurales ya conocidos por su implicación en la carotenogénesis. Entre estos nuevos genes cabe señalar *MXAN_6864* y el operón *MXAN_6048-47*, ya que ambos determinan posibles reductasas de sulfóxidos de metionina y en ambos casos se han identificado posibles sitios de unión a CarQ en las correspondientes regiones promotoras, lo que sugiere que su expresión fotoinducible

está directamente regulada por CarQ, como ocurre con el propio operón *carQRS* y el gen *crtIb*. Es improbable que el regulón de CarQ comprenda muchos más genes, pues al menos en el análisis transcriptómico no se encontraron otros genes que muestren un patrón tan claro de dependencia de CarQ. No obstante, experimentos futuros basados en el uso de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina a escala global (*ChIP-seq*), junto con la búsqueda bioinformática de sitios en el genoma que se ajusten a la secuencia consenso de unión de CarQ (Figura 53), permitirán definir aun con más precisión el regulón directo de CarQ. En cualquier caso, el análisis global realizado en este trabajo ha desvelado que, además de activar la síntesis de carotenos, CarQ activa la expresión de dos sistemas independientes para la reducción de los sulfóxidos de metionina en *M. xanthus*, uno basado en la enzima bifuncional de tipo MsrB/A (MXAN_6864) y el otro basado en el complejo MsrPQ (MXAN_6048-47). Esta observación sugiere que la oxidación de metioninas proteicas debe ser uno de los daños provocados por el estrés foto-oxidativo en *M. xanthus* y que su reparación debe ser una estrategia importante de defensa celular. Además, dado que nuestro análisis predice una localización en el periplasma para ambos sistemas enzimáticos, es probable que sea en dicho compartimento celular donde se concentren los sulfóxidos de metionina derivados de la producción de $^1\text{O}_2$ en la membrana. La eliminación en el futuro de MXAN_6864 y/o MXAN_6048-47, en combinación o no con la eliminación de la síntesis de carotenos, permitirá sopesar cuánto contribuye cada mecanismo a la protección de las células frente al estrés foto-oxidativo. Por otro lado, el análisis global ha permitido identificar también otros genes cuya expresión se fotoinduce, aunque de una manera que no depende de CarQ, lo que sugiere la existencia de vías adicionales para percibir el estrés causado por la iluminación.

No todos los genes identificados cuya expresión se fotoinduce exhiben el mismo patrón de fotoinducción. En los experimentos de *RNA-seq* que, en general, mostraron una mayor sensibilidad que los *microarrays* a la hora de detectar los cambios de expresión, se observó que gran parte de los genes que se inducen a 1 y 3 horas de exposición a la luz, también se mantienen activados a las 8 horas, que es cuando tiene lugar la fotoinducción de un mayor número de genes (Figura 66).

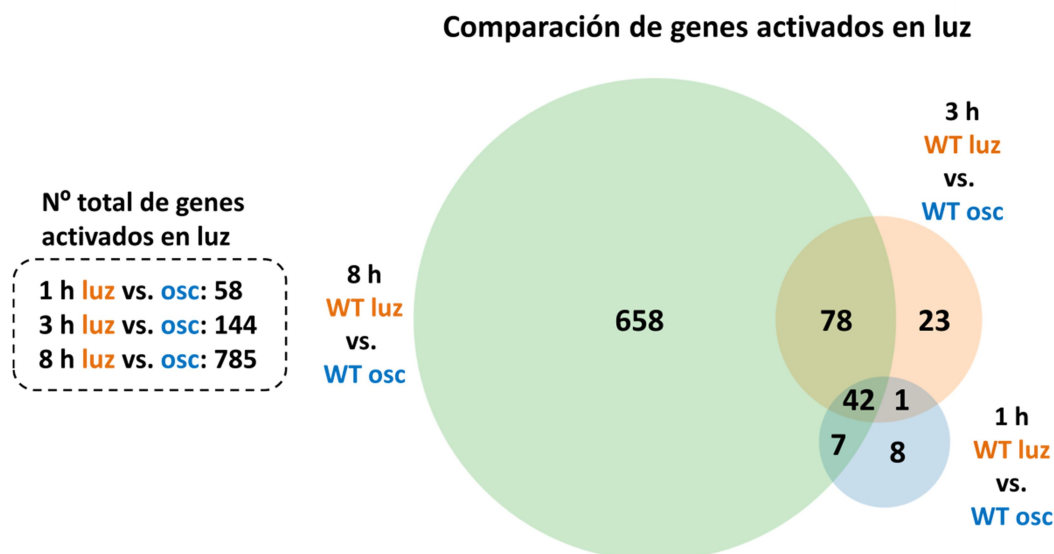


Figura 66. Diagrama de Venn comparativo de los genes que aumentan su expresión en los experimentos de RNA-seq en función del tiempo de exposición a la luz. Se muestra el número de genes comunes (zonas de solapamiento) y exclusivos para cada tiempo estudiado. A la izquierda, se indica el nº total de genes activados en luz a partir de los cuales se ha realizado el diagrama de Venn.

El análisis de los genes cuya expresión se induce a cada uno de los tres tiempos analizados, a partir del diagrama de Venn que se muestra en la Figura 66, permite establecer grupos génicos que muestran un patrón temporal de fotoinducción similar y establecer la cinética de la respuesta global al estrés foto-oxidativo en *M. xanthus* (Figura 67). A la vista de los datos, parece que la primera línea de defensa vendría dada por la activación por CarQ de la expresión de los genes carotenogénicos (excepto *orf9*, y los reguladores *carA* y *carH*) y del gen *MXAN_6864*. Los carotenoides inactivarían física o químicamente al $^1\text{O}_2$ (Di Mascio *et al.*, 1990; Ramel *et al.*, 2012) y la reductasa de sulfóxidos de metionina bifuncional determinada por *MXAN_6864* reduciría los dos tipos de estereoisómeros generados por oxidación de las metioninas proteicas (Han *et al.*, 2016; Weissbach *et al.*, 2002). A partir de las 3 horas de exposición a la luz, se activaría el resto de los genes dependientes de CarQ: los genes carotenogénicos restantes; el operón *MXAN_6048-47* que determina el sistema MsrPQ implicado también en la reducción de metioninas proteicas oxidadas; y el operón *MXAN_0893-91*, cuya posible implicación en la respuesta a la luz desconocemos (Figura 67). Estas diferencias en la cinética de expresión de los genes que dependen directa o indirectamente de CarQ es probable que esté determinada por la fuerza de los respectivos promotores y, para aquellos genes organizados en un operón, también por su localización relativa dentro del operón (ya que los genes que se encuentran al final de un operón tienden a mostrar niveles más bajos de expresión).

La mayoría de los genes dependientes de CarQ se mantienen inducidos a lo largo de todo el periodo de iluminación analizado y alcanzan unos niveles de expresión altos, sobre todo a las 8 horas, reflejando la importancia de este regulón para la supervivencia de la célula.

Es posible que el estrés foto-oxidativo sostenido en el tiempo, a través de la producción del $^1\text{O}_2$, dañe de forma directa o indirecta numerosos componentes celulares, y que conlleve la formación de otros ROS. En estas circunstancias, puede que no baste con los carotenoides y las reductasas de sulfóxidos de metionina para combatir los daños celulares. Quizás por ello, a medida que se prolonga el tiempo de exposición a la luz, aumenta también el número de genes cuya expresión se fotoinduce, varios de los cuales están relacionados con defensa enzimática frente a los ROS (Figura 67): enzimas relacionadas con el glutatión, destacando enzimas con función peroxidasa de glutatión, que podrían degradar peróxidos peptídicos (Morgan *et al.*, 2004); y enzimas con función S-transferasa de glutatión, que podrían detoxificar productos tóxicos procedentes de la interacción de moléculas con el $^1\text{O}_2$, conjugándolas con el glutatión (Allocati *et al.*, 2009). Además, se produce un aumento de expresión de varios genes que determinan oxidorreductasas, proteasas y chaperonas (Figura 67), que podrían reparar los daños ocasionados por el estrés oxidativo en proteínas. Las células muestran también un aumento de expresión de genes que cifran permeasas y transportadores ABC y RND, entre otros, que podrían expulsar los productos tóxicos procedentes del estrés foto-oxidativo (Berghoff & Klug, 2016) (Figura 67). La activación de los genes anteriormente comentados requiere de mecanismos reguladores que perciban, de algún modo, el estrés foto-oxidativo u oxidativo y modulen la expresión génica, por lo que el aumento de expresión de genes que determinan reguladores como sistemas de dos componentes, reguladores transcripcionales, factores sigma y quinasas mejoraría la respuesta defensiva (Figura 67). Tras las 8 horas de exposición a la luz, entran en juego un mayor número de genes que determinan oxidorreductasas y proteasas, lo que sugiere que a pesar de tener activados varios mecanismos de defensa, entre los que se incluyen mecanismos de inactivación directa de los ROS, las células ponen en marcha mecanismos adicionales para lidiar con el estrés oxidativo (Figura 67). El aumento observado en la expresión de más genes que determinan transportadores ABC podría contribuir a expulsar los productos tóxicos de manera más eficaz (Figura 67). Además, el estrés foto-oxidativo y oxidativo también podría generar daños en el DNA, lo que es consistente con el aumento de expresión observado en genes que codifican sistemas de reparación del DNA (Figura 67). Por otro lado, el aumento en el número de genes

relacionados con mecanismos reguladores podría servir para coordinar el patrón temporal de respuesta y potenciar la estrategia defensiva (Figura 67). En general, la mayoría de los genes comentados incrementan su expresión conforme aumenta el tiempo de exposición a la luz y los genes carotenogénicos son los que suelen presentar los niveles de expresión más altos.

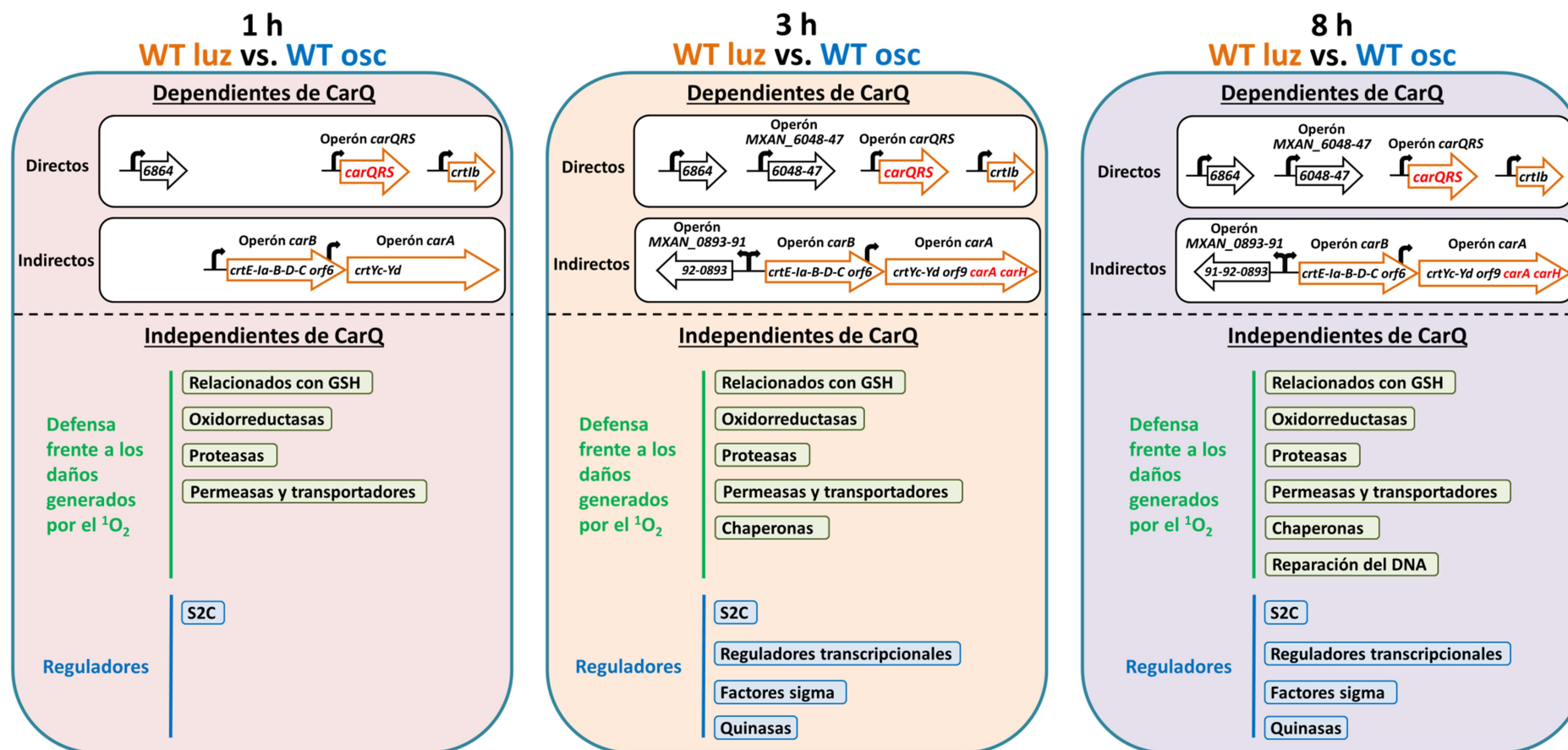


Figura 67. Cinética de expresión de los genes que se inducen en respuesta a la luz en *M. xanthus*. Los genes que responden a la luz analizados en este trabajo se han agrupado en función de si dependen o no de CarQ. Los genes dependientes de CarQ se han agrupado según si presentan una dependencia directa o indirecta de CarQ (los genes carotenogénicos se indican mediante flechas naranjas). Los genes independientes de CarQ se han clasificado a su vez en grupos funcionales que forman parte de los diferentes mecanismos de defensa frente al estrés foto-oxidativo. GSH, glutatión; S2C, sistemas de dos componentes.

La tendencia general de los grupos funcionales relacionados con la defensa frente a los daños generados por el $^1\text{O}_2$ es un aumento en el número de genes activados a mayor tiempo de exposición a la luz (Figura 68). Como se ha comentado, a la hora son muy pocos los genes pertenecientes a esta categoría, quizás porque los carotenos y la reductasa bifuncional de los sulfóxidos de metionina aporten los niveles de protección necesarios frente al estrés foto-oxidativo de corta duración. A partir de 3 horas, se observa un incremento en el número de genes activados, sobre todo aquellos que determinan proteasas y oxidorreductasas, y también tiene lugar la activación de genes que codifican chaperonas. Y a las 8 horas, se produce un aumento de expresión de un mayor número de genes que cifran oxidorreductasas, proteasas, permeasas y transportadores. Estos últimos presentan el incremento mayor, lo que apunta a que adquieren mayor relevancia para la supervivencia de la célula cuando el estrés foto-oxidativo se prolonga en el tiempo. Algo similar ocurre con los sistemas de reparación del DNA, ya que varios genes de esta categoría funcional experimentan una activación a las 8 horas de exposición a la luz.

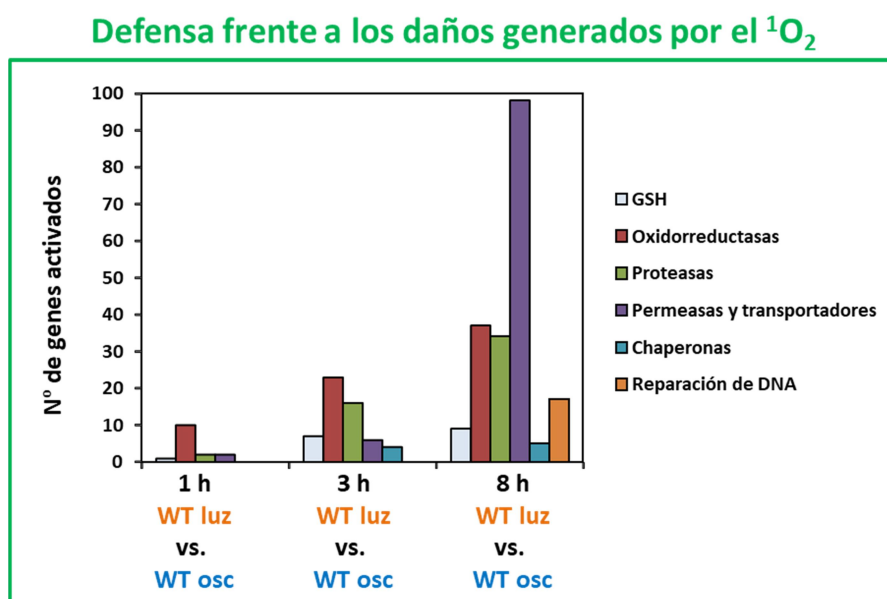


Figura 68. Análisis del número de genes “de defensa” activados durante el estrés foto-oxidativo. Se muestra el número de genes para los grupos funcionales indicados. GSH, glutatión.

Cabe esperar que el control del patrón de expresión temporal observado en respuesta al estrés foto-oxidativo vaya acompañado de la puesta en marcha de diversos mecanismos reguladores. La inactivación de CarR por la presencia de $^1\text{O}_2$ y la consiguiente liberación de CarQ no basta para explicar los cambios de expresión observados, sobre todo cuando se prolonga el estrés foto-oxidativo, puesto que

muchos de los genes que se activan a partir de las 3 horas de iluminación no dependen de CarQ. Nuestro análisis indica un aumento a las tres horas en el número de genes que determinan sistemas de dos componentes, que se hace más pronunciado a las 8 horas. Los sistemas de dos componentes, junto con los sistemas constituidos por las parejas σ -ECF/anti- σ , constituyen los principales pilares que sustentan la rápida adaptación de las bacterias a las condiciones cambiantes de su entorno, por lo que es posible que jueguen un papel importante cuando el estrés luminoso se sostiene en el tiempo, dictando la expresión de aquellos genes que no dependen de CarQ (Figura 69). Los sistemas de dos componentes, a su vez, pueden provocar la activación de otros sistemas de regulación y, quizás por ello, a las 8 horas se observa un aumento en otras categorías funcionales relacionadas con el control de la expresión génica.

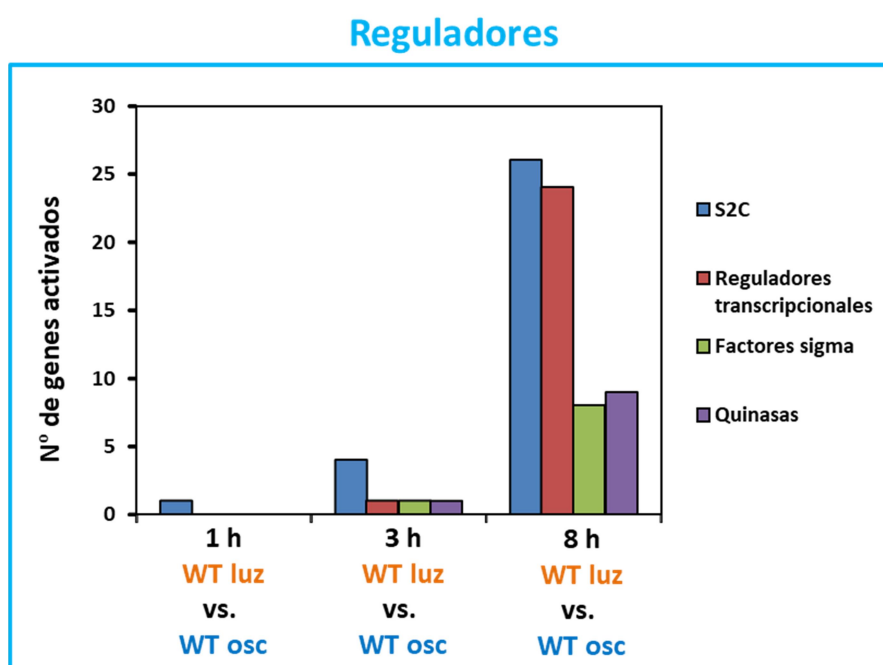


Figura 69. Análisis del número de genes “reguladores” activados durante el estrés foto-oxidativo. Se muestra el número de genes para los grupos funcionales indicados. S2C, sistemas de dos componentes.

La respuesta al estrés foto-oxidativo de *M. xanthus* presenta diferencias notables con respecto a la de otros microorganismos como, por ejemplo, *R. sphaeroides*, que también se han utilizado como modelos bacterianos para estudiar la respuesta al $^1\text{O}_2$. En *R. sphaeroides*, un organismo fotosintético, el $^1\text{O}_2$ normalmente se produce como consecuencia de la foto-excitación de las bacterioclorofilas. Aunque los carotenos juegan un papel clave en la defensa frente al $^1\text{O}_2$ en dicha bacteria, pues son constituyentes esenciales del aparato fotosintético, su síntesis no está sujeta a

fotorregulación (Glaeser & Klug, 2005), a diferencia de lo que ocurre en *M. xanthus*. Por otro lado, aunque tanto *M. xanthus* como *R. sphaeroides* utilizan una pareja σ -ECF/anti- σ para responder al $^1\text{O}_2$ (CarQ/CarR y σ^E /ChrR, respectivamente), los regulones que controlan son muy diferentes. CarQ controla la expresión de los genes carotenogénicos y la de otros que determinan posibles reductasas de sulfóxidos de metionina (Figura 70); mientras que σ^E activa una serie de genes que determinan una metilasa de ácidos grasos, una fotoliasa de DNA, un citocromo c_2 y el factor σ alternativo RpoH2, entre otros (Ziegelhoffer & Donohue, 2009). RpoH2, a su vez, activa diferentes grupos de genes que determinan productos relacionados con la detoxificación dependiente de glutatión, degradación de peróxidos, eliminación del metilglioal, entre otros (Nuss *et al.*, 2009); algunos de ellos también se activan en *M. xanthus* (Figura 70), pero a través de un mecanismo independiente de CarQ, que quizás dependa de un sistema de dos componentes. Los genes independientes de CarQ cuya expresión se ha analizado mediante RT-qPCR suelen presentar una fotoinducción mayor en ausencia de CarQ que en su presencia (Figura 57), lo que sugiere que adquieren mayor protagonismo cuando la vía de defensa primaria, la ruta dependiente de CarQ, está ausente. Por último, *M. xanthus* y *R. sphaeroides* difieren también en el mecanismo por el cual la pareja σ -ECF/anti- σ responde al $^1\text{O}_2$. ChrR es un factor anti- σ “clásico” en cuanto a que presenta un dominio NZASD por el cual secuestra a σ^E , presumiblemente en el citoplasma (ChrR carece de una hélice transmembranal), y un dominio C-terminal sensor que parece mediar la detección directa del $^1\text{O}_2$ (Campbell *et al.*, 2007; Greenwell *et al.*, 2011). CarR, sin embargo, carece de un dominio NZASD, presenta seis hélices transmembranales y requiere la presencia de plasmalógenos (que *R. sphaeroides* no sintetiza) para poder detectar el $^1\text{O}_2$. Así pues, aunque tanto *M. xanthus* como *R. sphaeroides* se sirven de una pareja σ -ECF/anti- σ para detectar el estrés foto-oxidativo, los mecanismos moleculares subyacentes son muy distintos, lo que sugiere que no tienen un origen evolutivo común. Es previsible que los estudios que se están realizando en el grupo permitan desvelar de qué manera participan los plasmalógenos en la detección del $^1\text{O}_2$ y cómo ello conduce a la inactivación de CarR y a la liberación de CarQ. Dado que los plasmalógenos no se encuentran presentes en otras bacterias, más allá de las mixobacterias, y que CarR es un factor anti- σ atípico, es probable que los estudios en progreso desvelen un nuevo mecanismo para la percepción del estrés foto-oxidativo y una nueva función señalizadora para los plasmalógenos que, tal vez, encuentre paralelismo en animales, incluido el ser humano.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan una visión mucho más completa y compleja de la respuesta al estrés foto-oxidativo en *M. xanthus*, que sienta las bases para futuros estudios sobre la contribución específica de los nuevos elementos tanto dependientes como independientes de CarQ identificados, y sobre cómo se regulan estos últimos.

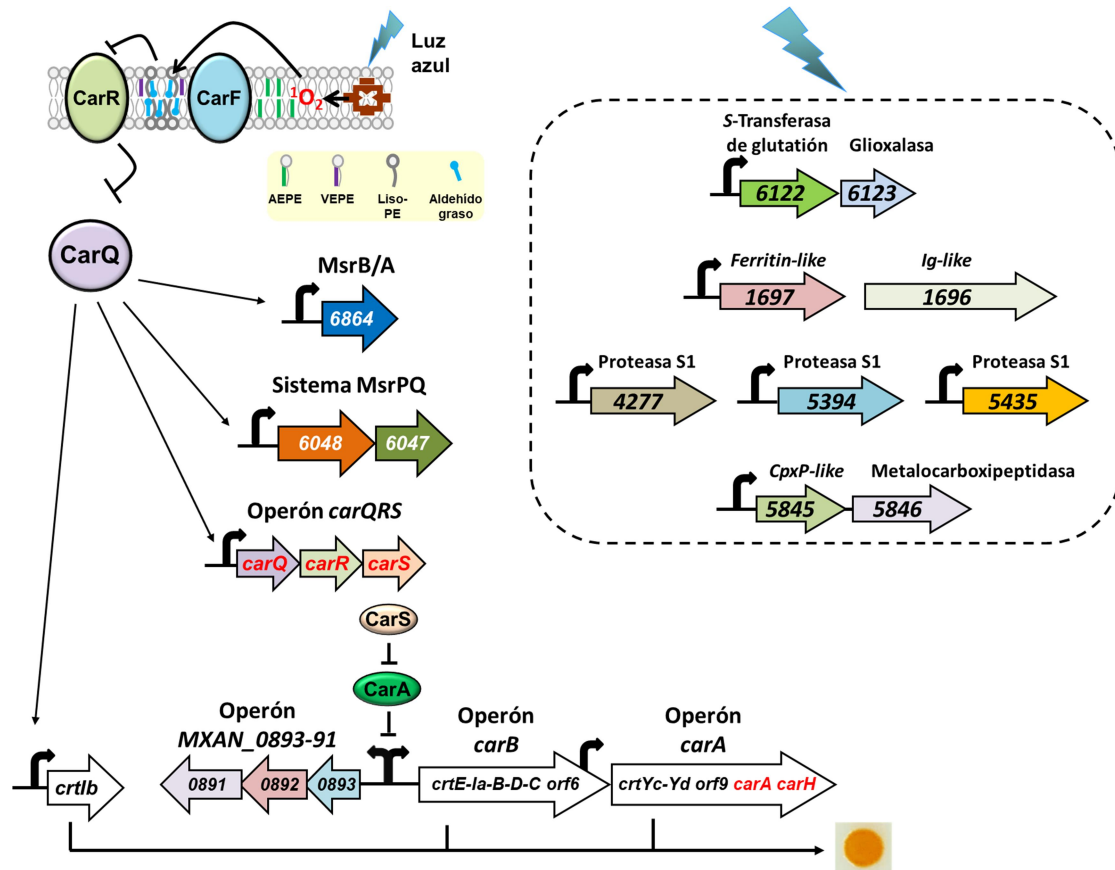


Figura 70. La respuesta global al estrés foto-oxidativo en *M. xanthus*. Se muestra el modelo de regulación simplificado de la respuesta a la luz dependiente de CarQ (con los nuevos genes identificados en los análisis globales) y los genes fotoinducibles independientes de CarQ validados por RT-qPCR (recuadro negro con líneas discontinuas). Msr, reductasa de sulfóxidos de metionina.

V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. CarF presenta una localización membranal en *M. xanthus*.
2. CarF se requiere en la respuesta a la luz de *M. xanthus* porque participa en la síntesis de plasmalógenos, un tipo de glicerofosfolípidos con enlace vinil éter en la posición *sn*-1.
3. Los plasmalógenos, pero no sus precursores con enlace éter, son esenciales para la respuesta a la luz de *M. xanthus*.
4. CarF es la desaturasa, buscada durante décadas, encargada de generar el enlace vinil éter en la ruta de biosíntesis de los plasmalógenos.
5. Las proteínas ElbD y MXAN_1676 están implicadas en la respuesta a la luz porque participan en los pasos previos a la generación del enlace vinil éter. ElbD participa en una ruta mayoritaria, y MXAN_1676 en una ruta minoritaria, para la síntesis de los glicerofosfolípidos con enlace éter.
6. El factor anti- σ CarR presenta una localización membranal tanto en oscuridad como en luz.
7. La inactivación de CarR no parece llevarse a cabo mediante un proceso de proteólisis dependiente de luz, puesto que no se aprecian diferencias significativas en la acumulación de CarR en luz y en oscuridad tanto en los experimentos realizados mediante detección con anticuerpos o mediante microscopía de fluorescencia.
8. CarR podría formar parte de un microdominio funcional de membrana, pues se encuentra preferentemente en la fracción de membrana resistente a detergentes, que normalmente está enriquecida en dichos microdominios. Este hallazgo constituye el primer paso en el estudio de la presencia de microdominios funcionales de membrana en *M. xanthus*.
9. Las proteínas FloA y FloB podrían ser flotilinas, ya que presentan las principales características de las flotilinas bacterianas: forman parte de la familia de proteínas SPFH, tienen un dominio PHB y una región transmembranal, presentan posibles repeticiones EA y una distribución subcelular similar a las flotilinas de *B. subtilis*, formando “parches proteicos” en la membrana.

10. Los estudios de expresión global mediante *microarrays* y *RNA-seq* han permitido identificar nuevos genes implicados en la respuesta a la luz en *M. xanthus*, que forman parte de mecanismos relacionados con la defensa y regulación frente al $^1\text{O}_2$ derivado del estrés foto-oxidativo.
11. Algunos de los nuevos genes identificados dependen de CarQ para su fotoinducción, pero otros son independientes de dicho factor σ -ECF, lo que sugiere que existen otras vías de percepción y respuesta a la luz, probablemente derivadas del estrés oxidativo generado tras la exposición continuada a la luz.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abellón-Ruiz, J., Bernal-Bernal, D., Abellán, M., Fontes, M., Padmanabhan, S., Murillo, F. J., & Elías-Arnanz, M. (2014).** The CarD/CarG regulatory complex is required for the action of several members of the large set of *Myxococcus xanthus* extracytoplasmic function σ factors. *Environmental Microbiology*, 16, 2475–2490.
- Agnez-Lima, L. F., Di Mascio, P., Demple, B., & Menck, C. F. M. (2001).** Singlet molecular oxygen triggers the soxRS regulon of *Escherichia coli*. *Biological Chemistry*, 382, 1071–1075.
- Albert, C. J., Thukkani, A. K., Heuertz, R. M., Slungaard, A., Hazen, S. L., & Ford, D. A. (2003).** Eosinophil peroxidase-derived reactive brominating species target the vinyl ether bond of plasmalogens generating a novel chemoattractant, α -bromo fatty aldehyde. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 8942–8950.
- Alhadid, Y., Chung, S., Lerner, E., Taatjes, D. J., Borukhov, S., & Weiss, S. (2017).** Studying transcription initiation by RNA polymerase with diffusion-based single-molecule fluorescence. *Protein Science*, 26, 1278–1290.
- Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., & Di Ilio, C. (2009).** Glutathione transferases in bacteria. *The FEBS Journal*, 276, 58–75.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389–3402.
- Álvarez-Martínez, C. E., Baldini, R. L., & Gomes, S. L. (2006).** A *Caulobacter crescentus* extracytoplasmic function sigma factor mediating the response to oxidative stress in stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 188, 1835–1846.
- Anthony, J. R., Warczak, K. L., & Donohue, T. J. (2005).** A transcriptional response to singlet oxygen, a toxic byproduct of photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 6502–6507.
- Armstrong, G. A. (1997).** Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Annual Review of Microbiology*, 51, 629–659.
- Bach, J. N., & Bramkamp, M. (2013).** Flotillins functionally organize the bacterial membrane. *Molecular Microbiology*, 88, 1205–1217.

- Balsalobre, J. M., Ruiz-Vázquez, R. M., & Murillo, F. J. (1987).** Light induction of gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84, 2359–2362.
- Battesti, A., & Gottesman, S. (2013).** Roles of adaptor proteins in regulation of bacterial proteolysis. *Current Opinion in Microbiology*, 16, 140–147.
- Bayer-Santos, E., Lima, L., Ceseti, L. M., Ratagami, C. Y., de Santana, E. S., da Silva, A. M., ... Álvarez-Martínez, C. E. (2018).** *Xanthomonas citri* T6SS mediates resistance to *Dictyostelium* predation and is regulated by an ECF σ factor and cognate Ser/Thr kinase. *Environmental Microbiology*, 20, 1562–1575.
- Beavers, W. N., & Skaar, E. P. (2016).** Neutrophil-generated oxidative stress and protein damage in *Staphylococcus aureus*. *Pathogens and Disease*, 74, ftw060.
- Berghoff, B. A., & Klug, G. (2016).** An omics view on the response to singlet oxygen. En F. J. de Bruijn (Ed.), *Stress and environmental regulation of gene expression and adaptation in bacteria* (pp. 619–631). Hoboken, USA: John Wiley & Sons.
- Bernal-Bernal, D. (2012).** *Análisis de los factores anti- σ DdvA y CarR de la bacteria Myxococcus xanthus: topología en la membrana e interacción con sus respectivos factores σ -ECF* (Tesis de Máster). Universidad de Murcia.
- Bernal-Bernal, D. (2018).** *El complejo CarD-CarG y su implicación en un nuevo mecanismo de regulación de un sistema CRISPR-Cas* (Tesis doctoral). Universidad de Murcia.
- Bernal-Bernal, D., Abellón-Ruiz, J., Iniesta, A. A., Pajares-Martínez, E., Bastida-Martínez, E., Fontes, M., ... Elías-Arnanz, M. (2018).** Multifactorial control of the expression of a CRISPR-Cas system by an extracytoplasmic function σ /anti- σ pair and a global regulatory complex. *Nucleic Acids Research*, 46, 6726–6745.
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., ... Martinez, J. (2016).** Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms*, 4, 14.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959).** A rapid method of total extration and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917.
- Bode, H. B., Ring, M. W., Schwär, G., Altmeyer, M. O., Kegler, C., Jose, I. R., ... Müller, R. (2009).** Identification of additional players in the alternative biosynthesis

- pathway to isovaleryl-CoA in the myxobacterium *Myxococcus xanthus*. *ChemBioChem*, 10, 128–140.
- Bode, H. B., Ring, M. W., Schwär, G., Kroppenstedt, R. M., Kaiser, D., & Müller, R. (2006).** 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (CoA) synthase is involved in biosynthesis of isovaleryl-CoA in the myxobacterium *Myxococcus xanthus* during fruiting body formation. *Journal of Bacteriology*, 188, 6524–6528.
- Bodelón, G., Palomino, C., & Fernández, L. Á. (2013).** Immunoglobulin domains in *Escherichia coli* and other enterobacteria: from pathogenesis to applications in antibody technologies. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, 204–250.
- Bonomi, H. R., Toum, L., Sycz, G., Sieira, R., Toscani, A. M., Gudesblat, G. E., ... Malamud, F. (2016).** *Xanthomonas campestris* attenuates virulence by sensing light through a bacteriophytochrome photoreceptor. *EMBO Reports*, 17, 1565–1577.
- Bramkamp, M., & López, D. (2015).** Exploring the existence of lipid rafts in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79, 81–100.
- Braun, V., & Mahren, S. (2005).** Transmembrane transcriptional control (surface signalling) of the *Escherichia coli* Fec type. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 673–684.
- Braverman, N. E., & Moser, A. B. (2012).** Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822, 1442–1452.
- Bretscher, A. P., & Kaiser, D. (1978).** Nutrition of *Myxococcus xanthus*, a fruiting myxobacterium. *Journal of Bacteriology*, 133, 763–768.
- Brooks, B. E., & Buchanan, S. K. (2008).** Signaling mechanisms for activation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 1930–1945.
- Browman, D. T., Hoegg, M. B., & Robbins, S. M. (2007).** The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *TRENDS in Cell Biology*, 17, 394–402.
- Brown, D. A. (2002).** Isolation and use of rafts. En *Current protocols in immunology*.
- 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.

- Browning, D. F., Whitworth, D. E., & Hodgson, D. A. (2003).** Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: functional characterization of the ECF sigma factor CarQ and antisigma factor CarR. *Molecular Microbiology*, 48, 237–251.
- Bryan, S. J., Burroughs, N. J., Evered, C., Sacharz, J., Nenninger, A., Mullineaux, C. W., & Spence, E. M. (2011).** Loss of the SPHF homologue Slr1768 leads to a catastrophic failure in the maintenance of thylakoid membranes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS ONE*, 6, e19625.
- Burchard, R. P., & Dworkin, M. (1966).** Light-induced lysis and carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 91, 535–545.
- Burchard, R. P., & Hendricks, S. B. (1969).** Action spectrum for carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 97, 1165–1168.
- 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, 195–203.
- Campbell, E. A., Greenwell, R., Anthony, J. R., Wang, S., Lim, L., Das, K., ... Darst, S. A. (2007).** A conserved structural module regulates transcriptional responses to diverse stress signals in bacteria. *Molecular Cell*, 27, 793–805.
- Cloonan, N., & Grimmond, S. M. (2008).** Transcriptome content and dynamics at single-nucleotide resolution. *Genome Biology*, 9, 234.
- Cohen, S. E., & Golden, S. S. (2015).** Circadian rhythms in cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79, 373–385.
- Cooper, R. A. (1984).** Metabolism of methylglyoxal in microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, 38, 49–68.
- Crooks, G., Hon, G., Chandonia, J., & Brenner, S. E. (2004).** WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research*, 14, 1188–1190.
- Croucher, N. J., & Thomson, N. R. (2010).** Studying bacterial transcriptomes using

RNA-seq. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 619–624.

Cuthbertson, L., & Nodwell, J. R. (2013). The TetR family of regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77, 440–475.

Da Silva, T. F., Eira, J., Lopes, A. T., Malheiro, A. R., Sousa, V., Luoma, A., ... Brites, P. (2014). Peripheral nervous system plasmalogens regulate Schwann cell differentiation and myelination. *Journal of Clinical Investigation*, 124, 2560–2570.

Das, K. C., & Das, C. K. (2000). Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: redox independent functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277, 443–447.

Davies, M. J. (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305, 761–770.

Davis, M. C., Kesthely, C. A., Franklin, E. A., & MacLellan, S. R. (2017). The essential activities of the bacterial sigma factor. *Canadian Journal of Microbiology*, 63, 89–99.

Dawid, W. (2000). Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 403–427.

Dawid, W., Gallikowski, C. A., & Hirsch, P. (1988). Psychrophilic myxobacteria from antarctic soils. *Polarforschung*, 58, 271–278.

Dean, J. M., & Lodhi, I. J. (2018). Structural and functional roles of ether lipids. *Protein & Cell*, 9, 196–206.

Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., Ormeño-Orrillo, E., Melo, I. S., Martínez-Romero, E., & Hungria, M. (2013). Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3342–3351.

Devasagayam, T. P. A., Sundquist, A. R., Di Mascio, P., Kaiser, S., & Sies, H. (1991). Activity of thiols as singlet molecular oxygen quenchers. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology*, 9, 105–116.

- Di Mascio, P., Devasagayam, T. P. A., Kaiser, S., & Sies, H. (1990).** Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. *Biochemical Society Transactions*, 18, 1054–1056.
- Domingues, R. M., Domingues, P., Melo, T., Pérez-Sala, D., Reis, A., & Spickett, C. M. (2013).** Lipoxidation adducts with peptides and proteins: deleterious modifications or signaling mechanisms? *Journal of Proteomics*, 92, 110–131.
- Donovan, C., & Bramkamp, M. (2009).** Characterization and subcellular localization of a bacterial flotillin homologue. *Microbiology*, 155, 1786–1799.
- Dougan, D. A., Reid, B. G., Horwich, A. L., & Bukau, B. (2002).** ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine. *Molecular Cell*, 9, 673–683.
- Du, D., van Veen, H. W., Murakami, S., Pos, K. M., & Luisi, B. F. (2015).** Structure, mechanism and cooperation of bacterial multidrug transporters. *Current Opinion in Structural Biology*, 33, 76–91.
- Dubowy, C., & Sehgal, A. (2017).** Circadian rhythms and sleep in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 205, 1373–1397.
- Ebright, R. H. (2000).** RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *Journal of Molecular Biology*, 304, 687–698.
- Elías-Arnanz, M., Fontes, M., & Padmanabhan, S. (2008).** Carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: a complex regulatory network. En D. E. Whitworth (Ed.), *Myxobacteria: multicellularity and differentiation* (pp. 211–225). Washington, D. C: ASM Press.
- Elías-Arnanz, M., & Murillo, F. J. (1991a).** Induction of germination in *Myxococcus xanthus* fruiting body spores. *Journal of General Microbiology*, 137, 381–388.
- Elías-Arnanz, M., & Murillo, F. J. (1991b).** Mutations affecting germination in *Myxococcus xanthus*. *Journal of General Microbiology*, 137, 389–397.
- Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S., & Murillo, F. J. (2010).** The regulatory action of the myxobacterial CarD/CarG complex: a bacterial enhanceosome? *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 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.
- Erickson, E., Wakao, S., & Niyogi, K. K. (2015).** Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 82, 449–465.
- Faulkner, S. M., Bee, P. E., Meyer, N., Dijk, D. J., & Drake, R. J. (2019).** Light therapies to improve sleep in intrinsic circadian rhythm sleep disorders and neuropsychiatric illness: a systematic review and meta-analysis. *Sleep Medicine Reviews*, 46, 108–123.
- Fernandes Messias, M. C., Colozza Mecatti, G., Gonçalves Priolli, D., & de Oliveira Carvalho, P. (2018).** Plasmalogen lipids: functional mechanism and their involvement in gastrointestinal cancer. *Lipids in Health and Disease*, 17, 1–12.
- Ferretti, U., Ciura, J., Ksas, B., Rác, M., Sedlářová, M., Kruk, J., ... Pospíšil, P. (2018).** Chemical quenching of singlet oxygen by plastoquinols and their oxidation products in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 95, 848–861.
- Fischer, B. B., Ledford, H. K., Wakao, S., Huang, S. G., Casero, D., Pellegrini, M., ... Niyogi, K. K. (2012).** SINGLET OXYGEN RESISTANT 1 links reactive electrophile signaling to singlet oxygen acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109, E1302–E1311.
- Fontes, M., Galbis-Martínez, L., & Murillo, F. J. (2003).** A novel regulatory gene for light-induced carotenoid synthesis in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 47, 561–571.
- Fontes, M., Ruiz-Vázquez, R., & Murillo, F. J. (1993).** Growth phase dependence of the activation of a bacterial gene for carotenoid synthesis by blue light. *The EMBO Journal*, 12, 1265–1275.
- Francez-Charlot, A., Frunzke, J., Reichen, C., Ebnetter, J. Z., Gourion, B., & Vorholt, J. A. (2009).** Sigma factor mimicry involved in regulation of general stress response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106, 3467–3472.
- Francez-Charlot, A., Kaczmarczyk, A., Fischer, H. M., & Vorholt, J. A. (2015).** The

general stress response in Alphaproteobacteria. *Trends in Microbiology*, 23, 164–171.

Galbis-Martínez, L. (2005). *Análisis genético y molecular de un transductor de la señal luminosa en la bacteria Myxococcus xanthus* (Tesis doctoral). Universidad de Murcia.

Galbis-Martínez, L., Galbis-Martínez, M., Murillo, F. J., & Fontes, M. (2008). An anti-antisigma factor in the response of the bacterium *Myxococcus xanthus* to blue light. *Microbiology*, 154, 895–904.

Galbis-Martínez, M., Padmanabhan, S., Murillo, F. J., & Elías-Arnanz, M. (2012). CarF mediates signaling by singlet oxygen, generated via photoexcited protoporphyrin IX, in *Myxococcus xanthus* light-induced carotenogenesis. *Journal of Bacteriology*, 194, 1427–1436.

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

Gao, B., Lara-Tejero, M., Lefebvre, M., Goodman, A. L., & Galán, J. E. (2014). Novel components of the flagellar system in epsilonproteobacteria. *MBio*, 5, e01349-14.

Gao, J., Ajjawi, I., Manoli, A., Sawin, A., Xu, C., Froehlich, J. E., ... Benning, C. (2009). FATTY ACID DESATURASE4 of Arabidopsis encodes a protein distinct from characterized fatty acid desaturases. *The Plant Journal*, 60, 832–839.

Gao, R., & Stock, A. M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual Review of Microbiology*, 63, 133–154.

García-Heras, F., Abellón-Ruiz, J., Murillo, F. J., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, 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, 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 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.
- Gennaris, A., Ezraty, B., Henry, C., Agrebi, R., Vergnes, A., Oheix, E., ... Barras, F. (2015).** Repairing oxidized proteins in the bacterial envelope using respiratory chain electrons. *Nature*, 528, 409–412.
- Glaeser, J., & Klug, G. (2005).** Photo-oxidative stress in *Rhodobacter sphaeroides*: protective role of carotenoids and expression of selected genes. *Microbiology*, 151, 1927–1938.
- Glaeser, J., Nuss, A. M., Berghoff, B. A., & Klug, G. (2011).** Singlet oxygen stress in microorganisms. *Advances in Microbial Physiology*, 58, 141–173.
- Goldfine, H. (2017).** The anaerobic biosynthesis of plasmalogens. *FEBS Letters*, 591, 2714–2719.
- Goldman, B. S., Nierman, W. C., Kaiser, D., Slater, S. C., Durkin, A. S., Eisen, J. A., ... Kaplan, H. B. (2006).** Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 15200–15205.
- Gomelsky, M., & Hoff, W. D. (2011).** Light helps bacteria make important lifestyle decisions. *Trends in Microbiology*, 19, 441–448.
- Gómez-Santos, N., Pérez, J., Sánchez-Sutil, M. C., Moraleda-Muñoz, A., & Muñoz-Dorado, J. (2011).** CorE from *Myxococcus xanthus* is a copper-dependent RNA polymerase sigma factor. *PLoS Genetics*, 7, e1002106.
- Good, M. C., Zalatan, J. G., & Lim, W. A. (2011).** Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science*, 332, 680–686.
- Gorham, H. C., McGowan, S. J., Robson, P. R. H., & Hodgson, D. A. (1996).** Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: light-dependent membrane sequestration of ECF sigma factor CarQ by anti-sigma factor CarR. *Molecular Microbiology*, 19, 171–186.

- Goutam, K., Gupta, A. K., & Gopal, B. (2017).** The fused SnaL_2 domain in the *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor σ^J modulates promoter recognition. *Nucleic Acids Research*, 45, 9760–9772.
- Green, J. B., Lower, R. P. J., & Young, J. P. W. (2009).** The NfeD protein family and its conserved gene neighbours throughout prokaryotes: functional implications for stomatin-like proteins. *Journal of Molecular Evolution*, 69, 657–667.
- Greenwell, R., Nam, T. W., & Donohue, T. J. (2011).** Features of *Rhodobacter sphaeroides* ChrR required for stimuli to promote the dissociation of σ^E /ChrR complexes. *Journal of Molecular Biology*, 407, 477–491.
- 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.
- Gruber, T. M., & Gross, C. A. (2003).** Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual Review of Microbiology*, 57, 441–466.
- Guo, Y., Sheng, Q., Li, J., Ye, F., Samuels, D. C., & Shyr, Y. (2013).** Large scale comparison of gene expression levels by microarrays and RNAseq using TCGA data. *PLoS ONE*, 8, e71462.
- Hakkila, K., Antal, T., Rehman, A. U., Kurkela, J., Wada, H., Vass, I., ... Tyystjärvi, T. (2014).** Oxidative stress and photoinhibition can be separated in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1837, 217–225.
- Hakkila, K., Valev, D., Antal, T., Tyystjärvi, E., & Tyystjärvi, T. (2019).** Group 2 sigma factors are central regulators of oxidative stress acclimation in cyanobacteria. *Plant and Cell Physiology*, 60, 436–447.
- Han, A., Kim, M. J., Kwak, G. H., Son, J., Hwang, K. Y., & Kim, H. Y. (2016).** Essential role of the linker region in the higher catalytic efficiency of a bifunctional MsrA-MsrB fusion protein. *Biochemistry*, 55, 5117–5127.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166, 557–580.

- Harayama, T., & Riezman, H. (2018).** Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19, 281–296.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005).** Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51–88.
- Helmann, J. D. (2002).** The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Advances in Microbial Physiology*, 46, 47–110.
- Helmann, J. D., & Chamberlin, M. J. (1988).** Structure and function of bacterial sigma factors. *Annual Review of Biochemistry*, 57, 839–872.
- Heo, L., Cho, Y. B., Lee, M. S., Roe, J. H., & Seok, C. (2013).** Alternative zinc-binding sites explain the redox sensitivity of zinc-containing anti-sigma factors. *Proteins*, 81, 1644–1652.
- Ho, T. D., & Ellermeier, C. D. (2012).** Extra cytoplasmic function σ factor activation. *Current Opinion in Microbiology*, 15, 182–188.
- Hodgson, D. A., & Murillo, F. J. (1993).** Genetics of regulation and pathway of synthesis of carotenoids. En M. Dworkin & D. Kaiser (Eds.), *Myxobacteria* (pp. 157–181). New York, USA: SpringerVerlag.
- Hoiczky, E., Ring, M. W., McHugh, C. A., Schwär, G., Bode, E., Krug, D., ... Bode, H. B. (2009).** Lipid body formation plays a central role in cell fate determination during developmental differentiation of *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 74, 497–517.
- Hong, H. J., Paget, M. S. B., & Buttner, M. J. (2002).** A signal transduction system in *Streptomyces coelicolor* that activates the expression of a putative cell wall glycan operon in response to vancomycin and other cell wall-specific antibiotics. *Molecular Microbiology*, 44, 1199–1211.
- Hsu, Y. H., Dumlao, D. S., Cao, J., & Dennis, E. A. (2013).** Assessing phospholipase A2 activity toward cardiolipin by mass spectrometry. *PLoS ONE*, 8, e59267.
- Huang, X., Pinto, D., Fritz, G., & Mascher, T. (2015).** Environmental sensing in *Actinobacteria*: a comprehensive survey on the signaling capacity of this phylum. *Journal of Bacteriology*, 197, 2517–2535.

- Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R., & Yamanaka, S. (1998).** Isolation of myxobacteria from the marine environment. *FEMS Microbiology Letters*, 169, 317–322.
- 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.
- Inoue, S., Ejima, K., Iwai, E., Hayashi, H., Appel, J., Tyystjärvi, E., ... Nishiyama, Y. (2011).** Protection by α -tocopherol of the repair of photosystem II during photoinhibition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807, 236–241.
- Isaac, D. D., Pinkner, J. S., Hultgren, S. J., & Silhavy, T. J. (2005).** The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 17775–17779.
- Ivanchenko, M., Stanewsky, R., & Giebultowicz, J. M. (2001).** Circadian photoreception in *Drosophila*: functions of cryptochrome in peripheral and central clocks. *Journal of Biological Rhythms*, 16, 205–215.
- Janssen, G. R., Wireman, J. W., & Dworkin, M. (1977).** Effect of temperature on the growth of *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 130, 561–562.
- Jogler, C., Waldmann, J., Huang, X., Jogler, M., Glöckner, F. O., Mascher, T., & Kolter, R. (2012).** Identification of proteins likely to be involved in morphogenesis, cell division, and signal transduction in *Planctomycetes* by comparative genomics. *Journal of Bacteriology*, 194, 6419–6430.
- Johnson, M. P. (2016).** Photosynthesis. *Essays in Biochemistry*, 60, 255–273.
- Jost, M., Fernández-Zapata, J., Polanco, M. C., Ortiz-Guerrero, J. M., Chen, P. Y., Kang, G., ... Drennan, C. L. (2015).** Structural basis for gene regulation by a B₁₂-dependent photoreceptor. *Nature*, 526, 536–541.
- Julien, B., Kaiser, A. D., & Garza, A. (2000).** Spatial control of cell differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 9098–9103.

- Kaiser, D. (2004).** Signaling in myxobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 58, 75–98.
- Kaiser, D., & Dworkin, M. (2008).** From glycerol to the genome. En D. E. Whitworth (Ed.), *Myxobacteria: multicellularity and differentiation* (pp. 3–15). Washington, D. C.: ASM Press.
- Kaiser, S., Di Mascio, P., Murphy, M. E., & Sies, H. (1990).** Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 277, 101–108.
- Kalapos, M. P. (1999).** Methylglyoxal in living organisms. Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicology Letters*, 110, 145–175.
- Kane, M. D., Jatkoa, T. A., Stumpf, C. R., Lu, J., Thomas, J. D., & Madore, S. J. (2000).** Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Research*, 28, 4552–4557.
- Kappler, U., Nasreen, M., & McEwan, A. (2019).** New insights into the molecular physiology of sulfoxide reduction in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 75, 1–51.
- Kashefi, K., & Hartzell, P. L. (1995).** Genetic suppression and phenotypic masking of a *Myxococcus xanthus* *frzF* defect. *Molecular Microbiology*, 15, 483–494.
- Kim, S. Y., Kim, E. J., & Park, J. W. (2002).** Control of singlet oxygen-induced oxidative damage in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 353–357.
- Kish, E., Mendes-Pinto, M. 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.
- Koch, G., Wermser, C., Acosta, I. C., Kricks, L., Stengel, S. T., Yepes, A., & López, D. (2017).** Attenuating *Staphylococcus aureus* virulence by targeting flotillin protein scaffold activity. *Cell Chemical Biology*, 24, 845-857.e6.
- Kohler, C., Lourenço, R. F., Avelar, G. M., & Gomes, S. L. (2012).** Extracytoplasmic function (ECF) sigma factor σ^F is involved in *Caulobacter crescentus* response to heavy metal stress. *BMC Microbiology*, 12, 210.

- Komano, T., Franceschini, T., & Inouye, S. (1987).** Identification of a vegetative promoter in *Myxococcus xanthus*. A protein that has homology to histones. *Journal of Molecular Biology*, 196, 517–524.
- Kress, W., Maglica, Ž., & Weber-Ban, E. (2009).** Clp chaperone-proteases: structure and function. *Research in Microbiology*, 160, 618–628.
- Krieger-Liszkay, A. (2005).** Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 56, 337–346.
- Krishnan, B., Levine, J. D., Lynch, M. K. S., Dowse, H. B., Funes, P., Hall, J. C., ... Dryer, S. E. (2001).** A new role for cryptochrome in a *Drosophila* circadian oscillator. *Nature*, 411, 313–317.
- Kroos, L., & Kaiser, D. (1987).** Expression of many developmentally regulated genes in *Myxococcus* depends on a sequence of cell interactions. *Genes & Development*, 1, 840–854.
- Kruk, J., & Trebst, A. (2008).** Plastoquinol as a singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777, 154–162.
- 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 B₁₂-dependent photoreceptor protein. *Nature Communications*, 6, 7907.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lane, W. J., & Darst, S. A. (2006).** The structural basis for promoter -35 element recognition by the group IV σ factors. *PLOS Biology*, 4, e269.
- Lang, D. M., Lommel, S., Jung, M., Ankerhold, R., Petrausch, B., Laessing, U., ... Stuermer, C. A. O. (1998).** Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *Journal of Neurobiology*, 37, 502–523.
- Langhorst, M. F., Reuter, A., & Stuermer, C. A. O. (2005).** Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cellular and Molecular Life*

- Sciences: CMLS*, 62, 2228–2240.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... Higgins, D. G. (2007).** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947–2948.
- Lean, J. (1997).** The Sun's variable radiation and its relevance for Earth. *Annual Review of Astronomy and Astrophysics*, 35, 33–67.
- LeDeaux, J. R., Yu, N., & Grossman, A. D. (1995).** Different roles for KinA, KinB, and KinC in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 177, 861–863.
- Ledford, H. K., Chin, B. L., & Niyogi, K. K. (2007).** Acclimation to singlet oxygen stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 6, 919–930.
- Lemke, R. A. S., Peterson, A. C., Ziegelhoffer, E. C., Westphall, M. S., Tjellström, H., Coon, J. J., & Donohue, T. J. (2014).** Synthesis and scavenging role of furan fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 111, E3450–E3457.
- 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.
- Li, W., Stevenson, C. E. M., Burton, N., Jakimowicz, P., Paget, M. S. B., Buttner, M. J., ... Kleanthous, C. (2002).** Identification and structure of the anti-sigma factor-binding domain of the disulphide-stress regulated sigma factor σ^R from *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Molecular Biology*, 323, 225–236.
- Li, Y., Luxenburger, E., & Müller, R. (2013).** An alternative isovaleryl CoA biosynthetic pathway involving a previously unknown 3-methylglutaconyl CoA decarboxylase. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 52, 1304–1308.
- Li, Z. G. (2016).** Methylglyoxal and glyoxalase system in plants: old players, new

- concepts. *The Botanical Review*, 82, 183–203.
- Lingwood, D., & Simons, K. (2010).** Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327, 46–50.
- Liscum, E., Askinosie, S. K., Leuchtman, D. L., Morrow, J., Willenburg, K. T., & Coats, D. R. (2014).** Phototropism: growing towards an understanding of plant movement. *The Plant Cell*, 26, 38–55.
- Llansola-Portoles, M. J., Pascal, A. A., & Robert, B. (2017).** Electronic and vibrational properties of carotenoids: from *in vitro* to *in vivo*. *Journal of the Royal Society Interface*, 14, 20170504.
- Lohner, K. (1996).** Is the high propensity of ethanolamine plasmalogens to form non-lamellar lipid structures manifested in the properties of biomembranes? *Chemistry and Physics of Lipids*, 81, 167–184.
- Lonetto, M. A., Brown, K. L., Rudd, K. E., & Buttner, M. J. (1994).** Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase σ factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 7573–7577.
- 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.
- López, D. (2015).** Molecular composition of functional microdomains in bacterial membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 192, 3–11.
- López, D., Fischbach, M. A., Chu, F., Losick, R., & Kolter, R. (2009).** Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106, 280–285.
- López, D., & Koch, G. (2017).** Exploring functional membrane microdomains in bacteria: an overview. *Current Opinion in Microbiology*, 36, 76–84.
- López, D., & Kolter, R. (2010).** Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes & Development*, 24, 1893–1902.

- Lorenzen, W., Ahrendt, T., Bozhüyük, K. A. J., & Bode, H. B. (2014).** A multifunctional enzyme is involved in bacterial ether lipid biosynthesis. *Nature Chemical Biology*, 10, 425–427.
- Lorenzen, W., Bozhüyük, K. A. J., Cortina, N. S., & Bode, H. B. (2014).** A comprehensive insight into the lipid composition of *Myxococcus xanthus* by UPLC-ESI-MS. *Journal of Lipid Research*, 55, 2620–2633.
- Lourenço, R. F., & Gomes, S. L. (2009).** The transcriptional response to cadmium, organic hydroperoxide, singlet oxygen and UV-A mediated by the σ^E -ChrR system in *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology*, 72, 1159–1170.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Lu, J., & Holmgren, A. (2014).** The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 75–87.
- Maeda, H., & DellaPenna, D. (2007).** Tocopherol functions in photosynthetic organisms. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 260–265.
- Mahmud, T., Wenzel, S. C., Wan, E., Wen, K. W., Bode, H. B., Gaitatzis, N., & Müller, R. (2005).** A biosynthetic pathway to isovaleryl-CoA in myxobacterial: the involvement of the mevalonate pathway. *ChemBioChem*, 6, 322–330.
- Mao, X. M., Sun, N., Wang, F., Luo, S., Zhou, Z., Feng, W. H., ... Li, Y. Q. (2013).** Dual positive feedback regulation of protein degradation of an extra-cytoplasmic function σ factor for cell differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 31217–31228.
- Marcos-Torres, F. J., Pérez, J., Gómez-Santos, N., Moraleda-Muñoz, A., & Muñoz-Dorado, J. (2016).** In depth analysis of the mechanism of action of metal-dependent sigma factors: characterization of CorE2 from *Myxococcus xanthus*. *Nucleic Acids Research*, 44, 5571–5584.
- Marrink, S., & Mark, A. E. (2004).** Molecular view of hexagonal phase formation in phospholipid membranes. *Biophysical Journal*, 87, 3894–3900.

- 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: MGG*, 223, 205–210.
- Martínez-Laborda, A., Elías, M., Ruiz-Vázquez, R., & Murillo, F. J. (1986).** Insertions of Tn5 linked to mutations affecting carotenoid synthesis in *Myxococcus xanthus*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 205, 107–114.
- Martínez-Laborda, A., & Murillo, F. J. (1989).** Genic and allelic interactions in the carotenogenic response of *Myxococcus xanthus* to blue light. *Genetics*, 122, 481–490.
- Mascher, T. (2013).** Signaling diversity and evolution of extracytoplasmic function (ECF) σ factors. *Current Opinion in Microbiology*, 16, 148–155.
- Masloboeva, N., Reutimann, L., Stiefel, P., Follador, R., Leimer, N., Hennecke, H., ... Fischer, H. M. (2012).** Reactive oxygen species-inducible ECF σ factors of *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS ONE*, 7, e43421.
- 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.
- Michel, V., & Bakovic, M. (2007).** Lipid rafts in health and disease. *Biology of the Cell*, 99, 129–140.
- Mielich-Süss, B., Schneider, J., & López, D. (2013).** Overproduction of flotillin influences cell differentiation and shape in *Bacillus subtilis*. *MBio*, 4, e00719-13.
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in molecular genetics. En K. B. Low (Ed.), *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY* (pp. 352–355).
- Möglich, A., Yang, X., Ayers, R. A., & Moffat, K. (2010).** Structure and function of plant photoreceptors. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 21–47.
- Mohr, K. (2018).** Diversity of myxobacteria—We only see the tip of the iceberg. *Microorganisms*, 6, 84
- 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.

- Morand, O. H., Zoeller, R. A., & Raetz, C. R. H. (1988).** Disappearance of plasmalogens from membranes of animal cells subjected to photosensitized oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 11597–11606.
- Moreno, A. J., Fontes, M., & Murillo, F. J. (2001).** *ihfA* gene of the bacterium *Myxococcus xanthus* and its role in activation of carotenoid genes by blue light. *Journal of Bacteriology*, 183, 557–569.
- Morgan, P. E., Dean, R. T., & Davies, M. J. (2004).** Protective mechanisms against peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 484–496.
- Munné-Bosch, S., & Alegre, L. (2002).** The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21, 31–57.
- 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, 781.
- Mustacich, D., & Powis, G. (2000).** Thioredoxin reductase. *Biochemical Journal*, 346, 1–8.
- 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.
- Neumann-Giesen, C., Falkenbach, B., Beicht, P., Claasen, S., Lüers, G., Stuermer, C. A. O., ... Tikkanen, R. (2004).** Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochemical Journal*, 378, 509–518.
- Nikaido, H., & Takatsuka, Y. (2009).** Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794, 769–781.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998).** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249–279.

- Nuss, A. M., Glaeser, J., Berghoff, B. A., & Klug, G. (2010).** Overlapping alternative sigma factor regulons in the response to singlet oxygen in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, 192, 2613–2623.
- Nuss, A. M., Glaeser, J., & Klug, G. (2009).** RpoHII activates oxidative-stress defense systems and is controlled by RpoE in the singlet oxygen-dependent response in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, 191, 220–230.
- O'Connor, K. A., & Zusman, D. R. (1991).** Behavior of peripheral rods and their role in the life cycle of *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 173, 3342–3355.
- Oberg, T. S., Ward, R. E., Steele, J. L., & Broadbent, J. R. (2012).** Identification of plasmalogens in the cytoplasmic membrane of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 880–884.
- Ortiz-Guerrero, J. M., Polanco, M. C., Murillo, F. J., Padmanabhan, S., & Elías-Arnanz, M. (2011).** Light-dependent gene regulation by a coenzyme B₁₂-based photoreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108, 7565–7570.
- Owen, D. M., Rentero, C., Rossy, J., Magenau, A., Williamson, D., Rodriguez, M., & Gaus, K. (2010).** PALM imaging and cluster analysis of protein heterogeneity at the cell surface. *Journal of Biophotonics*, 3, 446–454.
- 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, 41566–41575.
- Padmanabhan, S., Jost, M., Drennan, C. L., & Elías-Arnanz, M. (2017).** A new facet of vitamin B₁₂: gene regulation by cobalamin-based photoreceptors. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 485–514.
- Padmanabhan, S., Pérez-Castaño, R., & Elías-Arnanz, M. (2019).** B₁₂-based photoreceptors: from structure and function to applications in optogenetics and synthetic biology. *Current Opinion in Structural Biology*, 57, 47–55.
- Page, M. J., & Di Cera, E. (2008).** Serine peptidases: classification, structure and

- function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 1220–1236.
- Paget, M. S. B. (2015).** Bacterial sigma factors and anti-sigma factors: structure, function and distribution. *Biomolecules*, 5, 1245–1265.
- Paget, M. S. B., Chamberlin, L., Atrih, A., Foster, S. J., & Buttner, M. J. (1999).** Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor σ^E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 181, 204–211.
- Paltauf, F., & Holasek, A. (1973).** Enzymatic synthesis of plasmalogens. Characterization of the 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine desaturase from mucosa of hamster small intestine. *The Journal of Biological Chemistry*, 248, 1609–1615.
- 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.
- Pérez-Marín, M. C., Padmanabhan, S., Polanco, M. C., Murillo, F. J., & Elías-Arnanz, M. (2008).** Vitamin B₁₂ partners the CarH repressor to downregulate a photoinducible promoter in *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 67, 804–819.
- Pfaffl, M. W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, e45.
- Pike, L. J., Han, X., Chung, K. N., & Gross, R. W. (2002).** Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. *Biochemistry*, 41, 2075–2088.
- Pinto, D., & Mascher, T. (2016).** The ECF classification: a phylogenetic reflection of the regulatory diversity in the extracytoplasmic function σ factor protein family. En F. J. Bruijn (Ed.), *Stress and environmental regulation of gene expression and adaptation in bacteria* (pp. 64–96).
- Pinto, D., & Mascher, T. (2019).** ECF σ factors with regulatory extensions: the one-component systems of the σ universe. *Molecular Microbiology*, 112, 399–409.

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

Ramel, F., Birtic, S., Cuiné, S., Triantaphylidès, C., Ravanat, J. L., & Havaux, M. (2012). Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. *Plant Physiology*, 158, 1267–1278.

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

Ring, M. W., Bode, E., Schwär, G., & Bode, H. B. (2009). Functional analysis of desaturases from the myxobacterium *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiology Letters*, 296, 124–130.

Ring, M. W., Schwär, G., Thiel, V., Dickschat, J. S., Kroppenstedt, R. M., Schulz, S., & Bode, H. B. (2006). Novel iso-branched ether lipids as specific markers of developmental sporulation in the myxobacterium *Myxococcus xanthus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 36691–36700.

Rivera-Milla, E., Stuermer, C. A. O., & Málaga-Trillo, E. (2006). Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: convergent evolution of the SPFH domain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 343–357.

Rodemer, C., Thai, T. P., Brugger, B., Kaercher, T., Werner, H., Nave, K. A., ... Just, W. W. (2003). Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice. *Human Molecular Genetics*, 12, 1881–1895.

Rosenberg, E., Keller, K. H., & Dworkin, M. (1977). Cell density-dependent growth of *Myxococcus xanthus* on casein. *Journal of Bacteriology*, 129, 770–777.

Ruiz-Vázquez, 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.

Ryter, S. W., & Tyrrell, R. M. (1998). Singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$): a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 24, 1520–1534.

- Saenkham, P., Utamapongchai, S., Vattanaviboon, P., & Mongkolsuk, S. (2008).** *Agrobacterium tumefaciens* iron superoxide dismutases have protective roles against singlet oxygen toxicity generated from illuminated Rose Bengal. *FEMS Microbiology Letters*, 289, 97–103.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual*. N. Y, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001).** *Molecular cloning: a laboratory manual*. N. Y, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schneider, C. (2005).** Chemistry and biology of vitamin E. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, 7–30.
- Schneider, J., Klein, T., Mielich-Süss, B., Koch, G., Franke, C., Kuipers, O. P., ... López, D. (2015).** Spatio-temporal remodeling of functional membrane microdomains organizes the signaling networks of a bacterium. *PLoS Genetics*, 11, e1005140.
- Schulte, T., Paschke, K. A., Laessing, U., Lottspeich, F., & Stuermer, C. A. O. (1997).** Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development*, 124, 577–587.
- Sedoud, A., López-Igual, R., Rehman, A. U., Wilson, A., Perreau, F., Boulay, C., ... Kirilovsky, D. (2014).** The cyanobacterial photoactive orange carotenoid protein is an excellent singlet oxygen quencher. *The Plant Cell*, 26, 1781–1791.
- Shah, M. B., & Sehgal, P. B. (2007).** Nondetergent isolation of rafts. En T. J. McIntosh (Ed.), *Methods in Molecular Biology* (pp. 21–28).
- Shanklin, J., Achim, C., Schmidt, H., Fox, B. G., & Münck, E. (1997).** Mössbauer studies of alkane ω -hydroxylase: evidence for a diiron cluster in an integral-membrane enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94, 2981–2986.
- Shimkets, L., & 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.
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997).** Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569–572.

- Simons, K., & Sampaio, J. L. (2011).** Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, a004697.
- Sineva, E., Savkina, M., & Ades, S. E. (2017).** Themes and variations in gene regulation by extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Current Opinion in Microbiology*, 36, 128–137.
- Singh, A. K., Elvitigala, T., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Aurora, R., Ghosh, B., & Pakrasi, H. B. (2008).** Integration of carbon and nitrogen metabolism with energy production is crucial to light acclimation in the cyanobacterium *Synechocystis*. *Plant Physiology*, 148, 467–478.
- Sliusarenko, O., Neu, J., Zusman, D. R., & Oster, G. (2006).** Accordion waves in *Myxococcus xanthus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 1534–1539.
- Smith, J. L. (2004).** The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 30, 173–185.
- Snyder, F., Blank, M. L., & Wykle, R. L. (1971).** The enzymic synthesis of ethanolamine plasmalogens. *The Journal of Biological Chemistry*, 246, 3639–3645.
- Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (2016).** Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 40, 133–159.
- Spector, A., Yan, G. Z., Huang, R. R. C., McDermott, M. J., Gascoyne, P. R. C., & Pigiet, V. (1988).** The effect of H₂O₂ upon thioredoxin-enriched lens epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 4984–4990.
- Spira, F., Mueller, N. S., Beck, G., von Olshausen, P., Beig, J., & Wedlich-Söldner, R. (2012).** Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nature Cell Biology*, 14, 640–648.
- Spröer, C., Reichenbach, H., & Stackebrandt, E. (1999).** The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1255–1262.
- Stadelmann-Ingrand, S., Favreliere, S., Fauconneau, B., Mauco, G., & Tallineau, C. (2001).** Plasmalogen degradation by oxidative stress: production and disappearance of specific fatty aldehydes and fatty α -hydroxyaldehydes. *Free*

Radical Biology and Medicine, 31, 1263–1271.

Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S. A., ... Hall, J. C. (1998). The *cry^b* mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*, 95, 681–692.

Stanley, C. P., Maghzal, G. J., Ayer, A., Talib, J., Giltrap, A. M., Shengule, S., ... Stocker, R. (2019). Singlet molecular oxygen regulates vascular tone and blood pressure in inflammation. *Nature*, 566, 548–552.

Staroń, A., Sofia, H. J., Dietrich, S., Ulrich, L. E., Liesegang, H., & Mascher, T. (2009). The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) σ factor protein family. *Molecular Microbiology*, 74, 557–581.

Stein, J., & Budzikiewicz, H. (1987). 1-O-(13-Methyl-1-Z-tetradecenyl)-2-O-(13-methyltetradecanoyl)-glycero-3-phosphoethanolamine, a plasmalogen from *Myxococcus stipitatus*. *Zeitschrift Fur Naturforschung B*, 42, 1017–1020.

Stockwell, S. B., Reutimann, L., & Guerinot, M. L. (2012). A role for *Bradyrhizobium japonicum* ECF16 sigma factor EcfS in the formation of a functional symbiosis with soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 119–128.

Sung, C. H., & Chuang, J. Z. (2010). The cell biology of vision. *Journal of Cell Biology*, 190, 953–963.

Tavernarakis, N., Driscoll, M., & Kyripides, N. C. (1999). The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 24, 425–427.

Thakur, K. G., Joshi, A. M., & Gopal, B. (2007). Structural and biophysical studies on two promoter recognition domains of the extra-cytoplasmic function σ factor σ^C from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 4711–4718.

Thede, G. L., Arthur, D. C., Edwards, R. A., Buelow, D. R., Wong, J. L., Raivio, T. L., & Glover, J. N. M. (2011). Structure of the periplasmic stress response protein CpxP. *Journal of Bacteriology*, 193, 2149–2157.

- Thomson, T. M., Lozano, J. J., Loukili, N., Carrió, R., Serras, F., Cormand, B., ... Guigó, R. (2000).** Fusion of the human gene for the polyubiquitination coeffectector UEV1 with *kua*, a newly identified gene. *Genome Research*, 10, 1743–1756.
- Thukkani, A. K., Hsu, F., Crowley, J. R., Wysolmerski, R. B., Albert, C. J., & Ford, D. A. (2002).** Reactive chlorinating species produced during neutrophil activation target tissue plasmalogens. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 3842–3849.
- Timmons, M. D., Knutson, B. L., Nokes, S. E., Strobel, H. J., & Lynn, B. C. (2009).** Analysis of composition and structure of *Clostridium thermocellum* membranes from wild-type and ethanol-adapted strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 929–939.
- Tournaire, C., Croux, S., Maurette, M. T., Beck, I., Hocquaux, M., Braun, A. M., & Oliveros, E. (1993).** Antioxidant quenching activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) quenching. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 19, 205–215.
- 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, 4350–4354.
- Triantaphylidès, C., & Havaux, M. (2009).** Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science*, 14, 219–228.
- Tripathi, L. P., & Sowdhamini, R. (2008).** Genome-wide survey of prokaryotic serine proteases: analysis of distribution and domain architectures of five serine protease families in prokaryotes. *BMC Genomics*, 9, 549.
- Ueki, T., & Inouye, S. (2003).** Identification of an activator protein required for the induction of *fruA*, a gene essential for fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100, 8782–8787.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. M. (2007).** Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35, W71–74.

- 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.
- Verhoeven, G. (2017).** The reflection of two fields – Electromagnetic radiation and its role in (aerial) imaging. *AARGNEWS*, 55, 13–18.
- Wakao, S., Chin, B. L., Ledford, H. K., Dent, R. M., Casero, D., Pellegrini, M., ... Niyogi, K. K. (2014).** Phosphoprotein SAK1 is a regulator of acclimation to singlet oxygen in *Chlamydomonas reinhardtii*. *eLIFE*, 3, e02286.
- Watschinger, K., & Werner, E. R. (2013).** Orphan enzymes in ether lipid metabolism. *Biochimie*, 95, 59–65.
- Wecke, T., Halang, P., Staroń, A., Dufour, Y. S., Donohue, T. J., & Mascher, T. (2012).** Extracytoplasmic function σ factors of the widely distributed group ECF41 contain a fused regulatory domain. *MicrobiologyOpen*, 1, 194–213.
- Wei, Z. H., Chen, H., Zhang, C., & Ye, B. C. (2014).** FRET-based system for probing protein-protein interactions between σ^R and RsrA from *Streptomyces coelicolor* in response to the redox environment. *PLoS ONE*, 9, e92330.
- Weissbach, H., Etienne, F., Hoshi, T., Heinemann, S. H., Lowther, W. T., Matthews, B., ... Brot, N. (2002).** Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397, 172–178.
- Whitfield, D. L., Sharma, G., Smaldone, G. T., & Singer, M. (2019).** Peripheral rods: a specialized developmental cell type in *Myxococcus xanthus*. *Genomics*, 112, 1588–1597.
- Wiltbank, L. B., & Kehoe, D. M. (2019).** Diverse light responses of cyanobacteria mediated by phytochrome superfamily photoreceptors. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 37–50.
- Wykle, R. L., Blank, M. L., Malone, B., & Snyder, F. (1972).** Evidence for a mixed function oxidase in the biosynthesis of ethanolamine plasmalogens from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine. *The Journal of Biological Chemistry*,

247, 5442–5447.

Yang, H., Inokuchi, H., & Adler, J. (1995). Phototaxis away from blue light by an *Escherichia coli* mutant accumulating protoporphyrin IX. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92, 7332–7336.

Yang, Z., & Higgs, P. I. (Eds.). (2014). *Myxobacteria. Genomics, cellular and molecular biology*. Norkfolk, UK: Caister Academic Press.

Zdanowski, K., Doughty, P., Jakimowicz, P., O'Hara, L., Buttner, M. J., Paget, M. S. B., & Kleanthous, C. (2006). Assignment of the zinc ligands in RsrA, a redox-sensing ZAS protein from *Streptomyces coelicolor*. *Biochemistry*, 45, 8294–8300.

Zeller, T., & Klug, G. (2006). Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *Naturwissenschaften*, 93, 259–266.

Zhao, F., Zhang, J., Liu, Y. S., Li, L., & He, Y. L. (2011). Research advances on flotillins. *Virology Journal*, 8, 479.

Zhao, Z., Peng, T., Oh, J. I., Glaeser, J., Weber, L., Li, Q., & Klug, G. (2019). A response regulator of the OmpR family is part of the regulatory network controlling the oxidative stress response of *Rhodobacter sphaeroides*. *Environmental Microbiology Reports*, 11, 118–128.

Ziegelhoffer, E. C., & Donohue, T. J. (2009). Bacterial responses to photo-oxidative stress. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 856–863.

Zoeller, R. A., Morand, O. H., & Raetz, C. R. H. (1988). A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 11590–11596.

Zoratti, L., Karppinen, K., Luengo-Escobar, A., Häggman, H., & Jaakola, L. (2014). Light-controlled flavonoid biosynthesis in fruits. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–16.

Zusman, D. R., Scott, A. E., Yang, Z., & Kirby, J. R. (2007). Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nature Reviews*

Microbiology, 5, 862–872.