

Estudios de homología entre regiones del operón *mcy* de
Microcystis aeruginosa PCC 7806 y muestras procedentes de
La Estanca de Alcañiz (Teruel)

Beatriz Martín, José Ángel Hernández, Sara López, Luis Ángel Inda,
M. Teresa Bes, María F. Fillat y M. Luisa Peleato

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.
Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza. 50009-Zaragoza

Abstract

Samples from a toxic bloom in La Estanca (Alcañiz, Teruel) during the late summer and fall of 2000 were used to study the possible Fur (ferric uptake regulator) regulation of the microcystin synthesis. Three promoter regions with homology with promoter sequences present in the *mcy* operon from the toxic *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 were found. Putative iron-boxes are present in the three amplified sequences. Gel-shift assays were performed to study possible Fur-DNA binding using those promoter regions and a Fur protein from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120.

Resumen

En muestras colectadas en la proliferación detectada en otoño del año 2000 en La Estanca de Alcañiz (Teruel) se ha llevado a cabo la amplificación de regiones promotoras de genes descritas en el operón *mcy* de *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. El resultado ha mostrado la amplificación de tres regiones con un considerable grado de homología con el citado operón. Estas regiones presentan potenciales secuencias de unión de la proteína Fur (ferric uptake regulator). Ensayos de retardo en gel mostraron que estos promotores unían débilmente FurA de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120.

1. Introducción

El hierro es un elemento esencial limitante en los ecosistemas acuáticos. Recientemente el experimento de fertilización *in situ* en el océano Pacífico, Iron ExII (Coale *et al.*,

1996) demostró que la adición de este elemento incrementaba fuertemente la biomasa. El hierro es muy abundante en la naturaleza, pero paradójicamente se produce deficiencia en muchos casos, dada su escasa solubilidad en medios acuáticos. Además, los organismos deben controlar muy finamente su incorporación ya que puede catalizar la generación de radicales libres. La proteína Fur (ferric uptake regulator) es un represor que en presencia de hierro regula un gran número de genes en bacterias y cianobacterias. Se trata de una proteína de unión al DNA que reconoce secuencias específicas en los promotores de los genes blanco, y afecta a su transcripción. Asimismo, la supervivencia de muchas bacterias patógenas está limitada por el hierro disponible, y en muchos de esos casos la expresión de algunos factores de virulencia y toxinas esta mediada por Fur (De Lorenzo *et al.* 1999)

Las microcistinas son metabolitos secundarios hepatotóxicos producidos por ciertas cianobacterias. Se han descrito cerca de un centenar de microcistinas, que son péptidos cíclicos en los que intervienen aminoácidos no proteicos, y cuya síntesis no se lleva a cabo mediante ribosomas, sino por enzimas denominadas en general “péptido sintetetasas”, que llevan a cabo los enlaces peptídicos, junto con otras enzimas.

Las cianobacterias están ampliamente distribuidas en océanos y aguas dulces. En las aguas dulces, debido a la creciente eutrofización, en muchas ocasiones se producen proliferaciones incontroladas de cianobacterias, capaces de competir muy eficazmente con otros organismos del fitoplancton. Algunas de estas proliferaciones o “blooms” dan lugar a la producción de toxinas, sin que hasta el momento se hayan podido establecer con claridad las causas que llevan a esta situación. Sólo algunas cepas de estos organismos se han mostrado como capaces de formar toxinas. Los factores ambientales en que una cianobacteria pasa a expresar toxinas es uno de los aspectos más estudiados por los especialistas, pero dista mucho de estar claro. Parece ser que altas temperaturas, alta luminosidad, poco viento (es decir, aguas tranquilas y no aireadas), además de disponibilidad de nitrógeno y fósforo podrían ser los factores implicados en que una determinada especie se transforme en tóxica. También un pH del agua alcalino se ha asociado a la aparición de toxicidad. Se da la paradoja de que en muchos casos resulta bastante difícil hacer expresar la toxicidad en el laboratorio a determinadas cepas, mientras que en condiciones naturales la producción ha sido muy elevada.

Los péptidos no ribosomales se sintetizan tanto en organismos eucariotas como en procariotas. La síntesis ocurre en grandes complejos multienzimáticos llamados en general “péptido sintetetasas”, que permiten incorporar y modificar de forma muy variable los aminoácidos, dando lugar a una gran variabilidad. Los genes que codifican las proteínas que forman estos grandes complejos multienzimáticos suelen estar agrupados en grandes operones o “clusters”, donde cada módulo responsable de la adición de un aminoácido

concreto está constituido por dominios muy similares a otros del mismo operón (Moffit and Neilan, 2000). Tillet *et al.* (2000) caracterizaron el operón presente en una cepa de uno de los organismos que más frecuentemente produce problemas, *Microcystis aeruginosa* PCC 7806.

En el otoño del año 2000 tuvo lugar en La Estanca de Alcañiz (Teruel) una proliferación de *Microcystis*, acompañada de producción de toxinas. En estas muestras hemos estudiado la posible presencia de secuencias promotoras homólogas a las presentes en el operón *mcy* (responsable de la síntesis de microcistina) de la cianobacteria tóxica *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Se estudia también la potencial unión de una proteína Fur de otra cianobacteria, *Anabaena* PCC 7120 a estas regiones.

2. Material y Métodos

RECOGIDA DE MUESTRAS: Se tomaron muestras de agua de La Estanca (Alcañiz, Teruel) y tras filtrar a través de varias capas de gasa, se obtuvo el conjunto de la biomasa por centrifugación. Las muestras se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta su uso.

EXTRACCIÓN DEL DNA TOTAL: Se tomó 0,03 g de masa celular, resuspendiéndose la muestra en 300 μ l de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 1 mM EDTA, pH 8) y 1% Tritón-X 100. Tras calentar a 95°C durante 4 min, se procedió a la extracción del DNA utilizando fenol-cloroformo (1:1). La extracción se realizó dos veces en proporción 1:1 (v/v) con la muestra. Se centrifugó durante 2 min a 13.000 rpm para separar las fases.

AMPLIFICACIÓN DE LOS PROMOTORES: De acuerdo con la secuencia previamente publicada del operón *mcy* de *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, (Tillet *et al.*, 2000. Figura 1) se seleccionaron secuencias promotoras, y se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes, utilizándose 20 μ l de la fase acuosa obtenida anteriormente. Se llevó a cabo la amplificación utilizando los oligonucleótidos diseñados para las regiones promotoras J, H, E, G, DA de *Microcystis* PCC7806 en condiciones de hibridación muy permisivas 46°C , o más restrictivas, 57 °C (*T. annaling*), obteniéndose en este último caso una sola banda. Los fragmentos de DNA clonados se purificaron mediante los productos GFX PCR DNA y Gel Band Purification (Amersham-Pharmacia).

EXPERIMENTOS DE RETARDO EN GEL: Se utilizó una proteína recombinante clonada y sobreexpresada de acuerdo con lo descrito en Hernández *et al.* (2002). Los extractos se obtuvieron y purificaron parcialmente según lo descrito en Bes *et al.* (2001). El estudio de retardo en geles se llevó a cabo utilizando la metodología descrita en Bes *et al.* (2001). Se utilizó un tampón que contenía 10 mM Bis-Tris, pH 7.5, 2 mM de DTT, 40 mM KCl, 0.1 mM MnCl₂, 0.5 mg/ml BSA y 15% glicerol. Los fragmentos de DNA usados se obtuvieron

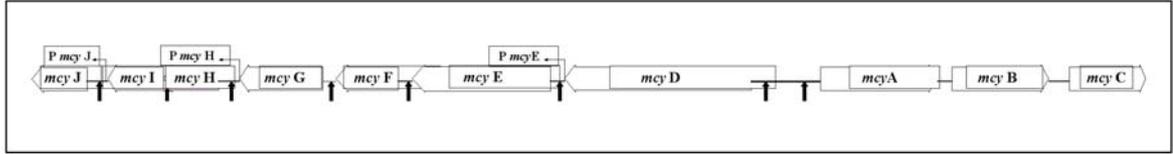


Figura 1.—Localización de potenciales secuencias de unión de Fur en el operón *mcy* de *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (Tillet *et al.*, 2000). Las flechas señalan las regiones promotoras en las que se ha localizado una potencial caja Fur

por PCR y su posterior purificación fue llevada a cabo mediante los “kits” GFX PCR DNA y Gel Band Purification (Amersham-Pharmacia). Para demostrar la especificidad de la unión de la proteína a un determinado promotor, las incubaciones se llevaron a cabo en presencia de un DNA competidor no específico, el cuarto exon de la Apo-E humana.

3. Resultados

El estudio de las secuencias publicadas del operón *mcy* permitió localizar varias secuencias, en las regiones promotoras de algunos genes, potencialmente identificables como una caja de unión de la proteína Fur. La secuencia utilizada como secuencia consenso para establecer la comparación, fue la descrita previamente en Bes *et al.*, (2001), y que correspondía con la secuencia de unión de Fur presente en la zona promotora del gen de la flavodoxina. Presentaban cajas de unión de Fur la mayoría de las regiones promotoras del operón *mcy*, (señaladas con una flecha en la Figura 1).

A partir del DNA cromosómico obtenido del conjunto de células procedentes de La Estanca, y utilizando los oligonucleótidos complementarios a las regiones del operón *mcy* en las que se había localizado una potencial caja de unión de Fur, fue posible amplificar 3 fragmentos de las regiones denominadas J, E y H. No resultó posible amplificar la región DA ni G utilizando los oligonucleótidos diseñados con las secuencias de *Microcystis aeruginosa* PCC 7806.

La figura 2 muestra el alineamiento de las regiones amplificadas, E, J y H (ver correspondientes en figura 1) con las secuencias publicadas para la cepa PCC 7806 de *Microcystis aeruginosa*. La figura muestra que la homología es alta en los tres casos mostrando que mientras en el caso de E y de J la identidad es del 98% y 99% respectivamente, en el caso de la región H, ésta se limita al 74%. En la figura se muestran con una barra las secuencias identificadas como potenciales cajas Fur, en algún caso, solapadas.

Se llevaron a cabo estudios de retardo en gel utilizando los fragmentos citados, una vez purificados. Los fragmentos, que presentaban potenciales cajas de unión a Fur, se

incubaron con la proteína FurA procedente de otra cianobacteria, *Anabaena* PCC 7120. La proteína FurA presentó una débil unión a los promotores, ya que únicamente se observaba retardo a altas concentraciones de proteína, 1 μ M (Figura 3). Otras concentraciones de proteína FurA, tales como 250 y 350 nM no indujeron ningún cambio.

Extractos crudos de las células recolectadas en La Estanca fueron incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos obtenidos contra la proteína FurA de *Anabaena* PCC 7120. Las muestras se centrifugaron y los precipitados se sometieron a una electroforesis desnaturalizante en presencia de SDS (15% de poliacrilamida), y a una posterior transferencia a una membrana de PVDF. La tinción de las proteínas obtenidas indicó que había una proteína mayoritaria con reacción cruzada con los anti-Fur de *Anabaena* PCC 7120, (carriles 4 y 5 de la Figura 4), que tenía mayor peso molecular que la utilizada como control, Fur de *Anabaena* (carriles 1, 2 y 3 de la Figura 4). Esta potencial proteína Fur podría también proceder de alguna de las cianobacterias presentes en las células de partida, no necesariamente de *Microcystis*, aunque ésta era la población mayoritaria.

4. Dicción

Fur es una proteína reguladora que se piensa que afecta a gran número de genes, incluyendo algunos no directamente relacionados con el metabolismo o la incorporación de hierro (Escolar *et al.*, 1999). Se ha propuesto que Fur podría ser un regulón de primera magnitud en los procariotas, controlando rutas clave. En bacterias heterótrofas patógenas se ha demostrado que la expresión de factores de toxicidad está controlada por la proteína Fur, que ante la escasez de hierro disponible, deja de reprimir una serie de genes que expresan toxinas. Las toxinas destruyen a las células circundantes, por ejemplo glóbulos rojos, que originan el hierro suficiente para garantizar su proliferación y no ver su crecimiento limitado por la escasez de este metal.

En cianobacterias, Fur reprime, entre otros genes, la expresión de la flavodoxina, una flavoproteína de pequeño tamaño que se induce en condiciones de deficiencia de hierro. El hecho de que en años anteriores se demostrara inequívocamente, mediante fertilización *in situ*, que el hierro es el elemento limitante en ciertas regiones oceánicas llamadas HNLC (high nutrients low chlorophyll, altos nutrientes y baja clorofila) (Coale *et al.*, 1996) indica que el metabolismo del hierro puede ser crucial en la supervivencia y crecimiento de las cianobacterias.

Existe muy poca información en cuanto a la regulación de la expresión de las enzimas relacionadas con la síntesis de microcistina. Se ha descrito que la luz regula la transcripción del operón *mcy* en *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (Kaebernick *et al.*, 2002),

pero por el momento no se ha encontrado ningún otro factor de regulación. Como dato interesante podemos apuntar que se han observado cajas de unión a Fur en general, en los genes regulados por luz.

Un factor importante en la regulación de la síntesis de microcistinas, podría ser en nuestra opinión, la disponibilidad de hierro, y Fur podría estar mediando esa regulación. En principio Fur es un represor, que en presencia de Fe^{++} se une al DNA e impide la transcripción de los genes a los cuales regula. Las cianobacterias tienen mecanismos de adquisición de hierro muy importantes, lo cual les confiere una ventaja muy grande en cuanto a competencia con otros organismos debido a la producción de sideróforos. Muchos de estos mecanismos de adquisición de hierro, están regulados también por Fur. En la literatura hay datos contradictorios con respecto a la influencia del hierro y la expresión de toxicidad, aunque Lukac y Aegerter (1993) y Lyck et al, (1996) demuestran que la deficiencia de hierro da lugar a una mayor producción de microcistina, interpretándolo como una respuesta a un estrés. Deficiencia de hierro provocaría la no funcionalidad de Fur, y el cese de represión de los genes afectados.

Nuestra hipótesis consiste en que un exceso de nutrientes, incluido el hierro, provocan una proliferación incontrolada de fitoplancton, con fuerte predominio de las cianobacterias con mejores sistemas de adquisición de nutrientes, y esta proliferación da lugar a un colapso en que se induce una deficiencia secundaria de hierro, por otra parte muy poco soluble en ciertos pHs típicos de blooms tóxicos. La deficiencia de hierro daría lugar a la expresión de los factores de toxicidad, antes bloqueados, y a la síntesis de microcistina. En algún caso, hay una referencia indicativa de que el hierro estimula la producción de microcistina (Utkilen and Gjome, 1995), pero en nuestra opinión, esto podría ser debido a un efecto del hierro sobre proliferación de las células, y posterior deficiencia indirecta.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias al proyecto P073/2001 de la Diputación General de Aragón y a una Beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador de D.G.A. concedida a Beatriz Martín Luna.

Referencias

- [1] Bes, M.T., Hernández, J.A., Peleato, M.L. y Fillat, M.F. (2001) Cloning, overexpression and interaction of recombinant Fur from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7119 with isiB and its own promoter. FEMS Microbiology Letters **194**, 187-192.
- [2] Escolar, L., Pérez-Martin, J. y de Lorenzo, V. (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. J. Bacteriol. **181**, 6223-6229.

- [3] Coale, K.H., Johnson, K.S., Fitzwater, S.E., Gordon, R.M., Tanner, S., Chavez, F.P., Ferioli, L., Sakamoto, C., Rogers, P., Millero, F., Steinberg, P., Nightingale, P., Cooper, D., Cochlan, W.P., Landry, M.R., Constantinou, J., Rollwagen, G., Trasvina, A. y Kudela, R. (1996). A massive phytoplankton bloom induced by an ecosystem-scale iron fertilization experiment in equatorial Pacific Ocean. *Nature* **383**, 495-501.
- [4] Boyd, P.W. (2000) A mesoscale phytoplankton bloom in the polar southern Pacific ocean stimulated by iron fertilization. *Nature* **407**, 695-702.
- [5] Hernández, J.A. M. Teresa Bes, María F. Fillat, José L. Neira and M. Luisa Peleato. (2002). Biochemical analysis of the recombinant Fur protein from *Anabaena* PCC 7119; factors affecting its oligomerization state. *Biochemical Journal*. **366**, 315-322.
- [6] Kaebernick, M., Neilan, B.A. (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**, 1-9.
- [7] Kaebernick, M., Dittmann, E., Börner, T. and Neilan, B.A. (2002) Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 449-445.
- [8] Lukac, M. y Aegerter, R. (1993) Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*. **31**, 293-305.
- [9] Lyck, S., Gjolme, N. y Utkilen, H. (1996). Iron starvation increases toxicity of *Microcystis aeruginosa* CYA 228/1 (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phycologia*, **35**, 120-124.
- [10] Tillet, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T y Neilan, B. (2000). Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-poliketide synthetase system. *Chemistry and Biology*, **7**, 753-764.

```

region H  GGAGGAGAAAACAGCATTC CCCCATGAACTTATTACCTAAGAAAATGTCCTTCCTTTAAGAN 60
mcyH      GGAGGAGAAAACAGCATTC CCCCATGAACTTATTACCTCTGAAAATGTCCTTCCTTTAAGAT 60

region H  CCGGATGGATACCACTCCTAGGAGCGNANATMAAANNMNAATTANCMAAAAANAGATGAGAA 120
mcyH      CCGGATGGATACCACTCCTAGGAGCGCAATCAATTTCCGATTGTCAAAAAATTGATGAGAG 119

region H  CTNTTNNMGGNATCTCTGCTNAAAAANNNMGATNTTNTGNATTTTGAA----- 166
mcyH      CTNTTACGGTTTCTCTGTTCAAAAATATGGAGTTTGCATAGTTTGAAATATAGGGTAACTTT 179

region H  ----- 166
mcyH      TAGGAAAATGCCTTGAATTTTTTTTTAACTTCAAGCTTTCTAACTTCAAGGCTTAGGATTAT 239

region H  ----- 166
mcyH      TTAATCTCCTAAAAAAGCCTCCAAATCAGTAAGTTCTTG 278

region E  CTCTCAACCATGCCCTATTCTCTATAAATTTCTAAATTTATACGCCGTTAAACATAAATTA 60
pmcyE    CTCTCAACCATGCCCTATTCTCTATAAATTTCTAAATTTATACGCCGTTAAACATAAATTA 60

region E  GGATGCTGTGCTATCAGTAAATATAAACCCAAATTTAACCTCCAGAGAGTTAAGCTTACTC 120
pmcyE    GGATGCTGTGCTATCAGTAAATATAAACCCAAATTTAACCTCCAGAGAGTTAAGCTTACTC 120

region E  ATGTTTCATCTACCTATCCTACCACATCTCATGGCTTTTGAAACATTAATTTTTAAAGTTTA 180
pmcyE    ATGTTTCATCTACCTATCCTACCACATCTCATGGCTTTTGAAACATTAATTTTTCAAGTTTA 180

region E  ACCTCCATATTGATCAAGCTCCG 203
pmcyE    ACCTCCATATTGATCAAGCTCCG 203

region J  CTGATCTTGCAAAAAACGCCATTTCTCGAACCGGATTAAGGATAAATTGTTTGATGCTTGC 60
pmcyJ    CTGATCTTGCAAAAAACGCCATTTCTCGAACCGGATTAAGGATAAATTGTTTGATGCTTGC 60

region J  CCAGCGATTACGCCATTCATCTTTGAGGGGAATTTTGCCGATGTTTTCCAAATTATTATC 120
pmcyJ    CCAGCGATTACGCCATTCATCTTTGAGGGGAATTTTGCCGATGTTTTCCAAATTATTATC 120

region J  CTCCTAAGGATTTTGCAGAAAATATTGCCATTTTTAACTTAACCGAATCCCTGAGATTCTCT 180
pmcyJ    CTCCTAAGGATTTTGCAGAAAATATTGCCATTTTTAACTTAACCGAATCCCTGAGATTCTCT 180

region J  AGATGCTTTAAAAAAGATTCCACGCCTCCGGATTAATC 218
pmcyJ    AGATGCTTTAAAAAAGATTCCACGCCTCCGGATTAATC 218

```

Figura 2.—Secuencia de las tres regiones promotoras amplificadas, H, E y J. Las secuencias se muestran alineadas con las correspondientes en el operón *mcy* de *Microcystis aeruginosa*. Las potenciales cajas de unión de la proteína Fur se encuentran señaladas con una barra en la parte superior.

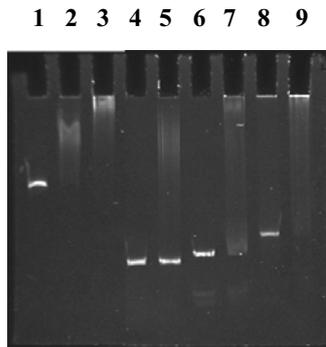


Figura 3.—Retardo en gel de las regiones H, E y J en presencia de FurA 1 mM. Carriles 1, 2 y 3: control positivo con la region promotora de furA (1) y esta región promotora en presencia de FurA 750 nM (2) y 1 μ M (3). Carriles 4 y 5: promotor E sin (2) y con (3) FurA 1 μ M. Carriles 6 y 7: promotor J sin (6) y con (7) FurA 1 μ M. Carriles 8 y 9: promotor H sin (8) y con (9) FurA 1 μ M.

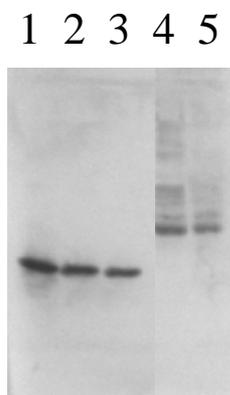


Figura 4.—Transferencia de Western de inmunoprecipitados obtenidos tras incubación de extractos crudos de muestras de La Estanca. Carril 1: 1 μ g de FurA pura ; carril 2: 0.5 μ g de FurA pura; carril 3: 0.25 μ g de FurA pura; carril 4: extracto crudo de muestras de La Estanca, con 64 μ g de proteína total, incubadas con anticuerpos antiFurA de *Anabaena* PCC 7120. Se aplicó el inmunoprecipitado; carril 5: muestra análoga a la aplicada en el carril 4, pero con 42 μ g de proteína total.