

Búsqueda de proteínas ACR2 en el género *Lupinus* L.

ACR2 proteins searching in the Genus *Lupinus* L.

Mónica Estefanía Raygoza Gutiérrez¹, Melina Del Real Monroy¹, César Díaz Pérez², Lenin Sánchez Calderón¹.

¹Universidad Autónoma de Zacatecas, ²Universidad de Guanajuato
cesar.diaz@ugto.mx², leninsanc@uaz.edu.mx¹

Resumen

Lupinus campestris en una planta que se distribuye en varios pasivos ambientales mineros en Zacatecas; en estudios *in vitro* se observó que tiene la capacidad de acumular varios metales pesados en sus raíces, entre ellos el arsénico (As). Aunque esta característica indica que *L. campestris* puede ser utilizada como una planta fitoestabilizadora de As del suelo, esta es una limitación para su uso en la fitoextracción debido a que la capacidad de translocarlo hacia el sistema de brotes es poca. En *Arabidopsis thaliana* la proteína ACR2, una proteína con función de AsV-reductasa, participa en la acumulación y translocación de As. Puesto que *L. campestris* y *A. thaliana* forman parte del clado Rosidae tienen un ancestro en común, por lo tanto, es probable que exista una proteína ACR2 en miembros del género *Lupinus*. Por lo anterior, se llevó a cabo una búsqueda de proteínas similares a ACR2 en la familia Fabaceae, se encontró evidencia que sugiere que ACR2 está presente en varias especies de la familia Fabaceae, incluyendo aquellas del género *Lupinus*. Se observó que el motivo funcional HC(X)₅R y el núcleo de cisteínas Cys-134, Cys-136, Cys-141, están conservados en las 26 secuencias de Fabaceae. Asimismo, las secuencias de *Lupinus* tienen dominios Acr2p y rodanasa, característicos de las proteínas ACR2.

Palabras clave: Metales pesados, arsénico, AsV-reductasa.

Introducción

Los análisis *in silico* tienen por objetivo indagar en procesos que ocurren en los organismos mediante simulaciones que se llevan a cabo en la computadora, de manera que nos dan la oportunidad de predecir la función que podría tener una proteína de particular interés en la investigación (Fina *et al.*, 2013). *Lupinus campestris* es una fabácea que se distribuye en suelos metalíferos, *in vitro* tiene la capacidad de acumular arsénico en el sistema radical, característica que en *Arabidopsis thaliana* se ha asociado a la reducción de AsV a AsIII por ACR2 (Dhankher *et al.*, 2006). Como Fabaceae y Brassicaceae tienen un ancestro en común (Takht, 1967) sería posible suponer que puede existir una proteína similar a la proteína ACR2 en *Lupinus* y que su función provoque la restricción de arsénico a las raíces de la planta, por lo que el objetivo de este trabajo fue llevar a cabo una búsqueda de proteínas ACR2 en la familia Fabaceae y analizar las secuencias que se encontraron del género *Lupinus* mediante un análisis *in silico*.

Metodología

Se hizo una búsqueda de secuencias de proteínas de Fabaceae similares a la proteína ACR2 de *A. thaliana* (AtACR2; número de acceso: NP_568119) mediante el programa Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), usando la base de datos "non-redundant protein sequences", las secuencias redundantes se eliminaron mediante análisis de grupos (clúster). Después se llevó a cabo un alineamiento múltiple de secuencias con ClustalW. Se llevó a cabo un análisis filogenético donde se usó el algoritmo "neighbor-joining" (NJ) con un Bootstrap de 1000 repeticiones, en el programa Mega7 (Kumar & Tamura, 2016). Seguido a esto se efectuó una búsqueda de dominios conservados en las secuencias, en la interface CD-search (CDD) y un análisis de conservación evolutiva de la estructura de las proteínas ACR2 de la Familia Fabaceae, en el servidor ConSurf (https://consurf.tau.ac.il/consurf_index.php). Las estructuras tridimensionales se descargaron de las bases de datos PDB (1T3K) y AlphaFold (A0A6A5M599) y se hizo un alineamiento entre las estructuras tridimensionales de AtACR2 y LaACR2 en el programa PyMOL (Molecular Graphics System, Version 2.1 Schrödinger, LLC).



Resultados y discusión

Se obtuvieron un total de cuarenta y seis secuencias similares a la proteína AtACR2 pertenecientes a varios géneros de la familia Fabaceae. Por análisis de agrupamientos se eliminaron veinte, de manera que se trabajó con un grupo final de veintiséis. Dos de las secuencias pertenecen a dos especies del género *Lupinus*, *Lupinus angustifolius* (XP_019444309; 135 residuos; porcentaje de identidad de 70.54%) y a *Lupinus albus* (KAE9585436; 141 residuos; porcentaje de identidad de 68.99%). Manualmente se agregaron seis secuencias pertenecientes a especies representativas del clado de las Tracheophyta.

Se obtuvo una inferencia filogenética que sugiere que las proteína ACR2 está presente en grupos basales dentro del clado de las Tracheophyta y que es posible encontrarla en especies del género *Lupinus* (figura 1). Este resultado coincide con lo reportado con Dhankher *et al.*, (2006), quienes sugieren que los genes que codifican para ACR2 en las plantas y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, son ortólogos, que fueron heredados a partir de un ancestro en común.

Para inferir la conservación de la función en las proteínas encontradas, se llevó a cabo un análisis de los dominios presentes en la proteína AtACR2 y en las dos proteínas putativas ACR2 de *Lupinus*, en el cual se encontró que las tres tienen dominios similares, Acr2p y rodanasa (figura 2). El dominio Acr2 (cd01531) fue caracterizado por primera vez en *S. cerevisiae*, en una proteína con función AsV-reductasa (Mukhopadhyay *et al.*, 2000; 2001). El dominio de rodanasa (cl00125) contiene los residuos que son parte del sitio catalítico reportado para la proteína AtACR2 (Bordo & Bork, 2002).

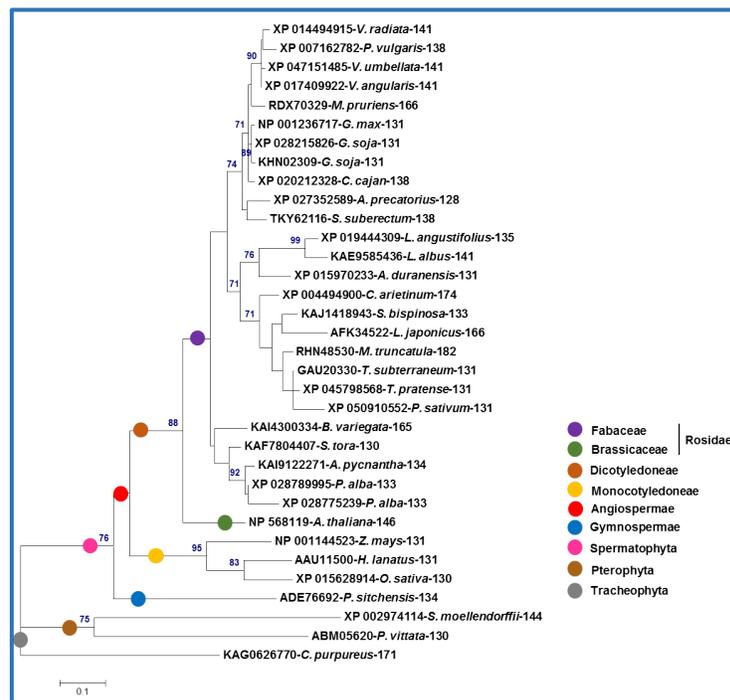


Figura 1. Reconstrucción filogenética de proteínas de Tracheophyta similares a AtACR2. Se muestran veintiséis secuencias de la familia Fabaceae. El árbol filogenético se reconstruyó mediante el método de NJ. En las ramas se muestran los valores de Bootstrap mayores a 70.

Fuente: Elaboración propia.



Además, se hizo un análisis de conservación evolutiva de la estructura de las proteínas ACR2 donde se observó un resumen gráfico de las posiciones de aminoácidos conservados en las secuencias de la familia Fabaceae con respecto a la secuencia de ACR2 de *L. albus* (figura 3). Esto nos ayuda a discernir qué aminoácidos podrían ser importantes en la función de ACR2, con base en su conservación en las secuencias. Se encontró que las proteínas del género *Lupinus* conservan los aminoácidos característicos del sitio activo de la familia ACR2, los motivos funcionales HC(X₅)R y un núcleo de cisteínas (H-41, C-122, C-124 y C-129) que son parte del sitio activo. Finalmente, se realizó un alineamiento entre las estructuras tridimensionales de las proteínas ACR2 de *A. thaliana* y *L. albus* (figura 3). El valor RMSD entre las dos estructuras es de 3.243, lo cual en primera instancia nos sugiere que tienen un plegamiento no similar, sin embargo, cuando se comparan, las estructuras secundarias, locales, α-hélices y láminas-β, las estructuras coinciden, lo que sugiere que ambas proteínas podrían tener una función similar.

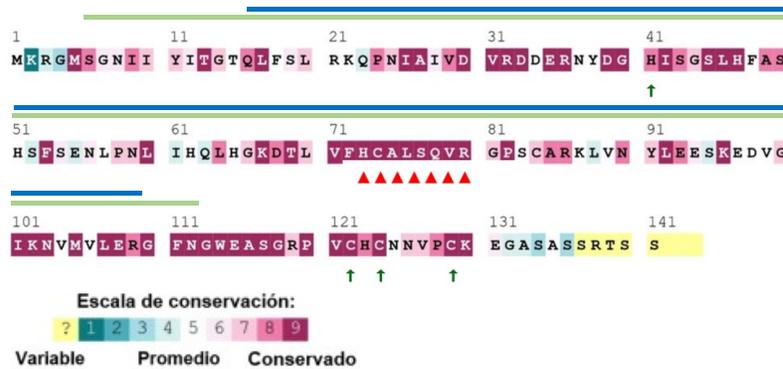


Figura 2. El motivo HC(X₅)R y los residuos del sitio de unión de AtACR2 están conservados en LaACR2 y la Familia Fabaceae. Resumen gráfico de las posiciones conservadas en las secuencias de la Familia Fabaceae y AtACR2 con respecto a LaACR2. Según la escala de ConSurf (esquina inferior izquierda), tanto el motivo HC(X₅)R (triángulos rojos) como los residuos involucrados en el sitio de unión de AtACR2 (flechas verdes) se encuentran fuertemente conservados en las secuencias de la Familia Fabaceae. Se muestran los dominios característicos de esta familia de proteínas, en verde el dominio Acr2p (cd01531) y en azul el dominio de rodanasa (cl00125).

Fuente: Elaboración propia.

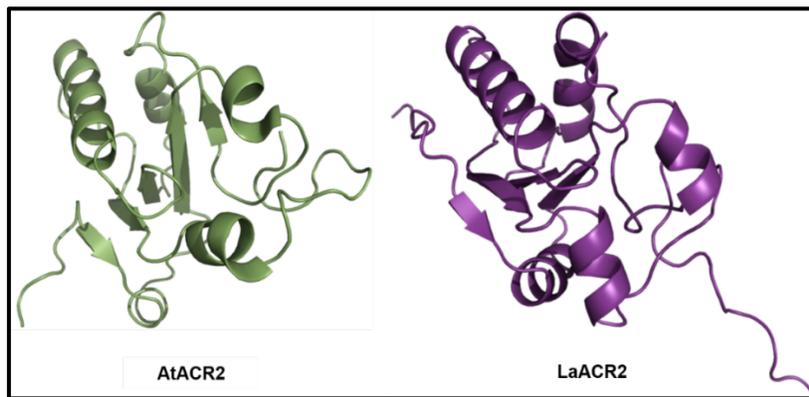


Figura 3. Las proteínas AtACR2 y LaACR2 tienen estructuras similares. Comparación de las estructuras tridimensionales de AtACR2 (estructura verde; 1T3K) y LaACR2 (estructura morada; A0A6A5M599). El valor RMSD entre ambas estructuras es de 3.243, es decir, no hay superposición entre ellas; sin embargo, las estructuras locales, α-hélices y láminas-β, se comparten.

Fuente: Elaboración propia.

Conclusiones

Se encontró que ACR2 está presente en miembros de la familia Fabaceae, con proteínas de *Lupinus* similares a AtACR2. De la reconstrucción filogenética se concluye que ACR2 está presente en el clado de las Tracheophyta, desde los clados más basales que son las Pteridophyta y Licophyta, como en los clados de reciente evolución como son las Monocotyledoneae. Además, hay proteínas similares a ACR2 en el género *Lupinus*, y es posible encontrarlas en *L. campestris*. Estas proteínas contienen dominio rodanasa y Acr2p; mientras que conservan el dominio HC(X)₅R y los residuos H-41, C-122, C-124 y C-129, por lo que es probable que conserven la función AsV-reductasa.

Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias a los fondos provenientes del proyecto Ciencia Básica CB-2010-0100000000156851 y UAZ-202138539.

Referencias

Bordo, D., & Bork, P. (2002). The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily: Sequence-structure-function relations. *EMBO Reports*, 3(8), 741-746. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf150>

Dhankher, O. P., Rosen, B. P., McKinney, E. C., & Meagher, R. B. (2006). Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (ACR2). *PNAS*, 103(14), 5413-5418. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509770102>

Fina, B. L., Lombarte, M., Rigalli, A. (2013). Investigación de un fenómeno natural: ¿estudios in vivo, in vitro o in silico? *Actual Osteol.*, 9(3), 294-299.

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*, 33(7), 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

Landrieu, I., Hassan, S., Sauty, M., Dewitte, F., Wieruszkeski, J.-M., Inzé, D., . . . Lippens, G. (2004). Characterization of the *Arabidopsis thaliana* Arath;CDC25. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322, 734-739. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.182>

Mukhopadhyay, R., & Rosen, B. P. (2001). The phosphatase C(X)₅R motif is required for catalytic activity of the *Saccharomyces cerevisiae* Acr2p arsenate reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(37), 34738-34742. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103354200>

Mukhopadhyay, R., Shi, J., & Rosen, B. P. (2000). Purification and characterization of Acr2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *J Biol Chem*, 275, 21149-21157. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910401199>

Nahar, N., Rahman, A., Warzecha, T., Algerin, M., Ghosh, S., Johnson-Brousseau, S., & Mandal, A. (2012). In silico and in vivo studies of an *Arabidopsis thaliana* gene, ACR2, putatively involved in arsenic accumulation in plants. *J Mol Model*, 18(9), 4249-4262. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1419-y>

