



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

“Evaluación de la importancia del ritmo circadiano
en la regulación del proceso de división celular de
Anabaena sp. PCC7120”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de
los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Javiera Jiménez Ávila

Directora del Seminario de Título: Dra. Luz Mónica Vásquez

Profesor Patrocinante: Dr. Octavio Monasterio Opazo

Enero 2021



Santiago - Chile

INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Javiera Jiménez Ávila:

“Evaluación de la importancia del ritmo circadiano en la regulación del proceso de división celular de *Anabaena* sp. PCC7120”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Directora Seminario de Título: _____

Profesor Patrocinante: _____

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: _____

Evaluador: _____

Santiago de Chile,

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a la Dra. Mónica Vásquez y al Laboratorio de Ecología Microbiana y Toxicología Ambiental y al grupo de trabajo del Laboratorio de Ecología Microbiana de Sistemas Extremos, en particular a mi tutor Marcial Silva, y a Blanca, Derly, Sebastián y Jorge por los consejos, paciencia y las risas.

También a mi madre y mi familia, mis amigos de hace años y los nuevos, que me dieron las energías y el propósito.

Y a ti, que estás leyendo esto.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN	5
Cianobacterias: Diversidad morfológica e importancia ecológica.....	5
Diferenciación celular.	7
División celular	9
Ritmo circadiano.	11
Procesos circadianos.....	15
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
MATERIALES & MÉTODOS	20
Cultivos	20
Conjugación triparental	20
Medición de clorofila	21
Extracción de ADN de <i>Anabaena</i> sp. por Xantogenato	22
Análisis y segregación de las colonias mutantes.....	23
Microscopía y procesamiento de imágenes.....	24
Inmunofluorescencia	24
Ensayo de reducción de acetileno (ARA)	25
RESULTADOS.....	28
Generación, análisis y segregación de la mutante	28
Desarrollo de scripts para procesamiento de imágenes.....	31
Caracterización: Crecimiento y morfología	34
Caracterización: Localización anillo Z.....	37
Caracterización: Capacidad de diferenciar células.....	38

DISCUSIÓN	42
Crecimiento y morfología.....	42
Localización anillo Z.....	45
Capacidad de diferenciar células	47
CONCLUSIÓN.....	51
BIBLIOGRAFÍA	53
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del oscilador circadiano en cianobacterias.	13
Figura 2. Diseño experimental para ensayo de reducción de acetileno (ARA).	27
Figura 3. Esquema del clúster <i>kaiABC</i> y del <i>cassette</i> de resistencia.	29
Figura 4. Verificación de la segregación de la mutante Δ <i>kaiABC</i>	30
Figura 5. Procesamiento de imágenes por el script Conteo.	32
Figura 6. Procesamiento de imágenes por el script Heterocistos.	33
Figura 7. Tasa de crecimiento de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y mutante Δ <i>kaiABC</i> bajo distintas condiciones de luz y suplementación de nitrógeno.	34
Figura 8. Tamaño de células <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 en ausencia del clúster circadiano.	36
Figura 9. Largo de filamentos de <i>Anabaena</i> silvestre y mutante.	36
Figura 10. Inmunofluorescencia anti-FtsZ realizada en <i>Anabaena</i> silvestre y mutante.	37
Figura 11. Patrón alterado en la formación de heterocistos entre <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y la variedad mutante en condiciones de crecimiento diazotrófico.	38
Figura 12. Tamaño del intervalo entre heterocistos de <i>Anabaena</i> sp y mutante Δ <i>kaiABC</i>	39
Figura 13. Estimación de la fijación de nitrógeno de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y de la mutante carente de reloj circadiano (Δ <i>kaiABC</i>) en medio BG11 ₀ en distintas condiciones de luz.	41

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARA	<i>Acetylene Reduction Assay</i> , ensayo de reducción de acetileno
ATP	Adenosín Trifosfato
BG11	Medio <i>Blue-Green 11</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Albúmina de Suero Bovino
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
HK	Histidina Quinasa
Kb	Kilo base
LB	Medio <i>Luria-Bertani</i>
L/D	<i>Light-Dark</i> , luz - oscuridad
L/L	<i>Light-Light</i> , luz - luz
OD	<i>Optic Density</i> , Densidad óptica
ON	Oclusión del nucleoide
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , marco abierto de lectura
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reacción en Cadena de la Polimerasa

PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> , Amortiguador Fosfato Salino
PTO	<i>Post Translational Oscillator</i> , Oscilador post traduccional
ROI	<i>Region of Interest</i> , Región de Interés
rpm	Revoluciones por minuto
RR	<i>Response Regulator</i> , Regulador de respuesta
SDS	Dodecilsulfato Sódico
Sp	Espectinomicina
TTLF	<i>Transcription-Translation Feedback Loop</i> , Circuito de retroalimentación de transcripción- traducción
ZT	<i>Zeitgeber</i> , el que da el tiempo

RESUMEN

En cianobacterias unicelulares, se ha demostrado que el reloj circadiano influye en la temporalidad con que ocurren ciertos procesos celulares tales como la fotosíntesis, respiración celular, división celular, entre otros. Esta regulación requiere la presencia de un oscilador central KaiABC que controle el sistema junto con una serie de proteínas de detección de señal (vía de entrada) y transcripción de genes (vía de salida) que permiten finalmente predecir y anticipar cambios ambientales en la intensidad lumínica con el fin de optimizar la respuesta celular, adaptando la topología del cromosoma, transcriptoma, proteoma, metabolismo, entre otros.

Estudios en cianobacterias unicelulares han mostrado un control sobre la formación del anillo Z por el oscilador KaiABC, lo cual, finalmente, determina la temporalidad de la división al impedir que ocurra durante cierto periodo. Por otro lado, los estudios en cianobacterias multicelulares son limitados, aunque hasta ahora ha sido posible identificar genes que oscilan circadianamente, entre ellos algunos específicos para heterocistos. A pesar del progreso en entender los factores que orquestan la división celular en cianobacterias, las proteínas involucradas y cómo ocurre el ensamblaje y dinámica del proceso en cianobacterias multicelulares aún se encuentra en estudio. Mas aún, la relevancia fisiológica y metabólica de la presencia de un reloj circadiano funcional y su interacción con este proceso, es totalmente desconocido. Por ello, para poder evaluar los efectos del reloj circadiano en cianobacterias filamentosas se generó y caracterizó una mutante de *Anabaena* sp. PCC7120 (modelo de estudio de división celular) mediante la

delección del clúster *kaiABC* por recombinación homóloga a través del método de conjugación triparental.

La poliploidía característica de las cianobacterias hace que el proceso de obtención de una mutante completa (proceso de segregación) sea largo y complejo. Inesperadamente, durante la segregación de la mutante, se observó un fenotipo ramificado, característico de cianobacterias pertenecientes al orden Stigonematales. Al obtener el mutante completo, el fenotipo observado fue similar a la cepa silvestre, aunque las células presentan un área 54,2% mayor. El posicionamiento del anillo Z en la mutante es efectivo, ya que las divisiones ocurren de manera exitosa, a pesar de haberse observado algunas anomalías en su localización. La tasa de crecimiento de la variedad mutante es significativamente menor de acuerdo con una prueba de Tukey ($P < 0,0001$), sin embargo, mediante un ANOVA de tres vías al comparar todas las variantes, las principales fuentes de variación son el fotoperiodo y la suplementación de nitrógeno.

Por otro lado, la capacidad de diferenciar heterocistos estaba aún presente en la mutante $\Delta kaiABC$, aunque se ve afectado el patrón de diferenciación, lo cual sugiere un control subyacente de la diferenciación celular por el reloj circadiano. Además, la capacidad de fijar nitrógeno fue verificada mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA), lo que mostró que en la variedad mutante los heterocistos eran funcionales y fijaban en tasas similares a la variedad silvestre.

ABSTRACT

In unicellular cyanobacteria has been demonstrated that the circadian clock influences the timing of certain cellular processes such as photosynthesis, cellular respiration, and cellular division. This regulation requires the presence of the central oscillator KaiABC which controls the system –along with a series of proteins involved in signal detection (input) and gene transcription (output) that allows to predict and anticipate environmental changes in light intensity to optimize the cellular response, adapting, for example, the chromosome topology, transcriptome, proteome, and metabolism.

The studies on unicellular cyanobacteria have shown a control on Z-ring formation by the KaiABC oscillator, which determines the timing by gating of cell division. On the other hand, studies on multicellular cyanobacteria have been scarce, nonetheless, clock-controlled genes have been identified, some of which are specific to heterocyst. Despite progress in understanding the factors that orchestrate cellular division on cyanobacteria, the proteins that participate and how the process occurs in multicellular cyanobacteria are still unknown, and the functional clock's physiological and metabolic relevance has been underexplored. To evaluate the effects of the circadian clock in filamentous cyanobacteria, we generated and characterized a mutant of *Anabaena* sp. PCC7120 –a model species – by deletion of the *kaiABC* cluster through homologous recombination.

The polyploid characteristic of filamentous cyanobacteria makes the process of mutagenesis long and complex in order to obtain a fully segregated mutant. Unexpectedly, during the segregation of the *kaiABC* cluster deletion mutant, it was

observed a branched phenotype, characteristic of the Stigonematales order. When the segregation was complete the phenotype was morphologically similar to the wild type, although cell area increased by 54.2%. Z-ring placement results in successful divisions, despite having observed some abnormalities in its location. Mutant strain's growth rate was significantly smaller according to a Tukey test ($P < 0.0001$), however, a three-way ANOVA shows that the main source of variation are photoperiod and nitrogen supplementation.

The capacity to differentiate cells to heterocysts was still present in the $\Delta kaiABC$ mutant, although the patterning was somehow altered, which suggest an underlying control of cell differentiation by the circadian clock. The nitrogen fixation activity was verified with an Acetylene Reduction Assay (ARA), that showed functional heterocysts with fixation rates similar to its wild-type counterpart.

INTRODUCCIÓN

Cianobacterias: Diversidad morfológica e importancia ecológica.

Las cianobacterias son organismos fotótrofos, en su mayoría capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, desde los cuales evolucionaron los cloroplastos (Martin et al., 2002). Fueron las detonantes de el gran evento de oxigenación hace unos dos mil millones de años (Berman-Frank et al., 2003), lo cual, permitió la diversificación de la vida en la tierra, principalmente de algas y plantas terrestres, y también metazoos (Giovannoni et al., 1988). Se encuentran distribuidas en ambientes acuáticos, terrestres, o formando relaciones simbióticas con hongos y casi todos los grupos de plantas, lo que les permite crecer en lugares en las que, de otra forma, no podrían, ampliando aún más el espectro de ecosistemas que son capaces de habitar (Büdel, 2011; Sarma, 2013, Capítulo 7).

Las cianobacterias son importantes productoras de oxígeno, y algunas son también fijadoras de nitrógeno, capaces de adaptarse a lugares con alta radiación ultravioleta de tipo B y C y de utilizar H_2S como foto-reductor en vez de H_2O , haciéndolas particularmente capaces de habitar ambientes extremos y privados de nutrientes (Gaysina et al., 2019). También son capaces de orquestar y compaginar diferentes procesos metabólicos y bioenergéticos recurriendo a separaciones espaciales y temporales como estrategia de adaptación a diversos ambientes, por ejemplo, fijando nitrógeno durante la noche o en células especializadas llamadas heterocistos en ambientes privados de nitrógeno combinado (Gaysina et al., 2019).

La flexibilidad ecológica de las cianobacterias va de la mano con su plasticidad morfológica y heterogeneidad (Gaysina et al., 2019), lo cual ha permitido clasificarlas morfológicamente en cinco subsecciones. Las subsecciones I y II incluyen cianobacterias unicelulares, diferenciadas por el tipo de reproducción. Las correspondientes a la sección I se reproducen por fisión binaria o gemación, mientras que las que forman parte de la sección II lo hacen por fisión múltiple o una mezcla de fisión múltiple y binaria. Cabe destacar que la fisión múltiple no está acompañada de crecimiento celular, por lo que se producen numerosas células hijas pequeñas denominadas baeocitos, algunos de los cuales son capaces de deslizarse (*gliding*) antes de finalizar la producción de pared celular (Rippka et al., 1979).

Por otro lado, las subsecciones del III al V se consideran organismos multicelulares y corresponden a cianobacterias filamentosas. Pueden reproducirse por rupturas del filamento, formación de hormogonios, o, en algunas integrantes de las secciones IV y V, por germinación de acinetes. Las cianobacterias pertenecientes a la sección III sólo son capaces de dividirse en un plano y sus filamentos presentan únicamente células vegetativas, mientras que las cianobacterias que forman parte de las secciones IV y V son capaces de diferenciar células (heterocistos y/o acinetes). Las cianobacterias de la sección V son las únicas que presentan ramificaciones verdaderas, es decir, división en múltiples planos.

Sólo las subsecciones IV y V en conjunto forman un grupo monofilético (Herrero et al., 2016) y análisis filogenéticos indican que todas las cianobacterias con heterocistos –Nostocales y Stigonematales (secciones IV y V de Rippka et al., 1979) – provienen de

un ancestro en común (Gugger & Hoffmann, 2004), y que la multicelularidad es una característica evolutivamente temprana, sin embargo, morfologías similares se han perdido y ganado a lo largo de la evolución. Estos antecedentes evidencian la futilidad de organizar morfológicamente a las cianobacterias, por lo que la taxonomía moderna ha abordado la clasificación de las cianobacterias con enfoques moleculares y morfológicos.

Diferenciación celular.

Las cianobacterias pertenecientes a los órdenes Nostocales y Stigonematales, presentan procesos de diferenciación celular desde células vegetativas hacia células especializadas, las cuales son, probablemente, evidencia de procesos evolutivos de adaptación a variables ambientales (Sukenik et al., 2019), como los heterocistos para la fijación de nitrógeno, los acinetos durante los periodos de latencia o los hormogonios para reproducción (Maldener et al., 2014).

Dentro del orden Nostocales se encuentra *Anabaena* sp. PCC 7120 (de ahora en adelante, *Anabaena* sp.), actualmente es el principal modelo de estudio de división celular en bacterias del tipo multicelular. *Anabaena* sp. presenta un único plano de división y es capaz de diferenciar células vegetativas a heterocistos, especializados en la fijación de nitrógeno atmosférico en ausencia de una fuente de nitrógeno, pero no presenta hormogonios ni acinetes (Christman et al., 2011).

Los heterocistos surgieron como respuesta a la incompatibilidad entre los procesos de fotosíntesis, que produce oxígeno, y la fijación de nitrógeno, que requiere un ambiente anóxico o micro-óxico para el correcto funcionamiento de la enzima nitrogenasa, además

de proteger del oxígeno presente en la atmósfera (Flores & Herrero, 2010). La compartimentalización de este proceso permite que la fijación de nitrógeno pueda ocurrir de día, incluso mientras la fotosíntesis está activa, ya que la fijación de nitrógeno es un proceso que requiere bastante energía debido al alto costo de romper el triple enlace del nitrógeno ambiental (Sohm et al., 2011). Para la mantención del ambiente micro-óxico los heterocistos poseen una envoltura de exopolisacáridos (HEP) y glicolípidos (HGL) (Cardemil & Wolk, 1979) que evita la permeabilización del oxígeno atmosférico, además de disminuir la superficie de contacto con las células vecinas mediante la formación de un “cuello”, lo cual también disminuye la cantidad de canales de intercambio molecular en la interfase heterocisto – célula vegetativa (Flores et al., 2006; Giddings & Staehelin, 1978). En este cuello además, se forma un tapón de cianoficina, que sirven de reserva de nitrógeno (Sarma, 2013, Capítulo 4). Metabólicamente, los heterocistos son fotoheterótrofos, produciendo ATP gracias al fotosistema I y poder reductor mediante la vía oxidativa de las pentosas fosfato (Summers et al., 1995; Wolk et al., 1994).

La respuesta a la deficiencia de nitrógeno ambiental es un proceso finamente regulado, en el cual numerosos genes controlan de manera positiva y negativa la formación de heterocistos en el filamento. El factor de transcripción global frente a la falta de nitrógeno es NtcA y la otra proteína de respuesta temprana es HetR. La inducción de ambas ocurre de manera mutuamente dependiente en células separadas espacialmente de manera regular (Flores & Herrero, 2010) y desencadenan una cascada de señalización y que controla numerosas proteínas involucradas en la diferenciación. Para evitar la formación de heterocistos consecutivos, la célula que está diferenciándose produce un

péptido señal de inhibición (PatS) que inhibe la diferenciación de las células colindantes, y PatA, que inhibe la acción de PatS en el pre-heterocisto (Orozco et al., 2006).

Los genes *nif* de fijación de nitrógeno se expresan en los heterocistos durante su desarrollo tardío (Kumar et al., 2010), la nitrogenasa está codificada por el operón *nifHDK*, y la proteína presenta un átomo de molibdeno en su estructura, aunque algunas cianobacterias presentan una nitrogenasa alternativa con vanadio como cofactor (Pratte et al., 2006). La fijación de nitrógeno es el proceso de reducción de nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_3), el nitrógeno fijado se usa posteriormente para la biosíntesis de compuestos orgánicos como proteínas y ácidos nucleicos.

División celular

En *Anabaena* sp., la división celular se cree que ocurre por fisión binaria, es decir, a partir de una célula madre se obtienen dos células hijas idénticas. Esto requiere la coordinación de diversos procesos como la elongación de la pared celular, duplicación y segregación del genoma y finalmente la formación del septo. El complejo de proteínas que lleva a cabo estos procesos y regula su temporalidad se denomina divisoma. Antecedentes muestran que en realidad las células hijas no son idénticas durante el proceso de división (Mandakovic et al., 2016).

Los componentes de divisoma cianobacteriano difieren a los modelos clásicos de división celular de bacterias gran positivas (*Bacillus subtilis*) y negativas (*Escherichia coli*), presentando componentes comunes a ambos (Koksharova & Babykin, 2011; Miyagishima et al., 2005) además de algunos exclusivos de cianobacterias (Koksharova

& Wolk, 2002a, 2002b; Mazouni et al., 2004). La mayoría de los estudios en cianobacterias se han desarrollado en cianobacterias unicelulares, sin embargo, no han sido suficientes para dilucidar por completo el divisoma cianobacteriano.

La base del divisoma es FtsZ, una proteína altamente conservada homóloga a la tubulina (Löwe & Amos, 1998). Ésta se localiza de manera temprana al medio de la célula en el futuro sitio de septación, formando un anillo denominado anillo Z, el cual actúa como andamio para el resto de las proteínas involucradas (den Blaauwen et al., 2017). Es importante coordinar de manera adecuada los distintos estadios de división, además de tener en cuenta la elongación de la pared, llevada a cabo por el elongosoma, y la segregación de los cromosomas. Experimentos en *Anabaena* sp. PCC 7120 (Sakr et al., 2006) comprobaron que la división es necesaria para la diferenciación celular, al tratarla con un inhibidor de la actividad GTPasa de FtsZ y también con un inhibidor de FtsI, proteína involucrada en la síntesis de peptidoglicano en el septo. Los mismos investigadores observaron que, a pesar de elongarse, estas células no eran capaces de completar la división y al crecer en ambientes privados de nitrógeno, no diferenciaban células a heterocistos.

El correcto posicionamiento del anillo es controlado mediante el sistema Min y el de oclusión del nucleoide (ON) (Egan & Vollmer, 2013). El sistema Min en *E. coli* consiste en tres proteínas: MinC inhibe la polimerización de FtsZ, mientras que MinD y MinE ayudan a mantener un gradiente de concentración de MinC, haciendo que este se concentre en los polos y permitiendo así que sólo ocurra una correcta formación del anillo en la zona central de la célula, equidistante a los extremos (Monahan et al., 2014). Por

otro lado, el sistema de oclusión del nucleoide impide la formación del anillo en regiones de la célula ocupadas por el cromosoma, por lo que la división ocurrirá una vez elongada la célula y segregados los cromosomas. En *B. subtilis* esto es controlado por la proteína Noc, mientras que en *E. coli* se encuentra SlmA (Barák & Wilkinson, 2007). En *Anabaena* sp. PCC 7120 se han encontrado las tres proteínas mencionadas del sistema Min (Kaneko et al., 2001), pero no se tienen antecedentes de proteínas similares a Noc o SlmA (Flores & Herrero, 2014, Capítulo 2).

Ritmo circadiano.

Los ritmos circadianos son procesos que tienen una oscilación cercana a las 24 horas y requieren de un reloj circadiano central como elemento de control primario. Los ritmos son endógenos, pero pueden ser influenciados por el ambiente, es decir, pueden adaptarse a ritmos externos (son “entrenables”). Para ser considerados realmente circadianos éstos deben ser capaces de permanecer aún sin la señal externa, por ejemplo, en oscuridad o luz constante (Golden & Canales, 2003). Este sistema le permite a los organismos adaptarse y prever los cambios cíclicos de luz-oscuridad ambientales, lo que les otorgaría una ventaja adaptativa frente a otros organismos en ambientes periódicos que se asemejen a su propia periodicidad interna (Sharma, 2003).

El reloj circadiano logra mantener su periodicidad mediante procesos bioquímicos que establecen su oscilación cercana a 24 horas (Swan et al., 2018), y esta información cronológica es luego transmitida mediante vías específicas de señalización a través del organismo, donde afecta la fisiología y el metabolismo, entre otros procesos. Los procesos bioquímicos que determinan el tiempo han sido clasificados en ciclos de retroalimentación

entre transcripción y traducción (TTFLs por sus siglas en inglés) y osciladores post traduccionales (PTOs por sus siglas en inglés) (Hurley et al., 2016), aunque ambos forman parte del oscilador bioquímico de varios relojes circadianos. En el primer caso, la oscilación se observa cuando un producto génico reprime su propia expresión una vez que esta alcanza cierto nivel, lo que lleva a una oscilación de los niveles de expresión del gen. Por otro lado, los PTOs son controlados por modificaciones post traduccionales, cambios conformacionales, interacción proteína – proteína y/o localización subcelular (Swan et al., 2018).

En cianobacterias, el reloj circadiano está formado por un PTO y un TTFL (Johnson et al., 2011). El PTO está formado por tres proteínas, KaiA, KaiB y KaiC, y puede ser reconstruido *in vitro* de manera autosuficiente con las tres proteínas purificadas más ATP (Nakajima et al., 2005). *In vivo*, el PTO funciona dentro del marco de un TTFL, es decir, la expresión circadiana de las proteínas del reloj resulta en un ritmo más robusto (Hosokawa et al., 2013; Kitayama et al., 2008).

Como se puede ver resumido en la figura 1, el núcleo del reloj circadiano de cianobacterias es KaiC, una proteína hexamérica con dos dominios (CI y CII), que presenta actividad auto quinasa, auto fosfatasa, y ATPasa, y exhibe una oscilación en la fosforilación de los residuos Ser431 y Thr432 (Wishiwaki et al., 2004) gracias a la acción opuesta de KaiA y KaiB. KaiA se une al dominio CII y estimula la autofosforilación de KaiC en los sitios antes mencionados (Iwasaki et al., 2002), lo cual conlleva un cambio conformacional que deja expuestos sitios de interacción con KaiB. KaiB se une al dominio CI de KaiC fosforilado y KaiA es secuestrado por el complejo KaiBC, por lo que es

inactivado y, en su ausencia, los sitios de fosforilación del dominio CII son desfosforilados (Chang et al., 2015; Tseng et al., 2017). La desfosforilación altera la afinidad de KaiC por KaiB, por lo que cuando la fosforilación se encuentra al mínimo, KaiB y KaiA son liberados y este último puede ir, nuevamente, a unirse al dominio CII y estimular la fosforilación (Kageyama et al., 2006). La energía necesaria para mantener las oscilaciones

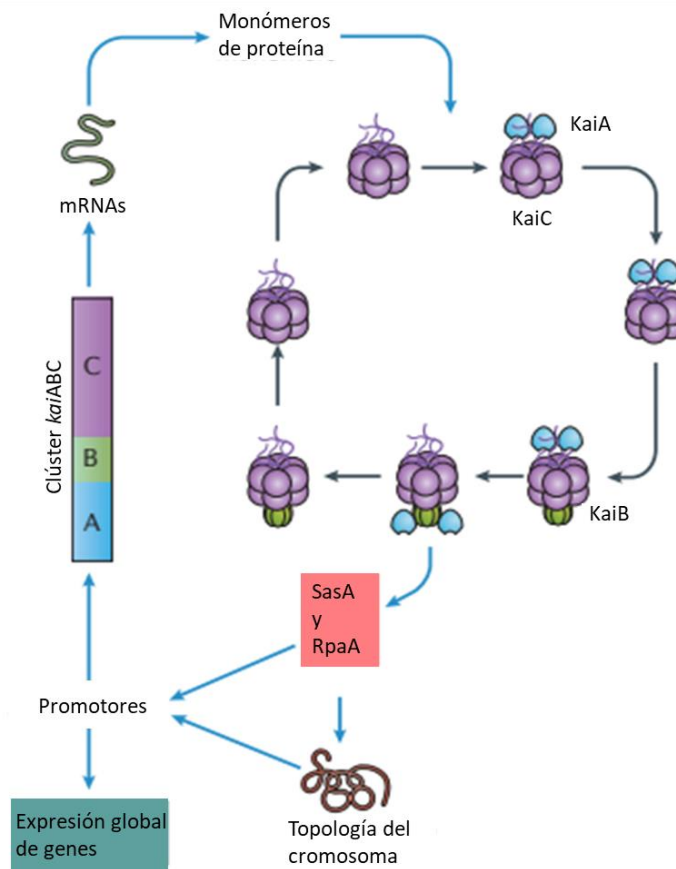


Figura 1. Esquema del oscilador circadiano en cianobacterias. El oscilador post traduccional KaiABC funciona dentro del marco de un ciclo de retroalimentación entre transcripción y traducción. La interacción entre KaiC y KaiA favorece la actividad autoquinasa de KaiC y permite la unión de KaiB, el cual secuestra a KaiA produciendo la desfosforilación de KaiC y una disminución de la afinidad con KaiB. SasA compete con KaiB por el sitio de interacción con KaiC, mediando la actividad de intermediarios como RpaA, que influyen la topología del cromosoma al influir en la expresión de diversos genes, entre ellos, el clúster circadiano *kaiABC*. Modificado de Johnson 2017.

es obtenida a través de la actividad ATPasa de KaiC (Terauchi et al., 2007), la cual también, de acuerdo con investigaciones recientes, es la reacción limitante responsable de la longitud del periodo circadiano (Abe et al., 2015; Terauchi et al., 2007).

La vía de señalización río abajo en la regulación circadiana ocurre mediante un sistema regulador de dos componentes (Takai et al., 2006), formado en este caso por dos histidina quininas (HK, por sus siglas en inglés) y un regulador de respuesta (RR) (Swan et al., 2018). RpaA es un RR maestro que, cuando es activado, controla la transcripción de un sitio que codifica para otros factores de transcripción que afectan genes que se encuentran bajo la influencia del ritmo circadiano, incluyendo KaiB y KaiC (Markson et al., 2013). RpaA es regulado a su vez por SasA y CikA, dos HKs. SasA compete por el sitio de unión de KaiB en el dominio CI de KaiC fosforilado, pero su unión a este sitio ocurre más velozmente, lo cual, de acuerdo con algunos investigadores, podría proveer de un control sobre la ventana temporal en la que puede actuar la señalización de SasA (Swan et al., 2018), ya que esto hace oscilar la disponibilidad de SasA y por extensión, la expresión de sus genes blanco.

Una vez que SasA se ha unido a KaiC fosforilado, esta se auto fosforila, fosforilando – y activando, – luego a RpaA. Este efecto es revertido por CikA, que actúa como fosfatasa sobre RpaA (Gutu & O’Shea, 2013), pero también tiene un rol sobre el entrenamiento del reloj junto con KaiA, las cuales detectan la luz indirectamente mediante la detección del estado redox de las plastoquinonas, un cofactor cuyo estado de oxidación varía de acuerdo con la actividad fotosintética (Shultzaberger et al., 2015). Cuando las quinonas están oxidadas, producen la agregación de KaiA, lo cual disminuye su

disponibilidad y reduce la eficiencia de fosforilación de KaiC (Wood et al., 2010). Toda esta intrincada red, que no ha sido completamente dilucidada, evidencia la fina regulación necesaria para orquestar y mantener el ritmo circadiano y comunicarlo efectivamente a la célula, y, en caso de organismos multicelulares como *Anabaena* sp., al conjunto de éstas.

Procesos circadianos.

Estudios en *Synechococcus elongatus* mediante RNA-seq, dan cuenta de la influencia de RpaA en la expresión de la mayoría de los genes del genoma (de producción y conservación de energía, metabolismo de aminoácidos, carbohidratos y lípidos, transcripción, ciclo celular, entre otros), al observarse una pérdida de la ritmicidad en mutantes *rpaA-null* (Markson et al., 2013), aunque aún no se sabe con certeza si estos resultados se deben a la acción directa de RpaA o de otros factores de transcripción como intermediarios.

De los datos obtenidos en Markson et al. (2013), se observa que los genes regulados negativamente en el mutante *rpaA-null* están enriquecidos en transcripciones que presentan un aumento al anochecer, mientras que los genes regulados positivamente están altamente enriquecidos en transcripciones que alcanzan su auge al amanecer. Lo cual respalda la hipótesis de que la regulación mediada por RpaA puede ser positiva o negativa (Shultzaberger et al., 2015). Se han realizado experimentos similares en otras cianobacterias que presentan resultados similares (Zinser et al., 2009), sin embargo, aún no se tiene claro el alcance total de RpaA u otros factores de transcripción que actúan de manera circadiana.

En el estudio de Markson et al. (2013) se clasificaron en grupos funcionales los genes identificados como circadianos, encontrándose diversos genes encargados de la transcripción (como *rpaA*); reloj circadiano (*kaiB*, *kaiC*, *sasA*); metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y lípidos; replicación, recombinación y reparación del ADN, biogénesis de la membrana y pared celular y del ciclo celular (*ftsZ*, *sepF*), entre otros (Markson et al., 2013). Estos indicios ayudan a esclarecer la cantidad de procesos que son influenciados por el ritmo circadiano, y dan luz sobre las ventajas que podría presentar para un organismo poseer un ritmo robusto, por ejemplo en cianobacterias unicelulares, la fijación de nitrógeno está separada temporalmente de la actividad fotosintética (Johnson et al., 1998), lo cual indica un control circadiano sobre este proceso, optimizando así la adquisición de nutrientes al no poseer estructuras especializadas capaces de realizar el proceso de fijación de manera paralela, como *Anabaena* sp..

Otro proceso fundamental que se ve influenciado por el reloj circadiano es la división celular. Estudios en *S. elongatus* mostraron que una alta actividad ATPasa de KaiC impide la división celular al evitar la formación del anillo Z, uno de los primeros pasos de la división celular y que actúa como andamio para el resto de la maquinaria de división. Esto junto el estudio de Markson et al. (2013), el cual muestra que genes encargados de biosíntesis de pared y membrana celular junto con genes de replicación y reparación del ADN presentan un patrón de expresión circadiana, dan indicios de cómo podría ser la influencia del ritmo circadiano sobre la división. A pesar de que estudios han demostrado la independencia del ritmo circadiano y la división celular en cianobacterias (Mori & Johnson, 2001), es posible concluir que, a pesar de no ser “necesario” el reloj

circadiano para la división, este puede de todas maneras influir en su temporalidad (Dong et al., 2010).

La mayoría de los estudios sobre ritmo circadiano en cianobacterias han sido realizados en variedades unicelulares, mientras que la influencia del reloj circadiano sobre las cianobacterias filamentosas se encuentra en ciernes. El genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 se encuentra totalmente secuenciado (Kaneko et al., 2001), y se han encontrado los componentes principales del reloj circadiano, como *kaiA*, *kaiB*, *kaiC*, *sasA*, *cikA*, entre otros, lo que respalda la existencia del reloj en este organismo. Se ha identificado también la presencia de genes que oscilan de manera circadiana en *Anabaena* sp., en particular relacionados con la diferenciación y funcionamiento de heterocistos (Kushige et al., 2013).

Mediante estudios de genómica comparativa se han identificado 32 genes compartidos entre las cianobacterias filamentosas de las cuales se posee el genoma secuenciado, lo que finalmente se redujo a 10 genes como candidatos al mínimo necesario para producir un fenotipo filamentosos (Stucken et al., 2010). De estos 10 genes, tres están relacionados con la diferenciación a heterocistos y siete son proteínas hipotéticas, sin embargo, recientemente se caracterizó una de ellas y se denominó CyDiv por *Cyanobacterial Division* (Mandakovic et al., 2016). La interrupción parcial de este gen resulta en un fenotipo alterado de división celular, produciéndose una deslocalización del septo de división.

En resumen, estos antecedentes son una clara indicación de que *Anabaena* sp. PCC 7120 posee un reloj circadiano activo, por lo que se le considera un organismo de estudio

modelo. Uno de los obstáculos de adentrarse en el estudio circadiano en cianobacterias filamentosas, radica en la dificultad de conocer el estado circadiano del filamento, el cual probablemente, a pesar de estar expuesto a una señal ambiental constante, presente células desincronizadas. Debido a que gran parte de la bibliografía relacionada con división celular y ritmo circadiano ha sido desarrollada en cianobacterias unicelulares, es necesario también contar con los nuevos factores al considerar las bacterias filamentosas, en particular la presencia de distintos genes y procesos, que son nuevas piezas sobre las cuales la maquinaria de control circadiano puede influir y de las cuales aún no se conoce a cabalidad la extensión de su influencia y relación.

HIPÓTESIS

La ausencia del clúster *kaiABC* genera desregulación de los procesos de división y diferenciación celular en *Anabaena* sp PCC. 7120.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la expresión del clúster *kaiABC* regula la división celular y cómo se relaciona con el proceso de diferenciación en *Anabaena* sp. PCC7120.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar la mutante $\Delta kaiABC$ de *Anabaena* sp. PCC7120 mediante conjugación triparental y segregar la mutación.
2. Caracterizar el efecto de dicha mutación en el proceso de división celular (crecimiento, división y formación del anillo Z).
3. Evaluar la importancia del clúster *kaiABC* en la diferenciación celular y en su proceso de fijación de nitrógeno en ausencia de nitrógeno combinado.

MATERIALES & MÉTODOS

Cultivos

Cultivos de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de la variedad mutante fueron mantenidos en matraces de vidrio en medio BG11, en condiciones de luz constante (L/L) o ciclos de luz/oscuridad 12h/12h (L/D) a una temperatura cercana a los 25 °C. Para crecimiento diazotrófico, es decir, en medio sin nitrógeno, los cultivos en fase exponencial son lavados por lo menos tres veces mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos con BG11₀ para eliminar la presencia de trazas de nitrógeno combinado, para luego ser mantenidas en BG11₀ en las condiciones de luz y temperatura correspondientes.

Conjugación triparental

La construcción para realizar el reemplazo del clúster *kaiABC* por un *cassette* de resistencia fue provista por gentileza del Dr. Hideo Iwasaki (Universidad de Waseda, Tokio, Japón). Para verificar la presencia del constructo en el plásmido piL204 (plásmido *carrier*), se digirió con la enzima de restricción *Bgl*III (Thermo Fisher) de acuerdo con el siguiente protocolo: Para un volumen final de 20 µL se utilizó 16 µL de agua sin nucleasas, 2 µL de tampón O 10x, 1 µL *Bgl*III y 1 µL de plásmido, y se dejó digiriendo durante toda la noche a 37 °C, para luego verificar la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa 1%.

El método de conjugación triparental fue modificado por C. Trigo a partir del trabajo de Elhai & Wolk, (1988). Esta consiste en la transferencia de un plásmido *carrier* desde una cepa bacteriana (cepa *helper*) a otra (cepa receptora) con ayuda de una cepa

intermediaria que posee un plásmido conjugativo (cepa conjugativa). El vector *carrier*, en este caso, pIL204, se utilizó para transformar una cepa *helper* (*E. coli* HB101pRL623), la cual contiene un plásmido de metilación y un sitio *mob* de movilización. Luego ésta es conjugada con la cepa conjugativa (*E. coli* HB101pRL433) que contiene un plásmido de conjugación que posee genes para la síntesis del pili, maquinaria de transferencia, etc. La conjugación debe ocurrir con ambas cepas en estado exponencial de crecimiento, por lo que estas se crecieron a 37 °C por 1,5 horas a 80 rpm. Se centrifugaron los cultivos (~1 mL) a 3000 rpm por 10 minutos, tres veces. Se resuspendió en 200 µL de medio LB, se agregó la cepa transformada sobre la cepa conjugativa con suavidad y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. El volumen de cultivo de *Anabaena* sp. debe corresponder a 10 µg de clorofila y debe ser previamente lavado. Se vertió sobre la conjugación de las cepas de *E. coli* y se distribuyó cuidadosa y homogéneamente sobre un filtro de éster-celulosa de 0,45 µm (Merck™) en una placa de BG11 Agar 5% LB. La placa se dejó en luz tenue durante 1-2 horas y luego 24 horas en luz constante a 25°C. Los días siguientes, se cambió el filtro a una placa de BG11 Agar y luego a BG11 Agar suplementada con espectinomicina a 50 µg/mL (Sp50). El filtro se fue cambiando de placa cada 2 o 3 días hasta que aparecieron colonias.

Medición de clorofila

Para la medición de clorofila se tomaron 100 µL de cultivo de *Anabaena* sp. y se agregó 900 µL de metanol más cuentas de vidrio de 425–600 µm de diámetro. Se incubó a 65°C durante 15 minutos y se lisó por rompimiento mecánico utilizando el equipo

TyssueLyser II por 3 minutos con una frecuencia de 30 s^{-1} . El lisado se dejó 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, y luego se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos. Se tomó el sobrenadante ($\sim 1 \text{ mL}$) y se determinó la absorbancia a 665 nm y 649 nm en un espectrofotómetro. Finalmente, se determinó la concentración de clorofila en $\mu\text{g/mL}$ de acuerdo con la siguiente fórmula (Lichtenthaler & Wellburn, 1983):

$$[Chl_a] = (13,95 \cdot A_{665} - 6,88 \cdot A_{649}) \cdot 10$$

Extracción de ADN de *Anabaena* sp. por Xantogenato

Para la extracción de ADN genómico de la variedad silvestre y mutante de *Anabaena* sp., se añadieron 500 μL de amortiguador X (1% etilxantogenato de potasio, 0,8 M de acetato de amonio, 0,1 M de Tris-HCl y 0,02 M de EDTA) a 500 μL de cultivo en fase exponencial. Luego, se agregaron cuentas de vidrio de 425–600 μm y se lisó mecánicamente en el equipo TyssueLyser II, tres veces por 2 minutos a 30 s^{-1} , dejándolo en hielo por 2 minutos entre cada sesión. Posteriormente, se añadieron 50 μL de SDS al 10% y se dejó incubando el lisado a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora, agitando los tubos suavemente cada 15 min. Pasado este tiempo, se dejó incubando en hielo durante 30 minutos y se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm. El sobrenadante se dejó en un tubo de 1,5 mL, se añadieron 500 μL de una mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (proporción 25:24:1) y luego se homogeneizó la muestra para centrifugarla a 13000 rpm por 10 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Luego, se transfirió la fase acuosa (sobrenadante) a un tubo nuevo y se le añadieron 750 μL de una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1). Se

homogeneizaron nuevamente las muestras y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores. Se extrajo la fase acuosa y se mezcló con un volumen de isopropanol más 1/10 de volumen de acetato de sodio 10M en un tubo nuevo. Las muestras fueron dejadas a -20 °C durante toda la noche. Al día siguiente, la solución incubada se centrifugó a 13000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, dejando secar el tubo sobre una toalla de papel absorbente bajo campana y se resuspendió el ADN en 30 µL de agua calidad PCR. Finalmente, se guardó a -20 °C hasta su uso.

Análisis y segregación de las colonias mutantes

Las colonias obtenidas por conjugación triparental se inocularon en BG11 líquido y, luego de obtener biomasa suficiente, se cambiaron a medio BG11 líquido suplementado con Sp50. Se sonicaron las colonias hasta obtener filamentos cortos o células individuales, y se sembró en placas con BG11 agar suplementado con Sp50 y 5% de sacarosa, la cual resulta letal para las células que presenten el plásmido, pero no hayan pasado por la recombinación homóloga y, por lo tanto, no hayan insertado en su genoma el segmento con el marcador de selección.

Para determinar el grado de segregación de las colonias crecidas en sacarosa, luego de cultivarlas individualmente para aumentar su biomasa, se realizó una amplificación por PCR utilizando los partidores GCTACTAGTGCAGTATTACGCAC (Fw) y GTGTTGTCCTTTCACCGCATC (Rv) diseñados por M. Silva, con los cuales se

obtienen productos diferenciales que indican presencia del clúster *kaiABC* silvestre (2700 bp) y/o el reemplazo por el *cassette* de resistencia a espectinomicina (1501 bp).

Microscopía y procesamiento de imágenes

Todas las fotografías fueron adquiridas en un microscopio Nikon Eclipse Ti2-E invertido, con una cámara CMOS ORCA-Flash 4.0 V3 Hamamatsu C13440, utilizando luz diascópica y/o episcópica a no ser que se indique lo contrario.

Las imágenes fueron procesadas en el software ImageJ, utilizando un algoritmo desarrollado en el lenguaje propio de programa (ImageJ Macro Language). Para automatizar el conteo de células y la determinación del área se utilizó el script de Conteo (Anexo, Script 1), mientras que para la diferenciación entre células vegetativas y heterocistos se desarrolló otro algoritmo, script Heterocistos (Anexo, Script 2). Entre los plugin utilizados para desarrollarlos se encuentran BioFormats (Linkert et al., 2010) y StackFocuser (Umorin, 2011). La secuencia de pasos de procesamiento de imagen necesarios para automatizar el conteo de células y la distinción entre células vegetativas y heterocistos se detallan en las imágenes 5 y 6. El detalle de los códigos se encuentra en el Material Suplementario.

Inmunofluorescencia

Se utilizaron la cepa mutante obtenida y la variedad silvestre para realizar las comparaciones. El protocolo es una modificación del especificado en *Protein Localization in the Cyanobacterium Anabaena sp. PCC7120 Using Immunofluorescence* (Trigo et al.,

2016), utilizando anticuerpos primarios anti-FtsZ y anti-CyDiv (Mandakovic et al., 2016). El anticuerpo primario fue mandado a hacer a GenScript por D. Andrade.

Se agregaron 50 μL de muestra en estado exponencial concentrado a un portaobjetos recubierto de poli-lisina y se dejó secar durante 10 minutos a 55 °C. Las células se fijaron en etanol frío 70% a -20 °C durante 30 minutos y luego se dejó secar a temperatura ambiente durante unos 20 min. Se dibujó un círculo alrededor de la gota seca con un lápiz hidrófobo Pap Pen. Una vez seco el trazado del lápiz, las células se permeabilizaron 4 veces con una gota (80 – 100 μL) de DMSO 0,2% y Triton X-100 0,02% en PBS (tampón de lavado) por 2 minutos en agitación. Se incubó con una gota de 3% BSA y Triton X-100 0,2% en PBS durante una hora a 4°C en una cámara de humedad, luego de lo cual se incubó con el anticuerpo primario diluido 1:100 en una solución de BSA 1% y Tween-20 0,05% en PBS por 2 horas a 4°C en una cámara de humedad. Transcurrido el tiempo se lavó nuevamente cuatro veces con tampón de lavado en agitación y se incubó con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 *goat anti-rabbit IgG* diluido 1:500 por 1 hora a 4° en la cámara de humedad. Finalmente, se volvió a lavar 4 veces en agitación con el tampón de lavado y se agregó una gota de Prolong Gold (~15 μL), se cubrió con un cubreobjetos cuidando de no dejar burbujas y se selló con barniz de uñas al día siguiente.

Ensayo de reducción de acetileno (ARA)

La estimación de la actividad nitrogenasa se realizó de acuerdo con el método especificado en Hardy et al., (1968). El reloj circadiano de cultivos de las variedades mutante y silvestre en BG11₀ se reajustó con 36 horas de oscuridad y se entrenó durante

tres días con ciclos L/D 12:12. Para la toma de muestras, los cultivos fueron homogeneizados y alicuotados (4 mL) en viales de vidrio de 10 mL sellados de manera hermética. Con una jeringa, se extrajo 1 mL de aire y luego se inyectó 1 mL de acetileno generado en una pipa plástica con una válvula de extracción de gases, en la cual se agregaron piedras de carburo (CaC_2) y agua para generar el gas (C_2H_2). Los viales se incubaron durante 3 horas en agitación a 50 rpm, en las condiciones de luz y temperatura del cultivo original, y luego se tomaron muestras de 4 mL de la fase gaseosa, las cuales fueron almacenadas en un Vacutainer® de 5 mL (BD, USA) a 4°C hasta ser enviadas a analizar en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-8^a (Shimadzu, Japón).

En la figura 2.A se muestra el diseño experimental para el ensayo de reducción de acetileno. La toma de muestras fue realizada cada 6 horas, por triplicado para cada cepa (silvestre y mutante) en condiciones de luz constante (L/L) y L/D 12:12, durante tres días consecutivos. De manera adicional, se midió la densidad óptica (OD_{750}) y la cantidad de clorofila *a* en cada punto tomado. El día circadiano fue ajustado para comenzar a las 7:00 horas. Para evitar la toma de muestras durante la noche, las cepas fueron sincronizadas de manera desfasada para que la mitad estuviese en noche circadiana durante el día (Figura 4.B), por lo que, por ejemplo, los puntos ZT0 y ZT12 fueron tomados a las 7:00 horas, mientras que los puntos ZT6 y ZT18 a las 13:00 horas. Se tomó un punto adicional (ZT72) a las 19:00 horas el último día.

El acrónimo ZT viene de *zeitgeber*, “el que da el tiempo”; en el contexto circadiano, la luz es el principal *zeitgeber*, por lo que el tiempo en horas se denomina ZT.

En estas condiciones (L/D 12:12), ZT0 corresponde al inicio del ciclo de luz y ZT12 al término (Sharma & Chandrashekar, 2005).

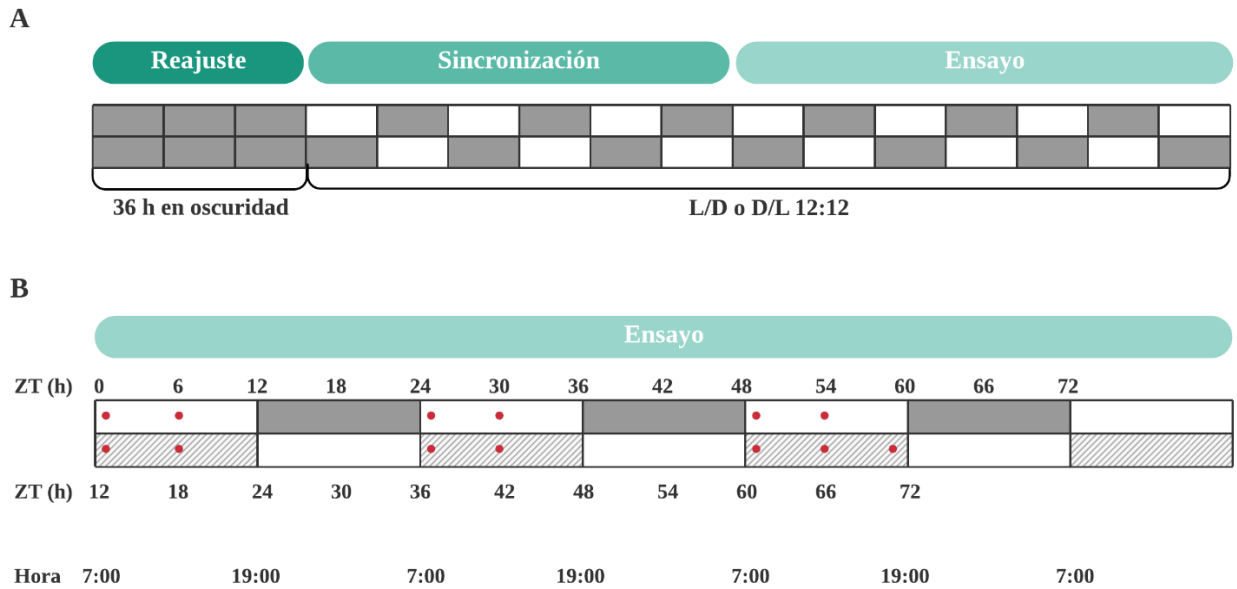


Figura 2. Diseño experimental para ensayo de reducción de acetileno (ARA). **A.** Se muestra el esquema del ensayo y su preparación, indicando la duración y el ciclo de luz y/u oscuridad utilizado. **B.** Detalle de la toma de muestras (puntos) durante el ensayo. Estas fueron tomadas cada 6 horas durante tres días consecutivos. Se indica el tiempo circadiano (ZT) y el tiempo real. La mitad de los cultivos se sincronizó desfasadamente para que estuviesen 12 horas adelantados y posibilitar la toma de muestras a la misma hora efectiva.

RESULTADOS

Generación, análisis y segregación de la mutante

La construcción para realizar el reemplazo del clúster *kaiABC* por un *cassette* de resistencia fue provista por el Dr. Hideo Iwasaki. Una vez verificada la integridad del plásmido mediante digestión con una enzima de restricción, se realizó la conjugación triparental sobre *Anabaena* sp. PCC 7120, con lo cual se obtuvieron colonias resistentes a espectinomicina.

Luego de aumentar la biomasa de las colonias mutantes, se procedió con la evaluación del correcto reemplazo (doble recombinación) del clúster circadiano por la resistencia a espectinomicina (Sp^R). El plásmido cargo utilizado, pIL204, está basado en el plásmido pRL271, el cual incluye el gen *sacB* es su esqueleto. Este gen codifica para la enzima levansacarasa, la cual, en presencia de sacarosa, resulta letal para las colonias que hayan integrado el vector pIL204 mediante recombinación simple o que lo mantengan sin integración (Cai & Wolk, 1990). Teniendo este antecedente en consideración, las colonias mutantes fueron plaqueadas en BG11 agar 5% sacarosa suplementado con antibiótico (Sp50). Una vez que aparecieron colonias, estas se crecieron en multiplacas con BG11 líquido (Sp50) para hacer más presión selectiva.

La poliploidía de esta cianobacteria filamentosa (Hu et al., 2007) hace el proceso de mutagénesis bastante largo en orden de obtener una mutante completamente segregada, por lo que luego de la evaluación por sacarosa, las colonias obtenidas fueron sometidas a varias rondas de sonicación y/o replaqueo para obtener cultivos monoclonales, y promover

la generación de filamentos desde células que estuviesen con la mayor cantidad posible de cromosomas con el reemplazo génico.

Para verificar la segregación de la mutación, se extrajo ADN desde un cultivo de la variedad mutante y se realizó una PCR con partidores específicos que producen bandas diferenciales, e indican presencia o ausencia del clúster *kaiABC* silvestre (2700 bp) y/o el reemplazo por el *cassette* de resistencia a espectinomicina (1501 bp) como se ve en la figura 3. En la figura 4, se puede ver el gel de electroforesis de la reacción mencionada, en el cual se aprecia una banda única en la variedad mutante (primer carril), que se corresponde con la banda observada en el carril control (segundo carril) y es significativamente diferente a la banda que se ve en el carril de la variedad silvestre (tercer carril). Todas las bandas obtenidas son únicas en la reacción y presentan el tamaño esperado.

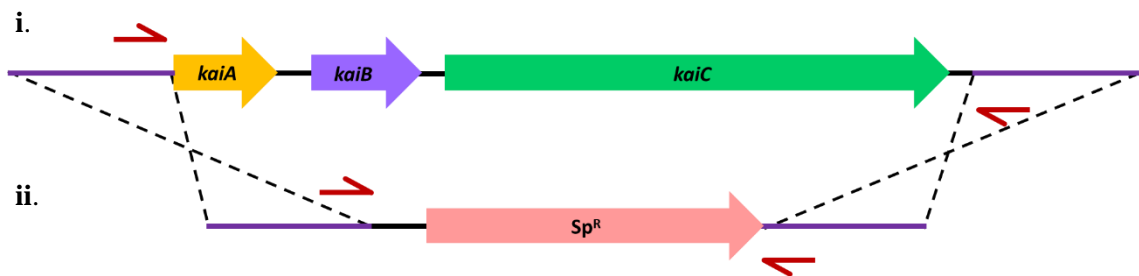


Figura 3. Esquema del clúster *kaiABC* y del *cassette* de resistencia. Comparación entre (i) el clúster genómico *kaiABC* y (ii) el marcador de selección (resistencia a espectinomicina). Flechas indican la ubicación de los partidores utilizados para verificar la segregación y las líneas punteadas indican los sitios de recombinación homóloga. Los tamaños esperados del amplificado para la variedad silvestre es 2700 nt. y 1501 nt. para la resistencia.

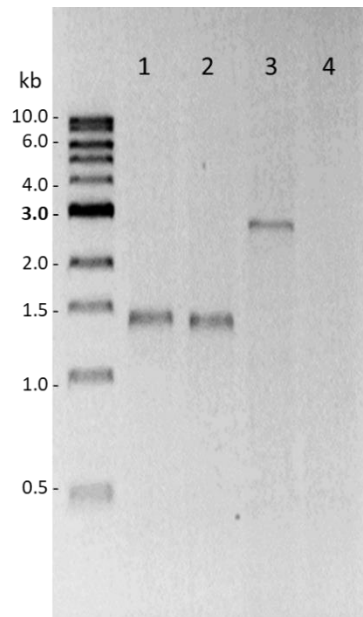


Figura 4. Verificación de la segregación de la mutante $\Delta k ai ABC$. Electroforesis en gel de agarosa 1% de la PCR diseñada para verificar la segregación de la mutación. Columnas corresponden a (1) $\Delta k ai ABC$, (2) pIL205 como control positivo, (3) cepa silvestre y (4) control negativo.

Inesperadamente, durante la segregación de la mutación, se observó que la morfología de los filamentos no era como la de la variedad silvestre, sino que presentaba ramificaciones, características del orden Stigonematales. Una vez completa la segregación el fenotipo observado fue similar al de la cepa silvestre.

Para verificar que la segregación fue efectiva y no ocurrieron mutaciones puntuales, se amplificó la zona correspondiente a la inserción de la resistencia a espectinomicina en la variedad mutante y se envió a secuenciar. Una vez confirmada la ausencia de mutaciones puntuales y la completa delección del clúster circadiano silvestre, se decidió disminuir la concentración de antibiótico utilizada de 50 $\mu g/mL$ (Sp50) a 10

$\mu\text{g/mL}$ (Sp10), teniendo en cuenta que valores muy altos pueden conllevar alteraciones al fenotipo y una disminución en la tasa de crecimiento.

Desarrollo de scripts para procesamiento de imágenes

Para estimar la cantidad de células por filamento se utilizaron imágenes obtenidas por el script Conteo (Figura 5) que presentan el contorno de cada célula, y se contó de manera manual.

Por otro lado, para la identificación y cuantificación de heterocistos utilizando el script Heterocistos (Figura 6), se compara la intensidad registrada para un mismo ROI en ambos canales. Si este presenta una alta intensidad en el canal de campo claro, pero no en el de autofluorescencia, es posible que se trate de un heterocisto. El umbral de intensidad fue determinado de manera empírica al revisar una muestra de las fotos obtenidas e identificar los heterocistos manualmente.

Actualmente se está trabajando en la implementación de un paso previo al tratamiento de las imágenes, que permitirá separar el filamento del fondo y borrar todo lo que sea contaminación y artefactos visuales, facilitando el reconocimiento del filamento por el script. Además, se quiere lograr que estos scripts puedan eventualmente determinar la cantidad de células por filamento y el patrón de heterocistos.

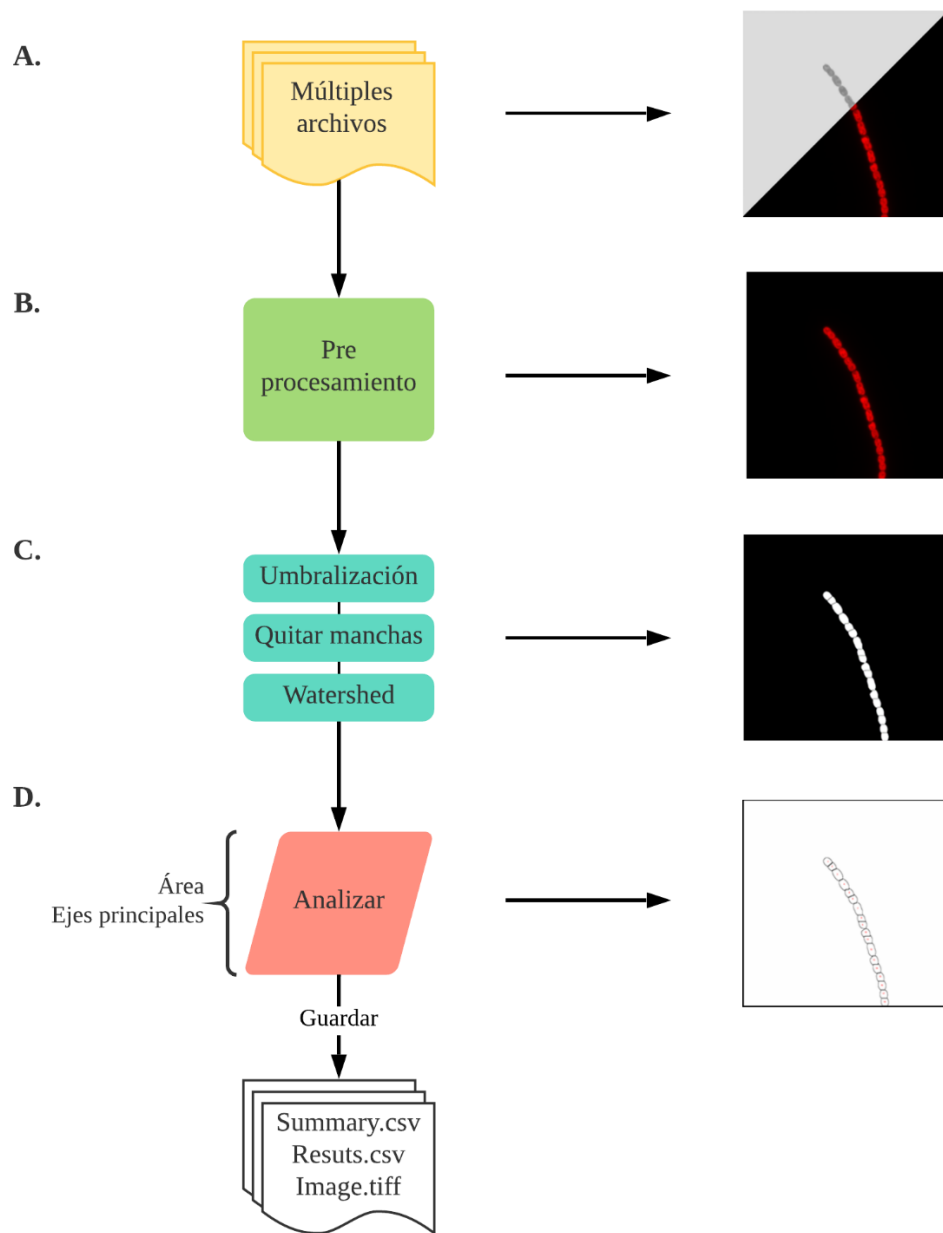


Figura 5. Procesamiento de imágenes por el script Conteo. **A.** Las imágenes son abiertas desde una carpeta origen y reconocidas por su extensión (.nd2 en este caso). Estas pueden haber sido obtenidas en más de un canal y/o en más de un plano (Z-Stack). **B.** De acuerdo sea el caso, se realiza una selección del canal de autofluorescencia, y si es necesario, una selección de las zonas enfocadas para obtener una imagen única. **C.** Esta imagen es convertida en una máscara binaria de acuerdo con un umbral definido automáticamente, y luego pasa por un proceso de limpieza de ruido y posterior división en células discretas. **D.** Para cada célula se determina el área y la elipse que más se ajusta a su forma, de la cual se obtiene el largo y ancho de cada célula. Todos los datos son guardados en un archivo en una carpeta destino junto con la imagen final. Las carpetas de origen y destino, junto con la extensión de las imágenes a procesar, son indicadas manualmente al iniciar el plugin.

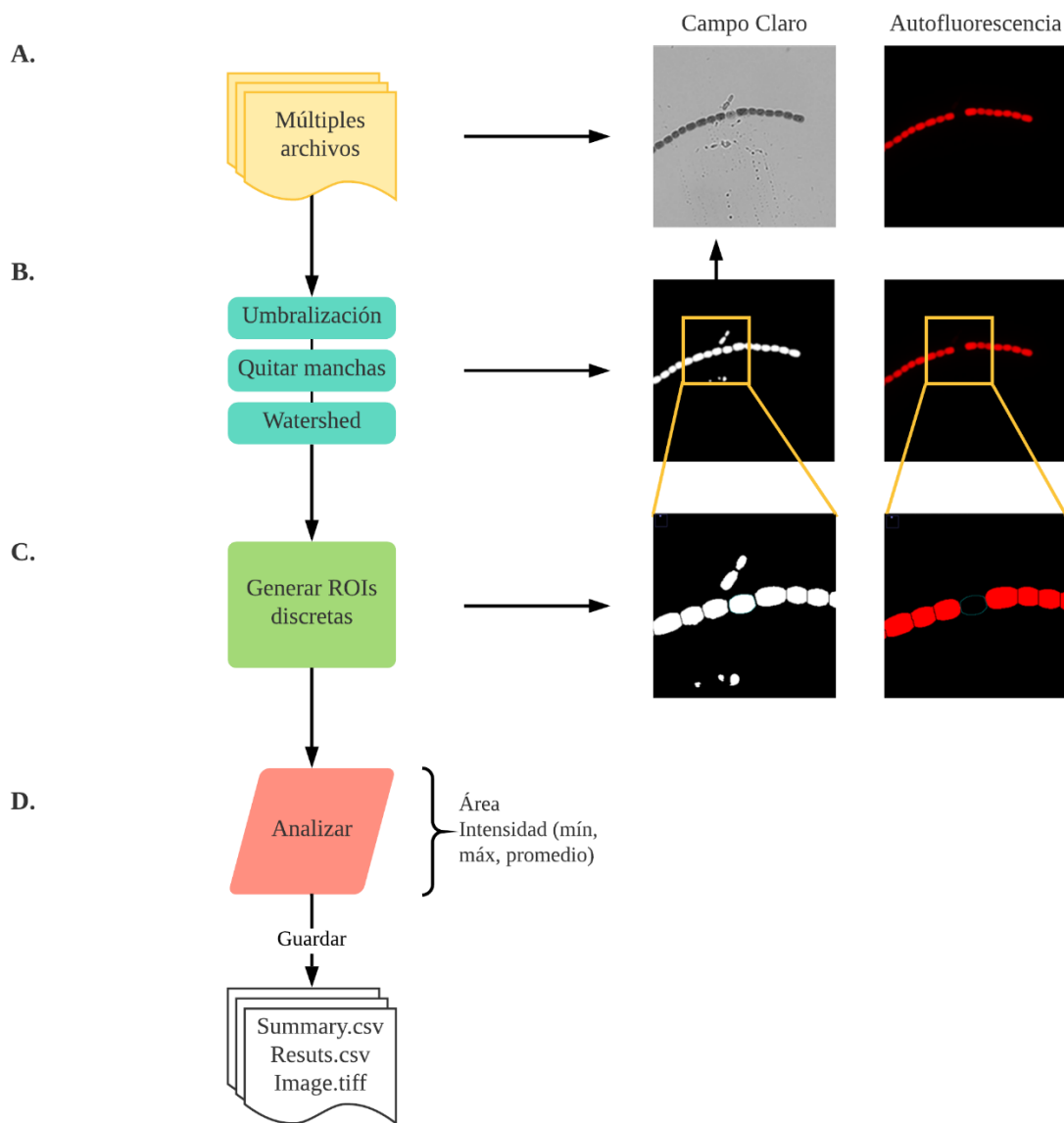


Figura 6. Procesamiento de imágenes por el script Heterocistos. **A.** Las imágenes son abiertas desde una carpeta origen y reconocidas por su extensión (.nd2 en este caso). Estas deben haber sido obtenidas en dos canales (campo claro y autofluorescencia) y pueden tener más de un plano (Z-Stack). **B.** Si es necesario, se realiza una selección de las zonas enfocadas para obtener una imagen única de cada canal y luego se procesan de manera independiente. La imagen es convertida en una máscara binaria de acuerdo con un umbral definido automáticamente, y luego pasa por un proceso de limpieza de ruido y posterior división en células discretas. **C.** En el canal de campo claro se generan ROIs discretas para cada célula. **D.** Para cada ROI (en ambos canales) se determina el área y la intensidad (mínimo, máximo, promedio). Todos los datos son guardados en un archivo de texto en una carpeta destino junto con la imagen final. Las carpetas de origen y destino, junto con la extensión de las imágenes a procesar, son indicadas manualmente al iniciar el plugin.

Caracterización: Crecimiento y morfología

Para evaluar el efecto de la delección del reloj circadiano sobre el fenotipo y considerando el antecedente de una regulación circadiana de la división celular, se realizó una curva de crecimiento. Antes de realizarla, la mutante y la cepa silvestre fueron reajustadas con 36 horas de oscuridad y entrenadas por tres días en ciclos luz-oscuridad L/D 12:12 antes de ser mantenidas en luz constante o luz-oscuridad. Los cultivos para la curva de crecimiento fueron crecidos en BG11 o BG11₀ (N(-)) líquidos.

La tasa de crecimiento fue estimada como la pendiente de una regresión lineal de los valores de absorbancia a 750 nm, los cuales fueron medidos con tres réplicas biológicas, cada una de las cuales contaba además con tres réplicas técnicas, cada tres

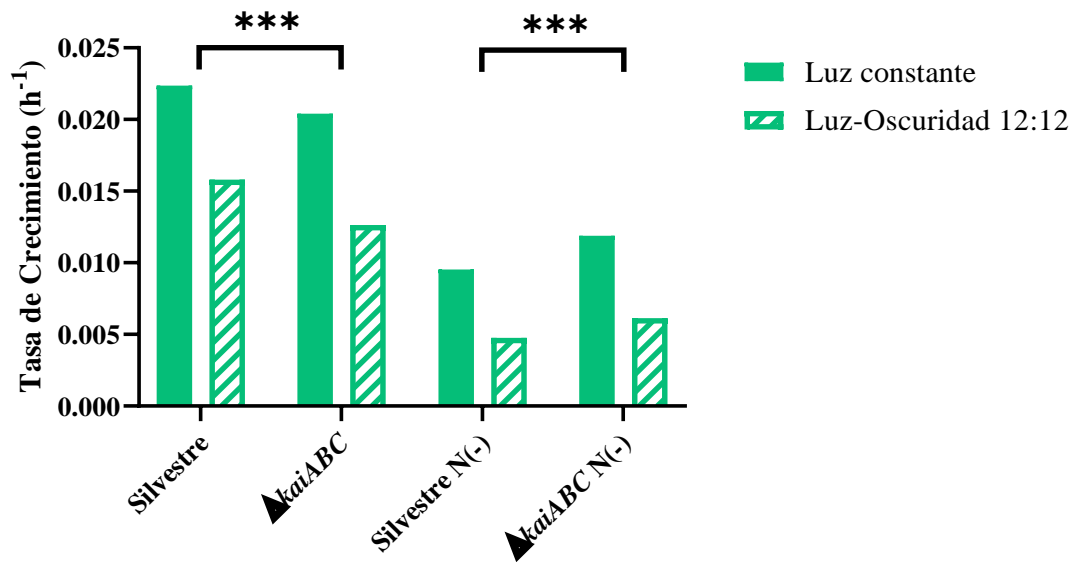


Figura 7. Tasa de crecimiento de *Anabaena* sp. PCC 7120 y mutante Δ *kaiABC* bajo distintas condiciones de luz y suplementación de nitrógeno. La tasa de crecimiento fue estimada durante la fase temprana del crecimiento exponencial. Las cepas fueron crecidas en luz constante (color sólido) o ciclo de luz-oscuridad 12:12 (achurado) luego de reajustar y sincronizar el reloj. Los cultivos fueron mantenidos en medio BG11 o BG11₀ (N(-)). Múltiples comparaciones mediante una prueba de Tukey muestran que, bajo las mismas condiciones de luz y nitrógeno, las cepas silvestre y mutante muestran una diferencia significativa en la tasa de crecimiento ($P < 0,0001$).

horas durante tres días desde la inoculación de los cultivos, los promedios se agruparon en la figura 7.

Los resultados de un análisis ANOVA de tres vías indican que la principal fuente de variación en la tasa de crecimiento proviene desde la presencia o ausencia de nitrógeno (67.28%, $P < 0,0001$), mientras que la cepa solo otorga un 0,088% de variación ($P = 0,0025$). Sin embargo, múltiples comparaciones mediante una prueba de Tukey evidencian que, bajo las mismas condiciones de luz y nitrógeno, ambas cepas presentan una diferencia significativa en la tasa de crecimiento ($P < 0,0001$). Tanto la variedad silvestre como la mutante presentan una mayor tasa de crecimiento cuando son crecidas bajo luz constante y en medio suplementado con nitrógeno combinado, siendo el ciclo de luz y la presencia de nitrógeno las fuentes de variación que afectan más significativamente el crecimiento de ambas variedades ($P < 0,0001$).

Por otro lado, la morfología de las células es, a simple vista, similar a la de la variedad silvestre, y, una vez completada la segregación y mantenida en condiciones normales, no se observó el fenotipo ramificado. Los análisis morfológicos fueron realizados utilizando el software ImageJ, utilizando el script desarrollado que permite la automatización del conteo y determinación del área. Se observó que, en promedio, las células de la variedad mutante tienen un área promedio de $22,96 \pm 0,0922 \mu\text{m}^2$, lo cual, en comparación con la variedad silvestre, que posee un área promedio de $14,89 \pm 0,1297 \mu\text{m}^2$, es significativamente distinto ($P < 0,0001$) (células mutantes son un 54,20% más grandes) (Figura 8). La variación en la cantidad de células por filamento entre ambas cepas no es significativa de acuerdo con una prueba Mann-Whitney ($P = 0,9266$), presentando

ambas una distribución similar como se puede ver en la figura 9. La variedad silvestre presenta un 39,3% de filamentos con 15 o más células, mientras que en la mutante hay un 37,2%. Al considerar 30 o más células, los porcentajes son 11% y 9,7% respectivamente.

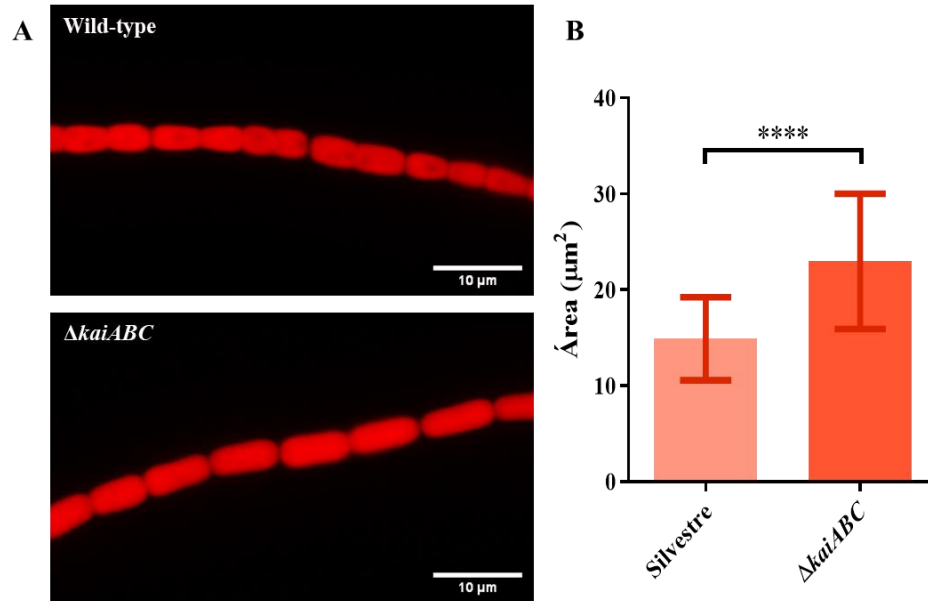


Figura 8. Tamaño de células *Anabaena* sp. PCC 7120 en ausencia del clúster circadiano. A. Microfotografías de autofluorescencia de las variedades mutante y silvestre, escala 10 μm . **B.** El área fue estimada utilizando ImageJ. **** = $P < 0,0001$ de acuerdo con una prueba Mann-Whitney.

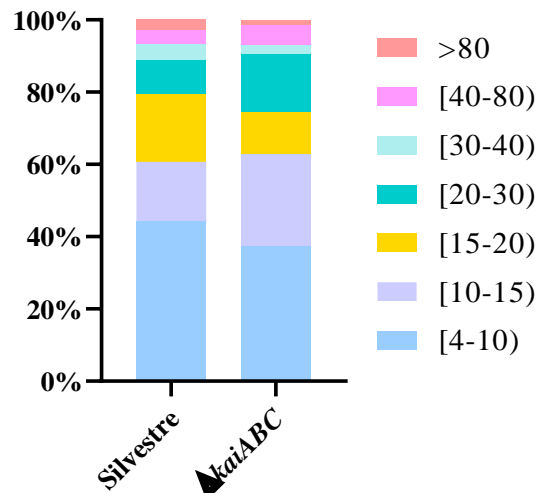


Figura 9. Frecuencia del largo de filamentos de *Anabaena* sp. silvestre y mutante. Se contaron 145 filamentos para cada cepa. El tamaño está en células por filamento. A la derecha el color para cada intervalo. Las columnas muestran el porcentaje acumulado.

Caracterización: Localización anillo Z

Un indicador de que la división está ocurriendo donde corresponde es la ubicación del anillo Z en el medio de la célula, equidistante a ambos extremos y perpendicular al eje del filamento. Si el anillo está deslocalizado, puede producir fenotipos aberrantes como ramificaciones o células de tamaño fuera del común para la especie. Para observar la posición del anillo Z se realizaron inmunofluorescencias contra FtsZ las cuales fueron observadas mediante microscopía de epifluorescencia en un microscopio Nikon Ti2-E invertido con una cámara CMOS ORCA-Flash 4.0 V3 Hamamatsu. Como se puede ver en la figura 10, en la variedad silvestre se aprecian anillos (cabezas de flecha) paralelos entre sí a lo largo del filamento, ubicados en el ecuador celular y de ancho variable, lo que indica que estos se encuentran en distintos estados de la división (Figura 10.i, ii). Por otro lado, en las microfotografías obtenidas de la variedad mutante, a pesar de observar anillos perpendiculares al filamento (Figura 10.iv), también se distinguen anillos deslocalizados, es decir, fuera del lugar que les corresponde (Figura 10.iii).

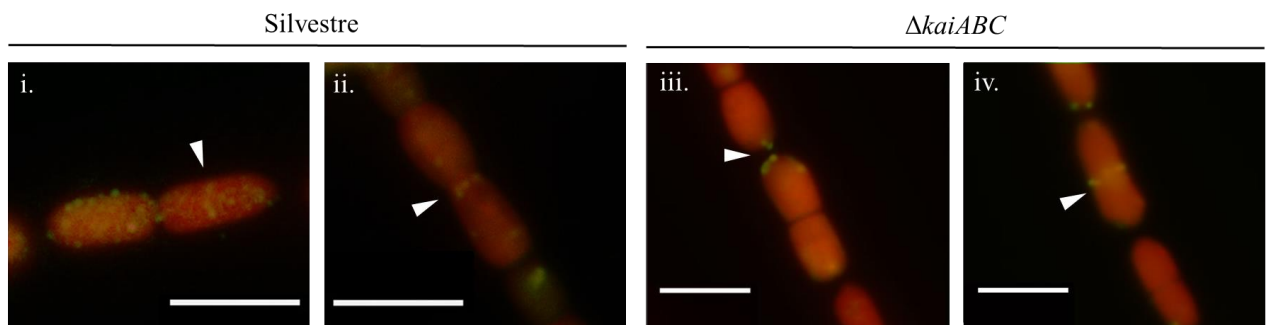


Figura 10. Inmunofluorescencia anti-FtsZ realizada en *Anabaena* sp. silvestre y mutante. Microscopías de epifluorescencia que muestra en rojo la autofluorescencia de los pigmentos fotosintéticos y en verde la localización de FtsZ marcada por inmunofluorescencia indirecta. Se muestran acercamientos indicando la presencia del anillo Z en *Anabaena* sp. silvestre (i, ii) y en la mutante $\Delta kaiABC$ (iii, iv). Las cabezas de flecha indican la localización del anillo, escala 5 μm

Caracterización: Capacidad de diferenciar células

Al crecer en ausencia de nitrógeno combinado (medio BG11₀) la variedad mutante no pierde la capacidad de diferenciar terminalmente células a heterocistos, sin embargo, se observaron algunos eventos en que la mutante presenta un patrón alterado de diferenciación, sin heterocistos a intervalos regulares como se puede ver en la figura 11. Estas microfotografías fueron adquiridas utilizando un microscopio Nikon Optiphot-2.

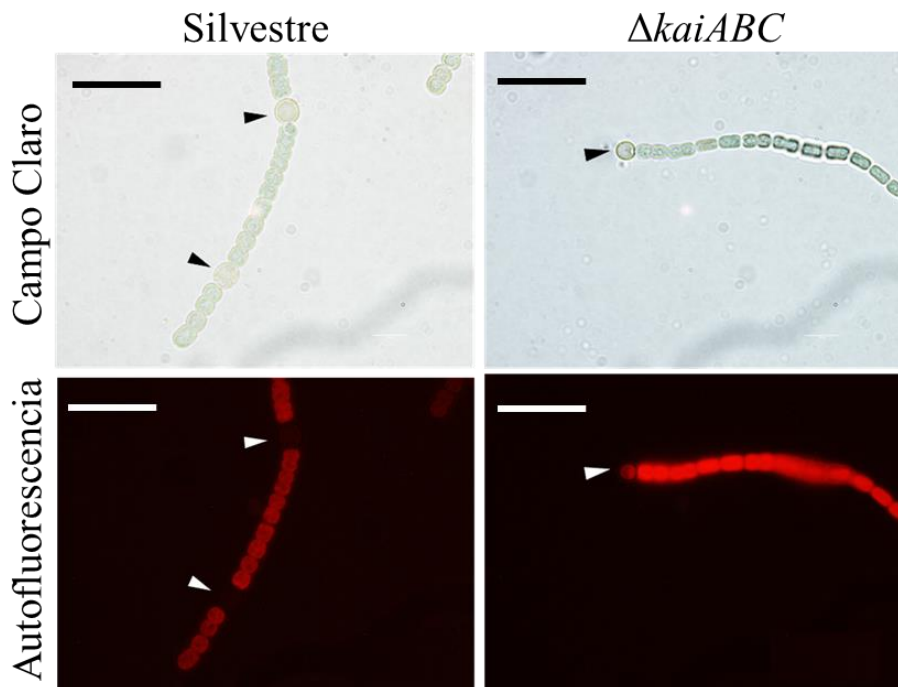


Figura 11. Patrón alterado en la formación de heterocistos entre *Anabaena* sp. PCC 7120 y la variedad mutante en condiciones de crecimiento diazotrófico. Microfotografías en campo claro y auto fluorescencia de las variedades silvestre y mutante de *Anabaena* sp., crecidas en condiciones de L/D 12:12 en medio BG11₀. Cabezas de flecha indican la presencia de heterocistos. Barra de escala 25 μm .

Una determinación cuantitativa utilizando el script Heterocistos y conteo manual para microfotografías en sólo campo claro, indicó que, de la población total de células, los heterocistos representan un 5,9% en la variedad silvestre y un 4,7% en la mutante. Esto se

determinó contando más de mil células para cada variedad y calculando la razón entre células vegetativas y heterocistos. También se observó que los filamentos de la variedad mutante eran, en promedio, un 39,73% más cortos que los filamentos observados en la variedad silvestre. El largo de los intervalos ente heterocistos se compara en la figura 12, que muestra la distribución del largo de éstos. La variedad silvestre presenta una distribución normal con la mayoría de los intervalos de un largo entre 11 y 20 células, mientras que la variedad mutante concentra el largo entre 1 y 10 células, con mayor cantidad de intervalos mayores a 30 células que la variedad silvestre, donde sólo se contaron 2. Un evento que se observó sólo en la variedad mutante fue el de largos filamentos con uno o ningún heterocisto, y más ocurrencia de heterocistos terminales.

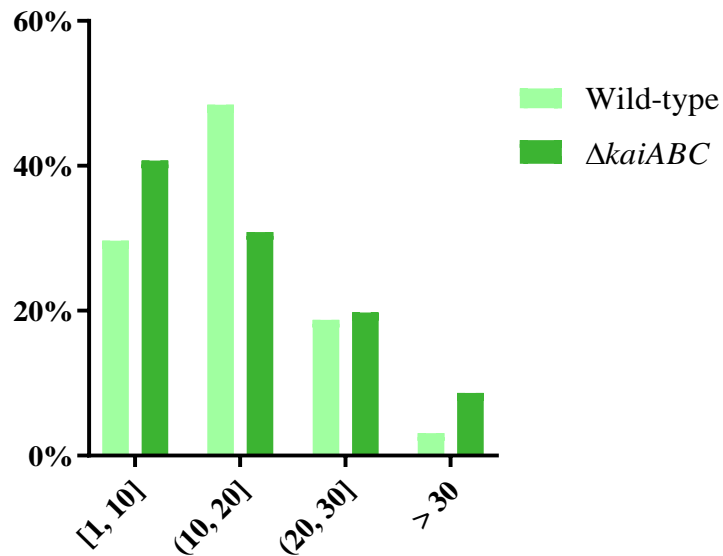


Figura 12. Tamaño del intervalo celular entre heterocistos de *Anabaena* sp y mutante $\Delta kaiABC$. Entre más de mil células identificadas para cada variedad, se determinó el intervalo entre los heterocistos. Se muestran como porcentaje del total de intervalos para cada cepa.

En cuanto a la capacidad de fijar nitrógeno de los heterocistos, se realizó un ensayo de reducción del acetileno (ARA), el cual permite estimar de forma indirecta la actividad de la enzima nitrogenasa. Los resultados, normalizados por la densidad óptica (OD) determinada a 750 nm, se encuentran resumidos en la figura 13. El punto correspondiente a las 72 horas se consideró atípico y se excluyó de los gráficos (datos no mostrados).

En condiciones de luz-oscuridad, para ambas cepas los valores más altos de reducción de acetileno a etileno correspondieron al mediodía circadiano (6, 30 y 54 horas). Por otro lado, los valores más bajos se registraron durante la noche circadiana (12-24, 36-48 y 60-66 horas). En el caso de los cultivos mantenidos en luz constante, no se observa una oscilación en la reducción de acetileno, sino más bien un aumento contante que supera la tasa máxima observada en el ciclo de luz/oscuridad.

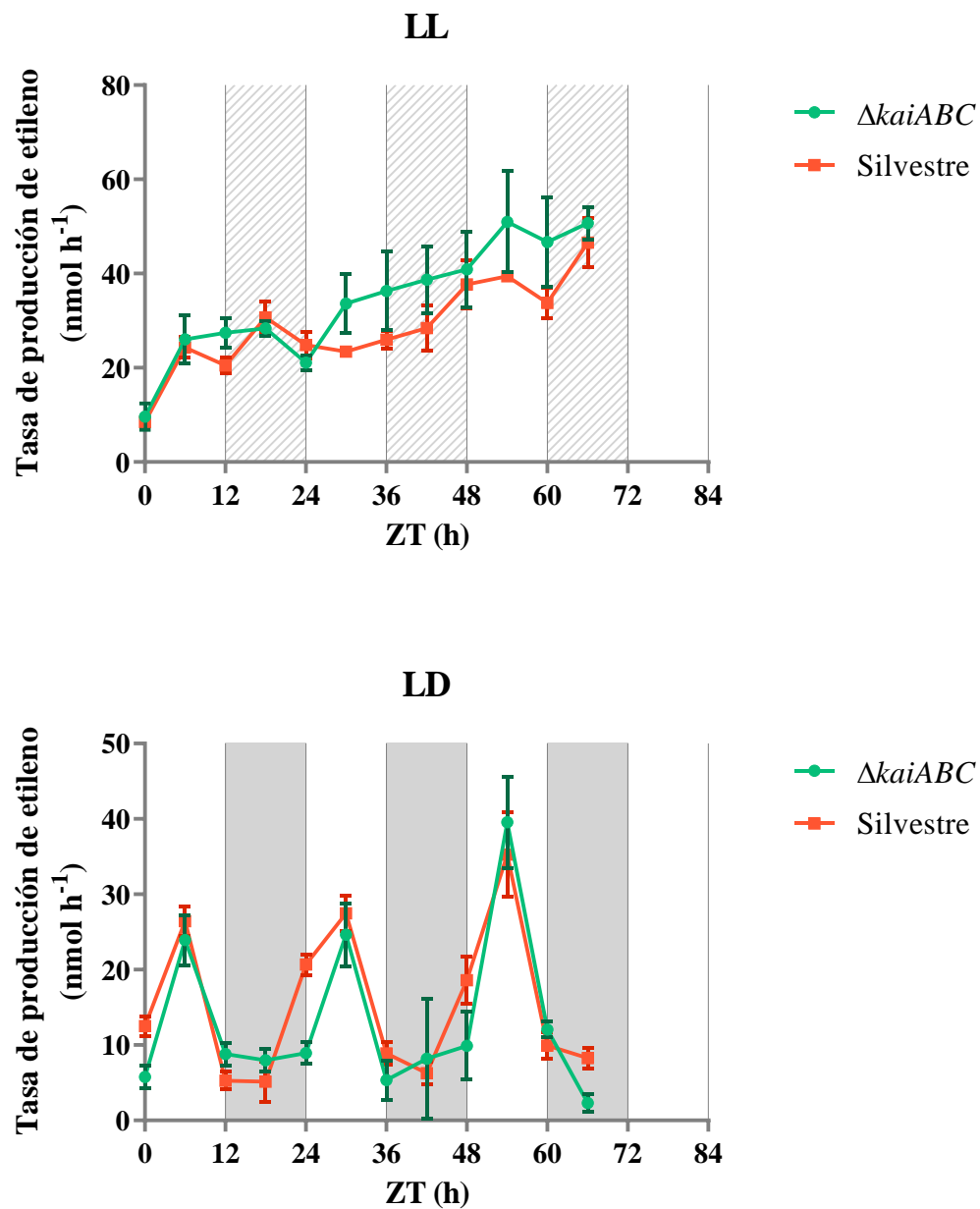


Figura 13. Estimación de la fijación de nitrógeno de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de la mutante carente de reloj circadiano ($\Delta kaiABC$) en medio BG11₀ en distintas condiciones de luz. La estimación de la fijación de nitrógeno se realizó mediante ensayo de reducción de acetileno. Las muestras fueron tomadas cada 6 horas durante tres días, evaluando condiciones de luz constante y de L/D 12:12 (noche circadiana se indica en gris cuando coincide con el periodo de oscuridad, o en achurado cuando corresponde a luz).

DISCUSIÓN

Crecimiento y morfología

A pesar de que la cantidad de células por filamento muestran una distribución similar en ambas cepas (Fig. 9), esta podría estar sesgada si se tiene en cuenta la complejidad de sacar microfotografías que abarquen un filamento demasiado largo, ya que los movimientos constantes de la platina suelen resultar en desplazamiento de los filamentos, que se desalinean y resultan microfotografías desde las cuales no se puede extraer información precisa. El largo del filamento observado para *Anabaena* sp. PCC 7120 en otros estudios, en cuanto a población, es más de un 70% con más de 30 células por filamento en Bornikoel et al. (2017), mientras que en Flores et al. (2007) se registró más de un 50% con filamentos mayores a 80 células en condiciones normales. Además, se está trabajando en la estimación de los filamentos mediante un algoritmo o código, donde surge la problemática de filamentos que se encuentran sobrepuestos, lo que dificulta el reconocimiento de filamentos independientes.

En cuanto al tamaño celular (Fig. 8), el aumento de tamaño en la mutante carente de reloj circadiano es evidencia de una descoordinación entre los procesos de división y elongación de la pared celular. Con los conocimientos actuales no es posible aseverar una única razón para esto, pero la especulación recae en dos posibilidades: la división estaría ocurriendo de manera más lenta, lo que permitiría que las células se elongasen por más tiempo, o es el proceso de elongación el afectado y, de alguna manera, las células están produciendo más peptidoglicano. El problema de estas especulaciones yace en el

desconocimiento de cómo ocurre el proceso de división y elongación en cianobacterias, ya que, a pesar de haberse descubierto algunas proteínas homólogas a las presentes en los modelos de división para bacterias Gram negativas y positivas (*E. coli* y *B. subtilis* respectivamente) (Koksharova & Babykin, 2011; Miyagishima et al., 2005), el cómo ocurre realmente el proceso sólo se puede extrapolar del conocimiento adquirido en éstos modelos clásicos.

Estudios en *S. elongatus* han evidenciado control río abajo de genes de biogénesis de la pared y membrana celular por el regulador circadiano RpaA, lo cual podría explicar la presencia de células más grandes en la variedad mutante, al verse afectados estos genes (Markson et al., 2013).

La tasa de crecimiento fue evaluada durante la fase temprana del crecimiento por lo que podría no corresponder a una aproximación verídica de la tasa de crecimiento durante el periodo exponencial ya que cabe la posibilidad de haber incluido mediciones de la transición entre las fases lag y exponencial (Fig. 7). Sería interesante observar qué ocurre con la variedad mutante en condiciones de luz constante, ya que, conocida la relación que hay entre el input del reloj y el estado redox de las plastoquinonas, podría ocurrir que la mutante sin el reloj circadiano no sea capaz de tomar medidas preventivas frente a cambios importantes en el estado redox de la célula, y sufrir una muerte temprana.

Por otro lado, la biomasa del cultivo en este estado fue insuficiente para obtener valores de clorofila consistentes, lo cual, junto con la volatilidad del medio en el que se extrajo el pigmento (metanol), hizo demasiado variables los valores de clorofila (datos no

mostrados) y se decidió descartarlos del análisis final y realizar la determinación de la tasa de crecimiento normalizando con los datos de densidad óptica a 750 nm (Fig. 7).

En estudios similares (Plominsky et al., 2013, 2015) es común presentar las observaciones en función del peso seco, la concentración de clorofila a, o la concentración de nitrogenasa, pero como ya se comentó, debido a lo temprano y acotado del periodo observado, estas mediciones no fueron viables. Para obtener una curva de crecimiento más precisa, sería necesario realizarla durante un periodo de tiempo más extendido, con tomas de muestras a intervalos más largos (por lo menos después de la fase temprana del crecimiento exponencial) y en las mismas condiciones para estudiar todas las variables posibles (ciclo de luz, presencia de nitrógeno, presencia de reloj circadiano), además de validarla con concentración de clorofila y peso seco. El problema que se presenta al plantear experimentos de esta envergadura es el alto volumen de cultivo necesario para ser capaces de realizar las copias técnicas y biológicas necesarias, durante un periodo extendido de tiempo, para darle solidez estadística a las observaciones realizadas.

Al tener en cuenta el ritmo circadiano al que fueron entrenados (12:12 L/D) no es radicalmente desafiante ya que no se desvía de las condiciones normales de crecimiento para *Anabaena*, sería interesante realizar un experimento similar, pero con distintos ciclos de luz como 16:8 o incluso 20:4, para ver qué ventaja adaptativa ofrece poseer un reloj circadiano en *Anabaena* sp. Estudios en *S. elongatus* mostraron que cepas con un reloj funcional crecían mejor en ambientes rítmicos que las que lo carecían, mientras que en un ambiente constante crecían a tasas similares (Woelfle et al., 2004) y que las que presentan un periodo que coincide con el ambiental, tenían mayor ventaja (Ouyang et al., 1998).

Localización anillo Z

La técnica de inmunofluorescencia indirecta es bastante agresiva para la integridad celular de *Anabaena* sp., además de depender del estadio celular para su éxito en este caso, ya que se quiere ver evidencia de división celular activa, por lo que resulta demoroso obtener microfotografías relevantes. En particular, la contingencia sanitaria impidió la repetición de este experimento con nuevos protocolos que podrían resultar menos agresivos, por lo que las imágenes presentadas no son las ideales. Para sortear estos obstáculos, y poder además realizar observaciones in vivo, en el laboratorio, Silva M. (no publicado) trabajó en la obtención de una mutante de ritmo circadiano con FtsZ marcado mediante una fusión con sfGFP en el C-terminal, basado en el trabajo de Olivares (2018), lo que facilitaría la observación de la dinámica de división celular en la mutante $\Delta kaiABC$.

A pesar de lo anterior, esta selección (Fig. 10) muestra ejemplos de los anillos observados en las variedades silvestre y mutante de *Anabaena* sp.. Normalmente, FtsZ se localiza en el ecuador celular (Figura 10.i, ii) perpendicular al eje del filamento o formando cúmulos (Olivares, 2018; Sun & Margolin, 1998). Sin embargo, en la mutante carente de reloj circadiano, a pesar de ser capaz de formar anillos en la posición adecuada (Figura 10.iv), se vio la presencia de anillos completamente deslocalizados (Figura 10.iii).

Los mecanismos descritos en bacterias que guían la posición y constricción del anillo son el sistema Min y el de oclusión del nucleoide (ON), de los cuales sólo el primero ha sido encontrado en *Anabaena* sp. (Kaneko et al., 2001). Para que el anillo pueda formarse fuera del ecuador celular tendría que existir alguna alteración en el gradiente del sistema Min. En un estudio en *S. elongatus* (Markson et al., 2013 S1) se encontró que

minC era un gen que presenta expresión circadiana, pero no es blanco del regulador maestro RpaA. También se encontró un ORF anotado como un “probable inhibidor de división MinD” con las mismas características que el gen anteriormente mencionado. Sin embargo, en (Kushige et al., 2013), que buscó genes con expresión circadiana en *Anabaena* sp., no se encontró que algún gen Min presentase un patrón de expresión circadiano. A pesar de los resultados mostrados por Kushige et al. (2013), es necesario mencionar que tales estudios no serían representativos si existiese una desincronización dentro de cada filamento.

De todas formas, esto no zanja por completo la posibilidad de que MinC o MinD esté efectivamente expresándose de manera circadiana. La dificultad de estudiar el ritmo circadiano en bacterias filamentosas radica en el diferente estadio circadiano en que se encuentra cada célula del filamento, el cual no es posible determinar con completa certeza a pesar del reajuste y entrenamiento que se realiza, ya que no hemos demostrado la sincronía de las células dentro de los filamentos y cuánto se correlacionan con el estadio celular en otros filamentos. Además, el mismo estudio de Kushige et al. (2013) determinó que la expresión de los genes *kai* en *Anabaena* sp. no es tan rítmica como en *S. elongatus*. Ya que no es posible descartar que *minC* y *minD* presenten, de alguna manera, una expresión o control circadiano en *Anabaena* sp., por más leve que sea, se presenta como una posible explicación al desajuste en el posicionamiento del anillo Z en la mutante $\Delta kaiABC$.

Capacidad de diferenciar células y fijar nitrógeno atmosférico

De forma general, *Anabaena* sp. diferencia heterocistos cada 10-20 células y no suelen presentarse de manera terminal en los filamentos (Zhang et al., 2006), sin embargo, las primeras observaciones muestran que se ve alterado el patrón de diferenciación entre las variedades silvestre y mutante, como filamentos de más de 30 células con solo un heterocisto y filamentos con heterocistos terminales.

El proceso de diferenciación de células vegetativas a heterocistos frente a la ausencia de nitrógeno combinado en el medio está finamente regulada, siendo los principales factores encargados de orquestarla HetR y NtcA, que inducen la diferenciación, y PatA/PatS, los cuales impiden que, una vez determinado el destino de una célula, las células vecinas se diferencien a heterocistos. La presencia de heterocistos terminales fue observada en una mutante de PatA (Liang et al., 1992). Actualmente se conoce la función de PatA, que es inhibir la acción de PatS sobre la célula cuyo destino se ha decidido. Esta mutante producía únicamente heterocistos terminales y tenía poca sobrevivencia en medio privado de nitrógeno, ya que un solo heterocisto no era suficiente para suplementar a todo el filamento. Estudios para determinar los genes que sufren una regulación positiva frente a la carencia de nitrógeno (Ehira et al., 2003; Kushige et al., 2013), concluyeron que los genes exclusivos de heterocistos que se expresan de manera circadiana pierden ritmicidad en las mutantes $\Delta kaiABC$.

La fijación de nitrógeno es un proceso muy costoso energéticamente (Sohm et al., 2011), por lo que resulta ideal realizarlo en conjunto con la fotosíntesis, mientras se está produciendo ATP. La diferenciación a células especializadas permite que estos procesos

ocurran de manera simultánea, y, como se ve en el primer gráfico de la figura 13, la mayor tasa de fijación se registra durante las horas de luz. En la variedad silvestre de *Anabaena* sp. PCC 7120 se observa mayor tasa de producción de etileno en los puntos 24 y 48 en comparación a la mutante, lo que indica que ésta sería capaz de anticipar el día y comenzar a fijar antes de recibir el estímulo lumínico (o energético). A su vez, las cepas mantenidas en luz constante muestran un aumento constante de la tasa de fijación al transcurrir las horas, lo cual podría explicarse por la constante producción energética al ser capaces de hacer fotosíntesis durante todo el día. La ausencia de un ritmo en la tasa de reducción de acetileno al mantener las cepas en luz constante, a pesar de tener las proteínas del reloj, refleja la dificultad de determinar el estado circadiano del filamento y la de sincronizarlo. Cuando están expuestas a un fotoperiodo cíclico la disponibilidad energética y otros procesos metabólicos retroalimentan el ritmo para hacerlo más robusto y restringen la actividad de la nitrogenasa durante la noche, pero en condiciones constantes esta retroalimentación se pierde y, dada la baja amplitud de los picos y la ausencia de un periodo claro, se puede inferir que el filamento está desincronizado y los heterocistos no están realizando la fijación al mismo tiempo.

Al tener en cuenta los datos de fijación de nitrógeno y porcentaje de heterocistos en la población, llama la atención ver que en la figura 7, donde se presenta la tasa de crecimiento, la mutante se desempeña mejor que la variedad silvestre en medio carente de nitrógeno combinado. Si una menor cantidad de heterocistos desregulados se desempeña de manera similar a un mayor porcentaje silvestre, podría dar cuenta de que alguno de los genes relacionados con la fijación de nitrógeno que presentan un patrón de expresión

circadiana se vio sobre regulado en ausencia del reloj. Otra opción es que la cantidad de heterocistos haya sido subestimada, y se obtengan valores similares una vez analizada una mayor cantidad de filamentos, y no haya en realidad una diferencia importante entre la cantidad de heterocistos y su tasa de fijación.

Estudios en *S. elongatus* (Ivleva et al., 2006; Wood et al., 2010) encontraron que CikA entrega información al reloj sobre la luminosidad ambiental al interactuar con las plastoquinonas, que cambian su estado redox de acuerdo con la actividad fotosintética. Que la mutante sea capaz de reaccionar frente a la luz (aumentando la fijación de nitrógeno al tener más energía disponible) implica que las vías de entrada de información no se han visto alteradas debido a la ausencia del reloj, si no que no puede haber un “entrenamiento” al no haber un reloj, por lo que no puede “aprender” ni adelantar los cambios cíclicos en la luz ambiental. Se ha visto que cambios en el estado redox de la célula también actúan como “entrenamiento” para el reloj (Kim et al., 2012; Rust et al., 2011), por lo que podría establecerse una retroalimentación con el metabolismo, que mantiene y entrena el ritmo para que sea más robusto.

A lo largo de esta discusión, la mayoría de los estudios mencionados fueron realizados en *S. elongatus* u otros organismos unicelulares, a no ser que se indique lo contrario, por lo que se tiene menor conocimiento de cómo actúa el ritmo circadiano en *Anabaena* sp. u otras bacterias filamentosas. Cabe mencionar que la capacidad de las cianobacterias unicelulares de fijar nitrógeno durante la noche fue uno de los primeros indicios de que las cianobacterias poseían un reloj circadiano (Huang et al., 1990; Mitsui et al., 1986). *S. elongatus* en particular no es diazotrófica, pero otras cianobacterias

unicelulares y filamentosas que no diferencian heterocistos son capaces de compatibilizar fotosíntesis y fijación de nitrógeno mediante una separación temporal controlada por el reloj circadiano (Schneegurt et al., 1994; Toepel et al., 2009).

No hay antecedentes de cianobacterias diazotróficas unicelulares mutantes para el reloj circadiano, pero estudios en *S. elongatus* carentes del reloj circadiano dan cuenta de alteraciones en el metabolismo de glicógeno, fundamental para la sobrevivencia durante la noche (Welkie et al., 2018), y pérdida de la ritmicidad del estado oxidativo en condiciones de luz constante, pero no de luz y oscuridad, ya que la señal ambiental es suficiente para mantener un ritmo (Tanaka et al., 2019).

La diferencia más notoria, es el distinto control de la división que posee *Anabaena* sp., ya que en el caso de *Anabaena* sp. y el resto de las cianobacterias filamentosas, la división no termina con dos células independientes, sino que éstas quedan conectadas por un septo, que funciona como separador y para establecer comunicación entre células colindantes (Bornikoel et al., 2017) y el filamento presenta un periplasma continuo (Flores et al., 2006). Mutantes de *S. elongatus* para KaiB resultan en células alargadas, pero no así las mutantes para KaiA, KaiC o KaiABC.

En resumen, estos antecedentes nos hacen hipotetizar que la división celular y la elongación de la célula son procesos regulados circadianamente y que existirían otros procesos como la fijación de nitrógeno y la inducción de la fragmentación de los filamentos en un medio carente de nitrógeno combinado que también estarían regulados circadianamente.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se puede ver que la variedad mutante $\Delta kaiABC$ de *Anabaena* sp. PCC 7120 es viable a pesar de presentar una menor tasa de crecimiento que su contraparte silvestre.

El anillo Z de la mutante logra posicionarse de manera correcta y llevar a cabo una división efectiva a pesar de haberse observado deslocalizaciones mediante inmunofluorescencia indirecta. Se desconoce aún qué etapa se ve alterada, pero las células de la variedad mutante resultan un 54,2% más grandes.

También mantiene la capacidad de diferenciar células y de realizar fijación de nitrógeno, aunque, como es de esperar, no es capaz de adelantar el periodo de tiempo en que podrá realizarlo. El espaciamiento entre los heterocistos es similar al de la variedad silvestre, a pesar de observarse una mayor cantidad de eventos alterados como mayor cantidad de heterocistos terminales y heterocistos únicos en filamentos de más de 30 células.

Estos resultados atisban el alcance del control que posee el reloj circadiano sobre esta cianobacteria filamentosa, pero para profundizar, es necesario realizar estudios que pongan a prueba el reloj, como usar un fotoperiodo distinto y ver la relación de éste con el estado redox de la célula.

La división en cianobacterias filamentosas es distinta a la de las cianobacterias unicelulares, por lo que estudiar los genes únicos de estas bacterias es necesario para un

entendimiento cabal de este mecanismo. Este trabajo contribuye a la comprensión del alcance del reloj circadiano sobre la división y diferenciación celular en cianobacterias filamentosas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, J., Hiyama, T. B., Mukaiyama, A., Son, S., Mori, T., Saito, S., Osako, M., Wolanin, J., Yamashita, E., Kondo, T., & Akiyama, S.** (2015). Atomic-scale origins of slowness in the cyanobacterial circadian clock. *Science*, *349*(6245), 312–316.
- Barák, I., & Wilkinson, A. J.** (2007). Division site recognition in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 31, Issue 3, pp. 311–326). Oxford Academic.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., & Falkowski, P.** (2003). Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology*, *154*(3), 157–164.
- Bornikoel, J., Carrión, A., Fan, Q., Flores, E., Forchhammer, K., Mariscal, V., Mullineaux, C. W., Perez, R., Silber, N., Wolk, C. P., & Maldener, I.** (2017). Role of two cell wall amidases in septal junction and nanopore formation in the multicellular cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*(SEP), 386.
- Büdel, B.** (2011). *Cyanobacteria: Habitats and Species* (pp. 11–21). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Cai, Y. P., & Wolk, C. P.** (1990). Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *Journal of Bacteriology*, *172*(6), 3138–3145.
- Cardemil, L., & Wolk, C. P.** (1979). The polysaccharides from heterocyst and spore envelopes of a blue-green alga. Structure of the basic repeating unit. *The Journal of Biological Chemistry*, *254*(3), 736–741.
- Chang, Y. G., Cohen, S. E., Phong, C., Myers, W. K., Kim, Y. I., Tseng, R., Lin, J.,**

- Zhang, L., Boyd, J. S., Lee, Y., Kang, S., Lee, D., Li, S., Britt, R. D., Rust, M. J., Golden, S. S., & Li Wang, A.** (2015). A protein fold switch joins the circadian oscillator to clock output in cyanobacteria. *Science*, *349*(6245), 324–328.
- Christman, H. D., Campbell, E. L., & Meeks, J. C.** (2011). Global transcription profiles of the nitrogen stress response resulting in heterocyst or hormogonium development in *Nostoc punctiforme*. *Journal of Bacteriology*, *193*(24), 6874–6886.
- den Blaauwen, T., Hamoen, L. W., & Levin, P. A.** (2017). The divisome at 25: the road ahead. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 36, pp. 85–94). Elsevier Ltd.
- Dong, G., Yang, Q., Wang, Q., Kim, Y. I., Wood, T. L., Osteryoung, K. W., van Oudenaarden, A., & Golden, S. S.** (2010). Elevated ATPase activity of KaiC applies a circadian checkpoint on cell division in *Synechococcus elongatus*. *Cell*, *140*(4), 529–539.
- Egan, A. J. F., & Vollmer, W.** (2013). The physiology of bacterial cell division. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1277*(1), 8–28.
- Ehira, S., Ohmori, M., & Sato, N.** (2003). Genome-wide expression analysis of the responses to nitrogen deprivation in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *DNA Research*, *10*(3), 97–113.
- Elhai, J., & Wolk, C. P.** (1988). Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods in Enzymology*, *167*(C), 747–754.
- Flores, E., & Herrero, A.** (2010). Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(1), 39–50.
- Flores, E., & Herrero, A.** (2014). *The cell biology of cyanobacteria* (E. Flores (ed.)). Caister Academic Press.
- Flores, E., Herrero, A., Wolk, C. P., & Maldener, I.** (2006). Is the periplasm continuous in filamentous multicellular cyanobacteria? *Trends in Microbiology*, *14*(10), 439–

443.

- Flores, E., Pernil, R., Muro-Pastor, A. M., Mariscal, V., Maldener, I., Lechno-Yossef, S., Fan, Q., Wolk, C. P., & Herrero, A.** (2007). Septum-localized protein required for filament integrity and diazotrophy in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*, *189*(10), 3884–3890.
- Gaysina, L. A., Saraf, A., & Singh, P.** (2019). Cyanobacteria in Diverse Habitats. *Cyanobacteria*, 1–28.
- Giddings, T. H., & Staehelin, L. A.** (1978). Plasma membrane architecture of *Anabaena cylindrica*: occurrence of microplasmodesmata and changes associated with heterocyst development and the cell cycle. *Cytobiologie*, *16*(2), 235–249.
- Giovannoni, S. J., Turner, S., Olsen, G. J., Barns, S., Lane, D. J., & Pace, N. R.** (1988). Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *Journal of Bacteriology*, *170*(8), 3584–3592.
- Golden, S. S., & Canales, S. R.** (2003). Cyanobacterial circadian clocks — timing is everything. *Nature Reviews Microbiology*, *1*(3), 191–199.
- Gugger, M. F., & Hoffmann, L.** (2004). Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(2), 349–357.
- Gutu, A., & O’Shea, E. K.** (2013). Two antagonistic clock-regulated histidine kinases time the activation of circadian gene expression. *Molecular Cell*.
- Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. K., & Burns, R. C.** (1968). The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, *43*(8), 1185–1207.
- Herrero, A., Stavans, J., & Flores, E.** (2016). The multicellular nature of filamentous heterocyst-forming cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *40*(6), 831–854.
- Hosokawa, N., Kushige, H., & Iwasaki, H.** (2013). Attenuation of the posttranslational

oscillator via transcription- translation feedback enhances circadian-phase shifts in *Synechococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(35), 14486–14491.

Hu, B., Yang, G., Zhao, W., Zhang, Y., & Zhao, J. (2007). MreB is important for cell shape but not for chromosome segregation of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Molecular Microbiology*, 63(6), 1640–1652.

Huang, T. C., Tu, J., Chow, T. J., & Chen, T. H. (1990). Circadian rhythm of the prokaryote *Synechococcus* sp. RF-1. *Plant Physiology*, 92(2), 531–533.

Hurley, J. M., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2016). Circadian oscillators: around the transcription–translation feedback loop and on to output. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 41, Issue 10, pp. 834–846). Elsevier Ltd.

Ivleva, N. B., Gao, T., Liwang, A. C., & Golden, S. S. (2006). Quinone sensing by the circadian input kinase of the cyanobacterial circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), 17468–17473.

Iwasaki, H., Nishiwaki, T., Kitayama, Y., Nakajima, M., & Kondo, T. (2002). KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in circadian timing loops in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15788–15793.

Johnson, C. H., Golden, S. S., & Kondo, T. (1998). Adaptive significance of circadian programs in cyanobacteria. In *Trends in Microbiology* (Vol. 6, Issue 10, pp. 407–410).

Johnson, C. H., Stewart, P. L., & Egli, M. (2011). The Cyanobacterial circadian system: from biophysics to bioevolution. *Annual Review of Biophysics*, 40(1), 143–167.

Kageyama, H., Nishiwaki, T., Nakajima, M., Iwasaki, H., Oyama, T., & Kondo, T. (2006). Cyanobacterial circadian pacemaker: Kai protein complex dynamics in the KaiC phosphorylation cycle *in vitro*. *Molecular Cell*, 23(2), 161–171.

- Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C. P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takazawa, M., ... Tabata, S.** (2001). Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *DNA Research*, 8(5), 205–213.
- Kim, Y. I., Vinyard, D. J., Ananyev, G. M., Dismukes, G. C., & Golden, S. S.** (2012). Oxidized quinones signal onset of darkness directly to the cyanobacterial circadian oscillator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(44), 17765–17769.
- Kitayama, Y., Nishiwaki, T., Terauchi, K., & Kondo, T.** (2008). Dual KaiC-based oscillations constitute the circadian system of cyanobacteria. *Genes and Development*, 22(11), 1513–1521.
- Koksharova, O. A., & Babykin, M. M.** (2011). Cyanobacterial cell division: Genetics and comparative genomics of cyanobacterial cell division. *Russian Journal of Genetics*, 47(3), 255–261.
- Koksharova, Olga A., & Wolk, C. P.** (2002a). Novel DNA-binding proteins in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*, 184(14), 3931–3940.
- Koksharova, Olga A., & Wolk, C. P.** (2002b). A novel gene that bears a DnaJ motif influences cyanobacterial cell division. *Journal of Bacteriology*, 184(19), 5524–5528.
- Kumar, K., Mella-Herrera, R. A., & Golden, J. W.** (2010). Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(4), a000315.
- Kushige, H., Kugenuma, H., Matsuoka, M., Ehira, S., Ohmori, M., & Iwasaki, H.** (2013). Genome-wide and heterocyst-specific circadian gene expression in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of*

Bacteriology, 195(6), 1276–1284.

- Liang, J., Scappino, L., & Haselkorn, R.** (1992). The *patA* gene product, which contains a region similar to CheY of *Escherichia coli*, controls heterocyst pattern formation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(12), 5655–5659.
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R.** (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11(5), 591–592.
- Linkert, M., Rueden, C. T., Allan, C., Burel, J. M., Moore, W., Patterson, A., Loranger, B., Moore, J., Neves, C., MacDonald, D., Tarkowska, A., Sticco, C., Hill, E., Rossner, M., Eliceiri, K. W., & Swedlow, J. R.** (2010). Metadata matters: Access to image data in the real world. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 189, Issue 5, pp. 777–782).
- Löwe, J., & Amos, L. A.** (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature*, 391(6663), 203–206.
- Maldener, I., Summers, M. L., & Sukenik, A.** (2014). Cellular differentiation in filamentous cyanobacteria. In E. Flores & A. Herrero (Eds.), *The Cell Biology of Cyanobacteria*. Caister Academic Press.
- Mandakovic, D., Trigo, C., Andrade, D., Riquelme, B., Gómez-Lillo, G., Soto-Liebe, K., Díez, B., & Vásquez, M.** (2016). CyDiv, a conserved and novel filamentous cyanobacterial cell division protein involved in septum localization. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 1–11.
- Markson, J. S., Piechura, J. R., Puszynska, A. M., & O’Shea, E. K.** (2013). Circadian control of global gene expression by the cyanobacterial master regulator RpaA. *Cell*, 155(6), 1396–1408.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M., & Penny, D.** (2002). Evolutionary analysis of

Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12246–12251.

Mazouni, K., Domain, F., Cassier-Chauvat, C., & Chauvat, F. (2004). Molecular analysis of the key cytokinetic components of cyanobacteria: FtsZ, ZipN and MinCDE. *Molecular Microbiology*, 52(4), 1145–1158.

Mitsui, A., Kumazawa, S., Takahashi, A., Ikemoto, H., Cao, S., & Arai, T. (1986). Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature*, 323(6090), 720–722.

Miyagishima, S. Y., Wolk, P. P., & Osteryoung, K. W. (2005). Identification of cyanobacterial cell division genes by comparative and mutational analyses. *Molecular Microbiology*, 56(1), 126–143.

Monahan, L. G., Liew, A. T. F., Bottomley, A. L., & Harry, E. J. (2014). Division site positioning in bacteria: One size does not fit all. *Frontiers in Microbiology*, 5(FEB), 1–7.

Mori, T., & Johnson, C. H. (2001). Independence of circadian timing from cell division in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, 183(8), 2439–2444.

Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., Oyama, T., & Kondo, T. (2005). Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science*, 308(5720), 414–415.

Olivares, J. (2018). *Localización subcelular y distribución espacial de FtsZ en Anabaena sp. PCC 7120*. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Orozco, C. C., Risser, D. D., & Callahan, S. M. (2006). Epistasis analysis of four genes from *Anabaena* sp. strain PCC 7120 suggests a connection between PatA and PatS in heterocyst pattern formation. *Journal of Bacteriology*, 188(5), 1808–1816.

Ouyang, Y., Andersson, C. R., Kondo, T., Golden, S. S., & Johnson, C. H. (1998).

Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15), 8660–8664.

Plominsky, Á. M., Delherbe, N., Mandakovic, D., Riquelme, B., González, K., Bergman, B., Mariscal, V., & Vásquez, M. (2015). Intercellular transfer along the trichomes of the invasive terminal heterocyst forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505. *FEMS Microbiology Letters*, 362(5), 1–8.

Plominsky, Á. M., Larsson, J., Bergman, B., Delherbe, N., Osses, I., & Vásquez, M. (2013). Dinitrogen fixation is restricted to the terminal heterocysts in the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505. *PLoS ONE*, 8(2), e51682.

Pratte, B. S., Eplin, K., & Thiel, T. (2006). Cross-functionality of nitrogenase components NifH1 and VnfH in *Anabaena variabilis*. *Journal of Bacteriology*, 188(16), 5806–5811.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., & Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*, 111(1), 1–61.

Rust, M. J., Golden, S. S., & O’Shea, E. K. (2011). Light-driven changes in energy metabolism directly entrain the cyanobacterial circadian oscillator. *Science*, 331(6014), 220–223.

Sakr, S., Jeanjean, R., Zhang, C.-C., & Arcondeguy, T. (2006). Inhibition of cell division suppresses heterocyst development in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*, 188(4), 1396–1404.

Sarma, T. A. (2013). *Handbook of cyanobacteria*. CRC Press.

Schneegurt, M. A., Sherman, D. M., Nayar, S., & Sherman, L. A. (1994). Oscillating behavior of carbohydrate granule formation and dinitrogen fixation in the cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142. *Journal of Bacteriology*, 176(6), 1586–1597.

- Sharma, V. K.** (2003). Adaptive significance of circadian clocks. *Chronobiology International*, 20(6), 901–919.
- Sharma, V. K., & Chandrashekar, M. K.** (2005). Zeitgebers (time cues) for biological clocks. In *Current Science* (Vol. 89, pp. 1136–1146). Current Science Association.
- Shultzaberger, R. K., Boyd, J. S., Diamond, S., Greenspan, R. J., & Golden, S. S.** (2015). Giving time purpose: The *Synechococcus elongatus* clock in a broader network context. *Annual Review of Genetics*, 49(1), 485–505.
- Sohm, J. A., Webb, E. A., & Capone, D. G.** (2011). Emerging patterns of marine nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 9(7), 499–508.
- Stucken, K., John, U., Cembella, A., Murillo, A. A., Soto-Liebe, K., Fuentes-Valdés, J. J., Friedel, M., Plominsky, A. M., Vásquez, M., & Glöckner, G.** (2010). The smallest known genomes of multicellular and toxic cyanobacteria: Comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. *PLoS ONE*, 5(2).
- Sukenik, A., Rücker, J., & Maldener, I.** (2019). Dormant cells (Akinetes) of filamentous cyanobacteria demonstrate a great variability in morphology, physiology, and ecological function. *Cyanobacteria*, 65–77.
- Summers, M. L., Wallis, J. G., Campbell, E. L., & Meeks, J. C.** (1995). Genetic evidence of a major role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in nitrogen fixation and dark growth of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain ATCC 29133. *Journal of Bacteriology*, 177(21), 6184–6194.
- Sun, Q., & Margolin, W.** (1998). FtsZ dynamics during the division cycle of live *Escherichia coli* cells. *Journal of Bacteriology*, 180(8), 2050–2056.
- Swan, J. A., Golden, S. S., LiWang, A., & Partch, C. L.** (2018). Structure, function, and mechanism of the core circadian clock in cyanobacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(14), 5026–5034.

- Takai, N., Nakajima, M., Oyama, T., Kito, R., Sugita, C., Sugita, M., Kondo, T., & Iwasaki, H.** (2006). A KaiC-associating SasA-RpaA two-component regulatory system as a major circadian timing mediator in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(32), 12109–12114.
- Tanaka, K., Ishikawa, M., Kaneko, M., Kamiya, K., Kato, S., & Nakanishi, S.** (2019). The endogenous redox rhythm is controlled by a central circadian oscillator in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942. *Photosynthesis Research*, *142*(2), 203–210.
- Terauchi, K., Kitayama, Y., Nishiwaki, T., Miwa, K., Murayama, Y., Oyama, T., & Kondo, T.** (2007). ATPase activity of KaiC determines the basic timing for circadian clock of cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(41), 16377–16381.
- Toepel, J., McDermott, J. E., Summerfield, T. C., & Sherman, L. A.** (2009). Transcriptional analysis of the unicellular, diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142 grown under short day/night cycles. *Journal of Phycology*, *45*(3), 610–620.
- Trigo, C., Andrade, D., & Vásquez, M.** (2016). *Protein localization in the cyanobacterium Anabaena sp. PCC7120 using immunofluorescence labelling.* 2–6.
- Tseng, R., Goularte, N. F., Chavan, A., Luu, J., Cohen, S. E., Chang, Y. G., Heisler, J., Li, S., Michael, A. K., Tripathi, S., Golden, S. S., LiWang, A., & Partch, C. L.** (2017). Structural basis of the day-night transition in a bacterial circadian clock. *Science*, *355*(6330), 1174–1180.
- Umorin, M.** (2011). *Stack Focuser.*
- Welkie, D. G., Rubin, B. E., Chang, Y. G., Diamond, S., Rifkin, S. A., LiWang, A., & Golden, S. S.** (2018). Genome-wide fitness assessment during diurnal growth reveals an expanded role of the cyanobacterial circadian clock protein KaiA. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, 115(30), E7174–E7183.

Wishiwaki, T., Satomi, Y., Nakajima, M., Lee, C., Kiyohara, R., Kageyama, H., Kitayama, Y., Temamoto, M., Yamaguchi, A., Hijikata, A., Go, M., Iwasaki, H., Takao, T., & Kondo, T. (2004). Role of KaiC phosphorylation in the circadian clock system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(38), 13927–13932.

Woelfle, M. A., Ouyang, Y., Phanvijhitsiri, K., & Johnson, C. H. (2004). The adaptive value of circadian clocks: An experimental assessment in cyanobacteria. *Current Biology*, 14(16), 1481–1486.

Wolk, C. P., Ernst, A., & Elhai, J. (1994). Heterocyst metabolism and development. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (pp. 769–823). Springer Netherlands.

Wood, T. L., Bridwell-Rabb, J., Kim, Y. I., Gao, T., Chang, Y. G., LiWang, A., Barondeau, D. P., & Golden, S. S. (2010). The KaiA protein of the cyanobacterial circadian oscillator is modulated by a redox-active cofactor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(13), 5804–5809.

Zhang, C. C., Laurent, S., Sakr, S., Peng, L., & Bédu, S. (2006). Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: A chorus of signals. In *Molecular Microbiology* (Vol. 59, Issue 2, pp. 367–375). John Wiley & Sons, Ltd.

Zinser, E. R., Lindell, D., Johnson, Z. I., Futschik, M. E., Steglich, C., Coleman, M. L., Wright, M. A., Rector, T., Steen, R., McNulty, N., Thompson, L. R., & Chisholm, S. W. (2009). Choreography of the transcriptome, photophysiology, and cell cycle of a minimal photoautotroph, *Prochlorococcus*. *PLoS ONE*, 4(4), e5135.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Códigos de ImageJ

1. Script Conteo

```
#@ File (label = "Input directory", style = "directory") input
#@ File(label = "Output directory", style = "directory") output
#@ String(label = "Title contains") pattern

openImages();
processOpenImages();

function openImages() {
    list = getFileList(input);
    for (i=0; i<list.length; i++) {
        incoming= input+"\\"+list[i];
        run("Bio-Formats Windowless Importer",
"open=["+incoming+"] color_mode=Default view=Hyperstack
stack_order=XYZCT");
    }
}

function processOpenImages() {
    n = nImages;
    while (1<=n) {
        imageTitle = getTitle();
        if (matches(imageTitle, "(.*)"+pattern+"(.*)")) {
            prefix = substring(imageTitle, 0,
lastIndexOf(imageTitle, "."));
            processImage(imageTitle, prefix, output);
        }
        newTitle = getTitle();
        if (endsWith(newTitle, "af-"+prefix)) {
            analyzeImage(imageTitle, prefix, output);
        }
    }
}

function processImage(imageTitle, prefix, output) {
    if (((is("composite")) && (Stack.isHyperstack == 1)) == 1) {
//        print(imageTitle+" is composite and Z");
        splitImage(imageTitle, prefix);
        stackImage(imageTitle, prefix);
    }
    else if ((is("composite")) || (nSlices >= 1)) {
        if(nSlices > 2){
//            print(imageTitle+" is Z");
        }
    }
}
```



```

        stackImage(imageTitle, prefix);
    }
    else if (nSlices == 2) {
//      print(imageTitle+" is composite");
        splitImage(imageTitle, prefix);
    }
}
else if ((is("composite") && (nSlices > 1)) == 0) {
//      print(imageTitle+" is simple");
        rename("af-"+prefix);
    }
}

function analyzeImage (imageTitle, prefix, output) {
    newTitle = getTitle();
    setAutoThreshold("Default dark no-reset");
//    run("Threshold...");
    setOption("BlackBackground", true);
    run("Convert to Mask");
    run("Watershed");
    run("Analyze Particles...", " show=Outlines display exclude
clear include summarize");
    selectWindow("Drawing of "+newTitle);
    saveAs("Tiff", output + File.separator + "count-
"+prefix+".tiff");
    close("count-*");
    selectWindow(newTitle);
    saveAs("Tiff", output + File.separator + "threshold-
"+prefix+".tiff");
    close("threshold-*");
    selectWindow("Results");
    saveAs("Results", output+ File.separator +"Results-
"+prefix+".csv");
    selectWindow("Summary");
    saveAs("Results", output+File.separator +"Summary-
"+prefix+".csv");
    close("Results");
    close("Summary*");
    print (prefix+" done");
}

function splitImage (imageTitle, prefix) {
    infoString=getMetadata("Info");
    chanPos=indexOf(infoString,"Name #2 =");
    channel=substring(infoString,chanPos+10, chanPos+11);
    if(channel == "R") {
        /*
        af = "C1-";

```

```

        wf = "C2-";
        */
run("Split Channels");
// selectWindow("C2-"+imageTitle);
close("C2-*");
selectWindow("C1-"+imageTitle);
rename("af-"+prefix);
}
else if (channel == "C") {
run("Split Channels");
// selectWindow("C1-"+imageTitle);
close("C1-*");
selectWindow("C2-"+imageTitle);
rename("af-"+prefix);
}
}

function stackImage (imageTitle, prefix) {
rename("af-"+prefix);
run("Stack Focuser ", "enter=11");
selectWindow("af-"+prefix);
getVoxelSize(width, height, depth, unit);
selectWindow("Focused_"+"af-"+prefix);
run("Properties...", "unit=micron" +
    " pixel_width=" + width +
    " pixel_height=" + height +
    " voxel_depth=" + depth);
selectWindow("af-"+prefix);
close();
}

```

2. Script Heterocistos

```

#@ File (label = "Input directory", style = "directory") input
#@ File(label = "Output directory", style = "directory") output
#@ String(label = "Title contains") pattern

```

```

openImages();
processOpenImages();

```

```

function openImages() {
list = getFileList(input);
for (i=0; i<list.length; i++) {
incoming= input+"\\ "+list[i];

```

```

        run("Bio-Formats Windowless Importer",
"open=["+incoming+"] color_mode=Default view=Hyperstack
stack_order=XYZCT");
    }
}

function processOpenImages() {
    n = nImages;
    setBatchMode(true);
    for (i=1; i<=n; i++) {
        selectImage(i);
        imageTitle = getTitle();
        if (matches(imageTitle, "(.*)"+pattern+"(.*)")) {
            prefix = substring(imageTitle, 0,
lastIndexOf(imageTitle, "."));
            sArray = assignSlice (imageTitle);
            AFslice = sArray[0];
            BFslice = sArray[1];
//            print(sArray[0]+"\\n"+sArray[1]);

            processImage (imageTitle, sArray[1], sArray[0]);
            analyzeImage (imageTitle, sArray[1], prefix,
output);

        }
    }
    setBatchMode(false);
    close("Results");
    close("threshold-*");
    close("ROI-*");
    close("ROI Manager");
}

function assignSlice (imageTitle) {
    infoString=getMetadata("Info");
    chanPos=indexOf(infoString, "sOpticalConfigName =");
    channel=substring(infoString, chanPos+21, chanPos+22);
    AFslice = 0;
    BSslice = 0;
    if(channel == "C") {
        AFslice = 1;
        BFslice = 2;
    }
    else if (channel == "R") {
        AFslice = 2;
        BFslice = 1;
    }
}

```

```

    }
    print("For "+imageTitle+"\nBFslice = " + BFslice + "\nAFslice =
" + AFslice);
    return newArray(AFslice,BFslice);
}

function processImage (imageTitle, BFslice, AFslice) {
    //for brightfield
    setSlice(BFslice);
    run("8-bit");
    run("Grays");
    // run("Brightness/Contrast...");
    run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
    run("Apply LUT", "slice");
    setAutoThreshold("Default no-reset");
    run("Convert to Mask", "method=Default background=Light
calculate only black");
    run("Close-", "slice");
    run("Fill Holes", "slice");
    run("Dilate", "slice");
    run("Close-", "slice");
    run("Erode", "slice");
    run("Fill Holes", "slice");
    run("Remove Outliers...", "radius=15 threshold=50 which=Bright
slice");
    run("Watershed", "slice");
    run("Remove Outliers...", "radius=5 threshold=50 which=Bright
slice");

    //for autofluorescence
    setSlice(AFslice);
    run("Red");
    run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
    run("Apply LUT", "slice");
    setAutoThreshold("Default dark no-reset");
    run("Convert to Mask", "method=Default background=Dark calculate
only black");
    run("Remove Outliers...", "radius=5 threshold=50 which=Bright
slice");
    run("Watershed", "slice");

    print("Done processing "+ imageTitle);
}

function analyzeImage (imageTitle, BFslice, prefix, output) {

```

```

    run("Set Measurements...", "area mean min limit display add
redirect=None decimal=3");
    setSlice(BFslice);
    run("Grays");
    run("Create Selection");
    run("Make Inverse");
    roiManager("Add");
    roiManager("Split");
    roiManager("Show All with labels");

    setSlice(AFslice);
    run("Red");
    run("Labels...", "color=white font=12 show draw");
    run("Flatten", "slice");
    saveAs("Tiff", output + File.separator + "ROI-"+prefix+".tiff");
    close("ROI-*");
// delete first ROI
    roiManager("Select", 0);
    roiManager("Delete");
    roiManager("Deselect");

// multimeasure and save
    selectWindow(imageTitle);
    setSlice(BFslice);
    roiManager("deselect");
    roiManager("multi measure");
    selectWindow("Results");
    saveAs("Results", output+ File.separator
+"Results_ROI"+prefix+".csv");
    selectWindow(imageTitle);
    saveAs("Tiff", output + File.separator + "threshold-
"+prefix+".tiff");

    print("Done analyzing "+imageTitle);
    roiManager("Deselect");
    roiManager("Multi Measure");
    roiManager("Delete");           // to clear ROI manager
}

```