

ACTIVIDAD TRANSGLUTAMINASA ASOCIADA AL FICOBILISOMA

GARCÍA-JIMÉNEZ PILAR, ROBAINA R. RAFAEL

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR.

CAMPUS UNIVERSITARIO DE TAFIRA S/N. 35017 LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

pgarcia@pas.ulpgc.es

INTRODUCCIÓN

La unión covalente de las poliaminas (PAs) y macromoléculas (e.g. proteínas) está catalizada por las transglutaminasas (TGasas, R-glutamil peptido: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.

Las algas rojas poseen una antena captadora de luz con una estructura muy particular, denominada FICOBILISOMA (FBS), la cual está constituida por complejos de proteínas y proteínas-pigmentos (ficobiliproteínas, FBP) capaz de aclimatarse a los cambios ambientales de luz. El tipo de unión entre estas moléculas no ha sido establecida.

En este contexto planteamos la hipótesis que las transglutaminasas podrían estar implicadas en la organización del ficobilisoma, considerando su composición y ductilidad a las condiciones ambientales.

MATERIAL Y MÉTODOS

El aislamiento de los ficobilisomas se realizó según los procedimientos descritos en Gray & Gantt (1975) y Wyman (1992) mediante un gradiente discontinuo de sacarosa donde el sedimento en la fracción de 1.5 M estaba constituido por FBS y las FBP libres en la correspondiente a 0.5 M. Estas estructuras fueron aisladas con diferentes grados de ensamblaje, atendiendo a las condiciones de cultivo:

- I. Ficobilisomas desensamblados a partir de talos cultivados en luz saturante.
- II. Ficobilisomas ensamblados a partir de talos cultivados en oscuridad durante 17-24 h.
- III. Ficobilisomas en vía de ensamblaje a partir de talos cultivados en luz saturante 7 h, seguidas de 17 h de oscuridad.

La formación de complejos de proteína-poliamina se reveló, incubando *in vivo* talos de *Grateloupia imbricata*, en presencia de la poliamina espermidina (Spd) radioactiva ($0.5 \mu\text{Ci}$; 1.85 MBq ml^{-1} ; $4.14 \text{ GBq mmol}^{-1}$) durante 7 h y con el aislamiento posterior de sus FBS. Los componentes de estos FBS fueron separados mediante electroforesis de gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente, este gel se reveló mediante autorradiografía (BioMax MR film) tras 30 d de exposición a -20°C .

In vitro, el re-ensamblaje de FBS en presencia de la Spd fría (10^{-6} M) y/o FBP (1FBS: 3FBP, v/v) se valoró con espectros de absorción.

La constatación de la presencia de γ -glutamyl-poliaminas se realizó extrayendo las proteínas del gel. Para ello las proteínas, una vez teñidas con nitrato de plata y alineado el gel con la película autorradiografiada como referencia de la localización de las moléculas radioactivas, fueron extraídas mediante digestión proteolítica. Finalmente, los γ -glutamyl-poliaminas resultantes se sometieron a hidrólisis ácida para liberar las poliaminas. La determinación y cuantificación de poliaminas se realizó según Sacramento et al. 2004. Las proteínas enlazadas a cromóforos fueron reveladas específicamente con acetato de Zn.

BIBLIOGRAFÍA Gray & Gantt 1975 Photochem Photobiol 21:121-128; Sacramento et al. 2004 J Phycol 50:887-894; Wyman 1992 Limnol Oceanogr 37: 1300-1306.

AGRADECIMIENTOS Ministerio de Ciencia y Tecnología (Plan Nacional I+D+i): BFI 2003-01244. Gobierno de Canarias PI 042005/140

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

POLIAMINAS UNIDAS A ELEMENTOS DEL FBS. El resultado obtenido mediante autorradiografía revela que la [^{14}C] Spd está asociada a aquellos péptidos de bajo peso molecular (Fig 1).

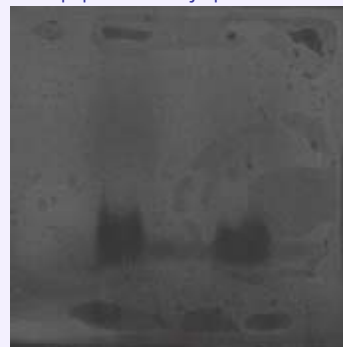


Fig 1. Autorradiografía de péptidos unidos a [^{14}C] Spd. Ambos pocillos se corresponden con condiciones de oscuridad. Dcha. FBS ensamblados; Izqda. FBS en vías de ensamblaje.

La determinación de γ -glutamyl-PAs, como PAs libres, revela que las PAs estaban unidas a los péptidos de bajo peso molecular (ca. 14-21 kDa). La presencia de las PAs libres, en el hidrolizado de las proteínas en gel, fue independiente de la presencia de Spd. La misma letra denota diferencias no significativas.

FRACCIÓN γ GLUTAMIL-PAs	PBS ENSAMBLADOS SIN Spd	PBS ENSAMBLADOS EN PRESENCIA DE Spd (10^{-6} M)
HIDROLIZADA- HCl	40 ± 3.9^a	72 ± 4.1^c
SIN HIDRÓLISIS (Control)	8 ± 0.08^a	10.3 ± 0.4^a

INTERFERENCIA DE LAS PAs DURANTE EL ENSAMBLAJE DEL FBS.

La separación de polipéptidos del FBS, en las distintas condiciones de cultivo, mostró un bandeo proteico característico para aquellos FBS en vías de ensamblaje en presencia de la Spd, indicando que la Spd modificó el contenido de los péptidos del FBS (Fig 2).

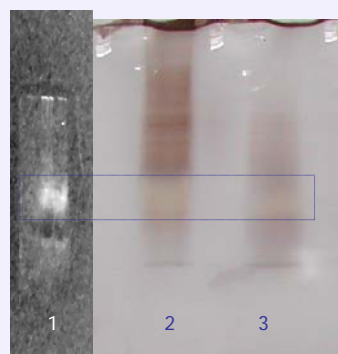


Fig 2. Pocillo 1 revela la presencia de complejos de proteína-pigmento (recuadro). Pocillo 2, bandeo peptídico de un FBS aislado en condiciones de oscuridad. Pocillo 3 bandeo correspondiente a un FBS en presencia de Spd (10^{-6} M).

In vitro, el espectro de absorción de los FBS ensamblados en presencia de FBP + Spd revela que la poliamina interfiere con la aparente re-asociación del FBS, disminuyendo los niveles de ficoeritrina. Por el contrario, la presencia de únicamente FBP permitió la ampliación del rango de absorción (Fig 3).

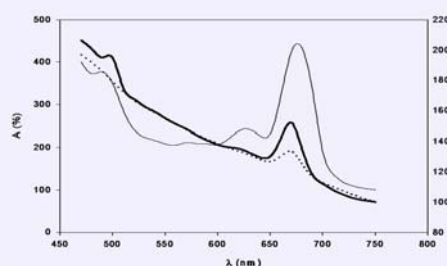


Fig 3. Espectros de absorción relativos (A, %) de los FBS: ensamblados en oscuridad (línea fina); ensamblados en presencia de Spd + FBP (línea a trazos); ensamblaje en presencia de FBP (línea gruesa).