

ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LOS MECANISMOS DE TRANSPORTE DE MOLIBDENO Y TUNGSTENO EN BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO

Ciccazzo, María Emilia

*Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas UNL
Director/a: Rivas, María Gabriela*

Área: Ciencias Biológicas

INTRODUCCIÓN

Las bacterias reductoras de sulfuro (BRS) son generadoras H_2S el cual está directamente asociado a problemas de biocorrosión que causan pérdidas económicas en diferentes tipos de industrias y sistemas de distribución de agua y combustible; contrariamente, por ser capaces de metabolizar compuestos hidrocarbonados y reducir algunos metales pesados (Fe, Cr, U, Mn, Te y Se) causantes de contaminación medioambiental, las BRS son propuestas como una forma de biorremediación en medios poluidos.

Los tres hechos más importantes que relacionan a las BRS con los metales Mo y W son: 1) la sensibilidad que presentan a los oxoaniones de estos metales, 2) la presencia de una gran variedad de enzimas de Mo y W importantes en el metabolismo de estas bacterias y 3) la identificación en el genoma de BRS de sistemas de transporte aparentemente específicos para estos metales.

En base a lo expuesto es que pretendemos obtener información acerca de dos proteínas responsables por la unión de Mo y W en el periplasma celular: ModA y TupA, respectivamente. Además, nos propusimos estudiar una proteína identificada como TunR que fue recientemente reportada como responsable de la regulación del nivel de Mo y W en la célula.

OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto es obtener información sobre los mecanismos que utilizan las BRS para incorporar los metales molibdeno y tungsteno y mantenerlos en niveles apropiados dentro de la célula. De este objetivo global se desprenden los siguientes objetivos específicos: 1) Producir heterológicamente las proteínas ModA, TupA y TunR de la bacteria reductora de sulfato *Desulfovibrio alaskensis* G20 (DaG20). 2) Estudiar cualitativa y cuantitativamente la afinidad de las mismas por los iones molibdato, tungstato y por otros de características similares (sulfato, fosfato y clorato).

Título del proyecto: "Estudio de los mecanismos de transporte de molibdeno y tungsteno en bacterias reductoras de sulfato"

Instrumento: PICT 2015-0061

Año convocatoria: 2015

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Director/a: María Gabriela Rivas (Investigador Adjunto CONICET, Profesor Adjunto, FBCB, UNL)

METODOLOGÍA

Cultivo celular y purificación de proteínas

Al inicio del proyecto contábamos con los genes que codifican para las proteínas ModA y TupA clonados en pET46 Ek-LIC y el gen que codifica para TunR clonado en pET-29 b(+). Las condiciones de producción y purificación de ModA y TupA fueron previamente optimizadas por lo que se trabajó en la determinación de las condiciones para la proteína TunR. Se realizaron pruebas de expresión en células BL21 (DE3) y BL21 (DE3) Gold en las que se evaluó: concentración del inductor de la expresión (IPTG), tiempo de inducción y temperatura.

Luego, para la producción de las proteínas se realizaron cultivos a mayor escala (4-6L) en las condiciones óptimas de expresión para cada una. Para colectar las células, pasado el tiempo de inducción, se centrifugaron durante 15 min a 3795 xg a 4°C y se descartó el medio de cultivo. Luego las células fueron lavadas mediante resuspensión en tampón 50mM K₂HPO₄ a pH 7.6, centrifugadas durante 15 min a 5000 rpm a 4°C y resuspendidas en tampón 5mM K₂HPO₄ pH 7.6 suplementado con ADNasa (5µg/ml). Por último, las células fueron lisadas mediante un proceso de congelamiento y descongelamiento (3 veces) y posterior sonicado. El extracto bruto obtenido fue centrifugado durante 1h a 15180 xg a 4°C para eliminar los restos celulares y obtener así el extracto soluble.

Debido a que las proteínas fueron clonadas con una secuencia de seis histidinas en el N-terminal, empleamos una cromatografía líquida utilizando una resina tipo IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) a pH 7.6 y a 4°C.

Una vez realizada la cromatografía, la pureza de cada proteína fue evaluada por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y las fracciones de interés fueron concentradas utilizando dispositivos de ultrafiltración con el objetivo de eliminar el imidazol y poder trabajar con volúmenes pequeños y cantidades detectables de proteínas.

Digestión con endoproteasa HRV 3C (Human rhinovirus 3C).

Para evitar unión inespecífica del metal a la cola de polihistidina se trabajó en la optimización de la remoción de esta secuencia. Se realizaron pruebas de digestión con HRV 3C (previamente producida y purificada) en las que se evaluaron diferentes variables: tiempo de digestión, relación proteína-endoproteinasa y presencia de detergentes y/o agentes reductores en el medio, obteniendo diferentes condiciones según la proteína.

Caracterización bioquímica

Mediante cromatografía líquida de exclusión molecular se analizó la interacción de las proteínas purificadas con los oxoaniones MoO₄²⁻ y WO₄²⁻ y como ésta afectaba su conformación. Para ello se compararon los volúmenes de elusión de las proteínas sin metal con la de las proteínas incubadas con metales en exceso. Estos ensayos fueron complementados con ensayos en geles de poliacrilamida en condiciones nativas en los cuales se analizó el perfil electroforético de muestra incubadas con oxoaniones comparadas con proteínas sin metal.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Producción y purificación de proteínas

ModA y TupA. Para ambas proteínas las condiciones óptimas de expresión fueron 0.1mM IPTG durante 3h a 30°C. El proceso de purificación incluyó un único paso después del cual ambas proteínas mostraron el grado de pureza deseado tal como muestra la Figura 1.

TunR. Para esta proteína se evaluaron las condiciones de expresión variando el tiempo de inducción y la concentración de IPTG (Figura 2) observándose que el nivel de expresión no variaba significativamente por lo que se optó por una inducción durante 2h con una concentración de 0.05mM IPTG.

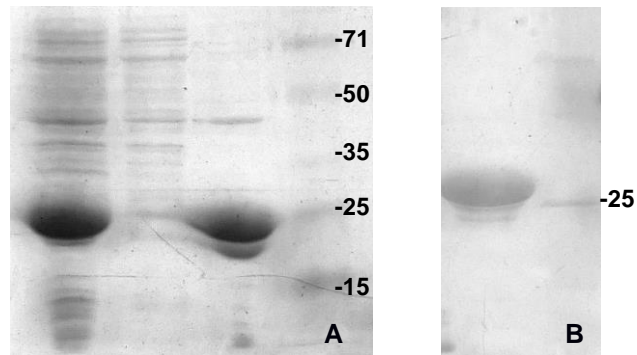


Figura 1. 12% SDS-PAGE, de izquierda a derecha: A) Extracto soluble, fracción que no interacciona con la resina, ModA después del paso de purificación y marcador de masa molecular; B) TupA después del paso de purificación y marcador de masa molecular.

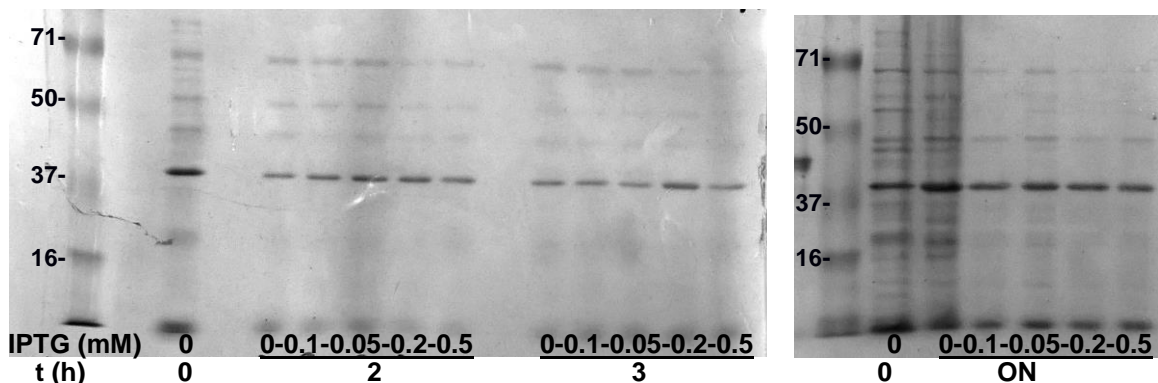


Figura 2. SDS-PAGE 12% de las proteínas totales de células transformadas con el vector de expresión para la producción de TunR inducidas en las condiciones indicadas en la figura.

En lo que se refiere al aislamiento de la TunR, hasta el momento se realizaron ensayos de purificación de la misma por IMAC y se observó que las fracciones más puras de la proteína eran poco estables. Actualmente estamos trabajando para encontrar condiciones que permitan tener una proteína soluble.

Optimización de la digestión de la cola de poli-His de ModA y TupA con HRV 3C

Para la ModA las condiciones evaluadas se indican en la Figura 3 y tal como se observa la digestión comienza a ser aceptable a partir de las 2h. Las condiciones establecidas fueron temperatura 4°C, durante toda la noche, en tampón 50mM TrisHCl suplementado con 150mM NaCl y 10mM β -mercaptoetanol, un exceso de 3 veces de ModA con relación a la proteinasa (en masa).

En el caso de la TupA, como se observa en la Figura 4, todas las condiciones ensayadas son favorables para una buena digestión ya que la cantidad de proteína sin digerir es despreciable en relación a la proteína que logró digerirse. Las condiciones establecidas fueron las siguientes: temperatura 4°C, durante toda la noche, en tampón 50mM TrisHCl suplementado con 100mM NaCl y 10mM β-mercaptoetanol, 0.1% Tritón X-100, un exceso de 6 veces de TupA con relación a la proteinasa (en masa).

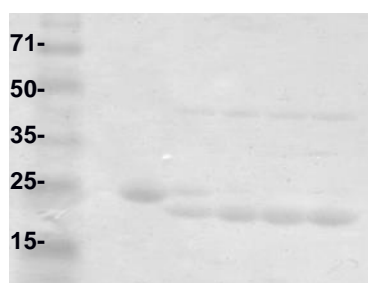


Figura 3. 15% SDS-PAGE digestión de ModA con HRV 3C a 4°C, de izquierda a derecha: marcador de masa molecular, ModA sin digerir, ModA digerida 1h, 2h, 3h y 16h, respectivamente.

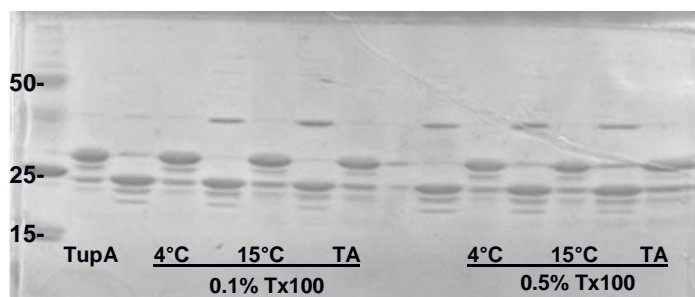


Figura 4. 15% SDS-PAGE digestiones de TupA con HRV 3C en diferentes condiciones. Para cada condición se muestra la proteína digerida y sin digerir respectivamente.

Influencia de la presencia de oxoaniones metálicos en la estructura global de ModA y TupA

En ambos casos se pudo observar que la interacción de la proteína con el metal producía una compactación de la estructura, lo cual se visualizaba en un mayor volumen de elusión por cromatografía de exclusión molecular. Este resultado fue confirmado en experiencias en geles de poliácridamida en condiciones nativas.

De forma resumida en este trabajo se logró: 1) Producir y purificar ModA y TupA, 2) Eliminar la cola de 6xHis y verificar la interacción metal/proteína, 3) Se continuará trabajando en la optimización de las condiciones en las cuales la proteína TunR es estable para obtenerla pura en cantidades requeridas para los diferentes ensayos.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Hagen W. R., 2011. Cellular uptake of molybdenum and tungsten. *Coordination Chemistry Reviews*, 255,1117-1128.

Kazakov A. E., Rajeev L., Luning E. G., Zane G. M., Siddartha K., Rodionov D. A., Dubchak I., Arkin A. P., Wall J. D., Mukhopadhyay A. and Novichkov P. S., 2013. New family of tungstate-responsive transcriptional regulators in sulfate-reducing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 195,4466-4475.

Nair R. R., Silveira C., Diniz M., Almeida M. G., Moura J. J. G. and Rivas M. G., 2015. Changes in metabolic pathways of *Desulfovibrio alaskensis* G20 cells induced by molybdate excess. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 20,311-322.

Otrelo-Cardoso A. R., Nair R. R., Correia M., Rivas M. G. and Santos-Silva T. S., 2014. TupA: A tungstate binding protein in the periplasm of *Desulfovibrio alaskensis* G20. *International Journal of Molecular Sciences*, 15,11783.