

Expresión coordinada de una proteína de 42kDa y plastocianina en el alga verde verde *Scenedesmus vacuolatus*

M. Dolores Miramar, M. Luisa Peleato y Luis A. Inda

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

Abstract

To maintain photosynthetic competence under different nutritional conditions, the green alga *Scenedesmus vacuolatus* is able to use either a hemo protein, cytochrome c_6 or a copper protein, plastocyanin, depending on the iron and copper availability. A 42 kDa protein, crossreactive with plastocyanin antibody is coordinately expressed with plastocyanin in response to changes in copper availability.

Resumen

Se ha purificado una nueva proteína del alga verde *Scenedesmus vacuolatus*. Esta proteína presenta reactividad cruzada con los anticuerpos de plastocianina, tiene un peso molecular aparente de 42 kDa, un punto isoeléctrico ácido. Esta proteína parece verse afectada por la disponibilidad de cobre, y se expresa coordinadamente con la plastocianina.

1. Introducción

La plastocianina es una pequeña proteína que contiene cobre, y que lleva a cabo un importante papel redox en organismos fotosintéticos. Este transportador soluble de un electrón se encuentra en el espacio tilacoidal y transfiere electrones desde el citocromo f al fotosistema I. Algunas algas y cianobacterias, bajo deficiencia de cobre son capaces de sustituir esta cuproproteína por otro transportador que contiene hemo, el citocromo c_6 . En contraste, solo plastocianina ha sido encontrada en las plantas superiores, y está ampliamente aceptado que el citocromo ha sido evolutivamente eliminado. La cantidad relativa de ambas proteínas, cuando estas coexisten, está regulado por cobre, que reprime la transcripción del gen del citocromo c_6 (Merchand y Bogarad, 1986).

En el trabajo de purificación y caracterización de la plastocianina del alga verde *Scenedesmus vacuolatus* (Miramar *et al.*, 2002) se detectó una proteína que presenta reactividad cruzada con los anticuerpos generados contra la plastocianina. En este trabajo se describe la purificación de esta proteína, su expresión en medios de cultivo con diferentes disponibilidades de hierro y cobre.

2. Materiales y Métodos

CULTIVO DE *Scenedesmus vacuolatus*

Las células se cultivaron a 28 °C con el medio de cultivo descrito por Kessler y Czygan (1970). Las células se iluminaron con un panel de luces fluorescentes ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y se burbujearon con aire y CO_2 al 5%. Las células fueron cultivadas en medios deficientes de hierro ($0,18 \mu\text{M}$) con cobre ($1 \mu\text{M}$) y en medios completos de hierro ($18 \mu\text{M}$) y nada de cobre.

PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA

Las células se rompieron utilizando un molino de bolas (Vi 4 de Edmund Bühler). Para ello se mezclan 160 g de bolas de circonio (de $500 \mu\text{m}$ de diámetro) por cada 20 g de algas y 25 ml de tampón de homogenización. El tampón de homogenización consiste en: Tris-acetato 50 mM pH 8, MnCl_2 5mM, β -mercaptoetanol 1 mM, EDTA 1 mM y el inhibidor de proteasas PMSF (fluoruro de fenil-metil-sulfonilo) $10 \mu\text{M}$. Las membranas y células no rotas se retiraron por centrifugación a 18000 g durante 20 minutos a cuatro grados. El sobrenadante resultante se precipitó con un 90% de acetona pre-enfriada ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$). El nuevo precipitado obtenido se separó por centrifugación y se eliminó la acetona restante por evaporación en campana extractora.

El precipitado se resuspendió en tampón de homogenización y se centrifugó a 18000 g durante 10 minutos.

Este extracto proteico crudo se pasó por una primera columna de DEAE-celulosa ($3 \times 65 \text{ cm}$) previamente equilibrada con Tris-HCl 50 mM pH 8. La elución se llevó a cabo mediante un gradiente salino de 0 a 0,5 M de NaCl. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante medidas de absorbancia a 280 nm y mediante el test de Ouchterlony. Las fracciones que contenían p42 se juntaron y dializaron frente a Tris-HCl 50 mM pH 8.

Se realizó una segunda cromatografía de DEAE-celulosa para separar la plastocianina de la p42. La columna ($2 \times 31 \text{ cm}$) se eluyó utilizando un gradiente salino de 0 a 0,4 M de NaCl. La fracción que contiene p42 se dializó y concentró con una célula Amicon (Grace).

Esta fracción se sometió a una nueva cromatografía por FPLC, usando una columna Mono-Q 10 (Pharmacia). El disolvente A fue Tris 20 mM pH 8 y el B fue Tris 20 mM

pH 8 y NaCl 1 M. El gradiente fue de 0 a 55 % en 30 minutos. Las fracciones obtenidas se examinaron por absorbancia a 280 nm, electroforesis y por la técnica de Ouchterlony.

MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS

Los anticuerpos anti-plastocianina se obtuvieron como se describe en Bes *et al.* (1999).

La reactividad cruzada se estudió con la técnica de Ouchterlony (1949).

Los análisis de western-blot se llevaron a cabo usando los anticuerpos anti plastocianina al 0,5% (v/v). Las muestras se corrieron en geles de SDS-PAGE al 15%, y se transfirió a filtros de PVDF (Waters). Las membranas fueron tratadas utilizando anticuerpos anti-IgG de conejo unidos a peroxidasa. Como sustrato de la peroxidasa se utilizó dioctil-sulfosuccinato y 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina.

MÉTODOS ANALÍTICOS

La cuantificación de proteína totales se llevó a cabo por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

El contenido en clorofila se determinó espectrofotométricamente utilizando acetona como describió MacKinney (1941).

La lectura de la secuencia aminoterminal de la p42 se llevó a cabo en The Babraham Institute de Cambridge (U.K.). La muestra para secuenciación fue transferida a membranas de PVDF como se describe en LeGengre *et al.* (1993).

TÉCNICAS ENZIMÁTICAS. ACTIVIDAD ALDOLASA.

Se determinó el descenso de absorbancia por minuto a 340 nm, causado por la oxidación del NADH a NAD⁺.

La mezcla de reacción contenía: Glicil-glicina-KOH pH 7,5 60 mM, KCl 0,15 M, Fructosa 1,6 difosfato 30 mM, Triosa fosfato isomerasa 1 UI, α -glicerofosfato deshidrogenasa 1 UI, NADH 1mM y muestra proteica.

3. Resultados y discusión

Las anticuerpos generados contra la plastocianina, no sólo reconocen a la plastocianina, sino que también reconocen a otra proteína. Utilizando la técnica de doble difusión (Ouchterlony) se comprobó que el mismo antisuero reconocía a dos proteínas (Fig. 1).

La reactividad cruzada podría ser debida a la presencia de un mismo determinante antigénico en ambas. Se excluyó que se tratara de una contaminación inicial al generar los anticuerpos, ya que no se observó una banda de precipitación extraña entre el antisuero y la proteína utilizada en su generación. El antisuero fue generado a partir de la proteína pura, la cual sólo produjo una señal. Esta analogía antigénica entre varias proteínas de un mismo organismo ha sido descrita previamente en proteínas ferredoxín-dependientes de al-

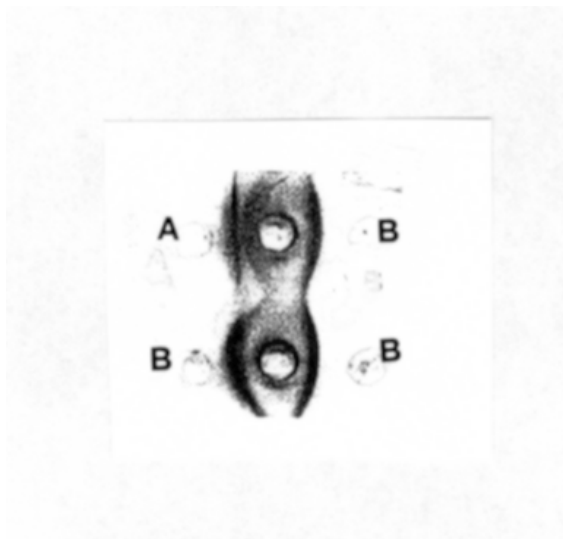


Figura 1.—Gel de Ouchterlony. En los pocillos centrales se colocó el suero anti-plastocianina. En el pocillo A se aplicó extracto total de proteínas solubles de *S. Vacuolatus* y en B se aplicaron muestras de la misma fracción de plastocianina pura de *S. Vacuolatus* utilizada para la inoculación de los conejos.

gas (Gotor *et al.*, 1990) y plantas (Knaff y Hirasawa, 1991). Esta proteína era ligeramente menos aniónica que la plastocianina ($pI= 3,9$), deducido a partir de su comportamiento en cromatografía de intercambio aniónico.

Transferencias de Western mostraron que la banda con reactividad cruzada correspondía a una masa molecular de 42 kDa (Figura 2, carril C).

Se consideró la posibilidad de que esta banda se debiera a oligomerización de plastocianina y un comportamiento anormal de estos oligómeros no afectándose por la presencia de SDS y β -mercaptoetanol. La formación de oligómeros en este tipo de geles había sido observado previamente en otras proteínas (Medina *et al.*, 1997; Kerfeld *et al.*, 1995), pero la plastocianina purificada y concentrada no daba lugar a esta banda pesada, por lo que se descartó esta posibilidad (Figura 2, carril A).

En el mismo experimento se analizaron muestras procedentes de cultivos en presencia y ausencia de cobre y se observó que esta proteína aparecía incrementada en cultivos sin deficiencia de cobre (Figura 3, carriles 1, 2 y 4), y que su comportamiento parecía paralelo al de la plastocianina. Con hierro en condiciones óptimas (carril 4), se observa otra banda con reactividad cruzada que identificamos como el precursor de la plastocianina, conteniendo el péptido señal para su introducción en el cloroplasto.

La purificación se realizó con varios pasos de cromatografía. En la primera cromatografía, columna de DEAE-celulosa, la elución se analizó espectrofotométricamente a varias longitudes de onda para determinar de forma específica la presencia de varias proteínas ya descritas. En el conjunto de fracciones que contenían plastocianina había considerables cantidades de p42. Este conjunto de fracciones que contenían plastocianina

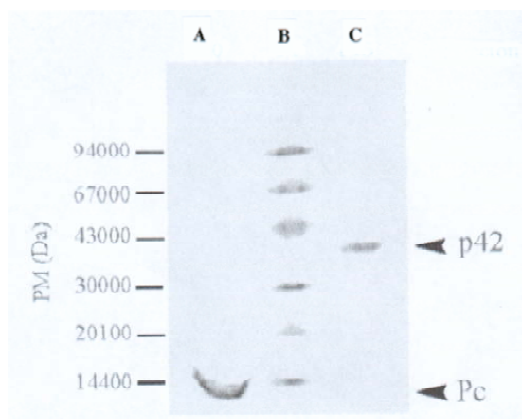


Figura 2.—Gel de electroforesis SDS-PAGE de dos fracciones eluídas de la cromatografía de FPLC. Carril A= muestra de plastocianina pura., Carril B= patrones de peso molecular, Carril C= proteína de 42 kDa pura.

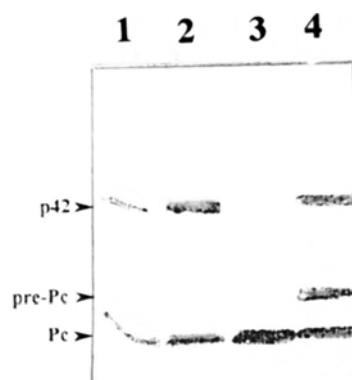


Figura 3.—Western-blot (electroforesis SDS-PAGE al 15% y transferencia a filtro de PVDF) de proteínas procedentes de extractos solubles de células de *S. vacuolatus* crecidas en diferentes condiciones de hierro y cobre. Carril 1: extracto de células crecidas con Fe 9 μM y Cu 0 μM . Carril 2: extracto de células crecidas con Fe 9 μM y Cu 1 μM . Carril 3: Plastocianina. Carril 4: extracto de células crecidas con Fe 18 μM y Cu 1 μM .

y p42 se dializó y sometió a una segunda cromatografía, también de DEAE-celulosa. Una nueva cromatografía en FPLC de intercambio iónico permitió separarla de las impurezas de plastocianina. En la figura 2 se observa un gel de electroforesis con dos muestras de proteínas separadas en la tercera cromatografía.

La proteína purificada se sometió a secuenciación del extremo amino-terminal, obteniéndose la secuencia:

1 K Y D E E L V Q T A N K K K S S S G R G 21

Se buscaron secuencias homólogas a la secuencia aminoterminal de p42 en las bases de datos Swiss-Protein (www.expasy.org/sprot/) (Bairoch y Apweiler, 2000) y EMBL (www.embl-heidelberg.de), con resultados meramente especulativos.

La máxima homología comparando con secuencias conocidas de proteínas correspondió

con la fructosa difosfato aldolasa de arroz (12 de 19 aminoácidos) y de otra alga verde, *Chlamydomonas reinhartii* (8 de 10 aminoácidos). Esta proteína tiene el peso molecular aproximado coincidente con nuestra proteína problema, pero por el contrario, el pI de todas las aldolasas caracterizadas hasta el momento es básico y el punto isoeléctrico de la p42 es aniónico. Las pruebas de actividad aldolasa realizadas con p42 purificada resultaron negativas, por lo que no se puede asumir que se trate de esta proteína. Aunque se han descrito tres tipos de aldolasas en los organismos fotosintéticos, con distintos requerimientos bioquímicos para ser activas, las de algas verdes, rojas y pardas no necesitan requerimientos especiales (Gibbs y Latzko, 1979).

La comparación con las bases de datos de genomas conocidos no aportó tampoco más luz al problema. Ninguna hipotética proteína de cianobacterias presentaba homología con p42, y en este caso la mayor homología la presentaba con una hipotética proteína inducible por NaCl (13 de 20 aminoácidos), acídica, pero de 7 kDa también presente en el alga verde *Chlamydomonas reinhartii*.

Los resultados obtenidos indican que se trata de una proteína desconocida que aumenta su concentración en presencia de cobre, que tiene un peso molecular de 42 kDa y un punto isoeléctrico cercano a 4.

Referencias

- [1] Bairoch A. y Apweiler R. (2000). *Nucleic Acid Res.*, **28**, 45-48.
- [2] Bes M.T., Parisini E., Inda L.A., Saraiva L.M., Peleato M.L. y Sheldrick G. (1999). *Structure*, **7**, 1201-1211.
- [3] Gibbs M. y Latzko E. (1979). *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol. **6**. Springer-Verlag.
- [4] Gotor C., Pajuelo E., Romero L.C., Márquez J.A. y Vega J.M. (1990). *Arch. Microbiol.* **153**, 2309-234.
- [5] Kerfeld C.A., Anawa H.P., Interrante R, Merchant S. y Yeates T.O. (1995). *J. Mol. Biol.* **150**, 627-647.
- [6] Kessler E. y Czygan F. C. (1970). *Arch. Mikrobiol.*, **70**, 211-216.
- [7] Knaff D.B. y Hirasawa M. (1991). *Biochim. Biophys. Acta* **1056**, 93-125.
- [8] LeGendre N., Mansfield M., Weiss A. y Matsudara P (1993). En *A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing*. Matsudara P.(ed). pp 71-101. Academic Press. San Diego (CA).
- [9] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951). *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

- [10] MacKinney G. (1941) *J. Biol. Chem.*, **140**, 314-322.
- [11] Medina M., Louro R., Gagmon J., Peleato M.L., Mendes J., Gómez Moreno C., Xavier A. y Teixeira M. (1997). *J. Biol. Inorg. Chem.* **2**, 225-234.
- [12] Merchand S. y Bogorad L. (1986). *Mol. Cell. Biol.* **6**, 462-469.
- [13] Miramar M.D., Inda L.A., Saraiva L.M. y Peleato M.L. (2002) enviado a *J. of Plant Physiology*.
- [14] Ouchterlony O. (1949). *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **26**, 507-511.