

DISEÑO DE UN BIOSENSOR NO INVASIVO PARA DETECTAR NIVELES DE NADP⁺/NADPH EN CÉLULAS VEGETALES

Molinari, Pamela Estefanía^{A,B}

^AInstituto de Biología Molecular y Celular de Rosario UNR-CONICET

^BFacultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: Y

Palabras clave: biosensor, NADP(H), fluorescencia.

INTRODUCCIÓN

Los cambios redox intracelulares son esenciales para el desarrollo y supervivencia de los seres vivos, participando en muchos procesos biológicos. El equilibrio dinámico del estado de óxido-reducción de la célula depende de la concentración de diferentes pares redox, tales como glutatión oxidado y reducido, piridín nucleótidos y, en el caso de plantas, ascorbato, y que son regulados de manera interdependiente para cumplir sus funciones específicas. Su detección es de fundamental importancia para comprender los mecanismos más básicos de la vida, y eventualmente manipularlos mediante recursos de ingeniería genética con fines aplicados a la agricultura, la industria, la salud, etc.

En este trabajo diseñamos un sensor codificado genéticamente que permite la detección del par NADP⁺/NADPH en células vivas, utilizando microscopía confocal y las propiedades ratiométricas de fluorescencia de una GFP *sensible a la reducción-oxidación* (roGFP2) (Hanson y col. 2004).

METODOLOGÍA

Construcción del vector con la fusión NTRC-roGFP2

La GFP se ha usado como marcador reportero de la expresión de genes y localización de proteínas debido a las propiedades que presenta de emitir fluorescencia, resistencia a proteasas y estabilidad en un amplio rango de solventes. Para usarla como indicador redox, se introdujeron mediante mutagénesis grupos redox reactivos (cisteínas 147 y 204) en dos cadenas β adyacentes suficientemente próximas de manera que la oxidación de los aminoácidos introducidos genera un puente disulfuro. El cambio conformacional resultante modifica las propiedades fluorescentes, siendo ésta llamada roGFP2 (**Figura 1a**). Las formas oxidada y reducida se excitan preferencialmente a dos longitudes de onda diferentes, lo cual determina que sea "ratiométrica". Si bien roGFP2 es capaz de equilibrarse con el *pool* celular de tioles y disulfuros, su utilidad como sensor ha sido limitada por su lento equilibrio ante los cambios redox y su inespecificidad, ya que estas sondas responden a cualquier compuesto que modifique el estado redox de grupos tioles (glutatión, cisteína, tiorredoxinas, etc.). roGFP2 puede convertirse en específica mediante fusión

Proyecto: Diseño de un biosensor no invasivo para detectar niveles de NADP⁺/NADPH en células vegetales.

Director del proyecto: Adriana Krapp

Director del becario/tesista: Pamela Estefanía Molinari

a proteínas. Una sonda para NADP(H) basada en este principio requiere un sistema de transducción de poder reductor entre el universo de los piridín nucleótidos y aquel de los tioles/disulfuros, una enzima que utilice ambos tipos de moléculas redox como sustratos. Existe una proteína cloroplástica que podría reunir condiciones para sensar NADPH: la tiorredoxina reductasa C dependiente de NADPH (NTRC), que posee un dominio tiorredoxina (Trx) C-terminal. Esta enzima tiene FAD como grupo prostético, adyacente a un disulfuro redox activo (cisteínas 140 y 143 en el dominio NTR) y un segundo grupo disulfuro reactivo en el dominio Trx (cisteínas 377 y 380). Esto determina que por una parte la reacción resulte cinéticamente optimizada por razones de proximidad, y por otra compita favorablemente contra las tiorredoxinas solubles, alcanzando un alto grado de especificidad. La unidad catalítica mínima de esta enzima es un dímero y en cada subunidad el dominio Trx podría interactuar con la roGFP2 estableciendo una vía de transporte de electrones desde el NADPH hasta la proteína sensora.

Se diseñó un gen quimérico (NTRC-roGFP2, **Figura 1c**), producto de fusión entre las secuencias codogénicas de la enzima cloroplástica NTRC y de la proteína fluorescente roGFP2, unidas por un brazo conector formado por repeticiones de Gly-Gly-Ser-Gly-Gly de dos longitudes (30 y 45 aa) para permitir la interacción flexible de las dos proteínas unidas como se muestra en la parte superior de la figura **Figura 1b**. También se realizaron fusiones de estas proteínas con mutaciones (parte inferior de la **Figura 1b**) en NTRC en las cuatro cisteínas relevantes reemplazándolas por serinas (en posiciones 140-143, 377-380) a fin de disponer de un control no reactivo.

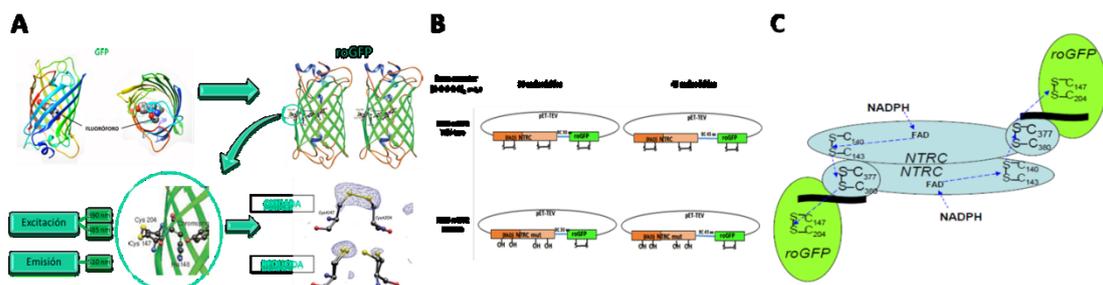


Figura 1. A) Modelo molecular de roGFP2. Cys introducidas próximas al cromóforo pueden formar puente disulfuro al oxidarse cambiando las propiedades espectrales del mismo. B) Vector de expresión pET-TEV donde fueron clonadas las fusiones NTRC y roGFP2. C) Dímero del constructo de NTRC-roGFP2.

Purificación de la NTRC-roGFP2

Estas fusiones fueron clonadas en el vector de expresión pET-TEV y expresadas en una cepa BL21 de *E. coli* que sobreexpresa los chaperones moleculares GroEL-GroES con el fin de mejorar el plegamiento y aumentar la solubilidad (y por lo tanto el rendimiento). Las células fueron lisadas por ultrasonido, y la purificación fue realizada mediante una columna de Ni-NTA. Luego se purificaron por cromatografía líquida de exclusión molecular. Se observan cuatro picos correspondientes al dímero, monómero, NTRC y roGFP2 libres en este orden. Al trabajar en frío y con máximos cuidados puede percibirse la desaparición de los picos correspondientes a NTRC y roGFP2 libres evitando falsos resultados. La expresión de las proteínas recombinantes biosensoras en *E. coli* fue observada macroscópicamente y en todas las etapas de purificación debido a la fuerte coloración verde que presenta la proteína. Tanto la fusión como la roGFP2 poseen dos máximos de excitación, a 390 y 485 nm, con un máximo de emisión a 510 nm. El R queda definido como el cociente entre la intensidad de fluorescencia a 390 sobre 485 nm.

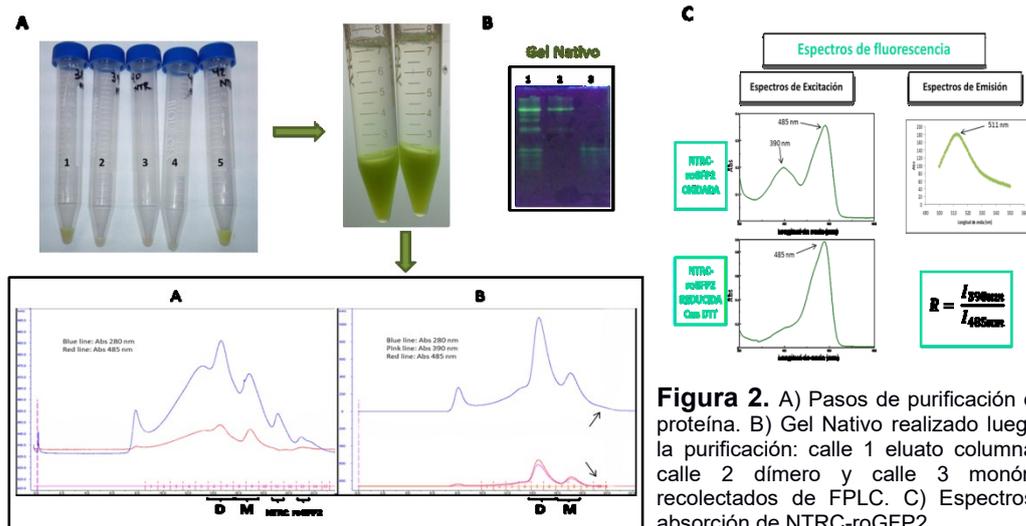


Figura 2. A) Pasos de purificación de la proteína. B) Gel Nativo realizado luego de la purificación: calle 1 eluato columna Ni, calle 2 dímero y calle 3 monómero recolectados de FPLC. C) Espectros de absorción de NTRC-roGFP2.

Determinación del potencial redox del NADP(H) *in vitro*

Se tituló *in vitro* con diferentes concentraciones de NADPH, evaluando el grado de oxidación mediante medidas de fluorescencia (excitación a 390 y 485nm, detección de la emisión a 510 nm). Se determinó la relación de fluorescencia 390/485 nm (**R o ratio**). Pudimos comprobar que por incubación con distintas concentraciones de NADPH, roGFP2 sensa el potencial redox del par $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ a través de NTRC, como enzima mediadora del flujo de electrones reversible entre NADPH y roGFP2. (**Figura 3a**). Se siguió la cinética de la reacción, y se pudo determinar que la proteína con el brazo conector de 45 aa permite alcanzar el equilibrio en menor tiempo, entre 15 y 20 minutos, ya que probablemente posee una mayor flexibilidad en el intercambio electrónico entre NTRC y roGFP2. También se observó que el sensor responde a los cambios redox obtenidos por incubación con H_2O_2 y DTT (**Figura 3b**). El equilibrio es alcanzado en menor tiempo por el dímero que por el monómero como se aprecia en la **Figura 3c**. En los ensayos con las mutantes NTRC(ss)-roGFP2, el agregado de NADPH reduce el biosensor wildtype pero no el mutante quedando demostrado que las propiedades se deben a las cisteínas ausentes en la misma (**Figura 3d**). La especificidad de NTRC-roGFP2 para NADPH se evaluó realizando una titulación con glutatión reducido, sin registrar respuesta con GSH con respecto a los resultados dados ante NADPH, corroborando que es selectiva para este último (**Figura 3e**).

El potencial redox del par $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ actual (E_{NADPH}) puede calcularse con el grado de oxidación de los puentes disulfuro de NTRC-roGFP2 a partir de una versión modificada de la ecuación de Nernst (**Ecuación 1**). Siendo los potenciales redox del NADPH y de roGFP2 dependientes del grado de oxidación de sus respectivos pares redox ($\text{OxD}_{\text{NADPH}}$ y $\text{OxD}_{\text{roGFP2}}$), se puede derivar a la siguiente expresión (Meyer y col., 2007, **Ecuación 2**):

$$E_{\text{NADPH}} = E_{\text{NADPH}}^{\circ'} - \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{NADPH}]_{\text{total}} \cdot (1 - \text{OxD}_{\text{NADPH}})}{\text{OxD}_{\text{NADPH}}} \quad 1$$

$$\text{OxD}_{\text{roGFP2}} = \frac{R - R_{\text{red}}}{\left(\frac{I_{485\text{min}}}{I_{485\text{max}}}\right) \cdot (R_{\text{ox}} - R) + (R - R_{\text{red}})} \quad 2$$

Finalmente, un gráfico de $\text{OxD}_{\text{roGFP2}}$ calculado de acuerdo la ecuación experimental versus el potencial redox de las soluciones de NADPH calculado en base a un $\text{OxD}_{\text{NADPH}}$ igual a 0,9% (teórico), resulta en una típica curva de titulación sigmoidea. Encontramos que el potencial de media onda del biosensor está entre los -300 y -290 mV (**Figura 3f**), evidenciando su funcionalidad *in vitro*.

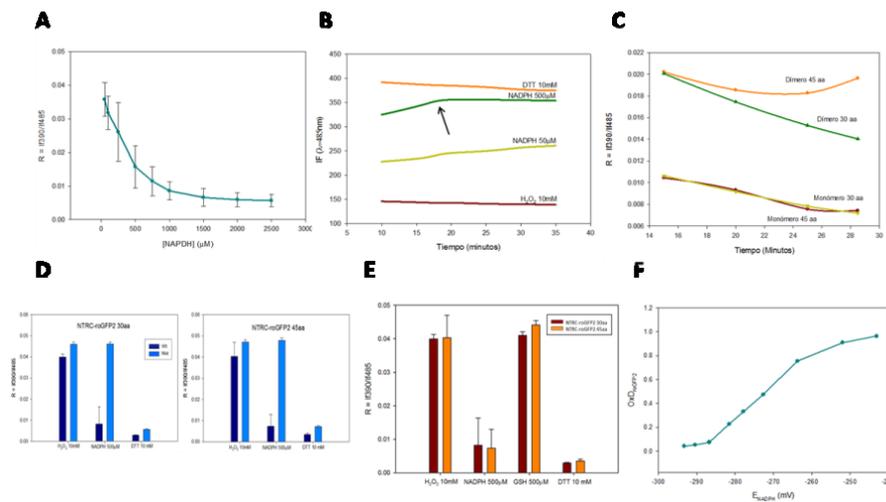


Figura 3. A) Curva de titulación de NADPH. Respuesta: B) Cinética C) Dímero vs el monómero, ante el agregado de NADPH 500 μ M. D) Respuestas de mutantes en las Cys reactivas de la NTRC. E) Prueba de especificidad con GSH. F) Cálculo del potencial redox *in vitro* del NADPH(H).

Ensayos de prueba de concepto *in vivo*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in vitro*, investigamos la sensibilidad del biosensor *in vivo*.

NTRC-roGFP2 fue expresada transitoriamente en diferentes compartimentos subcelulares en hojas de *Nicotiana benthamiana* y se registró la fluorescencia mediante microscopía confocal a 405 y 488 nm, emitiendo a 510 nm. Imágenes muestran una exitosa expresión diferencial en citosol y cloroplastos de acuerdo hacia donde se había direccionado el producto del vector, como muestra la **Figura 4a**.

Siguiendo con los estudios de funcionalidad, procedimos a la preparación de transformantes de tabaco que sean estables. Se encuentran en estudio las transformantes obtenidas para las construcciones de 45 aminoácidos.

Se realizaron ensayos de expresión en cepas de *E. coli* transformadas con el biosensor, sometándose a distintas condiciones de crecimiento: medios mínimos con una única fuente de carbono y anaerobiosis, obteniéndose resultados variables según los nutrientes utilizados (**Figura 4b**).

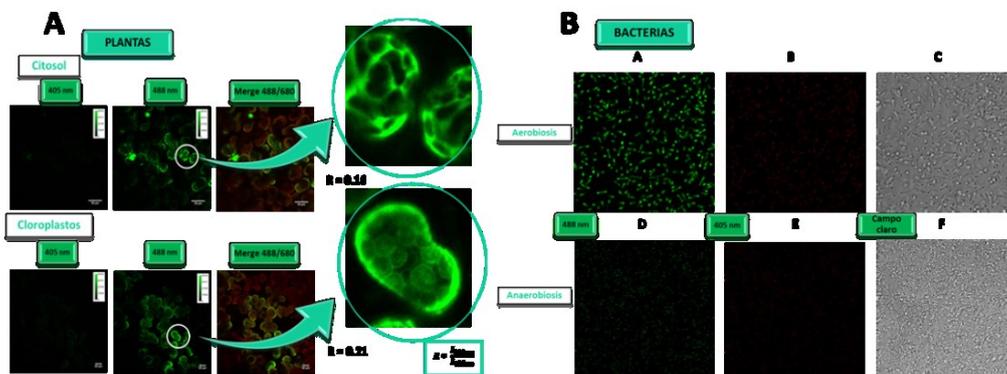


Figura 4. Imágenes tomadas por microscopía láser confocal de A) *N. benthamiana* dos días pos infiltración con NTRC-roGFP2 con espaciador de 45aa, dirigida a cloroplastos y citosol. B) *E. coli* crecida en medio mínimo suplementado con Glicerol tanto con o sin oxígeno.

NTRC-roGFP2 funciona como biosensor redox en células vivas.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Hanson, G. T., Aggeler, R., Oglesbee, D., Cannon, M., Capaldi, R. A., Tsien, R. Y. y Remington, S. J. (2004). Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J. Biol. Chem.* 279, 13044–13053.

Meyer, A., Brach, T., Marty, L., Kreye, S., Rouhier, N., Jacqout, J. y Hell, R. (2007). Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J.* 52, 973–986.