

SESIÓN V. Regulación hormonal de las respuestas al estrés.

POLIAMINAS EN ALGAS: ACTIVIDAD TRANSGLUTAMINASA DURANTE LA ACLIMATACIÓN SALINA Y EN LA ORGANIZACIÓN DEL FICOBILISOMA.

García-Jiménez P y Robaina RR

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 35017 Las Palmas de Gran Canaria.

RESUMEN

Se ha estudiado el papel de las transglutaminasas en el alga roja multicelular *Grateloupia doryphora* (Montagne) Howe en condiciones de hiposalinidad. Los resultados muestran que las fracciones libres de Put, Spd y Spm incrementan principalmente debido a la disminución de la actividad de esta enzima, junto a un ligero aumento de la actividad de la arginina descarboxilasa. Aparentemente, la acumulación de poliaminas de la fracción libre puede servir para la mejor aclimatación, al encontrarse que las actividades fotosintéticas de los talos y los cloroplastos aislados incrementan en presencia de las poliaminas. Centrando el estudio en los ficobilisomas, antena fotosintética en Rodófitas, se determinó, por autorradiografía y valoración del producto γ -glutamil –poliaminas, que existe actividad transglutaminasa asociada, capaz de unir poliaminas con los polipéptidos de bajo peso molecular e independientemente de las condiciones de salinidad.

INTRODUCCIÓN

La unión covalente de las poliaminas (PAs) y macromoléculas (e.g. proteínas) está catalizada por las transglutaminasas (TGasas, R-glutaminil peptide:amino γ -glutamil transferasa, EC.2.3.2.13)). Estas uniones reversibles indican un posible mecanismo de regulación de los procesos básicos de crecimiento y desarrollo o de respuesta al estrés, donde los niveles de las PAs desempeñarían su papel en la adaptación o la protección frente a diferentes circunstancias. Las algas intermareales están sometidas a variaciones diarias de salinidad por lo que se entiende que deben aclimatarse muy rápidamente a estas situaciones ambientales. En estos vegetales, se ha descrito el papel de las poliaminas en un evento de reproducción muy característico como es la formación y maduración de su estructura reproductora, el cistocarpo (Guzmán–Uriostegui et al. 2002, Sacramento et al. 2004). Por el contrario dentro del marco de las situaciones de estrés y a pesar del entorno donde viven, poco se conoce sobre el papel de estas sustancias.

En este contexto planteamos la hipótesis que bajo condiciones de hiposalinidad, las cantidades de poliaminas podrían verse alteradas para permitir la aclimatación al medio. Los objetivos de este trabajo fueron i) correlacionar los posibles cambios de los niveles endógenos con las actividades enzimáticas de síntesis (ODC, ADC y, Arginasa) y de interconversión entre las fracciones libres y conjugadas (TGAsas); ii) valorar la respuesta fotosintética para explicar su adaptación y los potenciales beneficios de la acumulación selectiva en una fracción, iii) determinar si existe una actividad transglutaminasa sobre la antena captadora de luz, denominada ficobilisoma en las algas rojas, considerando que ésta está constituida de proteínas y complejos de proteína-pigmento.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Grateloupia doryphora (Halymeniaceae, Rhodophyta) es una macroalga intermareal que se encuentra en la costa noreste de la isla de Gran Canaria. Su cultivo en condiciones axénicas se realiza de manera rutinaria en nuestro laboratorio según lo descrito por Robaina et al. 1990.

La extracción y separación de poliaminas por HPLC se realizó según lo descrito por Marcé y colaboradores (1995) con alguna modificación. El ruido generado por la fracción insoluble se redujo con la adición de 150 μ L de KOH (5N) en metanol a las poliaminas dansiladas e incubadas durante 30 min a 50°C. Transcurrido este tiempo, se añadió 1.5 mL de una solución acuosa de KH_2PO_4 (0.5 M) y Na_2HPO_4 (0.5 M). Las poliaminas se extrajeron finalmente con 4 mL de tolueno (Gross, comunicación personal).

La valoración de las actividades enzimáticas ODC y ADC se realizó según lo descrito en Sacramento et al. 2004. La actividad Arginasa se determinó espectrofotométricamente según el método descrito por Primikirios y Roubelakis-Angelakis (1999). La valoración de los complejos proteína-PA (γ -glutamil-PAs), se realizó a partir de la digestión en gel, del extracto crudo, separado por electroforesis en el sistema tricina-SDS según lo descrito por Schägger y von Jagow 1987.

La actividad fotosintética se determinó con fragmentos de talo (explantos) y con cloroplastos aislados. Los explantos fueron incubados durante 24 h en agua de mar de 36 ‰ o 18 ‰ de salinidad y en presencia/ausencia de 10^{-6} M de Put, Spd o Spm. El registro de las tasas de fotosíntesis se realizó a una intensidad de saturación de 200 μ moles fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ según lo descrito por Rodrigo y Robaina 1997. Los cloroplastos fueron aislados atendiendo a Leegood y Walker (1983). El grado de integridad de los cloroplastos se valoró sometiéndolos a un choque osmótico con agua bidestilada.

La incorporación de [1-¹⁴C]-Spd sobre el ficobilisoma (PBS) se realizó con los talos incubados en agua de mar de 36 ‰ y 18 ‰ de salinidad durante 24 h y en presencia de 0.9 µCi de Spd. Los PBSs fueron aislados según lo descrito por Rodrigo (1998). La incorporación de Spd radioactiva sobre los polipéptidos del PBS se reveló por contacto del gel de acrilamida con una placa autorradiográfica (Biomax MR1, Kodak.) durante 30 días a -20 °C. La actividad transglutaminasa asociada al PBS se valoró sobre los ficobilisomas procedentes de talos incubados en medios de salinidad 36 ‰ y en ausencia de Spd. El patrón de proteínas se reveló con nitrato de plata. Los complejos proteína-pigmento fueron teñidos específicamente con acetato de zinc (20 mM). Los complejos proteína-Spd (γ -glutamil- poliaminas) se extrajeron del gel de acrilamida en distintas etapas que constaban de una reducción, alquilación y digestión proteolítica. Finalmente, los γ -glutamil- poliaminas se sometieron a hidrólisis con HCl 12 N para liberar las PAs y poder ser cuantificadas por dansilación.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 13.0 (SPSS Inc. Chicago, USA). Los datos fueron analizados con el test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov para encontrar diferencias entre los diferentes tratamientos.

RESULTADOS

Los niveles endógenos de la Put, Spd y Spm de los talos incubados durante 24 h en 18 ‰ y 36 ‰ de salinidad se muestran en la figura 1. La cantidades de estas tres PAs incrementan significativamente en la fracción libre de los talos cultivados en 18 ‰, mientras que en las fracciones conjugadas (solubles e insolubles), las de la Put y Spd decrecieron significativamente y las de la Spm incrementaron bajo estas mismas condiciones. No se encontraron diferencias significativas en el total de las PAs (26.14 ± 4.5 in 18‰, y 19.76 ± 4.2 in 36 ‰).

Todas las actividades enzimáticas fueron detectadas. Las actividades de la ODC, de la TGasa y la Arginasa disminuyeron en los talos incubados en 18‰. Por el contrario, se observó un ligero incremento de la actividad ADC (tabla 1).

Las tasas fotosintéticas (Pmax) de los talos cultivados en presencia/ausencia de las poliaminas en los diferentes medios son comparadas en la figura 2 y la tabla adjunta. Se observó que la Pmax tendía a incrementar cuando la Put, Spd y Spm estaban presentes. Los registros más altos y, significativamente diferentes, se determinaron en presencia de la Spd en medios de 18‰. En los cloroplastos aislados se observó un incremento en la pendiente de los

registros cuando la Spm fue añadida (120%). La liberación de oxígeno fue inhibida, en todos los casos, por la presencia de DCMU en el medio.

No se encontraron diferencias estructurales en el bandeo de los polipéptidos del PBS de muestras procedentes de 36 ‰ y de 18 ‰. La autorradiografía reveló que la Spd se enlazó a las proteínas de masa molecular más pequeña, de manera diferencial a aquellas proteínas enlazadas a cromóforos (fig. 3). La digestión del gel de acrilamida permitió la extracción de las γ -glutamil- poliaminas y la valoración por HPLC de las PAs liberadas: 133,7 μ M PAs totales liberadas tras la hidrólisis vs. 34,7 μ M PAs previa a la hidrólisis.

DISCUSIÓN

G. doryphora tiende a modificar las fracciones libres de las tres poliaminas en condiciones hiposalinas (Fig.1), acumulando poliaminas en las mismas en detrimento de las fracciones conjugadas. A nivel enzimático, este mismo tratamiento (18‰) causó una disminución de la actividad ODC y Arginasa, mientras que, la ADC incrementó ligeramente, sin manifestar claras diferencias significativas. Aparentemente no existe un nuevo aporte de PAs, ya que las poliaminas totales permanecen constantes. La aclimatación dependería de la inhibición de la actividad transglutaminasa (Tabla 1) en 18%, aunque tampoco debe descartarse la presencia de actividad glutamil ciclo transferasa, la cual no hemos seguido. Con todo, la ADC manifiesta un papel preponderante sobre ODC en situaciones de estrés hiposalino. Esto coincide con el hecho de que la ADC sea una enzima alternativa en la síntesis de las poliaminas, relacionada principalmente con situaciones de estrés (Tiburcio et al. 1993).

En plantas superiores, las TGasas están implicadas en la unión de las PAs a componentes proteicos de la maquinaria fotosintética (Del Duca et al. 2000), mientras que, en el alga unicelular *Dunaliella*, son las encargadas de conjugar PAs a proteínas durante la organización del cloroplasto (Dondini et al. 2000). En macroalgas marinas es la primera vez que se muestra una implicación de estas enzimas.

Dado que la mayoría de la literatura referida a vegetales marinos muestra una relación entre las poliaminas y la estructura del cloroplasto, la síntesis de proteínas y la tasas fotosintéticas, nos preguntamos si en *G. doryphora* habría algún beneficio potencial por la presencia de estas aminas. Los talos sometidos a tratamiento hiposalino muestran incrementos de su Pmax en presencia de las tres poliaminas, siendo significativamente superiores a concentraciones de 10^{-6} M de Spd. Los experimentos con cloroplastos aislados muestran que el mayor incremento de Pmax se muestra en medios con Spm (10^{-6} M).

La existencia de una actividad TGasa asociada al ficobilisoma confirma la importancia de las poliaminas en la organización de estas antenas fotosintéticas. Por un lado la autorradiografía muestra la unión de [1-¹⁴C]-Spd a los péptidos de bajo peso molecular. Por otro lado, la extracción del producto de estas enzimas, la γ -glutamyl-Spd, determina que esta actividad TGasa es genuina. Esta actividad TGasa participa en la organización del PBS y es independiente de los tratamientos de salinidad. Será necesario ahondar en sus características hasta determinar si puede tratarse de una actividad constitutiva asociada a la misma organización proteica del ficobilisoma.

BIBLIOGRAFÍA

- Del Duca S, Dondini L, Della Mea M, Muñoz de Rueda P, Serafín-Fracassini D. (2000) *Plant Physiology and Biochemistry* 38(6): 429-439.
- Dondini L, Bonazzi S, Serafini-Fracassini D (2000) *J. Plant Physiol.* 157: 473-480.
- Guzmán-Urióstegui A, García-Jiménez P, Marián F, Robledo D, Robaina R. (2002) *Journal of Phycology* 38: 1169-1175.
- Lepri O, Bassie L, Thu-Hang P, Chritou P. (2002) *Theoretical Applications of Genetic* 105: 594-603.
- Marcé M, Brown DS, Capell T, Figueras X, Tiburcio AF (1995) *Journal of Chromatography B* 666: 329-335.
- Primikiriou NI, Roubelakis-Angelakis KA (1999) *Planta* 208: 574-582.
- Robaina RR, García-Reina G, Luque A (1990) *Hydrobiologia* 204/205: 137-142.
- Rodrigo M (1998) Tesis Doctoral. ULPGC.
- Rodrigo M, Robaina R.R (1997) *Marine Biology* 128: 689-694
- Sacramento AT, García-Jiménez P, Alcázar R, Tiburcio AF, Robaina R (2004) *J. Phycol* 40: 887-894.
- Tiburcio AF, Campos JL, Figueras X, Resford RT (1993) *Plant Growth Regulator* 12:331-40

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación del Ministerio de Educación y Ciencia (BFI2003-01244). Queremos agradecer las sugerencias en la determinación de actividades enzimáticas y fracciones insolubles de poliaminas del Dr. Wolfgang Gross (*in memoria*) a quien dedicamos este trabajo.

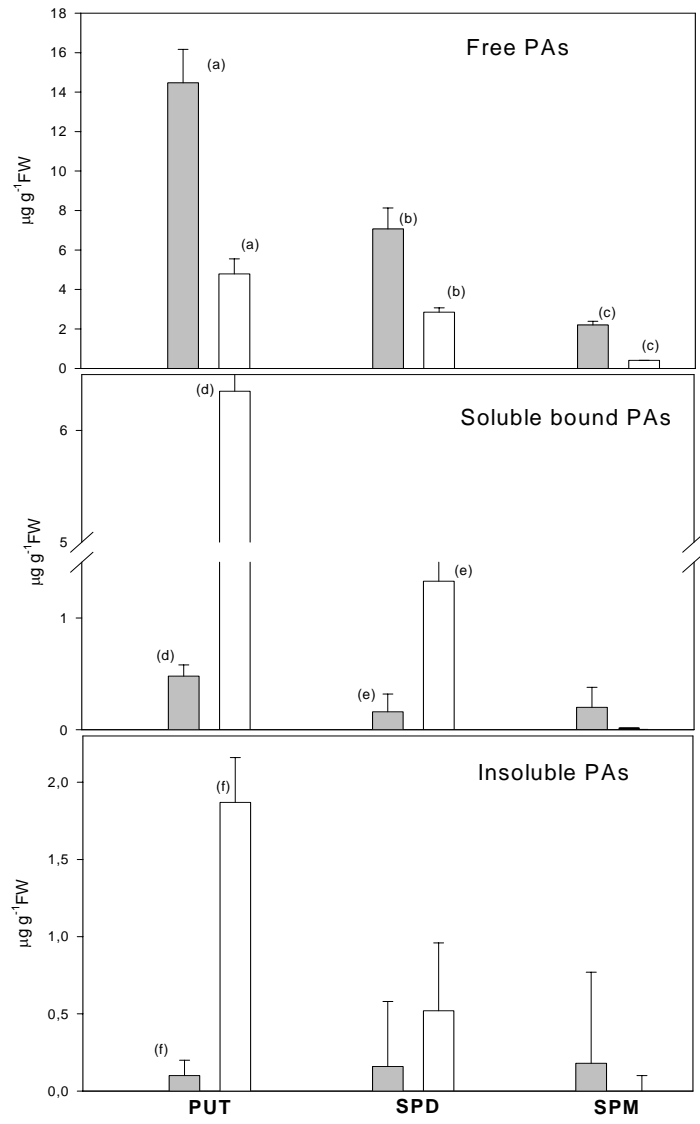
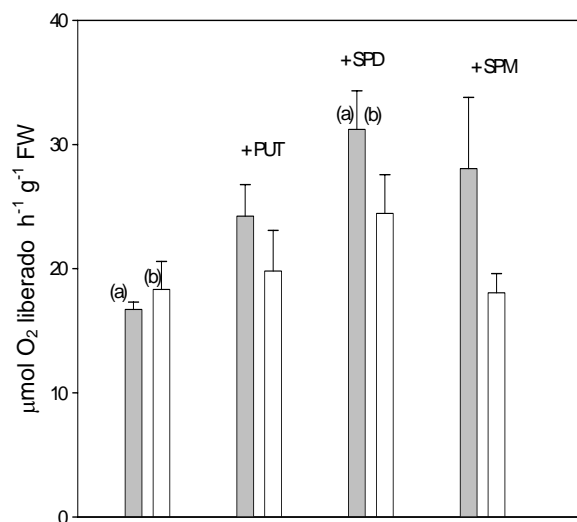
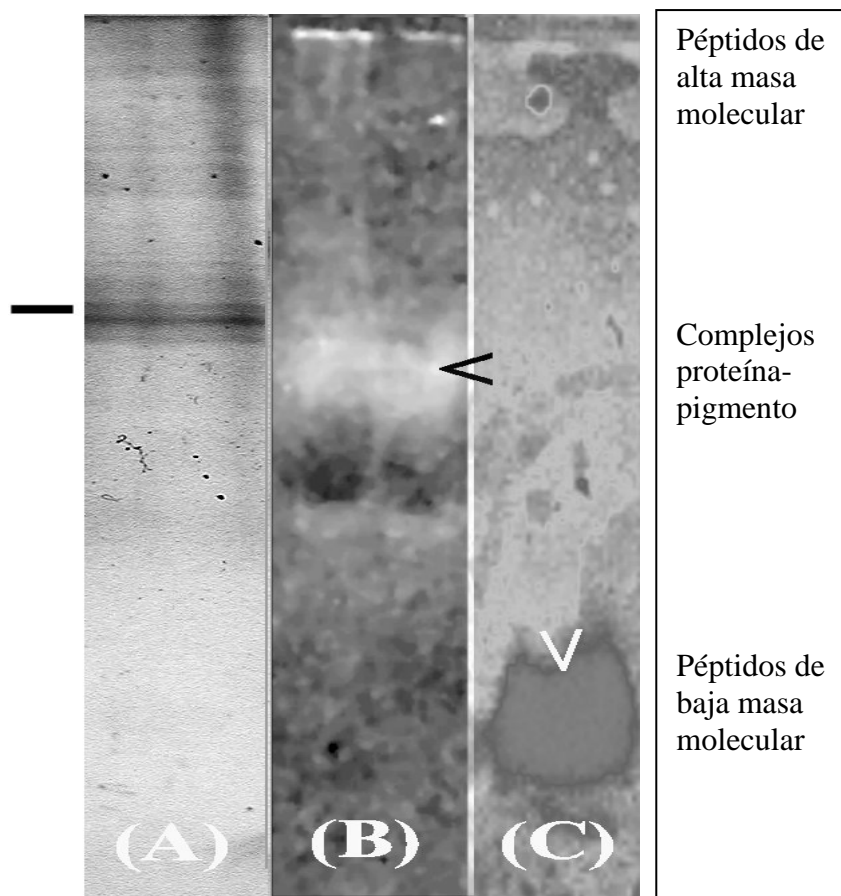


Tabla 1. Actividades de ADC, ODC, Arginasa and TGasa (mmoles producto mg^{-1} proteína h^{-1}) después de 24 h en agua de mar de 36‰ y 18 ‰. Los datos son la media de 3 muestras \pm error estándar; (*)= $p < 0.005$.

	Salinidad 36 ‰	Salinidad 18 ‰
ADC	0.82 ± 0.5	1.63 ± 0.42
ODC	0.24 ± 0.09	0.078 ± 0.04 *
Arginasa	35 ± 1.80	27.66 ± 7.50
TGasa	$4,11 \pm 0,40$	$0,76 \pm 0,16^*$



Tasa fotosintética de cloroplastos aislados ($\mu\text{mol O}_2$ liberado h^{-1}) (n=5)	
Control	+ SPM
$0,009 \pm 0,03$	$0,011 \pm 0,001$



LEYENDAS.

Figura 1. Niveles endógenos de Put, Spd y Spm ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso fresco) de todas las fracciones de los talos incubados durante 24 h en condiciones hiposalinas. (18‰, barras oscuras) y 36‰ (barras claras). Los datos son la media de 4-6 muestras ($n \pm$ error estándar). La misma letra indica diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

Figura 2. Actividades fotosintéticas de muestras incubadas durante 1 h en ausencia/presencia de Put, Spd y Spm (10^{-6} M) en medios 18‰ (barras oscuras) y 36‰ (barras claras). Los datos son la media de 4-6 muestras ($n \pm$ error estándar). La misma letra indica diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). La tabla adjunta muestra los valores de las tasas fotosintéticas de los cloroplastos aislados en condiciones control y tras la adición de Spm (10^{-6} M).

Figura 3. (A) Patrón de péptidos, revelados con nitrato de plata, de los PBS aislados después de una electroforesis Tricine-SDS. (B) Proteínas conteniendo cromóforos revelados con acetato de zinc (flecha). (C) Autorradiografía de PBS, mostrando acumulación de Spd sobre los péptidos de baja masa molecular (flecha). La línea horizontal indica la banda de BSA (65KDa), utilizada como referencia, bajo las mismas condiciones de separación.