



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas.
Área Biología Celular y Molecular

Caracterización estructural de una proteína de unión γ^{33} asociada a la R-ficoeritrina de *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta: Gracilariaceae)

ALEIKAR JOSÉ VÁSQUEZ SÚAREZ

CONCEPCIÓN, CHILE

2018

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Área Biología Celular y Molecular

Tutora: Marta Bunster Balocchi

Co-Tutor: José Martínez Oyanedel

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido diseñada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Tutor

Dra Marta Cecilia Bunster Balocchi
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Tutor

Dr. José Martínez Oyanedel
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora



Dra. Elena Amparo Uribe Pérez
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Alexis Marcelo Salas Burgos
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Patricio Manque
Profesor Evaluador Externo
Universidad Mayor-Chile

Director de Programa

Dr. Juan Pablo Henríquez Hohmann
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág
INDICE DE FIGURAS.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	ix
ABREVIACIONES.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVOS.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Extracción de ADN genómico.....	20
Diseño de partidores para la subunidad γ^{33} de R-ficoeritrina.....	21
Amplificación de la región 1-885 del gen de la subunidad γ^{33} de R-ficoeritrina.....	21
Amplificación de la región 3' (886-957) del gen de la subunidad γ^{33} de R-ficoeritrina.....	22
Extracción de ARN total.....	24
Electroforesis en geles de agarosa y visualización de productos de PCR.....	24
Electroforesis preparativa y extracción de ADN desde geles de agarosa.....	25
Secuenciación de los productos de PCR.....	25
Ensamble de los fragmentos 1-885 y la región 3' del gen de la subunidad γ^{33}	25
Análisis <i>in silico</i> de la secuencia aminoacídica obtenida a partir de la secuencia nucleotídica codificante de la subunidad γ^{33} de R-ficoeritrina.....	26
Purificación de la subunidad γ^{33} a partir de hexámeros de R-ficoeritrina.....	27
Caracterización espectroscópica de la subunidad γ^{33}	29
Generación de un modelo de la subunidad γ^{33} , mediante el uso de herramientas bioinformáticas.....	30
Ensayos de denaturación de subunidades de R-PE purificadas.....	31

Determinación de la posición de cromóforos presentes en la subunidad γ^{33} mediante espectrometría de masas. Búsqueda de una ficourobilina doblemente unida.....	32
Caracterización de la asociación entre la subunidad γ^{33} y R-ficoeritrina.....	33
Ensayo de entrecruzamiento y análisis de espectrometría de masas.....	33
Ensayo de cristalización y recolección de datos.....	34
Construcción del modelo cristalográfico.....	35
Integración de la data cristalográfica en la corrección del modelo obtenido por homología.....	36
Obtención de datos mediante tomografía crio-electrónica.....	36
Análisis <i>in silico</i> de las interacciones entre subunidad γ^{33} y R-ficoeritrina.....	37
RESULTADOS.....	38
Extracción de ADN genómico de <i>Gracilaria chilensis</i>	38
Extracción de ARN de <i>Gracilaria chilensis</i>	38
Amplificación y secuenciación de la región 1-885 del gen la subunidad γ^{33} de <i>Gracilaria chilensis</i>	39
Amplificación y secuenciación de la region 3' del gen de la subunidad γ^{33} de <i>Gracilaria chilensis</i>	40
Ensamblaje de los fragmentos secuenciados del gen de la subunidad γ^{33} de <i>Gracilaria chilensis</i>	41
Análisis de la secuencia de γ^{33}	44
Sitios potenciales de cromoforilación en la subunidad γ^{33} asociada a R-ficoeritrina de <i>Gracilaria chilensis</i>	47
Purificación de la subunidad γ^{33} a partir de complejos hexaméricos de R-ficoeritrina.....	49
Modelo de la subunidad γ^{33} , obtenido mediante modelamiento por homología.....	53
Ensayo de denaturación de subunidades α PE, β PE y γ^{33}	55
Determinación de la posición de cromóforos presentes en la subunidad γ^{33}	56

Análisis de las interacciones entre la subunidad γ^{33} y R-PE. Datos de entrecruzamientos acoplados a análisis de espectrometría de masas.....	59
Análisis de las interacciones entre la subunidad γ^{33} y R-PE. Enfoque cristalográfico.....	61
Identificación de un cuarto cromóforo mediante el enfoque cristalográfico.....	80
Obtención de un modelo del complejo mediante Crio-tomografía electrónica.....	81
Determinación de las distancias entre los cromóforos de la subunidad γ^{33}	83
DISCUSIÓN.....	84
CONCLUSIONES.....	99
BIBLIOGRAFÍA.....	101
AGRADECIMIENTOS.....	110
ANEXOS.....	112
Anexo 1. Secuencia nucleotídica de la región 1-885 del gen de la subunidad γ^{33} de <i>Gracilaria chilensis</i>	112
Anexo 2. Secuencia nucleotídica de la región 3' del gen de la subunidad γ^{33} de <i>Gracilaria chilensis</i> , obtenida mediante 3' RACE.....	113
Anexo 3. Representación de Ramachandran del modelo obtenido por homología seleccionado.....	114
Anexo 4. Diagrama de energía (DOPE), del modelo obtenido por homología seleccionado.....	115
Anexo 5. Identificación de estructuras secundarias en subunidades α y β R-ficoeritrina de <i>Gracilaria chilensis</i> , basada en la nomenclatura de Ritter <i>et al.</i> 1999.....	116
Anexo 6. Representación de Ramachandran del modelo de la subunidad γ^{33} corregido.....	117
Anexo 7 Evaluación energética (A) y estructural (B), del modelo corregido de la subunidad γ^{33} de <i>Gracilaria chilensis</i>	118
Anexo 8... Comparación entre los modelos de complejo hexamérico R-ficoeritrina asociado la subunidad γ^4 de <i>Griffithsia pacifica</i> (PDB-5Y6P) y <i>Gracilaria chilensis</i>	119
Anexo 9 Espectro de absorción y emisión de fluorescencia de subunidades α y β ficoeritrina de <i>Gracilaria chilensis</i>	120

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Esquema estructural de un ficobilisoma.....	2
Figura 2. Niveles de ensamblajes entre subunidades de R-ficoeritrina hasta la generación del estado hexamérico.....	3
Figura 3. Esquema de un cromóforo unido mediante un simple o doble enlace tioéter a una ficobiliproteína.....	5
Figura 4. Esquemas de diferentes tipos de ficoeritrinas aisladas de cianobacterias y algas rojas.	6
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa para evaluar la integridad del ADN genómico extraído desde <i>Gracilaria chilensis</i>	38
Figura 6. Gel de agarosa para evaluar la integridad del ARN total extraído desde <i>Gracilaria chilensis</i>	39
Figura 7. Amplificación del fragmento 1-885 del gen de la subunidad γ^{33}	40
Figura 8: Amplificación del fragmento 3' del gen de la subunidad γ^{33}	41
Figura 9: Alineamiento entre los dos fragmentos secuenciados (1-885 y 3' RACE) del gen de la subunidad γ^{33} de <i>Gracilaria chilensis</i>	42
Figura 10: Secuencia codificante para el gen de la subunidad γ^{33} de <i>Gracilaria chilensis</i>	43
Figura 11. Traducción <i>in silico</i> de la secuencia codificante para la subunidad γ^{33} de ficoeritrina.....	44
Figura 12. Alineamiento múltiple de secuencias de subunidades γ asociadas a ficoeritrina de algas rojas.....	46
Figura 13. Alineamiento múltiple a partir de secuencias de subunidades γ^{33} de algas rojas.....	48
Figura 14. Determinación del estado de oligomerización de R-ficoeritrina empleando cromatografía de filtración en gel.....	49
Figura 15. Espectro de absorción y emisión de hexámeros de ficoeritrina purificados.....	50

	Pág
Figura 16. Cromatograma de separación mediante HPLC-FR de subunidades componentes del complejo hexamerico R-PE.....	51
Figura 17. Espectro de absorción, emisión con excitación a 490nm y emisión con excitación a 550nm de la subunidad γ^{33}	52
Figura 18. Espectro de dicroísmo circular de una fracción purificada de la subunidad γ^{33}	53
Figura 19. Modelo por homología de la subunidad γ^{33} de <i>Gracilaria chilensis</i>	54
Figura 20. Espectros de absorción en estado nativo y denaturado de subunidades α , β y γ^{33} R-ficoeritrina.....	56
Figura 21. Espectros de masa en los que se identificaron ficourobilina y ficoeritrobilina asociados a fragmentos trípticos de la subunidad γ^{33}	57
Figura 22. Espectro de masas del cromopéptido-PUB purificado luego de una digestión de la subunidad γ^{33} con tripsina y luego hidrolizada con bromuro de cianógeno.....	58
Figura 23. Entrecruzamientos intra e interproteína identificados luego de usar el reactivo entrecruzante PDH.....	60
Figura 24. Cristales de R-ficoeritrina.....	61
Figura 25. Visualización del complejo hexamérico R-ficoeritrina luego de la resolución de fase mediante reemplazo molecular con las coordenadas del PDB 1EYX.....	62
Figura 26. Unidad biológica de R-ficoeritrina obtenida a partir de datos cristalográficos.....	64
Figura 27. Detalle del arreglo inicial del modelo por homología de la subunidad γ^{33} con respecto a la subunidad β R-PE y de su ajuste al mapa de densidad electrónica.....	65
Figura 28. Alineamiento estructural entre el modelo obtenido por homología y el modelo corregido a partir de la data cristalográfica.....	66

	Pág
Figura 29. Interacción de la subunidad γ^{33} mediante residuos aromáticos con el anillo D de las ficoeritobilinas unidas a la Cis-82 de subunidades β -PE.....	70
Figura 30. Vista lateral y dorsal del alineamiento de PEB unidas a las cisteínas 82 en subunidades β -PE	71
Figura 31. Ubicación de la hélice N cercana a la subunidad- α dentro de la cavidad hexamérica.....	71
Figura 32. Proyección de la hélice N' de la subunidad γ^{33} por fuera de la cavidad hexamérica en conjunto con el <i>loop</i> que la une a la hélice H ₁	72
Figura 33. Representación esquemática de las interacciones entre la subunidad γ^{33} con las subunidades α y β ficoeritrina.....	73
Figura 34. Aminoácidos cercanos a la ficoeritobilina unida a Cis-259 de la subunidad γ^{33}	80
Figura 35. Clasificación de complejos hexaméricos, en función a su posición sobre la rejilla, extraídos de las fotomicrografías obtenidas durante el análisis criomicroscópico.....	82
Figura 36. Diferentes vistas del modelo del complejo hexamérico R-PE en interacción con la subunidad γ^{33} , construido a partir de partículas únicas seleccionadas de fotomicrografías obtenidas mediante criomicroscopía electrónica	82
Figura 37. Esquema del posicionamiento de PUBs y PEBs en la subunidad γ^{33}	83
Figura 38. Región de unión de la ficourobilina unida a las Cis-50 y Cis-61 en la subunidad β de ficoeritrina y comparación con la región de doble unión de la ficourobilina en la subunidad γ^{33}	89
Figura 39. Aminoácidos conservados en los ambientes de cromóforos asociados a subunidades α y β ficobiliproteínas.....	97

INDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Modelos propuestos para la estequiometría y posicionamiento de la subunidad γ en el hexámero de ficoeritrina purificada a partir de algas rojas.....	10
Tabla 2: Programa de reacción en cadena de la polimerasa <i>touchdown</i> (TD-PCR) utilizado para el 3' RACE.....	23
Tabla 3. Fragmentos peptídicos identificados con entrecruzamiento luego del análisis mediante espectrometría de masas.....	59
Tabla 4. Información referente a la colección de los datos cristalográficos y datos estadísticos de refinamiento.....	69
Tabla 5. Potenciales interacciones no covalentes entre la subunidad γ^{33} y las subunidades α y β del complejo hexamérico R-ficoeritrina.....	75
Tabla 6. Areas de las interfaces, entre la subunidad γ^{33} con las diferentes subunidades α y β ficoeritrina.....	77
Tabla 7. Composición (%) de aminoácidos presentes en la interfaz subunidades α/γ^{33}	78
Tabla 8. Composición (%) de aminoácidos presentes en la interfaz subunidades β/γ^{33}	79

ABREVIACIONES

LHCs: Complejos captadores de luz

CR: Centro de reacción fotosintética

PBS(s): Ficobilisoma(s)

LP(s): Proteína(s) de unión "*Linker Proteins*"

PBP(s): Ficobiliproteína(s)

APC: Aloficocianina

PC: Ficocianina

PEC: Ficoeritrocianina

C-PE: Ficoeritrina tipo C

R-PE: Ficoeritrina tipo R

λ^{Amax} : Longitud de onda de máxima absorción.

PCB: ficocianobilina

PEB: ficoeritrobilina

PUB: ficourobilina

PVB: ficoviolobilina

XL-MS: Entrecruzamiento químico acoplado a espectrometría de masas

α -PE: subunidad alfa de ficoeritrina

β -PE: subunidad beta de ficoeritrina

T₁R-PE: Trímero uno de R-ficoeritrina

T₂R-PE: Trímero dos de R-ficoeritrina

SL-PEB: ficoeritrobilina unida de forma sencilla

SL-PUB: ficourobilina unida de forma sencilla

DL-PUB: ficourobilina con doble unión a la proteína



Caracterización estructural de una proteína de unión γ^{33} asociada a la R-ficoeritrina de *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta: Gracilariaceae).

RESUMEN

Los ficobilisomas (PBS) son complejos proteicos accesorios captadores de luz, constituidos principalmente por ficobiliproteínas (PBPs). La luz absorbida por las PBPs es eficientemente transferida a los centros de reacción fotosintética mediante bilinas o cromóforos que se encuentran covalentemente unidos a residuos específicos de cisteínas. Además de las ficobiliproteínas, el PBS contiene proteínas de unión responsables del ensamblaje y la estabilización de todo el complejo y el ajuste de los pasos de transferencia de energía entre los cromóforos. La proteína de unión cromoforilada (γ^{33}) de *Gracilaria chilensis*, es un linker de varillas que se encuentra asociada a hexámeros $(\alpha\beta)_6$ de R-ficoeritrina (R-PE). Debido a que su rol en el proceso de transferencia de energía aún no está claro, estudios con enfoques estructurales podrían ayudar a entender dicho proceso. Inicialmente, se realizó el clonamiento y secuenciación del gen codificante de la subunidad γ^{33} . La secuencia proteica fue analizada luego de su traducción *in silico*, en la que se determinó que la proteína consta de 318 residuos aminoacídicos incluyendo un péptido de tránsito cloroplástico (cTP) de 39 aminoácidos en el extremo N-terminal. Se realizaron análisis espectroscópicos del *linker* purificado a partir de R-PE y mediante espectrometría de masas se confirmó su secuencia. Usando subunidades α y β R-PE como sondas espectroscópicas en ensayos de denaturación, se dedujo la existencia de una ficourobilina (PUB) unida a dos residuos Cis en la subunidad γ^{33} , y luego el análisis de espectrometría de masas permitió confirmar los sitios de unión en las Cis62 y Cis73 (DL-PUB^{62/73}). El análisis del espectro de absorción del ensayo de denaturación, en conjunto con la determinación de las áreas de los máximos de absorción, indican igual proporción PUB/PEB.

Adicionalmente, datos obtenidos a partir de ensayos de entrecruzamiento químico acoplado a espectrometría de masa, difracción de rayos X junto con datos de crio-tomografía electrónica (Cryo-ET) del complejo R-PE se integraron para corregir y reconstruir un modelo de γ^{33} previamente obtenido a través de modelamiento por homología. La subunidad γ^{33} presenta dos repeticiones internas con nueve hélices α (H_1 - H_9) entre ellas. El extremo N-terminal consta de un bucle largo con dos pequeñas α -hélices (N , N'). Las repeticiones internas hacen contactos extensos con cierto estilo simétrico en la región interna del hexámero de R-PE. Las α -hélices H_1 , H_2 y H_3/H_4 contactan con tres lados internos del mismo trímero (T_1 R-PE): en la α -hélice X de las subunidades α , y F y F' de las subunidades β . El bucle que separa las α -hélices H_1 y H_2 interactúa principalmente con la hélice X de la subunidad α del trímero opuesto (T_2 R-PE). Las α -hélices H_6 , H_7 y H_8/H_9 entran en contacto con tres lados internos del mismo trímero T_2 R-PE: en la α -hélice X de las subunidades α , y F y F' de las subunidades β , como H_1 , H_2 y H_3/H_4 en T_1 R-PE. El extremo N-terminal de la subunidad γ^{33} contiene un bucle largo que se repliega hacia la región de repetición que junto con una α -hélice corta (N') sobresale ligeramente hacia el exterior de la cavidad y podría insertarse en el hexámero contiguo. El cromóforo unido a Cis-259 es una propuesta a partir de datos cristalográficos, y su entorno mantiene las características fisicoquímicas similares a los cromóforos asociados a α y β de otras PBPs, aunque con variaciones en los aminoácidos constituyentes que podrían explicar los sutiles cambios en las propiedades espectrales. Las cisteínas involucradas en la doble unión de la PUB se encuentran ubicadas en una región helicoidal en una conformación que recuerda la posición del DL-PUB^{50/61} en la subunidad β de R-PE. La subunidad γ^{33} interactúa por dentro de la cavidad del hexámero de R-ficoeritrina.

ABSTRACT

Phycobilisomes (PBS) are accessory light harvesting protein complexes, formed mainly by phycobiliproteins (PBPs). The PBPs absorb light being efficiently transferred to reaction centers due to chromophores covalently bound to specific cysteine residues. Besides phycobiliproteins, the PBS contain linker proteins responsible for the assembly and stabilization of the whole complex and the tuning of energy transfer steps between chromophores. The linker (γ^{33}) from *Gracilaria chilensis*, is a chromophorylated rod linker associated to $(\alpha\beta)_6$ hexamers of R-phycoerythrin (R-PE). Their role in the energy transfer process is not clear yet. So, structural studies are essential to understand it about this. The cloning and sequencing of γ^{33} coding gene was carried out. Bioinformatic tools were used to analyze the *in silico* translated sequences. The coding sequence analysis revealed a protein of 318 aminoacid residues containing a chloroplastidial transit peptide (cTP) of 39 aminoacids at N-terminus. Spectroscopic analysis of γ^{33} linker purified from R-phycoerythrin was carried out and by mass spectrometry its sequence was confirmed. Using α and β R-PE subunits as spectroscopic probes in denaturation assays, a double bonded phycourobilin (PUB) at Cys-62 and Cys-73 (DL-PUB^{62/73}) on γ^{33} subunit was deduced and confirmed, by combining tryptic digestion and cyanogen bromide nonenzymatic cleavage with mass spectrometry analysis. The absorption spectrum analysis from the denaturation assays also indicated equal PUB/PEB rate. Also, chemical cross-linking coupled to mass spectrometry, X-ray diffraction partial data together electron cryo-tomography (Cryo-ET) data of R-phycoerythrin complex were integrated to correct and rebuild a 3D interaction model of R-phycoerythrin with γ^{33} linker previously obtained through homology modeling. The γ^{33} subunit had two internal repeats with nine α -helices (H₁-H₉) inside. The N-terminus had a long loop and two short helices (N, N'). The internal repeats make extensive contacts in a symmetrical style with the inner face of the phycoerythrin hexamer. Helices H₁, H₂, and H₃/H₄ contact the three inner sides of same trimer (T₁R-PE): helix X from the α -subunits and F and

F' from the β -subunits. The loop separating helices H₁ and H₂ interacts mainly with helix X from the α -subunit of opposite trimer (T₂R-PE). Helices H₆, H₇, and H₈/H₉ contact the three inner sides of same trimer T₂R-PE: helix X from the α -subunits and F and F' from the β -subunits, as H₁, H₂, and H₃/H₄ on T₁R-PE. The N-terminus of γ^{33} subunit contains a long loop that folds back to the repeat region that in conjunction with a short helix (N') protrudes slightly to outside of cavity and could insert into the neighboring hexamer. The bilin on Cys-259 was modeled from crystallographic data, and its chromophoric environment maintains the physicochemical characteristics similarly to α and β phycobiliproteins. Nevertheless, varying in the constituent amino acids that could explain the variations in the spectral properties. The cysteines involved in the double link, is located in a helical region in a conformation that reminds the position of the DL-PUB^{50/61} in the β subunit of R-PE. The γ^{33} subunit is interacting inside the R-phycoerythrin hexamer cavity.



INTRODUCCIÓN

En el proceso de fotosíntesis, la captura y transferencia de energía luminosa hacia el centro de reacción representa los pasos iniciales para su transformación en energía química, y este proceso es realizado por complejos captadores de luz (LHCs) (Cogdell *et al.* 2008). Los LHCs de los organismos fotosintéticos, oxigénicos o anoxigénicos, comparten muchas características funcionales, pero difieren considerablemente en detalles moleculares. Éstos están compuestos de proteínas que se asocian a pigmentos (clorofilas, bilinas o carotenoides) en posiciones, orientaciones y conformaciones específicas que permiten la absorción y transferencia de energía de forma eficiente. La energía absorbida es canalizada hacia los centros de reacción fotoquímica (CR). Las proteínas de los LHCs deben también tener la capacidad de autoensamblarse dentro del complejo, y pueden requerir de chaperonas específicas (Anderson & Toole, 1998). En muchos casos, el ensamblaje es un proceso de múltiples niveles, en los que se ha propuesto inicialmente la formación de subcomplejos, consistentes de monómeros con la correcta unión de cromóforos, y la posterior organización de un sistema supramacromolecular capaz de canalizar la energía hacia los CRs. El requerimiento de múltiples componentes puede indicar que los mecanismos de flujo energético son generados mediante la transferencia de energía a cortas distancias (dentro de cada subcomplejo) que al acoplarse, permite la transferencia a mayores distancias (Cogdell *et al.*, 2004).

Los ficobilisomas (PBSs) (Figura 1) son el principal LHC en cianobacterias, algas rojas y criptofitas, en los que además de incrementar sustancialmente la absorción de luz hacia el fotosistema 680 (P680), transfieren la energía hasta el emisor final en la membrana tilacoidal, más eficientemente que otros LHCs conocidos en la naturaleza. Los PBSs se distinguen de otros LHCs tanto por su tamaño como por el contenido de pigmentos, siendo uno o dos órdenes de magnitud más grandes a los encontrados en plantas vasculares y bacterias. Se

encuentran unidos a la superficie estromal de la membrana tilacoidal y son ensamblados mediante la participación de las proteínas de unión (LPs del inglés *linkers proteins*), algunas de éstas, ubicadas principalmente dentro de cavidades formadas por la asociación de ficobiliproteínas (PBPs) (Adir, 2005).

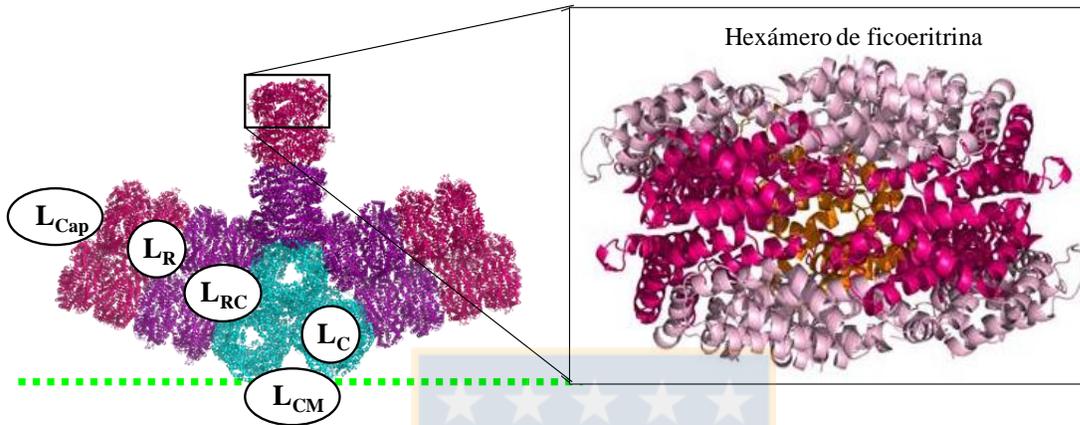


Figura 1. Esquema estructural de un ficobilisoma conformado por un núcleo de aloficocianina (azul) y varillas de ficocianina (violeta) y ficoeitrina (purpura). Se muestra la ubicación y el sistema de abreviación para proteínas de unión propuesto por Glazer (1985). Linker core-membrana (L_{CM}), Linker core (L_C), Linker rod-core (L_{RC}), Linker rod (L_R) y L_{Cap} en función a su ubicación en el PBS. La subunidad γ (anaranjado) es considerada un tipo de L_R asociada a la ficoeitrina en estado hexamérico. Fuente: Elaboración propia

Las PBPs absorben luz entre 550 y 680 nm, un rango de absorción que abarca la zona del espectro no cubierta por otros LHCs, por lo que organismos vegetales que contienen PBSs son capaces de utilizar una región más amplia del espectro visible para fotosíntesis. Las PBPs han sido clasificadas de acuerdo al tipo y número de grupos tetrapirrólicos lineales, (bilinas o cromóforos) unidos covalentemente a ellas, denominándoseles: ficoeitrina (PE, $\lambda_{max} = 560$ nm), ficoeitrocianina (PEC, $\lambda_{max} = 575$ nm), ficocianina (PC, $\lambda_{max} = 620$ nm) y

aloficocianina (APC, $\lambda^{max} = 652 \text{ nm}$), todas con ubicaciones específicas dentro del PBS (David *et al.*, 2014).

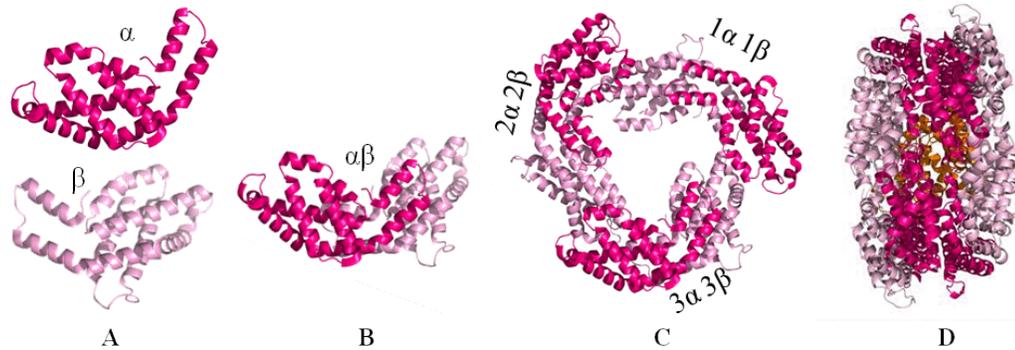


Figura 2. Niveles de ensamblajes entre subunidades de R-ficoeritrina hasta la generación del estado hexamérico. Fuente: Elaboración propia

Las PBPs de cianobacterias y algas rojas están comúnmente constituidas por dos tipos de subunidades: α y β (Figura 2A), las cuales son homólogas, sugiriendo la posibilidad de un ancestro común entre éstas (Apt *et al.*, 1995). Una asociación de subunidades ($\alpha\beta$) genera la unidad básica de los PBSs, un heterodímero altamente estable conocido tradicionalmente como monómero ($\alpha\beta$) (Figura 2B). En PE, PC y PEC, tres monómeros ($\alpha\beta$) se pueden asociar generando un trímero de forma discoidal (Figura 2C), y dos discos triméricos pueden asociarse para dar una estructura hexamérica (Figura 2D). Diferentes hexámeros de PE, PC o PEC, pueden agregarse formando un subcomplejo cilíndrico denominado varilla o “Rod”. Estas últimas son proyecciones que se encuentran en la periferia del PBS y su número varía en función de la especie. Igualmente, de dos a cuatro trímeros de APC pueden formar cilindros y empaquetarse en números de dos a cinco formando el subcomplejo “core” que se dispone sobre la membrana estromal del tilacoide. El posicionamiento de PC, PC-PE o PC-PEC en las varillas y de APC, asegura que la energía excitatoria, sea canalizada hacia el core del PBS

sirviendo de intermediario en la transferencia de energía hacia el centro de reacción fotosintética (Tamary *et al.*, 2012).

Las PBPs están entre las primeras proteínas fotosintéticas de estructuras conocidas, sin embargo, mientras las estructuras de otros LHCs se conocieron en su totalidad en tiempos recientes (Barros *et al.* 2009; Liu *et al.* 2004; Amust *et al.* 2010), la estructura completa de PBSs permanece sin conocerse en detalle. La dificultad en la determinación de su estructura, no solo radica en su gran tamaño, sino también en la alta inestabilidad *in vitro*, en su variación entre especies, además de la heterogeneidad posiblemente inducida por efectos del aislamiento (David *et al.*, 2011). Un trabajo reciente en el que se muestran grandes avances referentes a la estructura del PBS fue expuesto por Zhang *et al.*, (2017) quienes proveen información para el entendimiento del ensamble y el mecanismo de transferencia de energía dentro del PBS de *Griffithsia pacifica*.

El alto coeficiente de extinción y gran rendimiento cuántico de estas proteínas brillantes y coloreadas en sus conformaciones triméricas o hexaméricas, evidenciados en los máximos de absorción y emisión dentro del espectro de luz visible, son atribuidas a la presencia de las antes citadas, estructuras tetrapirrólicas abiertas, las ficobilinas, unidas covalentemente a las subunidades de PBPs por un enlace tioéter entre cisteínas que se encuentran en posiciones conservadas de las apoproteínas, con el C-3¹ del anillo A del grupo tetrapirrólico, o mediante dos enlaces tioéter que involucran dos residuos cisteínas con el C-3¹ del anillo A y el C-18¹ del anillo D (Figura 3) (Ficner & Huber, 1993; Adir, 2005).

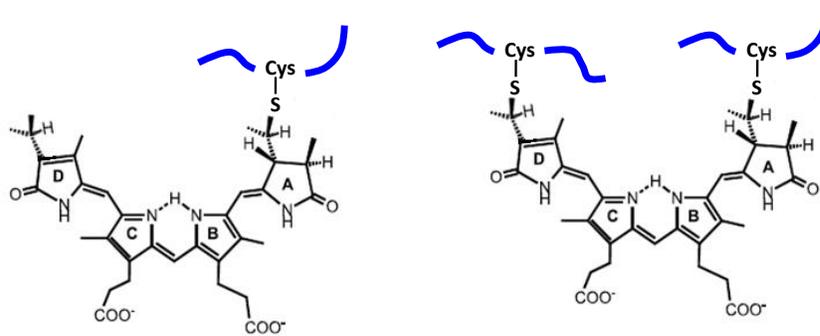


Figura 3. Esquema de un cromóforo unido mediante un simple (izquierda) o doble (derecha) enlace tioéter a una ficobiliproteína. Adaptado de Zhao *et al.*, 2004. Fuente: Elaboración propia

Las ficobilinas son isómeros con características espectroscópicas particulares, debido al número y disposición de dobles enlaces conjugados en su estructura. La ficourobilina (PUB), ficoeritrobilina (PEB), ficoviolobilina (PVB) y ficocianobilina (PCB) con cinco, seis, siete y ocho dobles enlaces de conjugación, respectivamente, han permitido clasificar las diversas PBP e incluso diferenciarlas dentro de una misma clase de PBP por sus espectros de absorción (Glazer *et al.*, 1982; Wedermayer *et al.*, 1992; Munier *et al.*, 2014). La clase más variada la representan las PEs con un intenso color fucsia. Actualmente, se conocen tres tipos de PEs según su constitución de ficobilinas (Figura 4). La B-PE aislada de cianobacterias y algas rojas se caracteriza por contar con cinco PEB unidas en los residuos $\alpha 84$, $\alpha 140$ ó $\alpha 143$, $\beta 50$ ó $\beta 61$, $\beta 82$ ó $\beta 84$, $\beta 155$ ó $\beta 159$. La C-PE aislada de cianobacterias está subdividida en C-PE-I la cual cuenta con cinco PEB en $\alpha 84$, $\alpha 140$ ó $\alpha 143$, $\beta 50/\beta 61$, $\beta 82$ ó $\beta 84$, $\beta 155$ ó $\beta 159$, y C-PE-II que adicionalmente a las PEB posicionadas como en C-PE-I, posee una PUB en $\alpha 75$. El tercer tipo es la R-PE aislada de algas rojas y caracterizada por poseer cuatro moléculas de PEB unidas a los residuos $\alpha 82$, $\alpha 139$, $\beta 82$ y $\beta 158$, además de una PUB unida a las cisteínas $\beta 50/\beta 61$ (Ritter *et al.*, 1999; Contreras-Martel *et al.*, 2002). La unión de un cromóforo a las PBP son modificaciones post-traduccionales llevadas a cabo por enzimas con actividad liasa específica, tanto para el cromóforo como para el residuo de unión en cada subunidad. Estas

enzimas aseguran la unión de la bilina en el residuo de cisteína correspondiente y con la correcta estereoquímica. Actualmente, se han descrito más de 1500 liasas de bilinas, todas pertenecientes a cianobacterias. Algunas de éstas ya están caracterizadas a nivel genético y bioquímico, existiendo sólo una estructura depositada en el *Protein Data Bank* (Zhou, 2014).

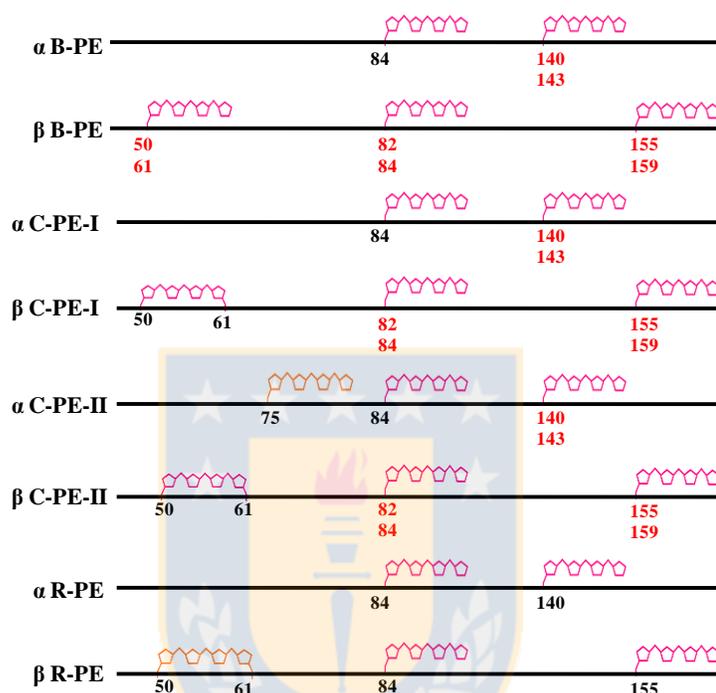


Figura 4. Esquemas de diferentes tipos de ficoeritrinas aisladas de cianobacterias y algas rojas. Las ficoeritrinas han sido caracterizadas principalmente de acuerdo al número y posición de dos tipos de cromóforos presentes, las ficoeritrobilinas (fucsia) y las ficourobilinas (naranja). Los números en rojo indican posiciones alternativas de los residuos de cisteínas a los que se encuentran unidos cada cromóforo. Fuente: Elaboración propia

Los cromóforos se disponen espacialmente de forma tal que la captura y transferencia de energía lumínica está optimizada. Los fotones que inciden en las PBP tardan tiempos del orden de picosegundos en alcanzar los centros de reacción fotosintéticos (Suter & Holzwarth, 1987). El mecanismo mediante el cual la energía lumínica se transfiere a través de las PBPs se conoce como FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), que consiste en la

transferencia de energía no radiativa entre un cromóforo donante y uno aceptor. Se ha postulado que el decaimiento electrónico, desde un estado excitado de la molécula donadora, a un estado de menor energía en la molécula aceptora queda descrito por un acoplamiento dipolo-dipolo entre las moléculas (Glazer, 1989; van der Weij-De Wit *et al.*, 2006). Pruebas experimentales han demostrado, que el postulado de Förster es una excelente aproximación para modelar los procesos de transferencia de energía en las PBP (Debreczeny *et al.*, 1995).

El correcto empaquetamiento de diferentes trímeros o hexámeros y el ensamblaje entre los subcomplejos de PBSs, así como la optimización de la absorción y maximización en la transferencia de energía de forma unidireccional ha sido atribuido, en parte, a la presencia de proteínas de unión (LPs) asociadas con ficobiliproteínas (Apt *et al.*, 1995), sin embargo, a la fecha, la información disponible respecto a estas proteínas es limitada. La asociación LPs-PBPs, ha sido evidenciada en estructuras triméricas de APC con la LP "core" (L_C) (Reuter *et al.*, 1999 PDB ID: 1B33). En trabajos más recientes, estructuras de diferentes pequeños dominios de LPs de varilla (L_R) y LP core-membrana (L_{CM}) fueron determinados mediante resonancia magnética nuclear (NMR) y cristalografía de rayos X (PDB IDs: 2KY4, 2L8V, 3NPH 3RPU, 3OHW y 3OSJ), pero ninguno correspondiente a PLs asociados con PE.

Particularmente, en la PE de algas rojas y algunas cianobacterias existe evidencias de una tercera subunidad cromoforilada, llamada subunidad gamma (γ) un tipo especial de LP cromoforilada, caracterizada por formar un complejo estable con las subunidades α y β de PE (Glazer & Hixson, 1977; Bernard *et al.*, 1996) y por su rol conector entre trímeros $(\alpha\beta)_3$ de tamaños entre 120-130KDa, generando hexámeros de PE $((\alpha\beta)_3\gamma(\alpha\beta)_3)$ de masa molecular 240-260KDa, los cuales pueden encontrarse en estado $((\alpha\beta)_3\gamma(\alpha\beta)_3)$ en solución, o formando parte del PBS (Adir, 2005). En las algas rojas *Aglaothamnion neglectum* y *Rhodella violacea*, por ejemplo, se ha señalado la existencia dos tipos de subunidades (γ) con pesos moleculares aparentes de 31kDa y 33kDa referidos como γ^{31} y γ^{33} , respectivamente (Bernard *et al.*, 1996;

Apt *et al.* 2001) que pueden ser análogos a los reportados por Talarico (1990) en *Audovinella saviana* quien los presentó como γ (PM= 30500) y γ' (PM= 35000), siendo el denominador común entre estos trabajos, la existencia de un ensamble $((\alpha\beta)_3\gamma(\alpha\beta)_3)$. Además, Apt *et al.* (2001) establecieron, respectivamente, el posible posicionamiento distal y proximal, con respecto al core, de γ^{31} y γ^{33} en varillas de PBSs de *A. neglectum*, luego de encontrar dos isoformas hexaméricas de PE diferenciadas por el tipo de subunidad γ , validando lo propuesto previamente por Glazer (1980) en B-PE. Por otra parte Chang *et al.* (1996) informaron la existencia de un hexámero en base a datos obtenidos a partir de cristales de R-PE de *Polysiphonia urceolata* donde señalan la presencia de una subunidad γ de 34kDa, asumiendo su posicionamiento en la cavidad central del hexámero y resaltando que solo una estequiometría $(\alpha_2\beta_2)_3\gamma$ de la molécula es funcional, concordando con lo expresado anteriormente, sin embargo, sólo se señala la presencia de un tipo de subunidad γ .

En otro trabajo, Sun *et al.* (2004) (Tabla 1) reportaron la presencia de una subunidad γ^{31} en *Polysiphonia urceolata* formando parte de un “subcomplejo” constituido por agregados de PE con estequiometría $\gamma^{31}(\alpha\beta)_3$ $L_R^{35}(\alpha\beta)_3\gamma^{31}$ y en trímeros $(\alpha\beta)_3\gamma^{31}$ obtenidos a partir de PBSs disociados, mientras que recientemente Zhao *et al.* (2015) en la misma especie, señalan la existencia de PE hexamérica con una o dos subunidades γ_1 y γ_2 , que según sus pesos moleculares y características espectroscópicas, pueden corresponder a γ^{33} y γ^{31} , respectivamente, contrastando con la estequiometría propuesta por Chang *et al.* (1996) para *P. urceolata*. Tomando en cuenta lo expuesto por Sun *et al.* (2004), en referencia a los trímeros $(\alpha\beta)_3\gamma^{31}$, es válido preguntarse, si es posible la estequiometría $(\alpha\beta)_3\gamma(\alpha\beta)_3$ presentada por Glazer & Hixson, (1977); Bernard *et al.* (1996); Talarico, (1990) y Apt *et al.* (2001). Una posible respuesta, podría fundamentarse en la disociación del hexámero $(\alpha\beta)_3\gamma(\alpha\beta)_3$, sin embargo, Sun *et al.* (2004) aclaran sobre la existencia de trímeros con subunidad γ tanto en la forma $(\alpha\beta)_3\gamma^{31}$ como $L_R^{35}(\alpha\beta)_3\gamma^{31}$, los cuales se encuentran en una proporción dos veces menor con

respecto al hexámero $\gamma^{31}(\alpha\beta)_3L_R^{35}(\alpha\beta)_3\gamma^{31}$ asociado mediante una proteína de unión no cromoforilada (L_R^{35}). Nuevamente, al igual que en el trabajo de Chang *et al* (1996) se expresa la existencia de trímeros o hexámeros de PE, pero se habla de un solo tipo de proteína de unión cromoforilada (la subunidad γ^{31}) y además, los hexámeros se originan mediante la presencia del (L_R^{35}), contrastando con las propuestas de Glazer & Hixson, (1977), Bernard *et al* (1996), Talarico (1990) y Apt *et al.* (2001), que igual difieren de los resultados recientemente presentados por Zhao, *et al.* (2015) al señalar la existencia de hexámeros de PE con dos subunidades γ diferentes, obtenidos a partir de la disociación de PBSs, y sin hacer referencia al posicionamiento dichas subunidades, como lo proponen Wang *et al.* (2015) (Tabla 1).



Tabla 1. Modelos propuestos para la estequiometría y posicionamiento de la subunidad γ en el hexámero de ficoeritrina purificada a partir de algas rojas.

Estequiometría propuesta	Especie	Literatura
$((\alpha\beta)_3\gamma(\alpha\beta)_3)$	<i>Porphyridium cruentum</i>	Glazer & Hixson, 1977
$(\alpha\beta)_3\gamma(\alpha\beta)_3$	<i>Audovinella saviana</i>	Talarico, 1990
$(\alpha\beta)_3\gamma'(\alpha\beta)_3$		
$(\alpha\beta)_3\gamma^{31}(\alpha\beta)_3$	<i>Aglaothamnion neglectum</i>	Apt <i>et al.</i> , 2003
$(\alpha\beta)_3\gamma^{33}(\alpha\beta)_3$		
$\gamma^{31}(\alpha\beta)_3\text{L}_R^{35}(\alpha\beta)_3\gamma^{31}$	<i>Polysiphonia urceolata</i>	Sun <i>et al.</i> , 2004
$(\alpha\beta)_3\gamma^{31,3}(\alpha\beta)_3$	<i>Heterosiphonia japonica</i>	Sun <i>et al.</i> , 2009
$(\alpha\beta)_3\gamma^{30,2}(\alpha\beta)_3$		
$(\alpha\beta)_3\gamma(\alpha\beta)_3$	<i>P. urceolata</i>	Zhao <i>et al.</i> , 2015
$(\alpha\beta)_3\gamma'(\alpha\beta)_3$		
$\gamma^{34,6}(\alpha\beta)_3 \gamma^{34,6}(\alpha\beta)_3 \gamma^{31,6}$	<i>P. urceolata</i>	Wang <i>et al.</i> , 2015
$\gamma^{34,6}(\alpha\beta)_3 \gamma^{31,6}(\alpha\beta)_3 \gamma^{34,6}$		

Fuente: Elaboración propia

La coloración de las subunidades γ varía con el tipo y número de bilinas unidas a éstas. Glazer (1985) y Figner *et al.* (1992) describieron que en las subunidades γ de B-PEs existe la presencia de cuatro bilinas, dos PEB y dos PUB mientras que en las asociadas a R-PEs, pueden existir entre cuatro y cinco cromóforos, e igualmente sus proporciones pueden cambiar en función de la especie. En *Callithamnion corymbosum* se ha observado una γ con tres PUB y dos PEB; en *Antithamnion spargus* se han evidenciado subunidades γ con cuatro PUB y una PEB (Stadnichuk *et al.* 1993). Por su parte, Zhao *et al.* (2015) mencionan que en *P. urceolata* existe una γ_1 con tres PUB y una PEB y otro (γ_2) con dos PUB y dos PEB. Está claro el importante rol que la subunidad γ podría tener en la estabilización y ensamblaje de los

hexámeros de PE (Zhao *et al.*, 2013) y la existencia de distintos tipos de hexámeros que ensamblan al PBS; sin embargo, las proporciones en las que abundan $(\alpha\beta)_6\gamma^{31}_x$ o $(\alpha\beta)_6\gamma^{33}_x$, (x indica número de γ por hexámero y posición desconocida) es un tema cuestionable entre diversos trabajos, producto de resultados contradictorios en los que señalan concentraciones equimolares (Yu *et al.*, 1981; Sun *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010), la presencia de un solo tipo de subunidad γ asociada a PE, por lo general γ^{33} , o la presencia de ambos pero en concentraciones disímiles. Estas diferencias pueden estar fundamentadas en las condiciones de cultivo del alga, sistemas o mecanismos de extracción y purificación de las proteínas, temporada de recolección del alga entre otros factores. Bernard *et al.* (1996) propusieron la existencia de dos niveles de regulación de PE y las subunidades γ asociadas a ellas: hexámeros de PE posicionados en la región intermedia de la varilla de PBS y su γ asociada, siempre están presentes aún cuando se incrementa la irradiación sobre el cultivo algal. En contraste, hexámeros de PE terminales de PBSs y su γ asociada, no se encuentran presentes bajo condiciones de alta irradiación. Esta idea, concuerda con los posicionamientos para los dos γ propuesto por Apt *et al.* (1995) y Apt *et al.* (2001) en *A. neglectum*.

La falta de consenso en algunas de las investigaciones antes señaladas, abren la posibilidad de plantearse numerosas las preguntas al respecto; muchas de las cuales pueden ser respondidas con el trabajo de Zhang *et al.* (2017) en los que se presenta la estructura del PBS de *Griffithsia pacifica*; a partir de datos de criomicroscopía electrónica. Aunque nuevas preguntas pueden surgir a partir del señalamiento de la existencia de al menos ocho subunidades γ asociadas a ficoeritrina en las varilla, como ejemplo; tienen todos el mismo tipo de cromóforo?, están éstos unidos de forma sencilla o mediante dos residuos cisteína? Son similares todos los ambientes cromofóricos? Es por esto que detalles a nivel atómico y otros enfoques son necesarios para el entendimiento del ensamble, determinación de los tipos de cromóforos, así como su tipo de unión a las PLs, que luego permitan determinar la participación

de las subunidades γ s en las vías de transferencia de energía dentro del PBS de *Gracilaria chilensis*. Por otro lado, Contreras-Martel *et al.* (2001) en su análisis de datos cristalográficos de R-PE purificada a partir de *G. chilensis*, señalaron la presencia de una densidad electrónica en el centro del anillo hexamérico, sugiriendo una posible localización de la subunidad γ en el interior de la cavidad del hexámero, y señalándola además como proteína de unión de varilla (L_R), con peso molecular cercano a 30000Mr. En su trabajo reciente Zhang *et al.* (2017) posicionan a parte de la subunidad γ^{33} dentro del hexámero con proyección de un gran “loop” correspondiente a la región N-terminal hacia afuera del hexámero que interacciona con el dominio Pfam00427 de la proteína de unión asociada a la ficocianina, contradictorio a lo expresado por Wilbanks & Glazer (1993) quienes hipotetizaron que solo la región N-terminal ocupa la cavidad hexamérica de PE, mientras que catalogan la región C-terminal como una escindible proyección desde la cavidad central. Si bien, la información de Zhang *et al.* (2017), permite posicionar la subunidad γ^{33} en la PE hexamérica, más detalles estructurales referente a las cadenas laterales de aminoácidos que interaccionan con cromóforos de PE o con los propios cromóforos de la subunidad γ^{33} son necesarios. Si en esencia son los cromóforos quienes transfieren la energía hacia el centro de reacción, debe existir un arreglo y disposición entre ellos para esta transferencia. Dicho arreglo involucra cromóforos tanto de las PBPs, en este caso particular las subunidades α o β de PE, como los de la subunidad γ . Existen estudios que han permitido dilucidar el tipo, número y disposición de las bilinas sobre las subunidades α o β de las PBPs (Isailovic *et al.*, 2004; Lundell *et al.*, 1984), sin embargo, son escasos los trabajos en los que se hayan caracterizado las subunidades γ , en función del contenido y disposición de ficobilinas. En *A. neglectum* Apt *et al.* (1993), señalan que γ^{33} presenta tres PUB y una PEB, mientras que γ^{31} presenta dos de cada una de estas bilinas; por otro lado, Wang *et al.* (2004) expresaron que una subunidad γ de 30KDa obtenida a partir de PE de *Corallina officinalis* presenta sitios potenciales o residuos conservados de cisteína, en los que asumen la unión de tres PUB en γC^{96} , γC^{135} y γC^{299} ; y una PEB en γC^{212} de acuerdo a sus alineamientos

con *Gastroclonium coulteri* (Klotz & Glazer, 1985), la única especie donde se ha demostrado la posición y tipo de cromóforos asociados a la subunidad γ . Recientemente, Zhang *et al.* (2017) señalan la presencia de solo PUB unidas a γ y asociadas a la PE de *Griffithsia pacifica*, sin mostrar evidencias al respecto. Por estas razones, es necesario pensar que ensayos de digestión trípica, en conjunto con análisis espectroscópicos y de espectrometría de masas para la identificación del tipo de cromóforo unido a las ficobiliproteínas como lo realizó (Klotz & Glazer, 1985), que en conjunto con técnicas cristalográficas pudieran ser empleadas para lograr la obtención de modelos estructurales de LPs cromoforiladas asociadas a las ficobiliproteínas.

Otro enfoque que pudiera ayudar en la generación de nueva data referente a la topología de las subunidades γ^{33} de *G. chilensis* y su modo de interacción con PE está representado por entrecruzamientos químicos combinado con espectrometría de masas (XL-MS), el cual es considerado actualmente como una poderosa herramienta en el estudio de interacción proteína-proteína. Durante el protocolo de XL-MS, las proteínas son entrecruzadas antes de una digestión enzimática (Yu *et al.*, 2016). Los productos digeridos incluyen péptidos entrecruzados y péptidos lineales convencionales. Los primeros permiten indicar la localización de sitios de entrecruzamientos y con ello, la proximidad espacial de grupos reactivos que se encuentran conectados mediante enlaces covalentes. Esta información, ya sea sola o en combinación con técnicas como resonancia magnética nuclear (NMR), criomicroscopía electrónica, que en años recientes ha mejorado significativamente su capacidad para resolver estructuras biológicas (Carroni & Saibil, 2016), y cristalografía de rayos X, puede ser utilizada para determinar el posicionamiento de subunidades o regiones locales interactuantes.

Los estudios de entrecruzamientos emplean agentes químicos homobifuncionales que reaccionan frente a aminas primarias como lisinas, siendo entre los comúnmente utilizados los

ésteres de la familia disuccinimidas (Leitner *et al.*, 2014b). De igual forma, el desarrollo de agentes entrecruzantes con capacidad de reaccionar frente a grupos diferentes a los amino, manteniendo la eficiencia de estos últimos, indudablemente incrementarán la información estructural obtenida a partir de estas técnicas (Leitner *et al.*, 2014a). Residuos aminoácidos con grupos carboxilos en sus cadenas laterales (ácido aspártico y ácido glutámico) son blancos atractivos debido a su alta prevalencia en muchas proteínas y las subunidades γ^{33} no son la excepción, por lo que el uso de estos tipos de agentes químicos combinado con análisis de espectrometría de masas y evaluación de los espectros con software adecuados podrían generar información sobre la interacción entre subunidades γ^{33} y R-PE.

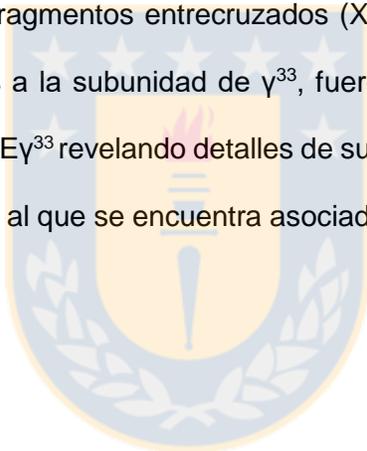
Protocolos de trabajo de XL-MS se encuentran actualmente bien establecidos. Luego del entrecruzamiento y la digestión proteolítica, los péptidos son sometidos a análisis de espectrometría de masas en *tandem* (Leitner *et al.*, 2010). Para los análisis posteriores, se han desarrollado diversos *software* especializados en la identificación de péptidos entrecruzados que proporcionan puntuaciones de confianza luego de la evaluación de la fiabilidad en cada entrecruzamiento detectado (Gao *et al.*, 2006; Gotze *et al.*, 2012; Holding *et al.*, 2013; Rasmussen *et al.*, 2011; Walzthoeni *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2012). Para el análisis estructural, las distancias máximas entre los residuos de aminoácidos involucrados, que varían dependiendo del agente entrecruzante utilizado son tomadas en cuenta como restricciones, facilitando el mapeo de las interacciones entre proteínas (Liu *et al.*, 2014), discriminando las conformaciones oligoméricas alternativas (Tosi *et al.*, 2013) y modelando las estructuras de proteínas (Kahraman *et al.*, 2013) y complejos proteicos (Lasker *et al.*, 2012; Politis *et al.*, 2014). Cada residuo de aminoácido puede formar, en principio, entrecruzamientos de tres tipos: (i) Intercruzamientos, ocurren entre subunidades de proteínas diferentes de un mismo complejo, y son útiles para determinar interfaces de proteínas además de definir la posición relativa de las subunidades de proteínas dentro de un

complejo. (ii) Intracruzamientos, conectan residuos de la misma subunidad proteica y son útiles para posicionar diferentes dominios de una misma proteína (Bui *et al.*, 2013; Lasker *et al.*, 2012; Politis *et al.*, 2014) y para guiar modelamientos por homología (Kahraman *et al.*, 2013). En caso de complejos homo-oligoméricos, los entrecruzamientos no pueden asignarse inequívocamente como inter o intracruzamientos ya que pueden surgir de un par de residuos de la misma subunidad proteica o de sus copias. (iii) monoenlaces representan los péptidos que se modificaron por la unión del agente entrecruzante, pero no se unieron a un segundo péptido debido a la inactividad de uno de los grupos funcionales del agente entrecruzante. Este tipo monounión, no proporciona información referente a la distancia, pero es empleado para mapear interfaces o superficies accesibles a través de la identificación de regiones en las estos enlaces están sobrerrepresentados (Tosi *et al.*, 2013).

En la actualidad se llevan a cabo grandes esfuerzos que buscan mejorar la eficiencia fotosintética principalmente de un grupo particular de microorganismos como son las cianobacterias, mientras que desde otra perspectiva se busca la obtención de sistemas artificiales que emulen la fotosíntesis para la producción de energía (Croce & Van Amerongen, 2014). En ambos casos una parte decisiva la representa los LHCs y en este caso particular los PBSs. En un esfuerzo por dilucidar la completa estructuración de PBSs del alga autóctona *G. chilensis*, el Laboratorio de Biofísica Molecular se ha propuesto mediante enfoques estructurales y biofísicos determinar el funcionamiento de PBSs en la mencionada alga roja, a fin de simular dicho sistema artificialmente. Como un aporte para el entendimiento del citado sistema, se propone realizar estudios que permitan caracterizar estructuralmente la subunidad γ^{33} asociada a R-PE (R-PE γ^{33}) de *G. chilensis*. La obtención de datos estructurales abre la posibilidad de entender mejor cómo se encuentra interactuando esta proteína con las subunidades de PE para estabilizar el complejo hexamérico o/y posiblemente su rol en la canalización de la energía hacia el core del PBS; generando conocimiento acerca del

mecanismo de transferencia energética a través del hexámero de PE. Esta información permitiría además definir en detalle el posible rol de γ^{33} en dicho proceso, a fin de esclarecer y poder adjudicarles, de ser comprobado, un papel bifuncional dentro del PBS, diferenciándolos funcionalmente de su contraparte, las proteínas de unión presentes en los hexámeros de PC, a las que se les ha atribuido un rol estructural.

Luego de haber identificado la secuencia génica codificante de la subunidad γ^{33} en *Gracilaria chilensis*, se propuso avanzar en la obtención de información estructural de la proteína cuando está formando complejo con R-PE. Es por ello que enfoques espectroscópicos, cristalográfico y de tomografía crio-electrónica detallados más adelante, en conjunto con análisis de espectrometría de masas de fragmentos entrecruzados (XL-MS) provenientes de complejos hexaméricos de PE asociados a la subunidad de γ^{33} , fueron necesarios para avanzar en el conocimiento del complejo R-PE γ^{33} revelando detalles de su arquitectura, posicionamiento con respecto al hexámero de R-PE al que se encuentra asociada así como zonas de contacto con α y β R-PE.



HIPÓTESIS

Partiendo de la premisa que:

- 1) Existen indicios de la interacción entre la subunidad γ^{33} y el hexámero de R-ficoeritrina.
- 2) Los modelos propuestos en la actualidad y antes mencionados, con respecto al arreglo o disposición entre la subunidad γ^{33} y el hexámero de R-ficoeritrina, no se encuentran sustentados por experimentos consistentes.
- 3) La ambigüedad entre los modelos propuestos con respecto a la disposición entre la subunidad γ y el hexámero de R-ficoeritrina, no permiten obtener una visión clara de su función en el PBS.
- 4) El modelo de interacción recientemente propuesto carece de detalles atómicos que contribuyan de forma fundamental a la comprensión de los mecanismos de transferencia energética en ficobilisomas

Es posible preguntarse ¿Cómo se encuentra interactuando la subunidad γ^{33} con el hexámero de R-ficoeritrina? Esta interrogante conduce a su vez, a la formulación de la siguiente hipótesis:

“La subunidad γ^{33} se encuentra interactuando por dentro de la cavidad del hexámero de R-ficoeritrina”.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar como interacciona la subunidad γ^{33} con subunidades α y β de ficoeritrina de *Gracilaria chilensis*.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar estructuralmente la subunidad γ^{33} .

1.1 Obtener la secuencia de la subunidad γ^{33} .

1.2 Postular sitios potenciales de cromoforilación mediante herramientas bioinformáticas

1.3 Generar un modelo de la subunidad γ^{33} mediante el uso de herramientas bioinformáticas

1.4 Purificar la subunidad γ^{33} a partir de hexámeros de R-ficoeritrina.

1.5 Caracterizar espectroscópicamente la subunidad γ^{33} .

1.6 Determinar los sitios de unión de cromóforos presentes en la subunidad γ^{33} mediante espectrometría de masas.

2. Caracterizar la asociación entre la subunidad γ^{33} y R-ficoeritrina.

2.1 Generar un modelo de la subunidad γ^{33} , mediante el uso de herramientas bioinformáticas

2.2 Purificar hexámeros de R-ficoeritrina a partir de *G. chilensis*.

2.3 Realizar ensayos de entrecruzamientos entre R-ficoeritrina y la subunidad γ^{33} .

2.4 Realizar digestión trípica de hexámeros entrecruzados

2.5 Analizar por espectrometría de masas los productos de digestión trípica.

2.6 Cristalizar complejos hexámicos de R-PE asociados con la subunidad γ^{33} .

2.7 Obtener un promedio del complejo de R-PE asociados con la subunidad γ^{33} , mediante tomografía crio-electrónica.

3. Corregir el modelo de interacción entre la subunidad γ^{33} y R-ficoeritrina mediante el uso e integración de datos de entrecruzamiento acoplados a espectrometría de masas, datos cristalográficos y de criomicroscopía electrónica.

3.1 Refinar los datos obtenidos a partir de cristalografía.

3.2 Postular un modelo de interacción subunidad γ^{33} y R-ficoeritrina mediante la integración de datos experimentales.



MATERIALES Y MÉTODOS

El alga roja *Gracilaria chilensis* utilizada en este trabajo fue recolectada en la localidad de Colcura (37° 06' 39" S, 73° 08' 52" O) en la región del Bío Bío, Chile. Y luego de su lavado se mantuvo almacenada a -20 ó -80°C, de acuerdo al uso posterior.

Extracción de ADN genómico.

Para obtener ADN genómico a partir de *Gracilaria chilensis* se pesaron 100mg de alga fresca o almacenada a -20°C, los que se congelaron con nitrógeno líquido y molieron con un mortero hasta obtener un polvo fino. El polvo se traspasó a un tubo Eppendorf de 1,5 mL, para luego añadir 600µL de *Nuclear Lysis Buffer* (Promega, EE.UU.). Esta mezcla se agitó con vortex durante 5seg para humedecer el alga, y se incubó a 65°C x 15min. A continuación se añadieron 3 µL de Ribonucleasa A 10 mg/mL (ThermoFisher), se mezcló por inversión, y se incubó a 37°C por 45min. Luego de enfriar a temperatura ambiente por 5min, se agregaron 200µL de acetato de amonio 9 M, y se agitó con vortex a máxima velocidad por 20seg. Luego de una centrifugación (3min x 13000g), las proteínas precipitadas formaron un *pellet* firme y el sobrenadante conteniendo el ADN fue retirado cuidadosamente y traspasado a un tubo nuevo de 1,5 mL conteniendo 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente. Este tubo se mezcló suavemente por inversión hasta que aparecieron filamentos de ADN formando una masa visible. Posteriormente, se centrifugó por 1min a 13000g a temperatura ambiente, tras lo cual el ADN sedimentó como un *pellet* de color claro. El sobrenadante se descartó, y el *pellet* se cubrió con 600 µL de etanol 70% a temperatura ambiente y se lavó invirtiendo suavemente el tubo varias veces. Después de centrifugar (1min x 13000g) a temperatura ambiente, el etanol se descartó cuidadosamente y el tubo se invirtió sobre papel absorbente para ser secado durante 15 minutos. El *pellet* seco se resuspendió en 50µL de agua libre de nucleasas. Para

augmentar la pureza del ADN obtenido, se llevó a cabo una extracción adicional con fenol-cloroformo (Chomczynski & Sacchi, 2006), para luego resuspenderlo nuevamente en agua libre de nucleasas, cuantificarlo mediante espectrofotometría a 260 nm y ser almacenado a -20°C hasta el momento de su uso. De igual forma, el ADN también fue analizado mediante un gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio (50ng/L).

Diseño de partidores para la subunidad γ^{33} de R-ficoeritrina.

Usando la secuencia aminoacídica de la subunidad γ^{33} de dos especies de algas rojas pluricelulares (*Aglaothamnion neglectum* y *Corallina officinalis*) presentes en la base de datos Uniprot, se realizó un TBLASTN contra la base de datos de EST (*expressed sequence tags*) perteneciente a la base de datos GenBank. Con los ESTs obtenidos desde distintas especies de *Gracilaria*, más la secuencia nucleotídica del gen codificante de la subunidad γ^{33} de *Aglaothamnion neglectum*, *Corallina officinalis* y *Chondrus crispus*, se diseñaron partidores sentido (5-ATGGAAGCCCCGCTTTTGCTG-3) y antisentido (5-TCAGTCGCGGCACATGGCGG-3) para el gen de la subunidad γ^{33} de *Gracilaria chilensis*, tomando en cuenta las regiones conservadas entre las secuencias mencionadas. Éstos fueron sintetizados mediante el servicio ofrecido por la empresa IDT (*Integrated DNA Technologies*) en la dirección <https://www.idtdna.com/site>. Una vez recibidos, se resuspendieron en agua libre de nucleasas a una concentración final de 10 μ M.

Amplificación de la región 1-885 del gen de la subunidad γ^{33} de R-ficoeritrina.

ADN de *Gracilaria chilensis*, se empleó para realizar un ensayo de PCR con los partidores antes señalados, usando la ADN polimerasa ExTaq (Takara Bio Inc, Japón). La reacción se hizo de acuerdo a las instrucciones del fabricante usando el siguiente programa: Denaturación inicial 95°C x 3min; 35 ciclos denaturación (95°C x 30seg), hibridación (50°C x 45seg) y extensión (72°C x 70seg) y una extensión final de 72°C x 5min.

Amplificación de la región 3' (886-957) del gen de la subunidad γ^{33} de R-ficoeritrina.

Como se mencionó anteriormente, no fue posible amplificar mediante PCR convencional el extremo 3' del gen de la subunidad γ^{33} . Por lo cual, para amplificar esta región del gen, se procedió a realizar un ensayo de 3' RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*). En esta técnica, se realiza una transcripción reversa (RT-PCR) tradicional, salvo que en este caso el partidor utilizado corresponde a un oligo (dT) con una secuencia adaptadora en su extremo 5'. A continuación, utilizando este producto, se realiza una amplificación por PCR convencional usando partidores internos (Scotto-Lavino *et al.*, 2006).

Para amplificar la región 3' del gen de la subunidad γ^{33} se utilizó el kit SMARTer™ RACE cDNA Amplificación Kit (Clontech Laboratories Inc., EE. UU.) en conjunto con la ADN polimerasa ExTaq Hot-Start (Takara Bio Inc, Japón). La transcripción reversa se efectuó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, ocupando ARN total de *Gracilaria chilensis*, extraído como se describe abajo. El partidor sentido 2 (5'-ATG AAG TAC GAC GAG TAC TGC G-3') diseñado a partir de la región ya conocida (fragmento 1-885), además del 3'-RACE CDS Primer A y la transcriptasa reversa SMARTScribe™ incluídos en el kit.

La amplificación desde el cDNA obtenido se llevó a cabo utilizando la técnica de Touchdown PCR (TD-PCR). Dicha técnica es similar a una PCR tradicional, con la excepción de que la temperatura de hibridación en el primer ciclo es más alta de lo recomendado, y va disminuyendo en los ciclos subsiguientes de forma gradual hasta llegar a la temperatura de hibridación sugerida. Este cambio produce un aumento en la especificidad de la reacción ya que, dada la naturaleza exponencial de la PCR, un aumento de la temperatura de hibridación en los primeros ciclos disminuye de manera significativa la presencia de productos inespecíficos en los ciclos posteriores (Korbie & Mattick, 2008). La reacción se realizó con la

polimerasa mencionada anteriormente, el partidador sentido 2 antes mencionado y *10X Universal Primer A Mix* (incluido en el kit de 3' RACE), siguiendo las instrucciones del fabricante de la ADN polimerasa. La Tabla 2 presenta el programa de amplificación utilizado.

Tabla 2: Programa de reacción en cadena de la polimerasa *touchdown* (TD-PCR) utilizado para el 3' RACE.

Etapa	Temperatura (C°)	Tiempo (mm:ss)	
Denaturación inicial	98	3:00	
Denaturación	98	0:10	10 ciclos
Hibridación	68-1°C/ciclo	0:30	
Extensión	72	3:00	
Denaturación	98	0:10	25 ciclos
Hibridación	58	0:30	
Extención	72	3:00	
Extención final	98	3:00	

Fuente: Elaboración propia

Con el fin de corroborar que la región amplificada correspondiese al extremo 3' de la subunidad γ^{33} se realizó una TD-PCR utilizando como templado el producto obtenido anteriormente. Los partidores ocupados fueron el partidador interno sentido 3 (5'-AAG CGC GTG TTC AAC CGT-3'), también diseñado de la secuencia previamente conocida, y el *10X Universal Primer A Mix*. El programa utilizado fue el mismo que se empleó para el 3' RACE (Tabla 2), con la única excepción del cambio de los tiempos de extensión de 3 a 2 minutos.

Extracción de ARN total

Para obtener ARN total a partir de *Gracilaria chilensis* se pesaron 100mg de alga fresca, los que se molieron en un mortero luego de congelar el alga con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El polvo se traspasó a un tubo Eppendorf de 1,5mL, en donde se le añadió 1mL de TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc., EE.UU.), correspondiente a una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidinio. La solución se homogenizó y agitó con vortex durante 10seg. Posteriormente, la solución se centrifugó a 13000xg durante 1 minuto. A partir de la fase acuosa obtenida se extrajo el ARN usando el kit Direct-Zol™ RNA-Miniprep (Zymo Research, EE. UU.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Previo a la elución del ARN desde la columna, se realizó un paso adicional de digestión de ADN en la columna, utilizando el cocktail constituido por: 5µL DNasa (1U/µL), 8µL amortiguador de reacción DNasa (10X), 3µL agua libre de nucleasas y 64µL amortiguador de lavado de ARN. Esta mezcla se agregó a la matriz de la columna y se incubó a 37°C durante 15min. El ARN eluido se resuspendió en 25µL de agua libre de nucleasas, se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm y se almacenó a -80°C hasta el momento de su utilización.

Electroforesis en geles de agarosa y visualización de los productos de PCR

Para estimar la integridad del ADN extraído y el tamaño de los productos de PCR obtenidos se realizaron ensayos de electroforesis. A las muestras de interés se les agregó buffer de muestra 6x, y se cargaron en un gel de agarosa elaborado con tampón Tris Acetato-EDTA (TAE) 0,5x y bromuro de etidio a una concentración de 50ng/L. La corrida electroforética se realizó en tampón TAE 0,5x. En el caso de la integridad de ADN, los geles de agarosa fueron hechos al 0,5% y se corrieron a 50 V. Para separar los productos de PCR los geles de agarosa se encontraban a una concentración de 1%, y la corrida de éstos se efectuó a 100 V.

Electroforesis preparativa y extracción de ADN desde geles de agarosa

Una vez comprobados los productos de PCR mediante electroforesis analítica, se procedió a utilizar electroforesis preparativa para la extracción los productos, y su posterior secuenciación. Al igual que en la electroforesis analítica, los productos de PCR fueron separados mediante geles de agarosa al 1%. Sin embargo, la corrida electroforética se realizó a 40 V. Una vez que la banda de interés fue separada, ésta fue cortada y el ADN del producto fue purificado con el kit *Zymoclean™ Gel DNA Recovery* (Zymo Research, EE. UU.), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR purificados se secuenciaron mediante el servicio ofrecido por el Departamento de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Éste utiliza el sistema automatizado de electroforesis capilar ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EE.UU.). Los electroferogramas obtenidos se inspeccionaron visualmente para confirmar las regiones con *peaks* resueltos de manera adecuada.

Ensamble de los fragmentos 1-885 y la región 3' del gen de la subunidad γ^{33}

Una vez obtenida la secuencias de ambos fragmentos de ADN, éstos se alinearon con el software Rev-Trans, disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/RevTrans-2.0/web/> (Wernersson & Pedersen, 2003), utilizando MAFFT como método de alineamiento y sin el requerimiento de un codón de inicio. RevTrans construye el alineamiento de secuencias de ADN de la siguiente manera: Primero traduce las secuencias, para luego alinear los péptidos resultantes. Finalmente este alineamiento se utilizó para alinear las secuencias originales de ADN. Este procedimiento sirve para asegurar la ausencia de discordancias entre ambas secuencias. Una vez que se verificaron las regiones que eran idénticas entre ambas

secuencias de ADN, estas últimas se combinaron para dar como resultado la secuencia de la región codificante del gen de la subunidad γ^{33} de R-ficoeritrina de *Gracilaria chilensis*.

Análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica obtenida a partir de la secuencia nucleotídica codificante de la subunidad γ^{33} de R-ficoeritrina.

La secuencia nucleotídica del gen de la subunidad γ^{33} se tradujo *in silico* usando la herramienta *Translate* del servidor web ExpASY (Gasteiger *et al.*, 2003). Una vez obtenidos los seis posibles marcos de lectura, cada uno de ellos fueron introducidos en el servidor BLASTP del NCBI, y se eligió aquel que tuviese mayor identidad con la secuencia proteica de subunidades γ^{33} existentes.

Para determinar los posibles sitios de cromoforilación de la subunidad γ^{33} , su secuencia se comparó con las secuencias de las subunidades γ^{33} de algas rojas presentes en Uniprot, y la asignación de estos potenciales sitios se basó en los datos experimentales de Klotz y Glazer (1985) en *Gastroclonium coulteri* y los recientemente presentados por Zhang *et al.* (2017) en *Griffithsia pacifica*. Todas las secuencias se alinearon utilizando el servidor de MUSCLE (Edgar, 2004), ubicado en el sitio web del EBI (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/). La identificación de repeticiones internas en la secuencia de γ^{33} se llevó a cabo mediante el uso del servidor HHrepID (Biegert & Söding, 2008), situado en <http://toolkit.tubingen.mpg.de/hhrepid>. Para los análisis de presencia de péptidos señal se empleó el servidor ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 2007). La estructura secundaria de γ^{33} se predijo con el servidor PSIPRED (Buchan *et al.*, 2013), localizado en <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>.

Purificación de la subunidad γ^{33} a partir de hexámeros de R-ficoeritrina.

Siguiendo las recomendaciones de (Bunster *et al.* 1997) con ligeras modificaciones se estandarizaron las condiciones que permitieron la purificación de hexámeros de R-ficoeritrina. Inicialmente, 500 gramos de alga fueron lavados y secados con papel absorbente para ser pulverizados en un mortero, luego de congelar con nitrógeno líquido. La muestra pulverizada se incubó en 600 mL de amortiguador K_2HPO_4/KH_2PO_4 5mM, pH 7 con 2 mL de una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Sigma), en agitación durante toda la noche a 4°C. El extracto obtenido fue sometido a precipitación $(NH_4)_2SO_4$ a una saturación de 30%, dejándose por 12h a 4°C. A continuación la muestra fue centrifugada a 12.000x g durante 20 minutos a 4°C y se eliminó el precipitado. El sobrenadante se llevó a un 60% de saturación y nuevamente colocándose por 12 h a 4°C en agitación constante, para luego ser centrifugada a 12.000x g durante 20 minutos a 4°C. El precipitado obtenido fue resuspendido en 50 mL K_2HPO_4/KH_2PO_4 5mM pH 7 y dializado (*D-Tube Mega 3.5 MWCO Merck*) contra el mismo amortiguador durante 12h con tres cambios sucesivos, los dos primeros cambios cada dos horas. Las ficobiliproteínas fueron separadas por cromatografía de intercambio aniónico, empleando un FPLC AKTA prime (GE Life Science), acoplado a una columna HiPred DEAE FF 16/10 (GE Life Science). Durante la fase de equilibrio de la columna, seis volúmenes de solución amortiguadora K_2HPO_4/KH_2PO_4 5mM pH 7 a un flujo de 1mL/min fueron empleados. La elución de las proteínas se realizó usando un gradiente lineal desde 5% hasta 85% de amortiguador K_2HPO_4/KH_2PO_4 5mM pH 7 con 1M NaCl. La cromatografía fue monitoreada de acuerdo a la absorbancia a 280nm. Las fracciones que presentaron perfiles de absorción correspondientes a ficoeritrina ($\lambda^A_{max} = 565$ nm), fueron colectados y dializados contra K_2HPO_4/KH_2PO_4 5mM pH 7.

El incremento en la pureza de ficoeritrina se logró, empleando una columna de hidroxapatita (Bio-Gel HTP. BIO-RAD), preparada en el laboratorio en un cartucho superformance (Merck) y equilibrada con K_2HPO_4/KH_2PO_4 5mM pH 7. La cromatografía se llevó a cabo a un flujo de 0,5 mL/min y monitoreada de acuerdo al valor de absorbancia a 280 nm. Las fracciones de R-ficoeritrina fueron concentradas en tubos Amicon Ultra-15 50K (Merck) hasta 1mg/ml, para ensayos posteriores o la máxima capacidad posible, para ensayos de cristalización (9,23mg/ml).

Con el fin de confirmar el estado de oligomerización de la R-ficoeritrina, se calibró una columna de exclusión molecular Superdex 200 HiLoad 16/60 (Amersham), utilizando un estándar de tamaño molecular (Gel filtration standard, Bio-Rad) constituido por tiroglobulina de bovino (670.000), γ -tiroglobulina de bovino (158.000), ovoalbúmina de pollo (44.000), mioglobina de equino (17.000) y vitamina B₁₂ (1750). 100 μ L de la solución estándar fueron inyectados en tres corridas independientes a un flujo de 0,3mL/min y los tiempos de retención de cada marcador fueron registrados a fin de construir la curva de calibración. Las mismas condiciones de corrida cromatográfica fueron empleadas para las muestras de R-ficoeritrina, las cuales fueron monitoreadas a 280 nm. En cada caso, la fase móvil fue K_2HPO_4/KH_2PO_4 5mM pH 7. Paralelamente, el perfil de absorción del complejo hexamérico fue determinado como se describe más abajo.

A partir de una solución de R-PE (1mg/mL) se realizó la separación de subunidades γ ³³ siguiendo las propuestas de Apt *et al.* (1993) con algunas modificaciones. 100 μ L de R-PE purificada ($A_{565}/A_{280}=4,9$) en estado hexamérico, fueron empleados para purificar subunidades mediante cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (HPLC-RP del inglés) usando un cromatógrafo (Merck-Hitachi) acoplado a una columna C₁₈ Lichrocart 250-4 (Merck®). La elución se realizó con un gradiente continuo entre una solución de ácido

trifluoroacético (TFA del inglés) 0,1% en agua (solución A) y otra de acetonitrilo:isopropanol proporción 2:1 más TFA 0,1% (Solución B). El flujo empleado fué de 0,8 ml/min, iniciando la corrida con 40% de B durante 10min, seguido de un gradiente por 60min hasta alcanzar 80% de B. El patrón de elución fue seguido a 280 nm usando un detector UV-VIS. Los espectros de absorbancia correspondientes a las dos subunidades y permitieron seleccionar esas fracciones para realizar corridas electroforéticas en geles de SDS-PAGE-Tricina 10%. La electroforesis permitió visualizar ambas subunidades γ , sin embargo para su confirmación, las bandas fueron cortadas desde el gel y analizadas por el Dr. Andrew Cronshaw usando un espectrómetro de masas ESI-FTICR, del instituto de Biología Estructural y Molecular (ISMB), Universidad de Edimburgo, Escocia, Reino Unido.

Caracterización espectroscópica de la subunidad γ^{33} .

Las fracciones obtenidas a partir de HPLC-RP y confirmada como γ^{33} , fueron rutinariamente caracterizadas mediante sus espectros de absorción en el rango de 400-700 nm, usando un espectrofotómetro Jasco V-650. Los perfiles se realizaron empleando cubetas de cuarzo con volumen de 1 mL y 1 cm de paso óptico. Las lecturas se realizaron a 1 nm de ancho de banda. Las áreas del espectro de absorción de la subunidad γ^{33} se calculó usando el software OriginPro 8.5, ajustando la curva con modelos gaussianos de tres componentes y evaluando el ajuste mediante análisis estadístico de X^2 y residuales.

Seguidamente, colocando la muestra en cubetas de cuarzo para medición de fluorescencia, con capacidad para 500 μ L, se registraron los espectros de emisión entre los 400 y 700 nm mediante el uso de un espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC. Se realizaron excitaciones a 490 nm, 538 nm, 554 nm y 565 nm de acuerdo al tipo de subunidad bajo estudio.

Para los análisis de dicroísmo circular (DC) se empleó un espectrofotómetro de DC Jasco J-1500 con detector PM-539, acoplado a un *peltier* PTC-517, que se encuentra en las

instalaciones del Centro de estudios para el desarrollo de la Química (CEPEDEQ), Universidad de Chile, Santiago. Se emplearon muestras de 0,05 mg/mL de concentración en amortiguador K_2HPO_4/KH_2PO_4 5mM pH 7. Los datos de DC fueron obtenidos a 1 nm de ancho de banda y velocidad de escaneo 50 nm/min. Se promediaron cinco espectros por cada muestra, a los que se le sustrajo los espectros de DC de la solución amortiguadora (blanco). El software automáticamente calcula la elepticidad molar $[\Theta]$ experimental, mediante la siguiente relación:

$$[\Theta] = 3300\Delta\epsilon$$

$$\Delta\epsilon = (\epsilon_L - \epsilon_R), \quad = (1/LC) \cdot \text{Log}(I_R/I_L)$$

En los que L representa la longitud de la celda, C concentración de la muestra (mol/L), ϵ coeficiente de extinción molar y I_R , I_L la intensidad de luz polarizada a la derecha y a la izquierda, respectivamente, detectada por el fotomultiplicador.

Generación de un modelo de la subunidad γ^{33} , mediante el uso de herramientas bioinformáticas

Para la obtención de un modelo estructural de la subunidad γ^{33} , se realizó inicialmente modelamiento por homología mediante MODELLER (Sali & Blundel, 1993), usando como templado la subunidad γ_4 (ID-PDB-5Y6P) de *G. pacifica* (Zhang *et al.*, 2017), la cual mostró un 65% identidad durante el alineamiento. Entre los modelos generados, el menor puntaje de la variable DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*), que representa un potencial estadístico atómico por pares fue la variable tomada en cuenta para la selección del modelo. Posteriormente, los parámetros esteroquímicos, fueron evaluados mediante PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

El modelo seleccionado, fue luego alineado estructuralmente con fragmentos identificados dentro de un modelo parcial de la subunidad γ^{33} , asociado con R-PE de *G. chilensis* obtenido a partir de datos cristalográficos, descritos más adelante. Luego del alineamiento estructural entre el modelo procedente de MODELLER y el modelo parcial cristalográfico asociado con R-PE, usando COOT (Emsley & Cowtan, 2004), se realizaron correcciones basadas en los datos cristalográficos, tomando en cuenta también los de entrecruzamiento, y seguido de refinamientos con Phenix (Afonine *et al.*, 2012).

Ensayos de denaturación de subunidades de R-PE purificadas.

Como un método para continuar en la caracterización de la subunidad γ^{33} , las fracciones correspondientes a subunidades de α and β -PE, ambas de composición cromofórica conocida, fueron empleadas como sondas espectroscópicas en ensayos de denaturación y comparadas con el perfil de la subunidad γ^{33} .

Luego que las subunidades α , β y γ componentes del complejo hexamérico R-PE fueron purificadas y caracterizadas mediante sus espectros de absorción, éstas fueron dializadas contra amortiguador fosfato de potasio 10mM a pH 8,0 y los espectros de absorción fueron obtenidos nuevamente. Con el fin de asegurar su denaturación, las fracciones de cada subunidad fueron concentradas y cargadas en geles de tricina SDS-PAGE, pero posterior a la corrida, las bandas típicamente coloreadas y sin teñir fueron cortadas e inmersas por 24h en amortiguador fosfato de potasio 10mM a pH 7,4 más cloruro de guanidino 3M a temperatura ambiente para su elución. A estas muestras denaturadas también se les realizó sus respectivos espectros de absorción.

Determinación de la posición de cromóforos presentes en la subunidad γ^{33} mediante espectrometría de masas. Búsqueda de una ficourobilina doblemente unida:

Se realizó un análisis de espectrometría de masas de fragmentos obtenidos a partir de ensayos de digestión trípica de hexámeros entrecruzados que se detallan más abajo. Y mediante el uso de la plataforma xQuest (Rinner *et al.* 2008) acoplada a xProphet (Walzthoeni *et al.*, 2012), se realizó una búsqueda que permitiera ubicar la posición de cromóforos en la subunidad γ^{33} mediante la identificación de péptidos trípticos.

En el caso de la búsqueda de un cromóforo unido a dos cisteínas diferentes en la subunidad γ^{33} , análisis espectroscópicos en conjunto con espectrometría de masas de cromopéptidos purificados luego del tratamiento de γ^{33} con tripsina y bromuro de cianógeno fueron empleados. Para obtener pequeños cromopéptidos que permitieran mayor precisión en la estimación de las masas, se siguieron los protocolos de digestión trípica seguida por el tratamiento con bromuro de cianógeno de acuerdo a Bryant *et al.* (1978), Arciero *et al.* (1988) and Van Montfort *et al.* (2002). 1 μ L of 1M ácido clorhídrico fue adicionado en 200 μ L de muestra de subunidad γ^{33} purificada (0,5mg/mL), seguida inmediatamente por la adición de 5uL tripsina (0,4mg/mL) y 15 μ L of 1M de bicarbonato de amonio. La mezcla fue incubada a 37°C por 2h en oscuridad y completamente secada mediante *Speed-Vac*. A la muestra seca se le adicionó 50uL de bromuro de cianógeno 50% en acetonoitrilo/isopropanol más 1% ácido trifluoroacético y se mantuvo a temperatura ambiente por 14h en oscuridad. La mezcla de cromopéptidos fue separada mediante HPLC-RP empleando las mismas condiciones de purificación usadas con las subunidades constituyentes de complejos hexaméricos.

Los cromopéptidos purificados luego de la digestión fueron caracterizados mediante espectrometría de masas ESI-FTICR, del instituto de Biología Estructural y Molecular (ISMB), Universidad de Edimburgo, Escocia, Reino Unido. Conjuntamente, se utilizó la plataforma MS-bridge prospector de la Universidad de San Francisco EE.UU en la dirección electrónica

<http://prospector.ucsf.edu>, para búsqueda e identificación de secuencias peptídicas. Durante este análisis, se realizaron modificaciones en la composición elemental de cisteínas y en el cromóforo ficourobilina usado como “*agente entrecruzante*” seleccionado en la plataforma antes señalada, la cual sirvió para la identificación de la posición de dicho cromóforo en la subunidad γ^{33} .

Caracterización de la asociación entre la subunidad γ^{33} y R-ficoeritrina.

Ensayo de Entrecruzamiento y análisis de espectrometría de masas

Con el fin de obtener información referente al modo cómo pueden estar interaccionando la subunidad γ^{33} con las subunidades α , β R-PE, complejos hexaméricos fueron entrecruzados y analizados mediante espectrometría de masas siguiendo el protocolo establecido por Leitner *et al.* (2014a; 2014b). Para esto, una mezcla de 100 μ L de PE (2,0 mg/mL pH = 8,0) y 4 μ L de disuccinimidil suberato (DSS) 25mM se agitaron por 1h a 25°C. La reacción fue detenida por adición de bicarbonato de amonio 1M hasta una concentración final de 50mM en agitación por 20min y la posterior evaporación total de los solventes presentes en la mezcla de reacción mediante *speed-vac*. El mismo procedimiento fue realizado con el agente entrecruzante hidrazida de ácido pimélico (PDH) 27 mg/mL pH 7,4; además de la adición de 4-(4,6-dimetoxi 1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino cloruro (DMTMM) 144mg/mL. Una vez evaporados los solventes se agregaron 100 μ L de urea 8M seguido de 5 μ L de tris 2-carboxietil fosfina (TCEP) 50mM, agitándose suavemente durante 30min. Transcurrido el tiempo, se agregaron 5 μ L de iodoacetamina hasta concentración final de 5mM, el cual se dejó reposar por 30 min en oscuridad. Cada mezcla de reacción fue diluida con bicarbonato de amonio hasta obtener 1M de urea, seguida por la adición de 5 μ L de tripsina equivalente a 4 μ g totales, dejándose toda la noche en agitación a 37°C. Una segunda proteasa empleada fue Glu-C de la que también se

agregaron 4µg totales. La detención de la digestión con proteasas se realizó mediante la adición de ácido fórmico concentrado hasta obtener 2% vol/vol.

Para la purificación de muestras entrecruzadas, se usaron columnas Sep-Pak. Vac 50mg (Waters) equilibradas con 1ml de solución de lavado (agua:acetonitrilo:ácido fórmico 95:5:0,1 vol/vol/vol). Luego de cargadas las muestras, fueron lavadas con 1mL de la solución anterior, seguida de la fase de elución en la que se emplearon 500µl una mezcla (agua:acetonitrilo:ácido fórmico 50:50:0,1 vol/vol/vol). Los eluatos fueron evaporados completamente y luego resuspendidos en 20 µl de una mezcla (agua:acetonitrilo:ácido fórmico 70:30:0,1 vol/vol/vol) que representó la fase móvil de cromatografía de exclusión molecular, y luego fueron centrifugadas para tomar el sobrenadante (18µL). Estas fracciones fueron inyectadas en un Micro-FPLC (ÄKTAmicro system) acoplado a una columna Superdex 200 10/300 GL mediante la cual se separaron fracciones enriquecidas con péptidos entrecruzados. Las fracciones de interés fueron colectadas, evaporadas completamente y resuspendidas en 20 µl de una mezcla (agua:acetonitrilo:ácido fórmico 98:2:0,2 vol/vol/vol) que representó la fase móvil en el análisis de espectrometría de masas (LC-MS) (Orbitrap Elite Thermo Fisher Scientific). Luego de generados los espectros, se empleó la plataforma xQuest (Rinner *et al.*, 2008) acoplada a xProphet (Walzthoeni *et al.*, 2012) para buscar y evaluar los fragmentos peptídicos entrecruzados.

Ensayo de cristalización y recolección de datos

La experiencia en los últimos años con respecto al método de contradifusión como mecanismo de cristalización ha demostrado que es una forma conveniente y eficiente de incrementar las probabilidades de éxitos en la obtención de cristales; mejorando además la calidad y/o tamaño de los cristales (Otálora *et al.*, 2009). Mediante el método contradifusión capilar, usando R-PE (9,23 mg/ml) de acuerdo a las recomendaciones de Contreras-Martel *et al.* (2001) con ligeras

modificaciones, se obtuvo cristales alargados con forma hexagonal que crecieron en una semana (Figura 24). Para esto, se preparó una solución con sulfato de amonio 15% y polietilenglicol (PEG) 6000 20% como agentes precipitantes, 4-morfolino etano sulfonato (Mes) 100mM pH 7,0; cloruro de sodio 0,3M y cloruro de Zinc 1mM. Los datos de difracción de cristales fueron adquiridos utilizando el haz de Rayos X (BM30A) en el Laboratorio Europeo de Radiación Sincrotrón con siglas en inglés ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), Grenoble-Francia. Se empleó una longitud de onda 0,979742 Å y un detector ADSC Q315r. Los datos fueron procesados y la fase fue resuelta mediante remplazo molecular (McCoy *et al.*, 2007) usando las coordenadas de la unidad biológica PDB-1EYX.

Construcción del modelo cristalográfico.

El modelo hexamérico obtenido luego del remplazo molecular se empleó como modelo inicial (Figura 25), en las que todas las subunidades α y β ficoeritrina fueron refinadas con Phenix (Afonine *et al.* 2012). La unidad asimétrica es representada por las cadenas A(α), B(β), E(α), F(β), I(α), J(β) que forman un trímero, denominado de aquí en adelante trímero uno (T₁R-PE) y las cadenas C(α), D(β), G(α), H(β), K(α), L(β) conforman el trímero dos (T₂R-PE). En la zona interna del hexámero, residuos de alanina fueron colocados inicialmente en densidades electrónicas correspondientes a la subunidad γ^{33} para el cálculo y refinamiento. Las mejoras del modelo fueron monitoreadas mediante la variable R_{free} , calculadas a partir del 5% de las reflexiones, seleccionadas de manera aleatoria y excluidas durante cada proceso de refinamiento. Las cadenas laterales de alanina del modelo fueron paulatinamente reemplazadas con la correspondiente cadena lateral de aminoácidos de la secuencia de γ^{33} durante los diferentes ciclos de refinamiento basados en el reconocimiento y ajuste al mapa de densidad electrónica. Reiterados ciclos de refinamiento fueron realizados y entre cada uno de ellos, el modelo fue manualmente reconstruido, mediante la adición inicial de residuos de alanina y su posterior modificación en el mapa de densidad electrónica tomando en cuenta las

ponderaciones del coeficiente de sigma entre lo observado y lo calculado $[(2F_o - F_c)$ y $(F_o - F_c)]$. Las ilustraciones y alineamientos estructurales necesarios se realizaron con el visualizador PyMol (<https://pymol.org>). Debido al tipo de grupo espacial, se pudo trabajar con mapas a $0,5 \text{ e}/\text{\AA}^3$.

Integración de la data cristalográfica en la corrección del modelo obtenido por homología.

Debido a deficiencias en la densidad electrónica en la zona correspondiente a la subunidad γ^{33} , se logró obtener un modelo de la unidad biológica de R-ficoeritrina y datos parciales de su interacción con la subunidad γ^{33} , el modelo parcial cristalográfico. Posteriormente, el modelo generado por homología fue alineado con las zonas identificadas en el modelo parcial cristalográfico, dentro de la cavidad hexamérica. Y mediante reconstrucción manual, además de ajustes basados en la información cristalográfica realizados entre ciclos de refinamientos, permitiendo la obtención de un modelo construido por homología y corregido en función de los datos cristalográficos.

Obtención de datos mediante Tomografía crio-electrónica

Ensayos de una de las variedades de la criomicroscopía electrónica, tomografía crio-electrónica, fueron realizados en el Centro Nacional de Biotecnología de Madrid, España. Para esto, muestras de $10\mu\text{L}$ (1 mg/mL) de ficoeritrina fue colocada en una grilla de cobre con película de carbono (Ted Pella Type B 01814-F) y sometida a tinción negativa usando acetato de uranilo 2%. En estas grillas fueron tomadas micrografías, adquiridas con un microscopio FEI Tecnai T20 operativo con 200KV y una cámara (4k x 4k) a 50000X de magnificación y 2,24

Å/pix. Más de 800 micrografías fueron adquiridas de forma automática usando el software SerialEM (Mastronarde, 2005). Las micrografías fueron importadas y procesadas con *Scipion framework* (De la Rosa-Trevin *et al.*, 2016). La función de la transferencia de contraste de fases (CTF) fue analizado usando el programa CTFFIND4 (Rohou & Grigorieff, 2015) y aquellas imágenes con señales inapropiadas fueron desestimadas. Se realizó una selección automática de los complejos hexaméricos usando el programa XMIPP (Vargas *et al.*, 2013), que logró la extracción de 300000 partículas. Estas partículas fueron reducidas a una caja de 50pixels (4,48 Å/pix) y sometidas a clasificación para la obtención de clases con Relion 2 2D (Scheres, 2012). Las mejores clases fueron utilizadas para la generación de un modelo inicial con ayuda de EMAN2 (Tang *et al.*, 2007) el cual fue usado en el auto-refinamiento 3D de la mejor imagen (110000 partículas) usando Relion 2 2D (Scheres, 2012) y aplicando simetría 3D. El modelo resultante y las partículas usadas en su reconstrucción fueron reclasificadas en 3D usando Relion 2 2D (Scheres, 2012) con la misma simetría. A partir de ese proceso, las mejores 80000 partículas fueron seleccionadas y refinadas nuevamente con simetría. El nuevo modelo de salida con simetría 3D fue clasificado mediante la cavidad interna del hexámero, lográndose obtener un modelo hexamérico que nuevamente fue refinado de forma independiente con y sin simetría 3D hasta la obtención de un modelo final.

Análisis *in silico* de las interacciones entre subunidad γ^{33} y R-ficoeritrina.

Una vez corregido el modelo de la subunidad γ^{33} a partir de las técnicas descritas arriba, la composición aminoacídica y zonas de interfaz fueron analizadas con ayuda de los servidores NOXcclass (Zhu *et al.*, 2006), CoCoMaps (Vangone *et al.*, 2011) y PPcheck (Sukhwal & Sowdhamini, 2015).

RESULTADOS

Extracción de ADN genómico de *Gracilaria chilensis*

El ADN utilizado como templado para la amplificación de la secuencia codificante de la subunidad γ^{33} se extrajo y se evaluó de dos maneras. Por una parte, se evaluó espectroscópicamente, donde su relación A260/A280 fue de 1,49. Adicionalmente, la integridad del ADN obtenido se evaluó y verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, en donde se obtuvo un perfil electroforético consistente en una banda única tamaño superior a los 10 kpb (Figura 5).

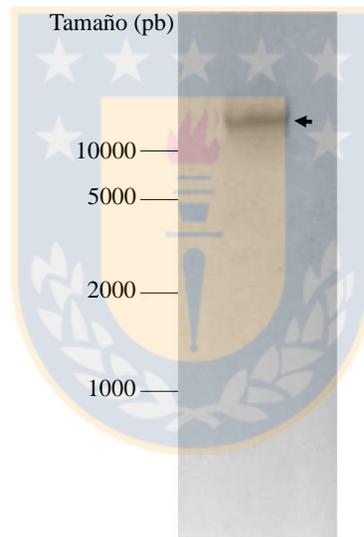


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa para evaluar la integridad del ADN genómico extraído desde *Gracilaria chilensis*. Observe la única banda señalada. Fuente: Elaboración propia

Extracción de ARN de *Gracilaria chilensis*

El ARN extraído desde *Gracilaria chilensis* tuvo una relación A260/A280 de 2,12; lo que sugiere que el ARN se encuentra en un grado alto de pureza. La electroforesis muestra las dos bandas

correspondientes al ARN ribosomal (Figura 6). Estos resultados sugieren que el ARN purificado es apto para utilizarse en los ensayos posteriores.

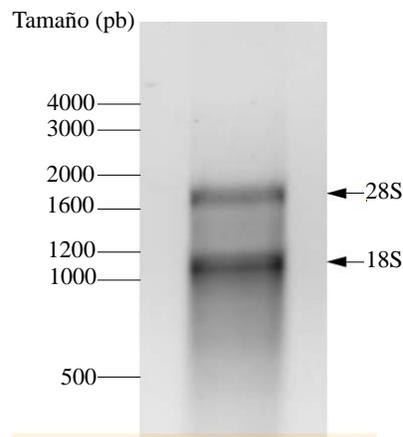


Figura 6. Gel de agarosa para evaluar la integridad del ARN total extraído desde *Gracilaria chilensis*. Las flechas indican las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y 18S. Fuente: Elaboración propia

Amplificación y secuenciación de la región 1-885 del gen la subunidad γ^{33} de *G. chilensis*

La amplificación del fragmento del gen de la subunidad γ^{33} que abarca los residuos nucleotídicos 1-885 se realizó utilizando la técnica de PCR convencional con una ADN polimerasa modificada con actividad *proofreading* denominada ExTaq (TakaRa), y utilizando partidores diseñados a partir de secuencias disponibles de otras especies para el gen codificante de la subunidad γ^{33} . El producto obtenido consiste en un amplicón de un tamaño aproximado de 900 pb (Figura 7), cuya secuencia pude observarse en el Anexo 1.

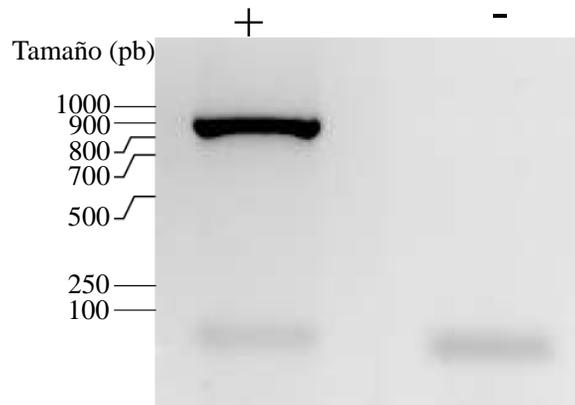


Figura 7. Amplificación del fragmento 1-885 del gen de la subunidad γ^{33} . +: Producto de PCR obtenido con los partidores diseñados. -: Control negativo de templado. Fuente: Elaboración propia

Amplificación y secuenciación de la region 3' del gen de la subunidad γ^{33} de *Gracilaria chilensis*.

Para amplificar el extremo 3' del gen de la subunidad γ^{33} se diseñó un partidor basado en la secuencia consenso de ESTs del género *Gracilaria* disponibles. Sin embargo, con este partidor no se obtuvo producto de amplificación en ensayos de PCR utilizando ADN genómico de *Gracilaria chilensis* como templado. Por ello, se recurrió a la técnica de 3' RACE para poder obtener dicho fragmento y así secuenciarlo. Luego de la transcripción reversa para generar el cDNA apropiado para la amplificación, se realizaron dos amplificaciones: el 3'RACE propiamente dicho, y una PCR interna para verificar que el producto correspondiese a una región del gen de la subunidad γ^{33} . El resultado de ambas reacciones se muestra en la Figura 8. El 3' RACE generó como producto una banda principal de aproximadamente 950 pb y una banda tenue cercana a los 1500 pb. La PCR interna tuvo como producto una banda de tamaño aproximado de 800 pb y, al igual que en la reacción de 3' RACE, una banda de aproximadamente 1500 pb.

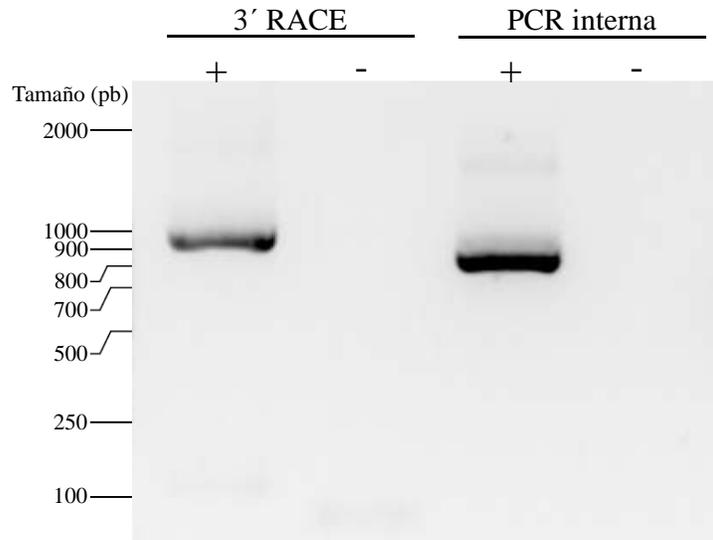


Figura 8: Amplificación del fragmento 3' del gen de la subunidad γ^{33} . +: Producto de PCR obtenido con los partidores diseñados. -: Control negativo de templado. Fuente: Elaboración propia

El fragmento de 950 kb obtenido mediante 3' RACE se purificó y luego se secuenció. El resultado de la secuenciación se observa en la figura Anexa 2, donde se logró alcanzar el codón de término del gen de la subunidad γ^{33} . Es importante recalcar que no fue posible secuenciar corriente arriba desde el extremo 3' del fragmento, por lo que la secuencia de la región 3' UTR está incompleta.

Ensamblaje de los fragmentos secuenciados del gen de la subunidad γ^{33} de *Gracilaria chilensis*

Después de secuenciar ambos fragmentos amplificados desde el gen de la subunidad γ^{33} de *Gracilaria chilensis*, se procedió a ensamblarlos para así obtener la completa secuencia codificante para la subunidad γ^{33} . Esto se llevó a cabo utilizando los servidores Reverse-complement (Stothard, 2000) y T-Coffe (Di Tommaso *et al.*, 2011) para alinear ambos fragmentos y determinar regiones idénticas entre ellos. El alineamiento muestra una región

superpuesta de aproximadamente 370 pb en donde la identidad es completa, permitiendo hacer el ensamble (Figura 9) y completo reconocimiento de la secuencia objeto de interés, mediante comparaciones con secuencias disponibles.

```

1-885      1  ATGGAAGCCCCCGCTTTTGCTGTCAATGGAATGTTCTCGGCCGTC AAGGTC CGCACGTCTTCCTTCACTGCCAACAAATGT  80
3'RACE    -----
1-885     81  GTCACCTCGCACCGGCACCGCTTCTCCGCCAGCCGTCACCATGGCGGTG CAGCGCTTCCAGAAGAAGTTTCAGAGCTTTG  160
3'RACE    -----
1-885    161  GAAAAATCAACATTGACTACTCGCGCCCCGAAAGAACTAGCCTCCTTCAAGCGAGCAGGCTACCCAGTCAGCTTTGACTAC  240
3'RACE    -----
1-885    241  CCCAACTCCCCCGCCATGGCCGGGCACTACTCAATCTCCAACTGCAATGTACCCAGCGCGTGCGACAAAATTTTCATGAA  320
3'RACE    -----
1-885    321  GTACGACGAGTACTGCGCAAAAGGAATGATGCAAGTGTTC AAGCGTTCGGCTGTTCCATTCCGTACCTACACCACCAAGT  400
3'RACE    -----
1-885    401  GCACCGAGGGCACC GTTCCGCAGCAAGCGTTTGCGAAGCGCGTGTTC AACC GTACCAAGGCATTCCGT CAGGCGCAGAAG  480
3'RACE     1  -----AG-CGCAG-AG  9
1-885    481  CCAATTAuACGTACGTCTCGCCGAGCGTTATGAAAACCGACGTCTGCTTTCAC TATGGCCAACGGCTGTCACAGAGAGGA  560
3'RACE    10  CC-ATTAuCGTACGTCTCGCCGAGCGTTATGAAAACCGACGTCTGCTTTCAC TATGGCCAACGGCTGTCACAGAGAGGA  88
1-885    561  GCAGCAATTCTCGACAATGCCCATGTGAGCCGCCACCTACCTTGCGGGCCGCGCCGAGGCCATGGGAACCTGTACAGAG  640
3'RACE    89  GCAGCAATTCTCGACAATGCCCATGTGAGCCGCCACCTACCTTGCGGGCCGCGCCGAGGCCATGGGAACCTGTACAGAG  168
1-885    641  TAGTTACTCCAACCTCGATTGCTGAGGACTACATGGCAGCCGGTGTGCGCGCGCAGATCACTGCCAAGGCCCATCCGTCG  720
3'RACE   169  TAGTTACTCCAACCTCGATTGCTGAGGACTACATGGCAGCCGGTGTGCGCGCGCAGATCACTGCCAAGGCCCATCCGTCG  248
1-885    721  GGCGTTTACCGCGTGGGTGTGTGCGAGGACGGCTACGCGAAGGGTGATGCCGAAAACCTCCGTGTTGCCGCTTTGGCAGC  800
3'RACE   249  GGCGTTTACCGCGTGGGTGTGTGCGAGGACGGCTACGCGAAGGGTGATGCCGAAAACCTCCGTGTTGCCGCTTTGGCAGC  328
1-885    801  TGAGTTCGGTGCCGGGCAGCAGTCTCCTAGTACCCTAACC GGTCAGCAGTATGAGTCTGCCCGCACGGCTCGCAAGCTGT  880
3'RACE   329  TGAGTTCGGTGCCGGGCAGCAGTCTCCTAGTACCCTAACC GGTCAGCAGTATGAGTCTGCCCGCACGGCTCGCAAGCTGT  408
1-885    881  ATGCC----- 885
3'RACE   409  ACGTAGCACTTGCCATCACGAAGAGACTCAAATCTTTCGCGTACCCTGCCGTTGCAGCCGCCATGTGCCGCGACTGAGTT  488
1-885    ----- 885
3'RACE  489  TTCTTTCTGTCACAGTCCCCTGATATGTTTGTGATAGTTCTTTCTTTTGGTATGCGGACAGTGTTCGCCTCAACTGC  568
1-885    ----- 885
3'RACE  569  AGCCATGAATCTCTTAGTTCTATTGGTAAAGAATACCTGTGCTTGCTGAA----- 618

```

Figura 9: Alineamiento entre los dos fragmentos secuenciados (1-885 y 3' RACE) del gen de la subunidad γ^{33} de *Gracilaria chilensis*.

Gracias a este alineamiento se puede determinar la región compartida entre ambos fragmentos, y con ello ensamblarlos para obtener la secuencia codificante para el gen de la subunidad γ^{33} (Figura 10). Fuente: Elaboración propia

1	ATGGAAGCCC	CCGCTTTTGC	TGTCAATGGA	ATGTTCTCGG	CCGTCAAGGT	50
51	CCGCACGTCT	TCCTTCACTG	CCAACAATGT	GTCACCTCGC	ACCGGCACCG	100
101	CTTCTCCGCC	AGCCGTCACC	ATGGCGGTCTG	ACGCCTTCCA	GAAGAAGTTT	150
151	CAGAGCTTTG	GAAAAATCAA	CATTGACTAC	TCGCGCCCGA	AGAAACTAGC	200
201	CTCCTTCAAG	CGAGCAGGCT	ACCCAGTCAG	CTTTGACTAC	CCCAACTCCC	250
251	CCGCCATGGC	CGGGCACTAC	TCAATCTCCA	ACTGCAATGT	ACCCAGCGCG	300
301	TGCGACAAAA	TTTTTCATGAA	GTACGACGAG	TACTGCGCAA	AAGGAATGAT	350
351	GCAAGTGTTT	AAGCGTTCGG	CTGTTCCATT	CGGTACCTAC	ACCACCAAGT	400
401	GCACCGAGGG	CACCGTTCCG	CAGCAAGCGT	TTGCGAAGCG	CGTGTTCAAC	450
451	CGTACCAAGG	CATTCCGTCA	GGCGCAGAAG	CCAATTAACG	TACGTCTCGC	500
501	CGAGCGTTAT	GAAAACCGAC	GTCTTGCTTT	CACTATGGCC	AACGGCTGTC	550
551	ACAGAGAGGA	GCAGCAATTC	TCGACAATGC	CCATGTCAGC	CGCCACCTAC	600
601	CTTGCGGGCC	GCGCCGAGGC	CATGGGAACC	TGCTACAGAG	TAGTTACTCC	650
651	AACCTCGATT	GCTGAGGACT	ACATGGCAGC	CGGTGTGCGC	GCGCAGATCA	700
701	CTGCCAAGGC	CCATCCGTCG	GGCGTTTACC	GCGTGGGTGT	GTGCGAGGAC	750
751	GGCTACGCGA	AGGGTGATGC	CGAAAACCTC	CGTGTGCGC	CTTTGGCAGC	800
801	TGAGTTCCGT	GCCGGGCAGC	AGTCTCCTAG	TACCGTAACC	GGTCAGCAGT	850
851	ATGAGTCTGC	CCGCACGGCT	CGCAAGCTGT	ACGCTAGCAC	TTGCCATCAC	900
901	GAAGAGACTC	AAATCTTCGC	GTACCCTGCC	GTTGCAGCCG	CCATGTGCCG	950
951	CGACT TGA ---	-----	-----	-----	-----	957

Figura 10: Secuencia codificante para el gen de la subunidad γ^{33} de *Gracilaria chilensis*. Los codones de inicio y término están destacados en negritas. Fuente: Elaboración propia

▶

γ^{33} MEAPAFVNGMFSVAVKVRTSSFTANNVSPRTGTASPPAVTMAVDA**AFQKKFQSF**GKINIDYSRPKK 26
 MS -----YSRPKK

γ^{33} **LASF**KRAGYPVPSFDYPNSPAMAGHYSISNCCNVPSA**CDKIFMKYDEYCAKGM**QVFKRSVPPFGTY 91
 MS LASFKRAGYPVPSFD-----AGHYSISNCCNVPSACDK----YDEYCAKGMQVFKRSVPPFGTY

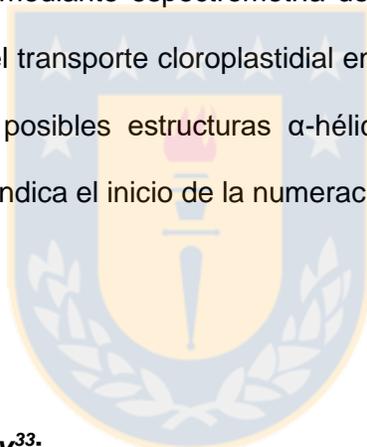
γ^{33} TTKCTEGTVP**QQAFAKRVFNRTKAFRQAQKP**INVRLAERYENRRLAFTMANGCHRE**EQQF**STMPM 156
 MS TTKCTEGTVPQQAFAKRVFNR-----QAQKPINVR-----EQQFSTMPM

γ^{33} **SAATYLAGRAEAMGTCYRVVTPTSIAEDYMAAGVRAQITAKA**HPSGVYRVGVCEGDGYAKGDAENL 221
 MS SAATYLAGRAEAMGTCYRVVTPTSIAEDYMAAGVRAQITAKAHP SGVYRVGVCEGDGYAKGDAENL

γ^{33} **RVAALAAEF**FRAGQOSPSTVT**GQOQ**YESARTARKLYASTCHHE**ETQIFAYPAVAAA**MCRD----- 279
 MS RVAALAAEFBRAGQOSPSTVTGQOQYE-----EETQIFAYPAVAAA MCRD-----

Figura 11. Traducción *in silico* de la secuencia codificante para la subunidad γ^{33} de ficoeritrina.

MS: fragmentos identificados mediante espectrometría de masas para su confirmación. En cursiva el péptido señal para el transporte cloroplastidial en la región N-terminal. En negritas, regiones correspondientes a posibles estructuras α -hélices. Subrayadas las repeticiones internas. La cabeza de flecha indica el inicio de la numeración de la proteína madura. Fuente: Elaboración propia



Análisis de la secuencia de γ^{33} :

La secuencia aminoacídica de γ^{33} (figura 11), incluye un péptido señal de transporte cloroplastidial en el extremo N-terminal que involucra los primeros 39 aminoácidos de la proteína inmadura de un tamaño 318 aminoácidos. De la secuencia de la proteína madura (279 aminoácidos y 34,884 Mr), 74 % fue confirmado mediante espectrometría de masas (MS) y mostrado en esta misma figura como MS. Durante el análisis realizado con el servidor HHrepID, la secuencia reveló similitudes entre las regiones N-terminal y C-terminal, detectándose dos repeticiones internas, (Repetición I: Cys⁶²-Gly¹⁷⁰, and Repetición II: Tyr¹⁷³-Arg²⁷⁸). Estas repeticiones se caracterizan por estar constituidas por un 30% de aminoácidos

hidrofóbicos y 39,78% de aminoácidos polares, con respecto al total de aminoácidos constituyentes de la proteína madura. El mismo patrón de repetición ha sido reportado en la subunidad γ^{33} de *A. neglectum* (Apt *et al.*, 2001) y en los alineamientos realizados entre secuencias de subunidades y asociadas a ficoeritrina conocidas actualmente (Figura 12). De acuerdo a las predicciones de estructura secundarias, que luego fueron corroboradas por data experimental y presentada más adelante, la subunidad γ^{33} se encuentra constituida, principalmente por α -hélices.



<i>C. crispus</i> ³¹	-----	000
<i>A. neglectum</i> ³¹	-----	000
<i>G. pacifica</i> ³¹	-----	000
<i>P. umbilicalis</i> ³³	-----AP---AKA---A-STVTMVDAFQRRFQSPGKIGIDYSRPR	033
<i>C. crispus</i> ³³	-----A-----SVRMAVDPLQRKFQTLGKINVDYSRPK	028
<i>C. officinalis</i> ³³	-----MAVDAFQKKFQTFGKIGVDYSRPK	024
<i>A. neglectum</i> ³³	-----ASMPVDSKPAASATGVRMVVDPLQRKYQSIGKIGIDYSRPK	041
<i>G. pacifica</i> ³³	-----A---V-SKTA-PTASVRMVVDPFQRKFQSIGKIGIDYSRPK	036
<i>G. chilensis</i> ³³	-----TMAVDAFQKKFQSFQKINIDYSRPK	033
<i>C. crispus</i> ³¹	-----T--SLRKPV---GSSSAFVGMASGFGGAAAILSKADTYMAQSILMQYYKVANPAGVYGVQ	055
<i>A. neglectum</i> ³¹	-----TFSVYGTYSIMSKADTYMAQCCKQYLAMANPMGTFGVQ	040
<i>G. pacifica</i> ³¹	-----PV---PSGAATVYGYVGRGNISVILAKADEYMAKSVRKQYLAKSNPYGTFGVQ	050
<i>P. umbilicalis</i> ³³	PTSPAMAGFYTLSTCGRMMSGASKTLAKADEYMAKGINMVKRRTAAASGVYTTQKLLSSYKRSGPS-SLIDY	102
<i>C. crispus</i> ³³	PTSAAMAGHYSVSSCGKPGGAAKILMKYDEYCAKGMQTYKRSVAVPFGTYTTKLLATYKRSYGS- <u>VENMDY</u>	097
<i>C. officinalis</i> ³³	KLASYKRGGFDAASVEYPNAPSFAQKYSIASCGQPSGASKILMKYDEYCAKGMQLQVFKRNVAVPFGVYTTK	094
<i>A. neglectum</i> ³³	KLATYVRSYGS-VGMEFPNTPSMAGHYSLTDCKAGGAAKILMKYDEYCAKGMQLQVKRAACRTGVYTTK	110
<i>G. pacifica</i> ³³	KLATYKRVYGS-VGLDFPNAVSMAGHYSLTDCTRAGGAAILMKYDEYCAKGMQLQVYKRSVAVSTGVYTTK	105
<i>G. chilensis</i> ³³	KLASFKRAGYP-VSFDYNSPAMAGHYSISNCNVPSACDKIFMKYDEYCAKGMQVFKRSVAVPFGTYTTK	094
<i>C. crispus</i> ³¹	CTEGGSKHMADFSRIRALNARFRARQASKAQAYARLFENRKMIVSSHECHHEETQFSQYANVAASYNVS	125
<i>A. neglectum</i> ³¹	CTEGSVKFAAEVARVRSLADYRQKMSSPSKAAFDMYENRKAIVAAHGCHYEGYFVDYKKTSTYNTA	110
<i>G. pacifica</i> ³¹	CTEGSVKFAADFSRIRALNAEFRALGSAKKTTFDMYENRKNAINSHGCHHEETQFVGYKGVSSMYNVS	120
<i>P. umbilicalis</i> ³³	CAESTTPGGAEFKRVFNRI SAFKAAQKSPAATQKQFQNRKAI IAAHGCHHEEVQFCNNPMSASVYLAG	172
<i>C. crispus</i> ³³	CAEGTVPQQAQAFDKRVFNRTNAFRQAQKPVNVRLEQYEAARRACFI LANGCDREEAQFKNMPMSAATFLAG	167
<i>C. officinalis</i> ³³	CTEGTVAGQAQEKRVFNRTMAFRQAQKPVNVRLEQYEAARRACFI LANGCSREEDQFKSMPVSAATFLAG	164
<i>A. neglectum</i> ³³	CTEGTQPQMAFDVRFNRTQAFRQAQKPVNVRLEQYEAARKACFVLAHNC SREEAQFKEMPMSCATFLAG	180
<i>G. pacifica</i> ³³	CTEATQPQVAYDVRVFNRTAAFRQAQKPVNVRLEQYEAARKACVTLAHNC SREEAQFKNMPMSCATFLAG	175
<i>G. chilensis</i> ³³	CTEGTVPQQAFAKRVFNRTKAFRQAQKPVNVRLEQYEAARKACVTLAHNC SREEAQFKNMPMSAATFLAG	164
<i>C. crispus</i> ³¹	RAEALGSCSRYPATPETVEEAAALLRFMDIQQTAAANPSGVYNV--ACNEGAAKFQAECDRVAALNAAYRNG	193
<i>A. neglectum</i> ³¹	KSEAA GTCFKYASPETVEEAMVRYMDITONNFANPSGVYNM--SCNEGSVRGQAE DIRVAALNAQYRQA	178
<i>G. pacifica</i> ³¹	KSEASGSCSRYPASPETVVEAAMLRFMDIQVKMAANPTGVYNI--SCNEGAARGQAE DVRVAALNAAFRQG	188
<i>P. umbilicalis</i> ³³	RNEASGTCIRYATPSSAAEYMARSVADQKRRPSAAGVFRVSPYCTDGHAKGQAEQRRVAALAGEFRAV	242
<i>C. crispus</i> ³³	RAEAMGTCYRNVTPSTIAEDYMADGVRAQLTQKAHPYGLYRVG-VCEDGHAKGDAEERRVAALSAEYRSN	236
<i>C. officinalis</i> ³³	KHESLGTCFRVVTPSNIAEDYIASGVRMQLVAKSNSTGVYGVG-SCMEGFAGKDAEARRVAALAAEYRAL	233
<i>A. neglectum</i> ³³	KMEATGACYRTRVPTSV AEDYMAGSVRAQLYTKLNPQVYGVG-ACEDGHAKGDADQRRVIALASEYRAA	249
<i>G. pacifica</i> ³³	KMEAMGTCYRTRVPSKAEDYMAGSVRMQVYQKGNASGVYPVG-GCEDGHAKGDADLRRVIALASEYRAA	244
<i>G. chilensis</i> ³³	RAEAMGTCYRNVTPSTIAEDYMAAGVRAQITAKAHPSGVYRVG-VCEDGYAKGDAENLRVAALAAEFRAQ	233
<i>C. crispus</i> ³¹	<u>QKSAGKLLQEKYDQRKKG</u> -AATH-GCNYEEGLVNNYPALGATFRPKTYGY-----	241
<i>A. neglectum</i> ³¹	<u>QKSTNKLMDKEYQOKKAGY</u> -AAAH-GCTYEEGLISTYAAIGAAFREPKSYHF-----	226
<i>G. pacifica</i> ³¹	<u>QKSLGKLLDEKYQOKKQGY</u> -SFAH-GCNYEEGLINKYPALGAAFREPKSYGY-----	236
<i>P. umbilicalis</i> ³³	<u>QQGPSATSAAYKAATEALTVYGHGDCNAEEVIYRNPATAMAMVT</u> ----D-----	248
<i>C. crispus</i> ³³	<u>QQSPAAVTGQQYESARTARKLYAH</u> -DCHHEEEQIFQYPAVAAAMCR----H-----	281
<i>C. officinalis</i> ³³	<u>QQSPAAVTGQQYESSRMAVKLYAQ</u> -NCSHEQEQLYKWPATAAAFCR----Y-----	278
<i>A. neglectum</i> ³³	<u>AQSPSTVTGQQYKSAQLATQLFAH</u> -DCHHEQEQLYKWPATAAAFCR----Y-----	294
<i>G. pacifica</i> ³³	<u>QQGAAAVTGAQYASSKMAIQLYGH</u> -SCNHEEGQFCDYPAVAAAMCR----Y-----	290
<i>G. chilensis</i> ³³	<u>QQSPSTVTGQQYESARTARKLYAS</u> -TCHHEETQIFAYPAVAAAMCR----D-----	279

Figura 12. Alineamiento múltiple de secuencias de subunidades y asociadas a ficoeritrina de algas rojas. En negrita y subrayado se muestran las repeticiones internas I y II, respectivamente. Fuente: Elaboración propia.

Sitios potenciales de cromoforilación en la subunidad γ^{33} asociada a R-ficoeritrina de *Gracilaria chilensis*.

Zhang *et al.* (2017) mencionaron que dominios conservados de unión de bilinas (CBD γ) en subunidades γ , que en este trabajo son llamadas repeticiones internas, presentan cinco cromóforos. Dos ubicados en cada una de sus mitades y uno localizado en la región central de las proteínas. Una excepción la representaba el CBD γ de la proteína de unión de varilla denominada por Zhang *et al.*, (2017) como γ^7 , el cual contenía cuatro bilinas en *Griffithsia pacifica*. Sin embargo, de acuerdo al alineamiento realizado en la figura 13, la primera bilina (Cys⁵⁶) estaría fuera de las repeticiones internas. En el trabajo de Klotz y Glazer (1985) en *G. coulteri*, también se identificaron cuatro cisteínas cromoforiladas mediante análisis de espectrometría de masas de fragmentos trípticos. El alineamiento múltiple de las secuencias γ disponibles actualmente (figura 13), muestra los posibles sitios de cromoforilación, indicado mediante cisteínas remarcadas en función de los trabajos de Klotz & Glazer (1985) y Zhang *et al.*, (2017). Sin embargo, muchas de las secuencias presentadas contienen mayor número de cisteínas conservadas con respecto al número de cromóforos reportados en la actualidad para cualquier subunidad γ . A partir del alineamiento múltiple de secuencias (AMS), los sitios potenciales de cromoforilación para *Gracilaria chilensis* podrían ser: Cys⁵⁶, Cys⁹⁵, Cys¹⁷², Cys²⁰⁹ y Cys²⁵⁹. Discusiones con respecto a los tipos y posiciones de cromóforos así como el tipo de unión de una ficourobilina son planteadas más adelante con base en resultados experimentales.

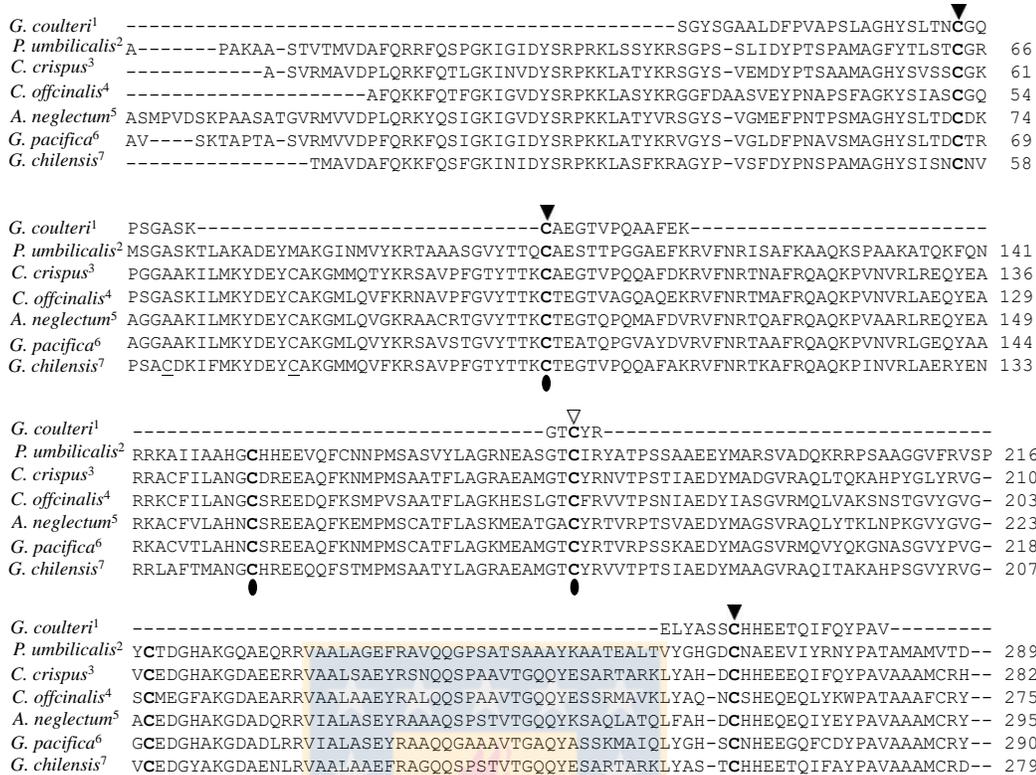


Figura 13. Alineamiento múltiple a partir de secuencias de subunidades γ^{33} de algas rojas. Se resaltan los sitios de cromofilación a partir de datos experimentales en los trabajos de Klotz & Glazer (1985) (triángulos) y Zhang *et al.*, (20017) (óvalos). Triángulo blanco indica la posición de ficoeritrobilina, mientras que triángulos/óvalos negros indican la presencia de ficourobilinas.

Fuente: Elaboración propia

Purificación de la subunidad γ^{33} a partir de complejos hexaméricos de R-ficoeritrina.

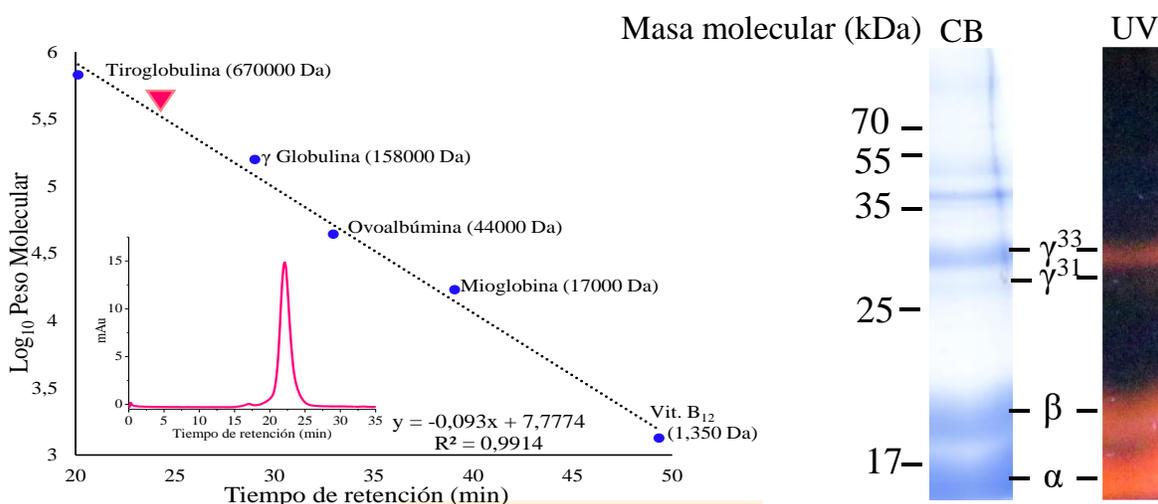


Figura 14. (Izquierda) Determinación del estado de oligomerización de R-ficoeritrina empleando cromatografía de filtración en gel (cromatograma inserto). (Derecha) SDS-PAGE para hexámeros de ficoeritrina impregnados con $ZnSO_4$ y expuesto a luz UV; posteriormente teñido con azul de Coomassie (CB). Fuente: Elaboración propia

La subunidad gama γ^{33} fue separada a partir de complejos hexaméricos de R-ficoeritrina que fueron previamente purificados siguiendo las recomendaciones de Bunster *et al.* (2000), estas muestras sirvieron para todos los ensayos realizados descritos de aquí en adelante. La figura 14 (panel izquierdo) muestra el cromatograma durante el proceso final de purificación de R-ficoeritrina mediante exclusión molecular, el cual permitió verificar el estado de oligomerización hexamérico constituido por subunidades α , β -PE y asociado a subunidades γ^{33} o γ^{31} (panel derecho Figura 14). Como siguiente prueba rutinaria, se realizaron espectros de absorción figura 15 (línea continua) que dieron cuenta del típico perfil de la R-ficoeritrina, caracterizada por un máximo a 495nm atribuido a la absorción por parte de la ficourobilina unida a las Cys⁵⁰ y Cys⁶¹ de la subunidad β -PE, conjuntamente con las ficourobilinas presentes en la subunidad

$\gamma^{33/31}$ y de las que se hablarán más adelante, en específico de γ^{33} . De igual forma se evidencian dos máximos a 538 y 565nm correspondientes a dos poblaciones de ficoeritobilinas presentes en las subunidades α y β -PE, en conjunto con las asociadas a la subunidad $\gamma^{33/31}$. La emisión a 575nm mostrada con líneas punteadas es producto de la excitación de la R-PE a 490, 538 y 565nm indicando la funcionalidad/integridad del complejo por la transferencia de energía desde las ficourobilinas hacia la ficoeritobilinas.

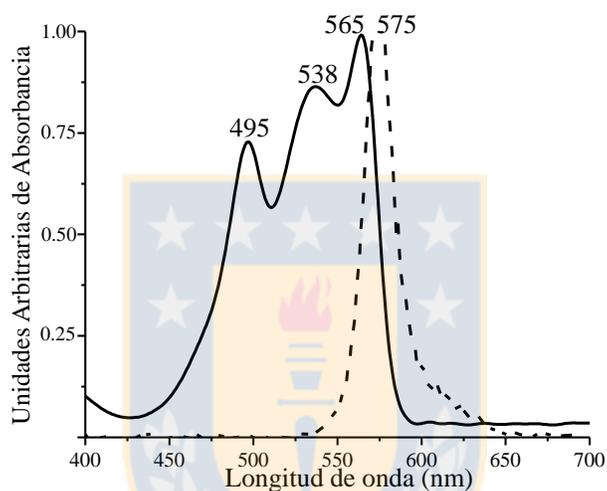


Figura 15. Espectro de absorción (línea sólida) y emisión (línea punteada) de hexámeros de ficoeritrina purificados. Fuente: Elaboración propia

En un intento por avanzar en la separación de γ^{33} a partir de los hexámeros, mediante HPLC-FR se logró la purificación de cuatro subunidades proteicas (Figura 16) y cada una de las fracciones fue caracterizada espectroscópicamente. Las cuatro subunidades fueron cargadas y resueltas mediante una electroforesis en gel de tricina SDS-PAGE (Figura 16C), evidenciándose la correspondencia de α , β , γ^{31} and γ^{33} con masas moleculares relativas de 18, 20, 31 y 33, respectivamente, las cuales migraron como bandas difusas fluorescentes (Figura 16B). Debido a que las cantidades de γ^{31} , con tiempo de retención 53,82min (Figura 16A) purificada, fueron insuficientes para algunos de los experimentos aquí descritos, los

resultados y discusión están enfocados en la subunidad γ^{33} . La co-purificación de las subunidades γ s en conjunto con R-PE, permite sugerir sobre la formación de un complejo muy estable entre ellas.

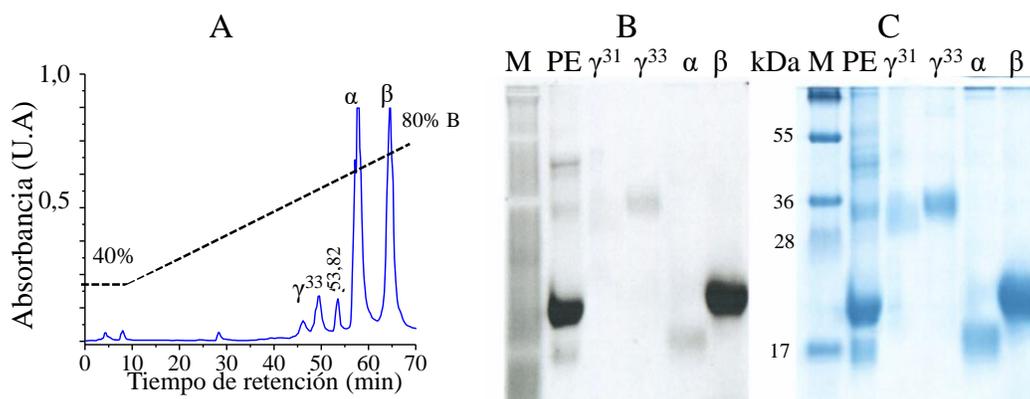


Figura 16. Cromatograma de separación mediante HPLC-FR de subunidades componentes del complejo hexamérico R-PE (A). Ensayo electroforético de subunidades purificadas a partir de R-PE en gel de Tricina-SDS-PAGE 10%, expuestas a luz ultravioleta luego de ser impregnadas en $ZnSO_4$ (B) y posteriormente teñidas con azul de Coomassie (C). Fuente: Elaboración propia

La fracción obtenida mediante purificación con HPLC-FR a los 48,06min, mostró en su espectro de absorción un máximo a 494nm y otro a 554nm (Figura 17), indicativo de la presencia de PUB y PEB, respectivamente y fue identificada mediante espectrometría de masas como la subunidad γ^{33} asociada a ficoeritrina. Durante su excitación a 490nm se pudo evidenciar que la emisión fue a 509nm, mientras que durante el proceso de excitación a 550nm, la emisión fue observada a 575nm (Figura 17A). Por otro lado, tomando en cuenta el cálculo de las áreas, basados en los máximos de absorción, se estimó la presencia en iguales proporciones de ambas bilinas (Figura 17B).

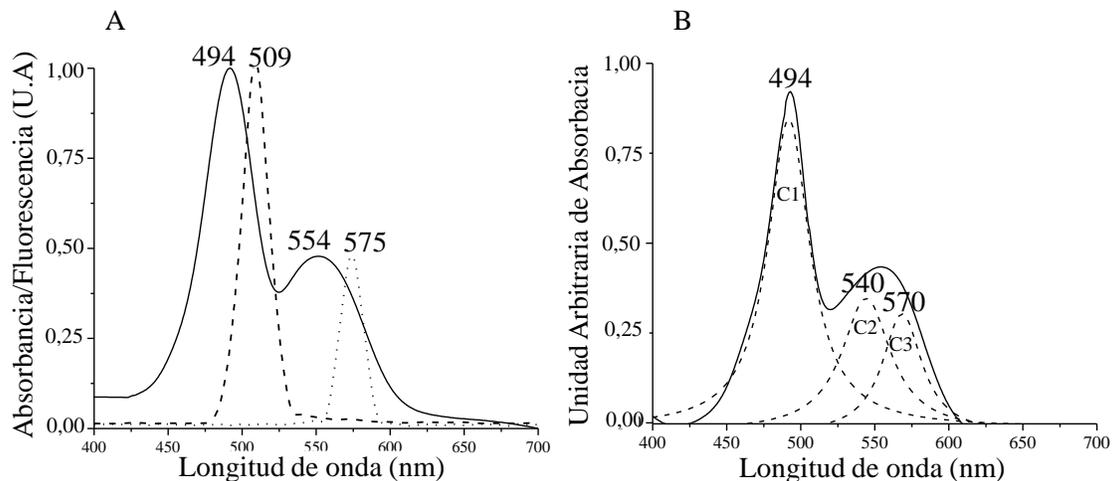


Figura 17. (A) Espectro de absorción (línea sólida), emisión con excitación a 490nm (línea discontinua) y emisión con excitación a 550nm (línea punteada) de la subunidad γ^{33} . (A.U) unidades arbitrarias. (B) Cálculo de áreas del espectro de absorción de la subunidad γ^{33} basado en tres componentes C1, C2 y C3 (líneas discontinuas). Fuente: Elaboración propia

Seguidamente, se estudiaron las características de estructuras secundarias de la fracción identificada como subunidad γ^{33} , mediante espectroscopía de dicroísmo circular, en longitudes de onda del UV lejano. El espectro observado en la figura 18 coincide con un perfil característico de proteínas con α -hélices, con sus bandas negativas a 208 nm y 222 nm y un máximo positivo a 193 nm (Holzwarth & Doty, 1965). Luego que los datos del espectro de dicroísmo circular fueron analizados con DICHROWED (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>), el algoritmo CDSSTR permitió estimar la existencia de 3,6 hélices por cada 100 aminoácidos, lo que representa un 67% α -hélices, mientras que un 13% y 8% los representan desordenes intrínsecos y giros, respectivamente. Estos valores se acercan con los obtenidos mediante predicciones en función a la secuencia aminoacídica.

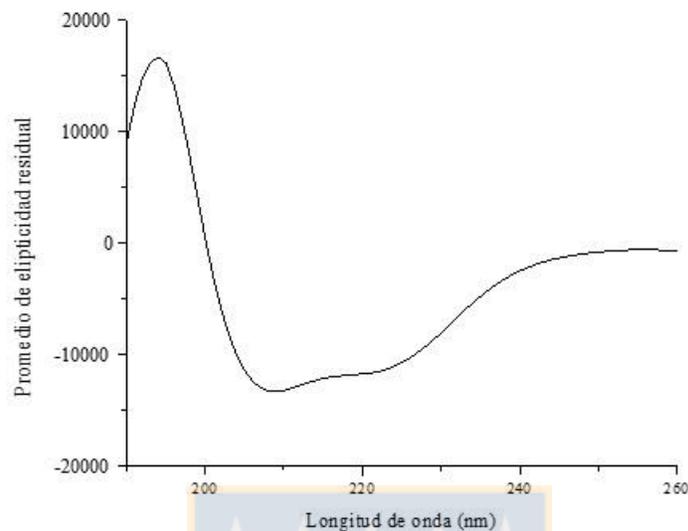


Figura 18. Espectro de dicroísmo circular de una fracción purificada de la subunidad γ^{33} .

Fuente: Elaboración propia

Modelo de la subunidad γ^{33} , obtenido mediante modelamiento por homología.

Las reglas básicas durante la selección de un templado para el modelamiento están representadas por el estudio del mayor número de estructuras posibles mediante alineamientos de secuencias y construcción de árboles filogenéticos (Fiser, 2010). Esto no fue posible debido a que actualmente existen únicamente depositadas las estructuras de las subunidades γ de *G. pacifica*. (ID-PDB-5Y6P) (Zhang *et al.*, 2017). Sin embargo, el alto porcentaje de identidad de secuencias (65%) entre γ^{33} de *G. chilensis* y γ^4 de *G. pacifica*, así como el ambiente donde éstas fueron modeladas, marcan puntos importantes en la “confiabilidad” del molde. El término “ambiente” es empleado aquí en un amplio sentido para hacer referencia a las interacciones cuaternarias. La figura 19A muestra el modelo generado

por homología, usando como templado la subunidad γ^4 de *G. pacifica* (Figura 19B). Una identidad sobre el 30% representa un “buen” predictor de la “exactitud” esperada de un modelo (Fiser, 2010), como en este caso. Sin embargo, la variable energética (DOPE) inherente a Modeller, fue tomada en cuenta para la validación en conjunto con la evaluación estereoquímica (Anexos 3-4). Un total de 12 hélices, agrupadas en lo que semeja un único dominio, se hacen evidentes en el modelo con una estructura terciaria de predominio globular.

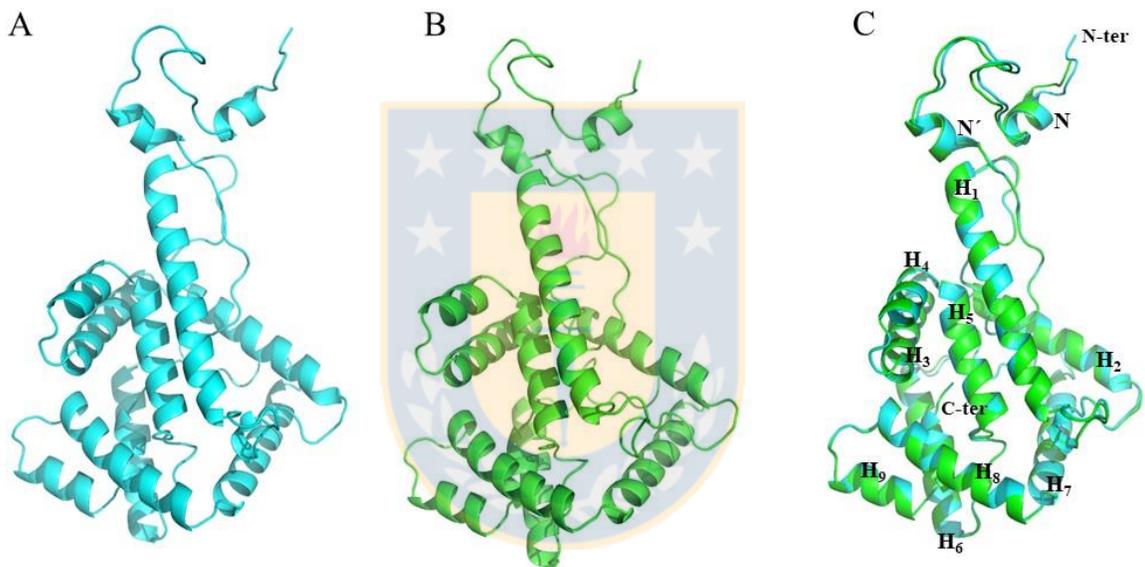


Figura 19. (A) Modelo por homología de la subunidad γ^{33} de *Gracilaria chilensis*. (B) Estructura de la subunidad γ^4 de *Griffithsia pacifica*, empleada como molde durante el modelamiento por homología. (C) Alineamiento estructural entre la subunidad γ^4 de *Griffithsia pacifica* y γ^{33} de *Gracilaria chilensis*. Fuente: Elaboración propia

Ensayo de denaturación de subunidades α PE, β PE y γ^{33} .

Ha sido reportado que la subunidad β -PE de R-PE está caracterizada por presentar una DL-PUB unida a las cisteínas 50 y 61 (Cys^{50/61}), manteniendo el cromóforo en conformación extendida aún en condiciones de denaturación (Ritter *et al.*, 1999) lo que implicaría menores cambios en sus propiedades espectroscópicas. La información estructural de R-PE (Contreras-Martel *et al.*, 2001) confirmó la presencia de la DL-PUB a las Cys^{50/61} en la subunidad β -PE de *G. chilensis*. De igual forma, experimentos previos han demostrado que la DL-PUB de R-PE es más estable a la denaturación en comparación con cromóforos unidos de forma sencilla la ficobiliproteína (Ritter *et al.*, 1999). Partiendo de esta idea y teniendo el conocimiento de las estructuras de las subunidades α y β de R-PE de *G. chilensis*, se propuso emplearlas como sondas espectroscópicas en ensayos de denaturación como se describió en métodos. Los espectros de absorción de cada subunidad nativa al igual que en estado denaturado son mostradas en la figura 20, La subunidad α de R-PE (α -PE), que contiene dos ficoeritrobilinas unidas de forma sencilla (SL-PEB) a las Cys⁸² y Cys¹³⁹, muestra un espectro de absorción (Figura 20A) con un máximo a 554nm en estado nativo, pero después de la denaturación, la señal es reducida en un 50% de intensidad y además dos componentes se hacen evidentes a 538 y 580nm. En el caso de la subunidad β , esta contiene dos SL-PEB unidas a las Cys⁸² y Cys¹⁵⁸, y una DL-PUB en las Cys^{50/61}. Su espectro de absorción en estado nativo (Figura 20B) presenta un máximo a 495nm asignado a la DL-PUB, y otro a 560nm atribuido a las dos SL-PEB. Después del proceso de denaturación, el máximo a 560nm casi desaparece, dejando en evidencia dos hombros a 537 y 580nm correspondientes a las dos poblaciones de SL-PEB, similar a lo observado en la subunidad α . El máximo de absorción a 495nm (DL-PUB) no mostró mayores cambios con la denaturación. El mismo ensayo fue realizado con la subunidad γ^{33} (Figura 20C), y después de la denaturación, el máximo a 494nm asociado a PUBs y observado en el estado nativo, mantuvo considerable intensidad de

absorción con un corrimiento hacia el rojo de 15nm. Este comportamiento deja en evidencia que al menos un PUB en la subunidad γ^{33} , se encuentra en una forma distendida con capacidad de absorción como la DL-PUB en la subunidad β . Otra observación interesante, se hace evidente con la aparición de un hombro a 541nm además de considerable disminución en la absorción a 587nm, debido a que este perfil es común en las subunidades α y β -PE atribuido a la presencia de dos poblaciones de SL-PEBs.

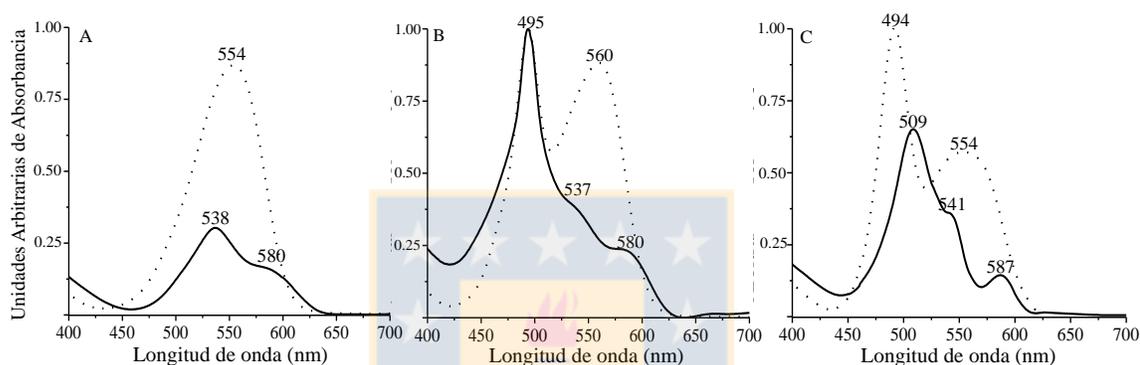


Figura 20. Espectros de absorción en estado nativo (línea punteada) y denaturado (línea continua) de subunidades α (A), β (B) y γ^{33} (C) R-ficoeritrina. Fuente: Elaboración propia

Determinación de la posición de cromóforos presentes en la subunidad γ^{33} .

Mediante análisis de espectrometría de masas de fragmentos obtenidos a partir de ensayos de digestión triptica de hexámeros entrecruzados, y con ayuda de la plataforma de búsqueda xQuest (Rinner *et al.* 2008) acoplada a xProphet (Walzthoeni *et al.* 2012), se realizó una búsqueda en la que sólo se incluyeron productos monounidos al agente entrecruzante, como un mecanismo para la disminución de error. Únicamente se logró la identificación del posicionamiento de los cromóforos ubicados en las posiciones Cis-95 y Cis-172, correspondientes a una PUB y una PEB, respectivamente (Figura 21)

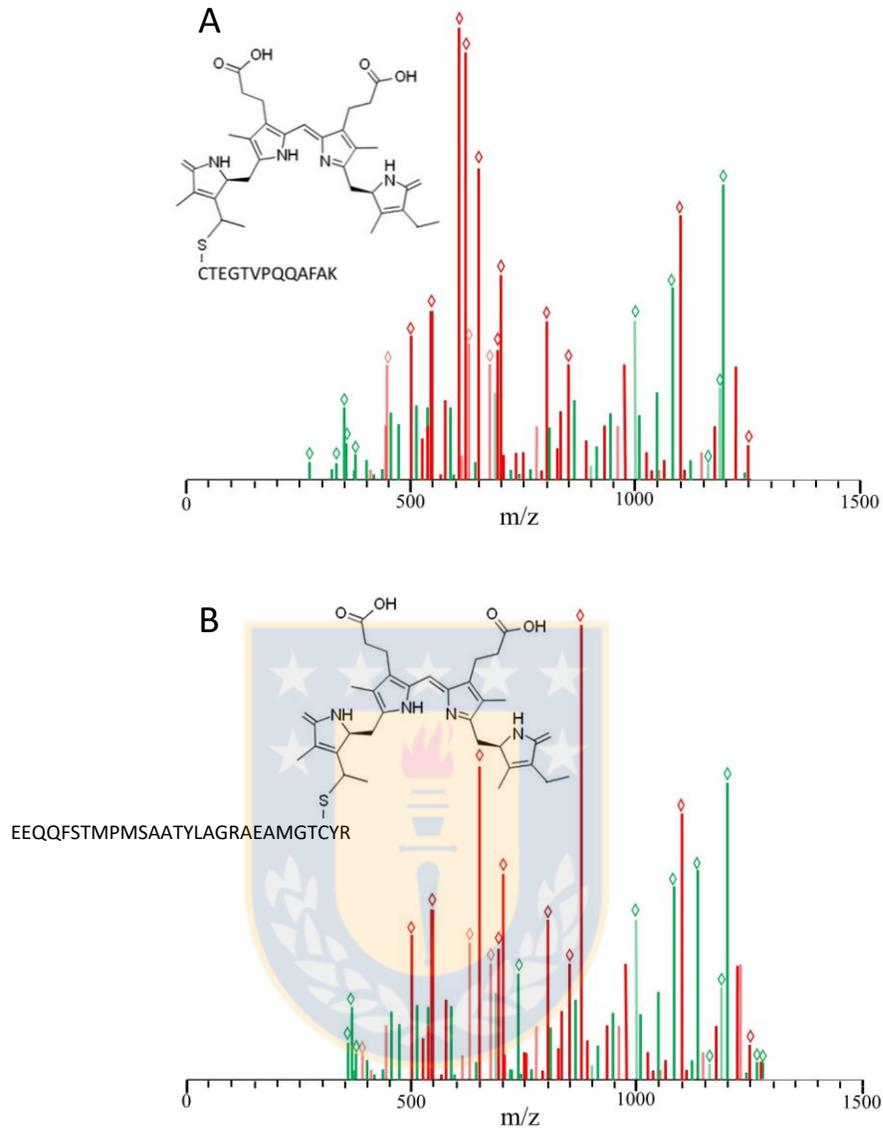


Figura 21. Espectros de masa en los que se identificaron ficourobilina (A) y ficoeritobilina (B) asociados a fragmentos trípticos de la subunidad γ^{33} . Los rombos sobre las barras indican la coincidencia entre fragmentos identificados con unión (rojo) y sin unión (verde) al agente entrecruzante. Fuente: Elaboración propia

Por otro lado, el análisis de espectrometría de masas, en conjunto con las pruebas espectroscópicas, correspondiente a un fragmento proteolítico caracterizado como

cromopéptido-PUB permitió la confirmación de una DL-PUB en las Cys^{62/73} de γ^{33} . El resultado del MALDI-TOF es mostrado en la figura 22A, en el que se identificaron dos péptidos trópicos entrecruzados mediante una PUB (Figura 22B). Este cromopéptido-PUB, luego de su hidrólisis y purificación, mostró un máximo de absorción a 508nm (inserto Figura 22A), atribuido al PUB, y un efecto batocrómico similar al observado cuando la subunidad γ^{33} fue denaturada.

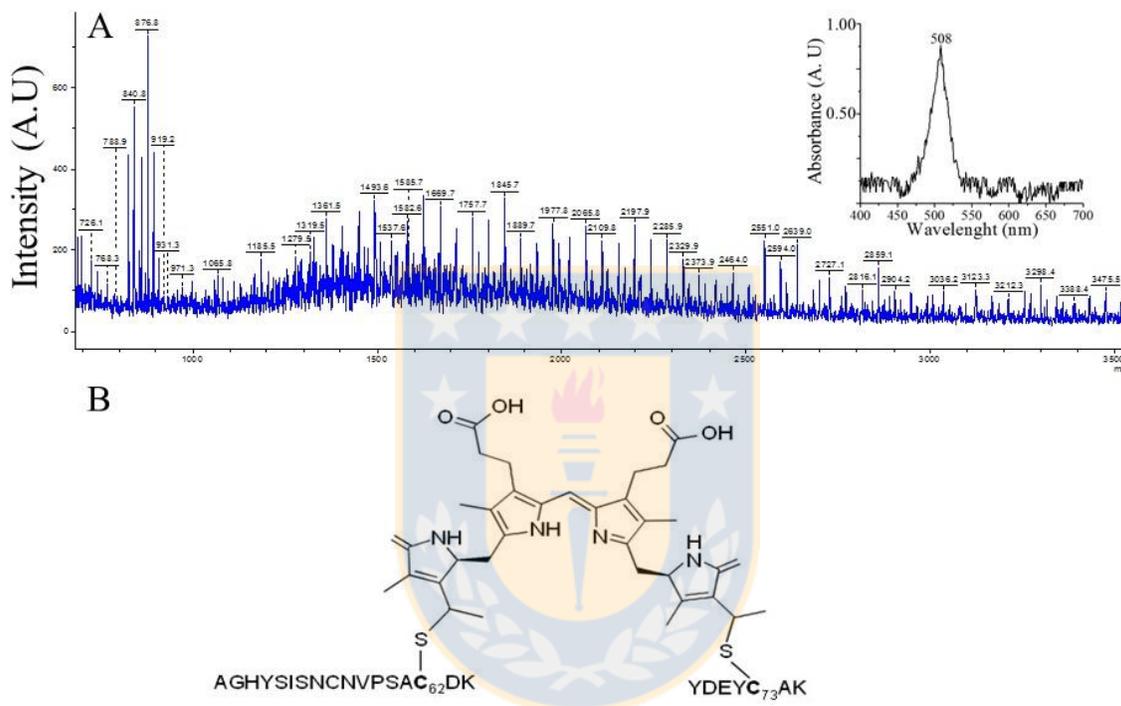


Figura 22. A. Espectro de masas del cromopéptido-PUB purificado luego de una digestión de la subunidad γ^{33} con tripsina y luego hidrolizada con bromuro de cianógeno. El inserto presenta el espectro de absorción de cromopéptido-PUB. B esquema estructural de cromopéptidos unidos a través de una PUB identificada mediante espectrometría de masas con la plataforma MS-Bridge. Fuente: Elaboración propia

Análisis de las interacciones entre la subunidad γ^{33} y R-PE. Datos de entrecruzamientos acoplados a análisis de espectrometría de masas.

Tabla 3. Fragmentos peptídicos identificados con entrecruzamiento luego del análisis mediante espectrometría de masas. En negritas se resaltan los aminoácidos entrecruzados.

Péptido A entrecruzado con péptido B	Péptido B entrecruzado con péptido A	Agente entrecruzante	Posición en proteína A	Posición en proteína B
*CTEGTVPQQAF K R	GMMQVF K R	DSS	107 γ^{33}	82 γ^{33}
*YISYALLAGDSSVLE D R	VAALAA E FR	PDH	107 β	229 γ^{33}
AGQQSPSTVTGQQY E SAR	DG E IILR	PDH	246 γ^{33}	87 β
YISYALLAGDSSVLE D R	VAALAA E FR	PDH	106 β	229 γ^{33}
DG E IILR	LEAA E K	PDH	87 β	42 α
VVTPTSIAE D YMAAGVR	YISYALLAGDSSVLE D R	PDH	184 γ^{33}	107 β
VVTPTSIAE D YMAAGVR	YISYALLAGDSSVLE D R	PDH	183 γ^{33}	107 β
VVTPTSIAE D YMAAGVR	YISYALLAG D SSVLEDR	PDH	184 γ^{33}	101 β
VVTPTSIAE D YMAAGVR	VAALAA E FR	PDH	184 γ^{33}	229 γ^{33}
VVTPTSIAE D YMAAGVR	VAALAA E FR	PDH	183 γ^{33}	229 γ^{33}
FPSS D LESVQGN I QR	LEAA E K	PDH	23 α	39 α
SLVIGGTGPL D EWGIAGAR	FPSS D LESVQGN I QR	PDH	106 α	23 α
RMAACLRDG E IILR	DI D HYMR	PDH	87 β	87 α
Longitud cero				
AQITAKAHPSGVYR	DG E IILR		197 γ^{33}	87 β
Monolink				
AQITAKAHPSGVYR			197 γ^{33}	

* Representadas en los detalles de la figura 23.

Fuente: Elaboración propia

Luego de la búsqueda y análisis de los espectros de masas de R-PE entrecruzada, mediante xQuest/xProphet, se logró la identificación de entrecruzamientos mostrados en la tabla 3. Estos resultados permiten sugerir que al menos las dos subunidades γ s, no se encuentran interaccionando dentro de un mismo complejo hexamérico. La información obtenida sobre entrecruzamientos entre subunidades α y β PE, fue empleada para la validación del método de entrecruzamiento (XL) mediante el uso de la información cristalográfica existente en el *Protein Data Bank* (PDB) para R-ficoeritrina de *G. chilensis* (PDB 1EYX); todos los XL entre estas subunidades estuvieron dentro de las distancias de restricción ($\leq 30\text{\AA}$), la figura 23 muestra algunos ejemplos de las distancias entre los aminoácidos entrecruzados e identificados que se reportan en la Tabla 3.

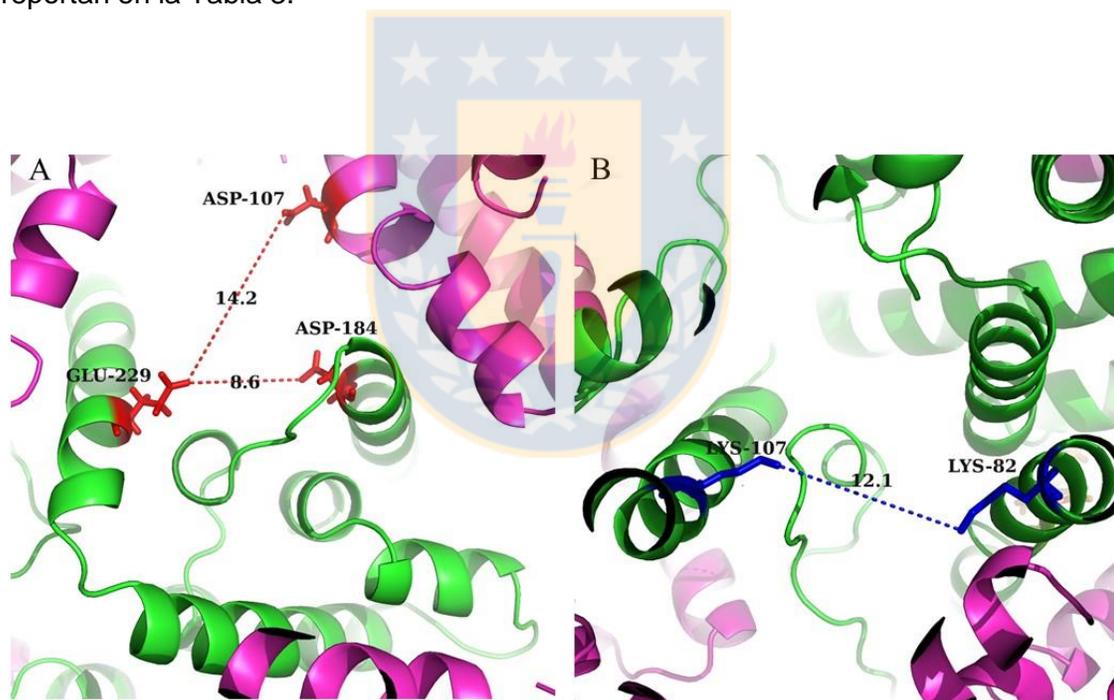


Figura 23. (A) Entrecruzamientos intra (γ^{33} - γ^{33} verde-verde) e interproteína (γ^{33} - β -PE, verde-roso) identificados luego de usar el reactivo entrecruzante PDH. (B) Entrecruzamiento intraproteína (γ^{33} - γ^{33} , verde-verde) identificado luego de usar el agente entrecruzante DSS.

Fuente: Elaboración propia

Aunque fueron pocos los resultados obtenidos a partir de los ensayos de entrecruzamiento, éstos representaron un punto importante durante la construcción del modelo de interacción gama - ficoeritrina, ya que las restricciones obtenidas a partir de ellas, en conjunto con la información cristalográfica y basados en el modelo presentado por Zhang *et al.* (2017) PDB-5Y6P, se logró la obtención del modelo propuesto en la figura 25A. El hecho de obtener, principalmente entrecruzamientos entre la región C terminal de la subunidad γ^{33} , permite sugerir que la zona N terminal además de estar más expuesta, está representada por zonas móviles que pudieron dificultar los entrecruzamientos.

Análisis de las interacciones entre la subunidad γ^{33} y R-PE. Enfoque cristalográfico

Durante el ensayo de contradifusión capilar, se obtuvo cristales alargados con forma hexagonal que son mostrados en la figura 24. Luego de su difracción, se obtuvo un *set* de datos a 2,34 Å de resolución con grupo espacial P1 y los estadísticos son mostrados en la tabla 4.



Figura 24. Cristales de R-ficoeritrina, señalados por cabezas de flechas, formados mediante la técnica contradifusión capilar. Diámetro interno del capilar 0,33mm. Fuente: Elaboración propia

El reemplazo molecular se realizó empleando las coordenadas de la unidad biológica depositada en el PDB con la identificación 1EYX, correspondiente a ficoeritrina de *G. chilensis* (Contretras-Martel *et al.*, 2001), manteniendo la nomenclatura para la identificación de cada una de las subunidades α y β ficoeritrina como se indica en la sección metodológica. De acuerdo a los datos cristalográficos obtenidos luego del reemplazo molecular, se pudo observar una densidad electrónica residual en la región interna del hexámero (Figura 25), correspondiente a γ^{33} , la cual representó el principal foco en esta investigación, para la obtención del modelo de interacción entre la subunidad γ^{33} y ficoeritrina.

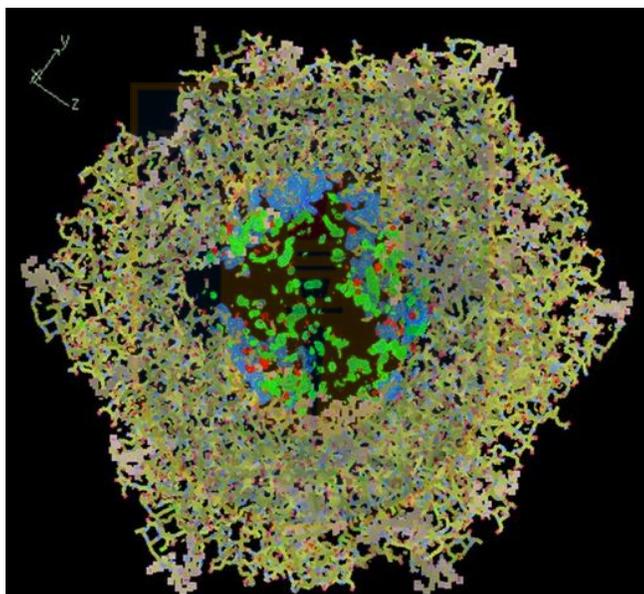


Figura 25. Visualización del complejo hexamérico R-ficoeritrina luego de la resolución de fase mediante reemplazo molecular con las coordenadas del PDB 1EYX. En azul, mapa de densidad electrónica calculado a partir de $F_o - F_c$. Marrón, representación de $C\alpha$ y cadenas laterales de subunidades α y β R-ficoeritrina. Gris, cromóforos. Verde, densidad electrónica residual correspondiente a átomos de la subunidad γ^{33} . Visualización con el software software COOT (Emsley & Cowtan, 2004). Fuente: Elaboración propia

De igual forma, se llevó a cabo el refinamiento de cada una de las subunidades α y β ficoeritrina. Para esto, y basados en el conocimiento de la secuencia proteica de la subunidad γ^{33} anteriormente descrita, al igual que se hizo con las subunidades α y β de R-PE, se identificaron y ajustaron las “mejores” cadenas laterales de aminoácidos durante múltiples ciclos de refinamiento usando Phenix, además de la edición manual del modelo con ayuda del mapa de densidad electrónica presente en la cavidad interna del hexámero empleando el software COOT (Emsley & Cowtan, 2004), para corregir el modelo obtenido por homología.

Dada las deficiencias de densidad electrónica en el centro del hexámero, correspondiente a la zona de “alojamiento” de la subunidad γ^{33} , se logró obtener un modelo de la unidad biológica de R-ficoeritrina (Figura 26A) y datos parciales de su interacción con la subunidad γ^{33} , (Figura 26B) el modelo parcial cristalográfico. Posteriormente, el modelo generado por homología fue alineado estructuralmente con las zonas identificadas en el modelo parcial cristalográfico, dentro de la cavidad hexamérica (Figura 26C). Mediante reconstrucción manual y ajustes basados en la información cristalográfica fueron realizados ciclos de refinamientos, que inicialmente permitieron evidenciar errores en la disposición de aminoácidos del modelo por homología (Figura 27A), y que posteriormente fueron corregidos entre ciclos de refinamiento a partir de la misma información cristalográfica, permitiendo que las modificaciones del modelo construido por homología estuvieran basadas en la información del modelo parcial cristalográfico (Figura 27B).

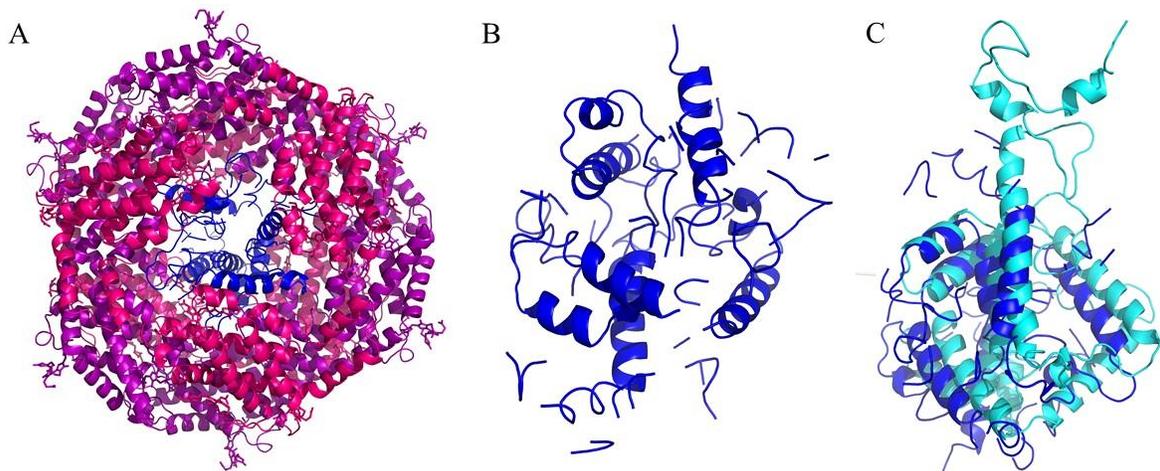
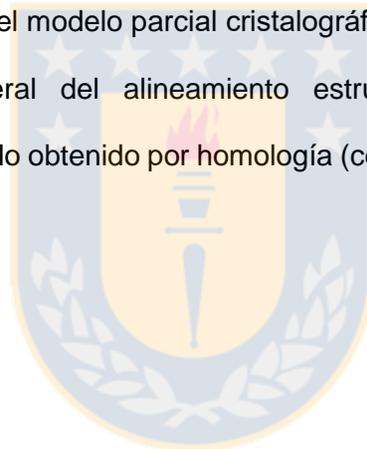


Figura 26. (A). Unidad biológica (vista frontal), de R-ficoeritrina obtenida a partir de datos cristalográficos, las subunidades α -PE en violeta, β -PE en fucsia y fragmentos de la subunidad γ^{33} en azul. (B) Vista lateral, del modelo parcial cristalográfico de la subunidad γ^{33} asociada a R-ficoeritrina. (C) Vista lateral del alineamiento estructural entre el modelo parcial cristalográfico (azúl) y el modelo obtenido por homología (celeste). Fuente: Elaboración propia



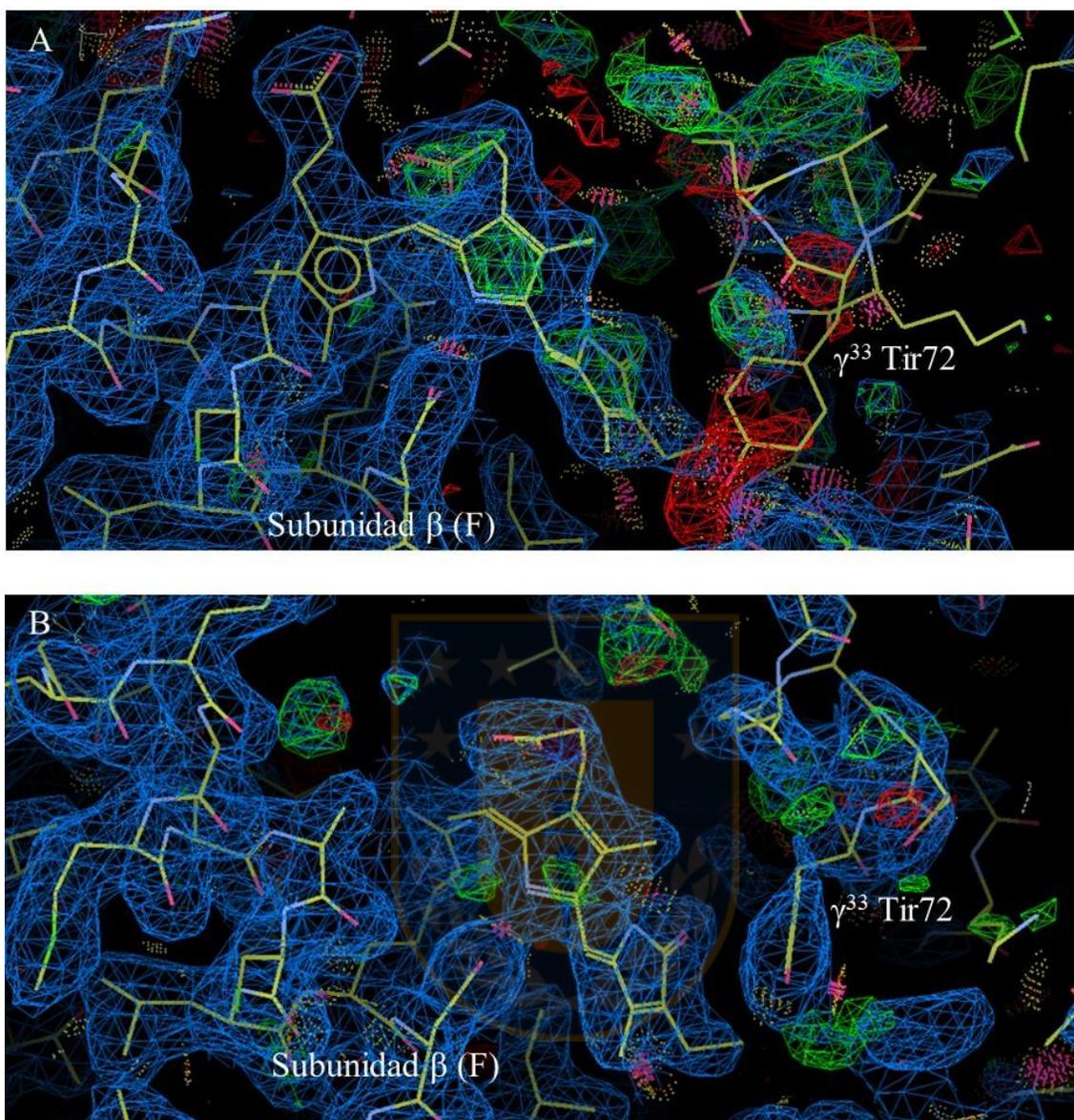


Figura 27. Detalle del arreglo inicial (A) del modelo por homología de la subunidad γ^{33} con respecto a la subunidad β R-PE y de su ajuste al mapa de densidad electrónica (B). Zonas verdes (densidades electrónicas positivas) indican deficiencia de átomos. Zonas rojas (densidades electrónicas negativas) indican la presencia de átomos en coordenadas erróneas.

Fuente: Elaboración propia

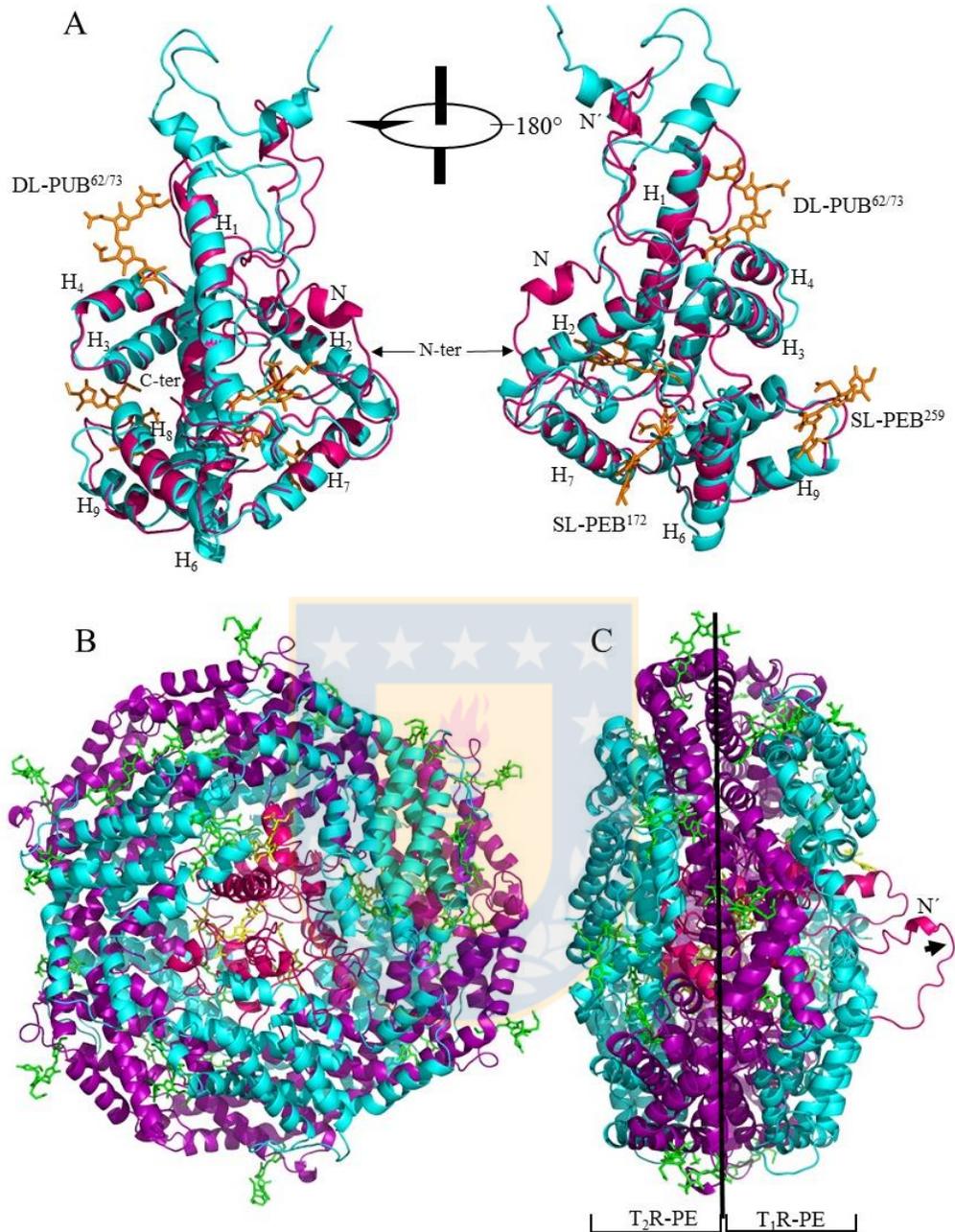


Figura 28. (A) Alineamiento estructural entre el modelo obtenido por homología (celeste) y el modelo corregido a partir de la data cristalográfica (rosado). (B) Vista frontal y (C) lateral, del complejo hexamérico R-ficoeritrina (celeste y violeta) asociado a la subunidad γ^{33} (rosado). En C, la línea esquematiza la división del hexámero en los trómeros uno y dos (T₁R-PE y T₂R-PE,

respectivamente), que se encuentran interaccionando mediante sus subunidades α -PE (violeta). Fuente: Elaboración propia

Las figuras 28B y C representan la unidad biológica obtenida luego de la difracción de cristales de ficoeritrina, en la que se obtuvo un set de datos que indexó en el grupo espacial P1. La fase fue resuelta mediante reemplazo molecular, empleando las coordenadas del PDB-1EYX, en la que se reprodujo el R-PE hexámero (Figuras 25 y 26A). En la unidad asimétrica se observan un total de 6 copias de monómeros $\alpha\beta$. El reemplazo molecular fue exacto con respecto a la densidad electrónica de cadenas laterales y enlaces covalentes de los cromóforos asociados a las subunidades de $\alpha\beta$ -PE. El alineamiento estructural con otras ficoeritrinas conocidas arrojó un RMSD de 0,25 Å para los C α , lo que apoya la conservación en el plegamiento de las subunidades α y β para la formación del complejo hexamérico como unidad biológica en las distintas especies reportadas en la actualidad ya que inicialmente éstas fueron construidas a partir de grupos espaciales R3 (Chang *et al.*, 1996; Contreras-Martel *et al.*, 2001), en lugar del grupo espacial más sencillo P1, como en este caso o el recientemente presentado por Kumar *et al.* (2016) o Sonani *et al.* (2018). La ventaja de la información obtenida a partir de un grupo espacial P1 se fundamenta en que la construcción/determinación del mapa de densidad electrónica está basada en la información neta de la difracción, mientras que en los grupos espaciales R3, el mapa de densidad electrónica representa un tercio de la unidad biológica y que al reconstruir esta última mediante simetría cristalográfica, parte de la información se repite, sin obtenerse mayor información del resto la subunidad γ^{33} asociada.

La unidad asimétrica contiene seis heterodímeros $\alpha\beta$ -PE, señalados convencionalmente en la literatura como los “monómeros”, treinta cromóforos dispuestos en cisteínas específicas de las subunidades $\alpha\beta$ -PE señaladas previamente y fragmentos ubicados en el interior de la cavidad hexamérica correspondientes a la subunidad γ^{33} , además de un cromóforo propio de ésta. La

celda unitaria está comprendida por los trímeros uno (T_1R -PE) y dos (T_2R -PE) (Figura 25C) formados por heterodímeros $\alpha\beta$ o “monómeros $\alpha\beta$ ” (cadenas) $\alpha\beta$ (AB), $\alpha\beta$ (EF), $\alpha\beta$ (IJ) y $\alpha\beta$ (CD), $\alpha\beta$ (GH), $\alpha\beta$ (KL), respectivamente.

El modelo estructural de la R-ficoeritrina refinado presentó un $R_{\text{work}}-R_{\text{free}}$ de 20,11-25,38 respectivamente. Los datos estadísticos son mostrados en la tabla 4. La densidad electrónica para casi todos los residuos de R-PE así como para sus cromóforos asociados fueron claramente definidos, sin embargo para la cavidad central, se observó una débil densidad electrónica que permitió identificar al menos aminoácidos de las α -hélices H_1 , H_2 , H_3 , H_6 , H_7 y H_8 , que se encuentran interactuando con las subunidades β -PE y corregir el modelo previamente generado por homología. La evaluación del modelo corregido usando MOLPROBITY (Chen *et al.*, 2010), reveló aceptable estereoquímica de la estructura, con el 98,7% de residuos en las regiones favorables de la representación Ramachandran (Tabla 4 y Anexo 6), que en conjunto con la evaluación energética y estructural usando el servidor ProSA-web (Wiedersrein & Sippl, 2007) (Anexo 7) permitieron la validación del modelo.

Tabla 4. Información referente a la colección de los datos cristalográficos y datos estadísticos de refinamiento.

Colección de datos	
Fuente de rayos-X	BM30A
Detector	ADSC Q315r
Longitud de onda (Å)	0,979742
Rango de escaneo (°)	180
Oscilación (°)	1
Grupo espacial	P1
<i>a</i> (Å)	59,81
<i>b</i> (Å)	111,20
<i>c</i> (Å)	111,23
α (Å)	116,84
β (Å)	100,32
γ (Å)	100,34
Mosaicidad (°)	0,060
Resolución general (Å)	48,35-2,34
No. observado/reflexiones únicas	187135/94593
Mayor resolución (Å)	2,48-2,34
R_{sym} (última capa)	8,3 (38,5)
$I/\sigma(I)$ (última capa)	11,50 (3,04)
Wilson plot <i>B-factor</i> (Å ²)	38,27
Refinamiento	
R_{world}/R_{free} (%)	20,11/25,38
RMS desviación longitud de enlaces (Å)	0,008
RMS desviación angulos de enlaces (°)	1,46
Promedio del <i>B-factor</i> (Å ²)	35,6
Residuos en regiones favorecidas/permitidas en el gráfico Ramachandran (%)	98,7

Fuente: Elaboración propia

Luego del ajuste del modelo obtenido por homología con las regiones identificadas, correspondientes a γ^{33} a partir de los datos cristalográficos, y usando la información de entrecruzamientos, se logró la obtención de un modelo subunidad γ^{33} interaccionando con las subunidades α y β ficoeritrina. En este modelo se pueden evidenciar 9 hélices ubicadas dentro de las dos repeticiones internas de la proteína, señaladas aquí como H₁-H₉, organizadas de forma tal que H₁-H₅ se encuentran en la repetición uno de la zona N-terminal, mientras que H₆-H₉ se ubican en la repetición dos de la región C-terminal. Con interacciones puntuales,

reiteradas en seis zonas dentro de la cavidad hexamérica y con cierto estilo simétrico, γ^{33} se encuentra predominantemente localizada entre las seis subunidades β , participando en la estabilización y conformación de los ambientes de las ficoeritribilinas unidas a la Cis-82 de dichas subunidades de ficoeritrina. En estas interacciones se encuentran involucrados aminoácidos aromáticos enfrentados con el anillo D de las ficoeritrobilinas (Figura 29). Adicionalmente, se observa la misma conformación en estos seis cromóforos (Figura 30).

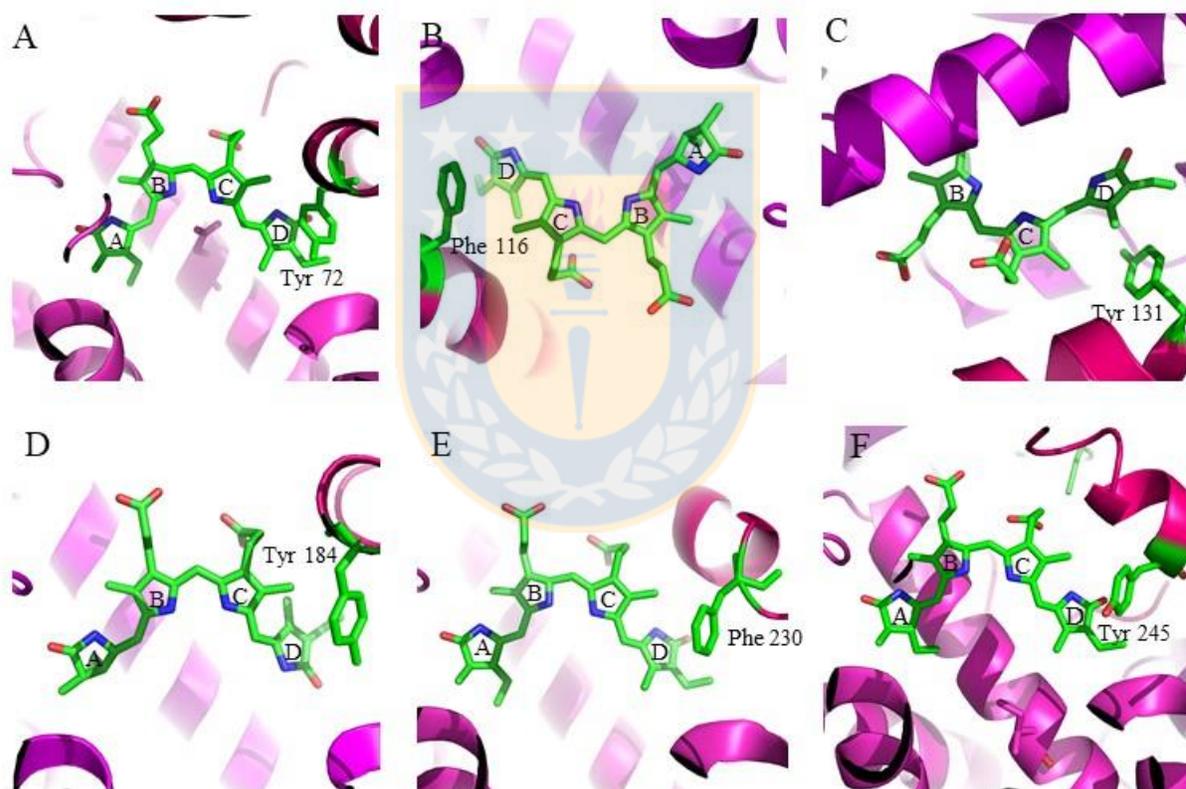


Figura 29. Interacción de la subunidad γ^{33} (rosado) mediante residuos aromáticos con el anillo D de las ficoeritrobilinas unidas a la Cis-82 de subunidades β -PE. A, B, C, D, E y F, correspondientes a residuos aromáticos ubicados en las hélices H₁, H₂ y H₃, H₆, H₇ y H₈ respectivamente. Fuente: Elaboración propia

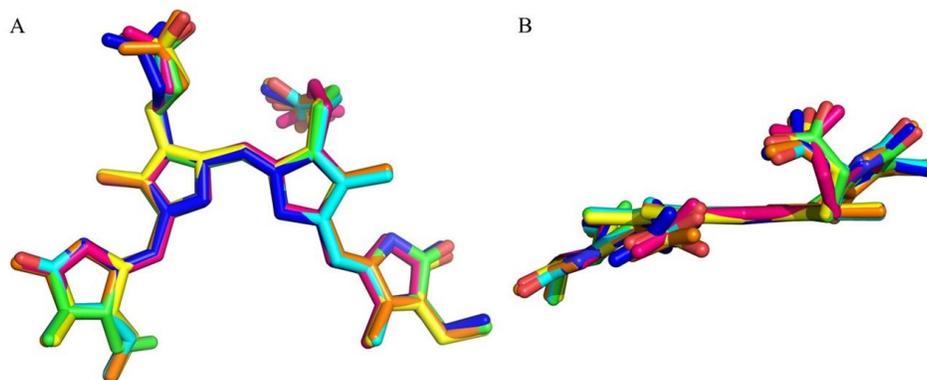


Figura 30. Vista lateral (A) y dorsal (B) del alineamiento de PEB unidas a las cisteínas 82 en subunidades β -PE. Fuente: Elaboración propia

En el extremo N-terminal que no involucra la zona de repeticiones, también se ubican dos pequeñas estructuras α -hélices denominadas N y N', la primera cercana al extremo N-terminal en la hélice X de la subunidad- α PE(E), dentro de la cavidad hexamérica (Figura 31), mientras que la segunda, N' representa una ligera proyección fuera de la cavidad, en conjunto con el largo *loop* que la conecta con H₁ (Figura 32A).

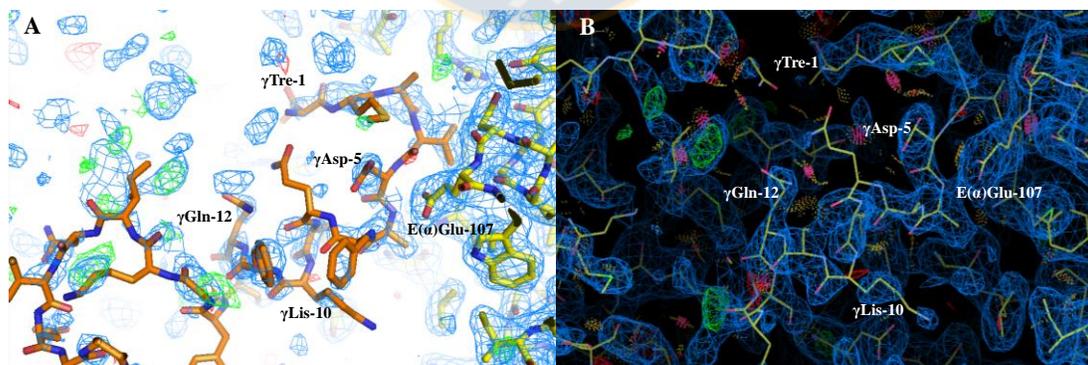


Figura 31. Ubicación de la hélice N cercana a la subunidad- α (E) dentro de la cavidad hexamérica. (A) Imagen visualizada mediante PyMol a 1σ . (B) Imagen del mapa de densidad electrónica con COOT a $0,65\sigma$. Fuente: Elaboración propia

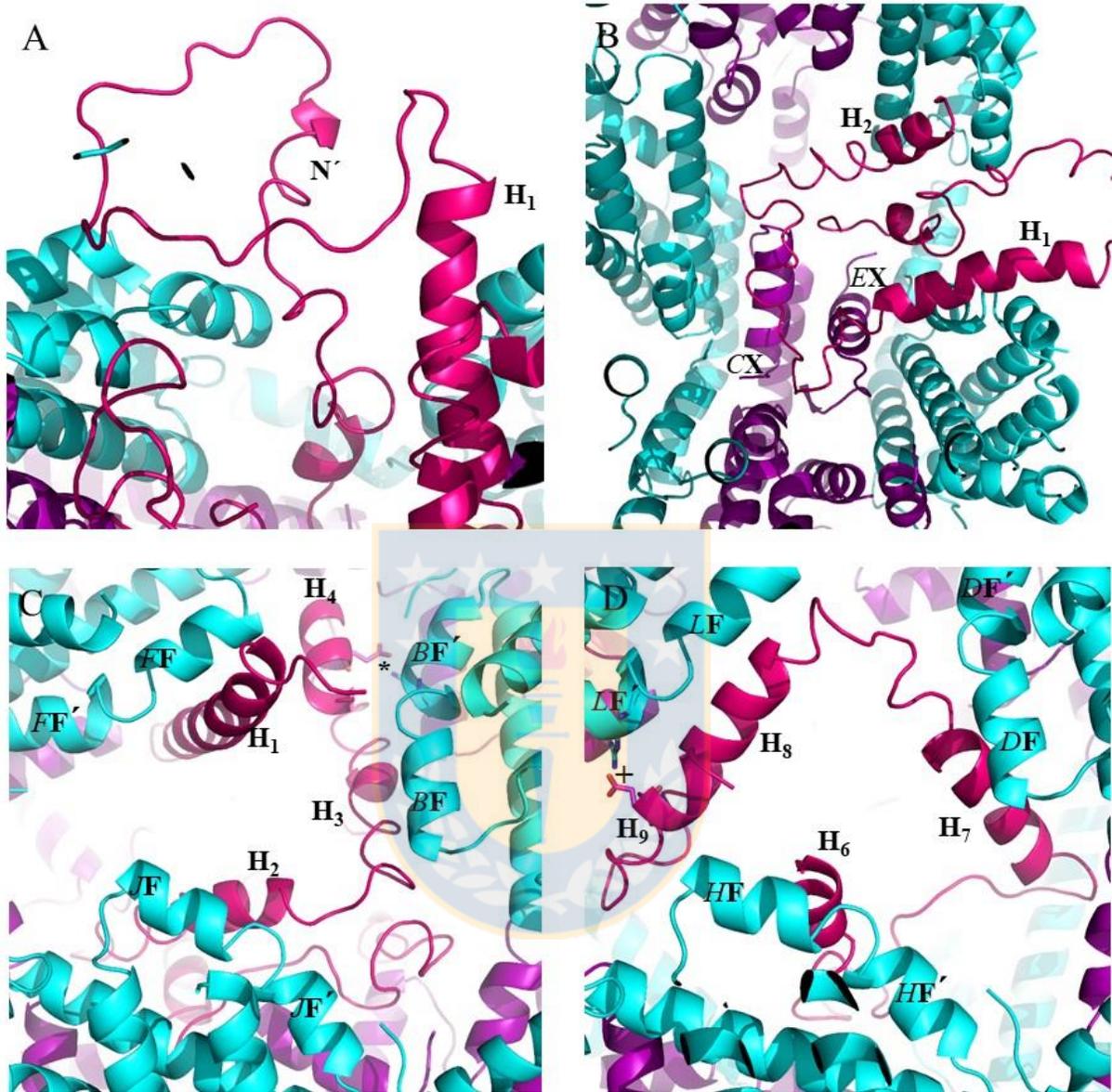


Figura 32. (A) Proyección de la hélice N' de la subunidad γ^{33} (rosado) por fuera de la cavidad hexamérica en conjunto con el *loop* que la une a la hélice H₁, indicado por la cabeza de flecha. (B) Interacción del *loop* que une las hélices H₁ con H₂ de γ^{33} con las hélices X de las subunidades α (violeta) diferenciadas por letras cursivas C y E. (C) Zonas de interacción de las hélices H₁, H₂, H₃ y H₄ de la subunidad γ^{33} con las hélices F y F' de tres subunidades β (cian y diferenciadas por cursivas) constituyentes del trímero 1. Asterisco indica interacción entre

γ^{33} -Glu-148 y β -Arg-108 de *B.* (D) Zonas de interacción de las hélices H₆, H₇, H₈ y H₉ de la subunidad γ^{33} con las hélices F y F' de tres subunidades β (diferenciadas por cursivas) constituyentes del trímero 2. Cruz indica interacción entre γ -Glu-263 y β -Arg-108 de *L.* Fuente: Elaboración propia

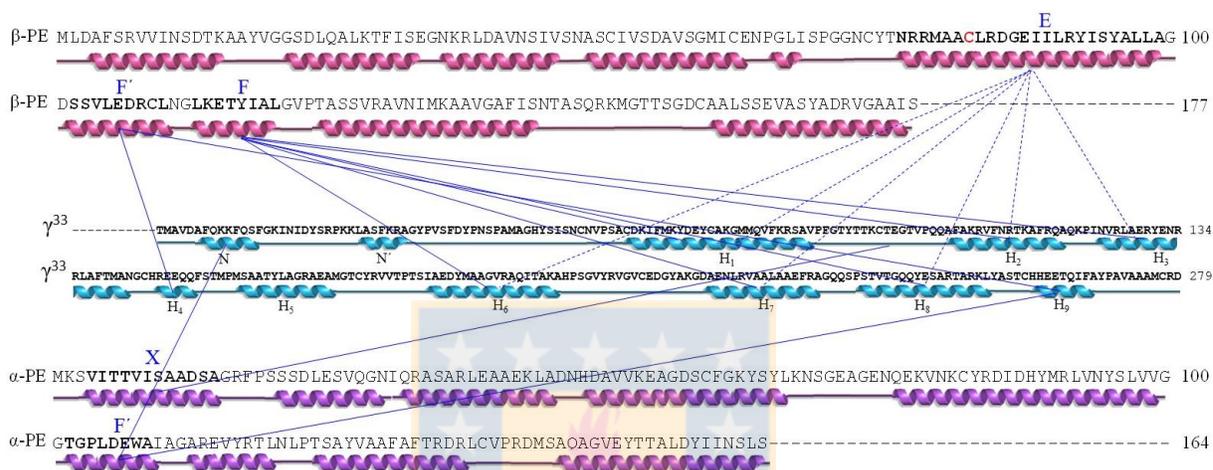


Figura 33. Representación esquemática de las interacciones entre la subunidad γ^{33} con las subunidades α y β ficocieritrina. Línea sólida indican interacciones directas. Líneas punteadas representan interacciones con cromóforos unidos a Cis-82 (rojo) en la subunidad β . En las subunidades α y β se emplea la nomenclatura de Ritter *et al.* (1999). Para la subunidad γ^{33} se utiliza la nomenclatura expuesta en Zhang *et al.* (2017). Fuente: Elaboración propia.

La repetición interna I (Cis-62 – Gli-170) de γ^{33} se encuentra en su totalidad interaccionando con el trímero uno T₁R-PE, excepto por una zona que involucra el *loop* conector entre H₁ y H₂ que interacciona con dos hélices X correspondientes a las subunidades α (C) y α (E), siendo α (C) una subunidad constituyente del trímero dos T₂R-PE (Figura 32B). Adicionalmente, las hélices H₁, H₂, H₃ y H₄ contactan con diferentes subunidades β componentes del mismo trímero de R-PE (T₁R-PE); H₁, H₂, H₃ interaccionan con las hélices F de la subunidad β (F), F' y F de

la subunidad β (J) y F de la subunidad β (B), respectivamente (Figura 32C). La hélice H_4 también interacciona con β (B), y lo hace mediante el γ^{33} -Glu-148, que contacta con la β -Arg-108(B), que forma parte de la hélice F' (Figura 32C). Las hélices H_6 , H_7 , H_8 y H_9 , interaccionan con el resto de las subunidades β constituyentes del otro trímero (T_2R -PE); H_6 , H_7 y H_8 contactan con las hélices F' y F de β (H), β (D) y β (L), respectivamente, mientras que H_9 interacciona con β (L), mediante el γ^{33} -Glu-263, que contacta con la β -Arg-108 (L) en la hélice F' (Figura 32D). En la figura 33 y tabla 5, se pueden observar y especificar más detalles de zonas interacción y potenciales interacciones no covalentes de la subunidad γ^{33} con las subunidades α y β ficoeritrina.



Tabla 5. Potenciales interacciones no covalentes entre la subunidad γ^{33} y las subunidades α y β del complejo hexamérico R-ficoeritrina.

Nombre-Número de Aminoácido 1	Nombre del Átomo	Nombre-Número de Aminoácido 2 en γ^{33}	Nombre del Átomo	Tipo de enlace	Distancia (Å)
A(α)Arg-17	NH1	Ser-257	OG	H (SS)	3,05
A(α)Glu-107	OE1	His-145	N	H (SB)	2,39
A(α)Ala-15	CB	Ala-256	CB	HF	3,73
B(β)Met-1	N	Glu-148	OE2	H (BS)	2,72
B(β)Asp-107	O	Arg-134	NH2	H (BS)	3,04
B(β)Asp-107	OD2	Gln-149	NE2	H (SS)	2,60
B(β)Arg-108	NE	Glu-148	OE1	H (SS)	3,09
B(β)Ala-119	CB	Ile-123	CB	HF	4,23
B(β)Arg-108	NH2	Glu-148	OE1	PS	3,33
B(β)Arg-108	NH2	Glu-148	OE2	PS	3,43
C(α)Lis-2	NZ	Gli-89	O	H (SB)	3,03
C(α)Ser-14	OG	Cis-95	O	H (SB)	2,43
C(α)Ala-11	CB	Tir-91	CB	HF	5,53
C(α)Ala-15	CB	Ala-3	CB	HF	4,17
C(α)Ala-15	CB	Ala-104	CB	HF	5,44
C(α)Ala-111	CB	Val-86	CB	HF	5,56
D(β)Arg-91	NH2	Tre-99	O	H (SB)	2,51
D(β)Arg-108	NH2	Tir-91	O	H (SB)	3,22
D(β)Ile-8	CB	Val-100	CB	HF	6,02
E(α)Glu-107	OE2	Ala-6	N	H (SB)	2,52
E(α)Ala-15	CB	Phe-88	CB	HF	3,47
E(α)Ala-111	CB	Phe-105	CB	HF	5,16

Fuente: Elaboración propia

Tabla 5. Continuación. Interacciones no covalentes potenciales entre la subunidad γ^{33} y las subunidades $\alpha\beta$ del complejo hexamérico R-ficoeritrina.

Nombre-Número de Aminoácido 1	Nombre del Átomo	Nombre-Número de Aminoácido 2 (γ^{33})	Nombre del Átomo	Tipo de enlace	Distancia (Å)
F(β)Asp-107	OD2	Lis-9	NZ	H (SS)	2,76
F(β)Cis-109	O	Tir-72	OH	H (BS)	2,91
F(β)Leu-113	CB	Tir-72	CB	HF	6,03
F(β)Leu-118	CB	Ile-65	CB	HF	4,92
F(β)Ala-119	CB	Ile-65	CB	HF	6,32
F(β)Ala-119	CB	Fen-66	CB	HF	4,40
F(β)Ala-119	CB	Tir-69	CB	HF	3,49
F(β)Asp-107	OD2	Lis-9	NZ	PS	2,76
G(α)Ile-110	O	Lis-215	NZ	H (BS)	2,58
G(α)Ala-111	CB	Val-206	CB	HF	5,77
H(β)Asn-111	O	Tir-185	OH	H (BS)	2,41
H(β)Ala-119	CB	Tir-269	CB	HF	6,26
I(α)Ser-10	OG	Arg-205	O	H (SB)	2,65
I(α)Asp-106	OD2	Tir-204	OH	H (SS)	2,73
J(β)Ala-174	O	Asn-43	ND2	H (BS)	2,73
J(β)Ile-118	CB	Ala-28	CB	HF	5,32

Interacciones calculadas mediante el servidor PPcheck (Sukhwal A. & Sowdhamini R. 2015).

H = Enlaces puente de Hidrógeno, HF = Interacciones hidrofóbicas, PS = Puentes salinos.

Fuente: Elaboración propia

Por otro lado, el caracter básico de la subunidad γ^{33} , en conjunto con el caracter ácido de las subunidades α y β ficoeritrina, pudiera explicar el predominio de aminoácidos polares en la interfaz $\alpha\beta$ -PE con γ^{33} , los cuales estuvieron entre 66,20% y 53,04%; correspondientes a interacciones con las subunidades α (C) y β (H), respectivamente, mientras que los porcentajes de aminoácidos no polares involucrados en las interfaces estuvo entre 33,79% y 46,96%, correspondientes a las subunidades β (H) y α (C), respectivamente (Tabla 6). Las composiciones porcentuales de aminoácidos presentes en las interfaces, calculadas en función de las áreas de interfaces se muestran en las tablas 7 y 8. De forma general, se puede visualizar como característica común entre ambos tipos de interfaces (α - γ^{33} y β - γ^{33}), el predominio de Arg, Tir y Ser en representación de los aminoácidos polares, la Ser principalmente en las interfaces α - γ^{33} ; mientras que Ala, Ile y Leu corresponden a los aminoácidos hidrofóbicos mayoritariamente involucrados en todas las interfaces.

Tabla 6. Áreas de las interfaces, expresadas en Å^2 , entre la subunidad γ^{33} con las diferentes subunidades α y β ficoeritrina. Entre paréntesis, valores porcentuales, calculados en función del área de interfaz.

Subunidad	Area de Interfaz (Å^2)	Interfaz Polar (Å^2)	Interfaz Hidrofóbica (Å^2)
A(α)	321,0	202,25 (63,01)	118,7 (36,98)
C(α)	512,4	339,2 (66,2)	173,15 (33,79)
G (α)	419,6	247,95 (59,09)	171,65 (40,91)
E(α)	702,35	429,95 (61,22)	272,35 (38,78)
I(α)	487,75	296,9 (60,87)	190,8 (39,12)
K(α)	361,6	206,25 (57,04)	155,3 (42,95)
B(β)	710,85	422,85 (59,49)	288,0 (40,51)
D(β)	429,7	260,95 (60,73)	168,8 (39,28)
F (β)	778,0	500,45 (64,33)	277,55 (35,67)
H(β)	376,9	199,9 (53,04)	177,0 (46,96)
J(β)	1004,0	561,7 (55,95)	442,3 (44,05)
L(β)	470,5	258,35 (54,91)	212,1 (45,08)

Fuente: Elaboración propia

Tabla 7. Composición (%) de aminoácidos presentes en la interfaz subunidades α/γ^{33} .

	A(α)	C(α)	G(α)	E(α)	I(α)	K(α)
Ala	18,23	17,55	21,19	11,65	12,35	13,52
Arg	13,16	6,15	20,25	13,37	7,42	8,43
Asn	0	0	1,34	0,15	0	7,15
Asp	6,03	6,21	2,45	3,66	4,75	9,50
Cis	5,52	2,49	0	0	1,72	0,53
Gln	0	0,49	3,28	7,90	0	0
Glu	10,41	1,48	7,05	7,72	9,06	7,75
Gli	0	4,51	3,78	6,92	7,36	0
His	0,97	0	0	0	1,13	0,33
Ile	6,22	8,11	7,38	5,05	8,03	6,39
Leu	8,73	7,34	6,23	5,11	5,32	8,09
Lis	3,14	4,53	8,21	4,78	6,94	6,96
Met	0,92	1,51	0	1,48	1,20	4,21
Fen	1,24	0,99	0	5,14	0,48	0
Pro	0	1,81	0	0,81	0,88	0
Ser	20,43	13,09	11,54	9,14	13,59	12,82
Tre	5,0	12,76	2,49	0,35	2,14	13,77
Tri	0	0	0	0,27	0,43	0
Tir	0	7,59	1,06	6,74	12,98	0,67
Val	0	3,39	3,74	8,76	4,21	0

Fuente: Elaboración propia

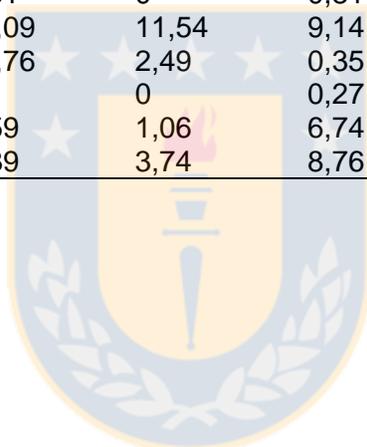
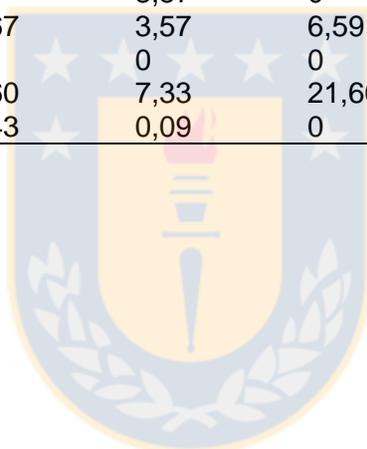


Tabla 8. Composición (%) de aminoácidos presentes en la interfaz subunidades β / γ^{33} .

	B(β)	D(β)	F(β)	H(β)	J(β)	L(β)
Ala	4,95	7,33	7,52	14,36	8,17	5,47
Arg	16,79	20,83	19,51	20,57	19,67	20,26
Asn	6,57	1,82	3,02	3,04	7,12	7,10
Asp	4,33	2,62	4,13	1,25	3,06	6,69
Cis	5,12	1,30	4,99	2,45	0,61	1,18
Gln	2,23	8,86	1,24	3,99	3,73	0
Glu	10,15	6,82	5,39	5,49	7,66	5,35
Gli	1,55	0,68	1,76	0,77	2,21	0,45
His	3,61	0	0	3,58	2,36	4,43
Ile	6,58	8,94	10,34	8,61	6,05	10,95
Leu	10,11	9,28	6,03	7,20	7,57	8,22
Lis	1,73	0	9,50	0	0,66	0
Met	3,29	1,30	3,93	0	1,13	1,90
Fen	3,12	10,45	8,08	0	9,21	6,42
Pro	2,93	1,07	0	0,5	1,09	1,59
Ser	6,69	0	3,57	0	4,88	1,53
Tre	5,58	7,67	3,57	6,59	2,05	13,14
Tri	0	0	0	0	0	0
Tir	4,67	3,60	7,33	21,60	5,96	8,91
Val	0	6,43	0,09	0	6,81	2,37

Fuente: Elaboración propia



Identificación de un cuarto cromóforo mediante el enfoque cristalográfico.

En función a los datos cristalográficos, se obtuvo información de la ubicación del cromóforo en la cisteína 259. El microambiente, se encuentra principalmente conformado por aminoácidos propios de la subunidad γ^{33} excepto por la Arg-114 de la subunidad $\alpha(A)$, que se encuentra a 5,8 Å del grupo carboxilo del anillo B. El γ Glu-262 interacciona con el nitrógeno del anillo C, separado por 3,1 Å; mientras que la γ Arg-278 pudiera estabilizar grupo carboxilo del anillo C (Figura 34).

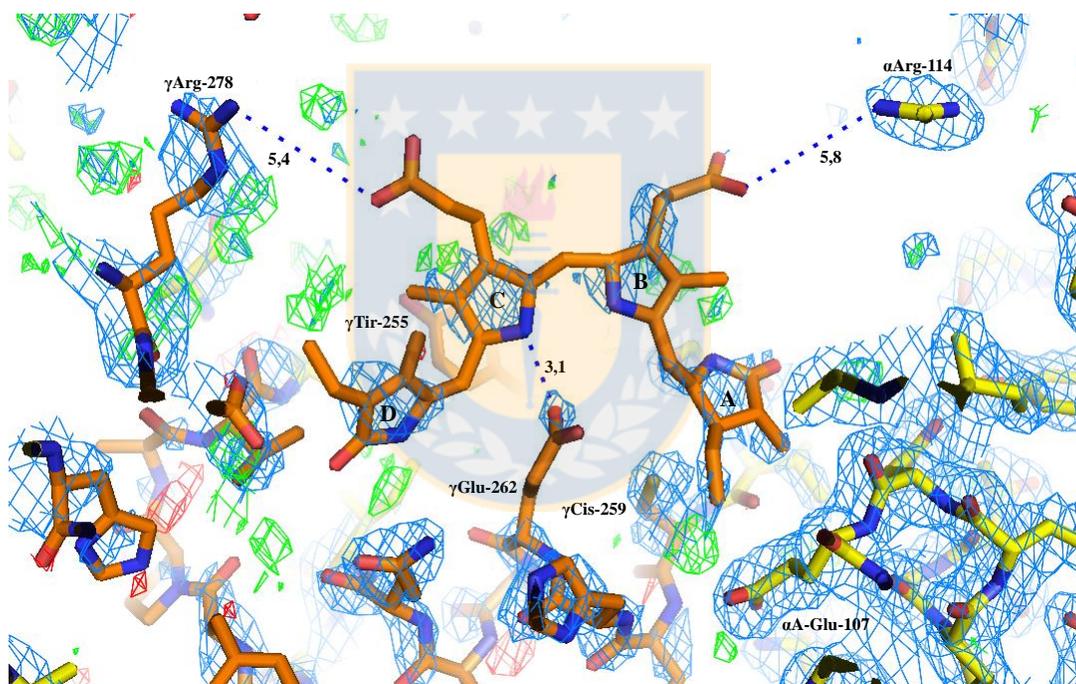


Figura 34. Aminoácidos cercanos a la ficocitrobilina unida a la cisteína 259 de la subunidad γ^{33} . Líneas punteadas indican distancias (Å) entre aminoácidos. Fuente: Elaboración propia.

Obtención de un modelo del complejo mediante Crio-tomografía electrónica.

Como enfoque adicional, mediante el uso de la criomicroscopía en una de sus variantes, la crio tomografía electrónica, se logró obtener imágenes de los complejos hexaméricos de R-PE que habían sido previamente empleados durante el proceso de cristalización. Partículas seleccionadas a partir de las fotomicrografías para su procesamiento, mediante el uso de *softwares* descritos en la sección metodológica, se logró la construcción de un modelo o también llamado promedio, que permitió afianzar la idea de que la subunidad γ^{33} se encuentra en su totalidad en el interior de la cavidad hexamérica sin observarse proyección alguna hacia el exterior del hexámero (ver 10-1; 12-3; 13-3, 6-4; 11-4 en la figura 35). Adicionalmente, se hizo evidente tres zonas de interacción entre la subunidad γ^{33} con cada trímero de R-PE (ver 1-1; 1-2; 10-1; 3-7 en la figura 35), que de acuerdo a los datos de entrecruzamiento y cristalográficos corresponden a interacciones directas con las α -hélices F' y F (Líneas sólidas azules en figura 33) e indirectas (Líneas punteadas azules en figura 33) con las α -hélices E de subunidades β (Ver además Tabla 5). Como se mencionó recientemente y se describió durante la metodología, las partículas fueron seleccionadas y clasificadas en función del posicionamiento observado en la microfotografía y luego empleadas en la construcción de un modelo promedio (Figura 36), de forma independiente al obtenido mediante cristalografía, en el que nuevamente se hace evidente tres principales zonas de interacción de la subunidad γ^{33} con cada trímero de R-PE.

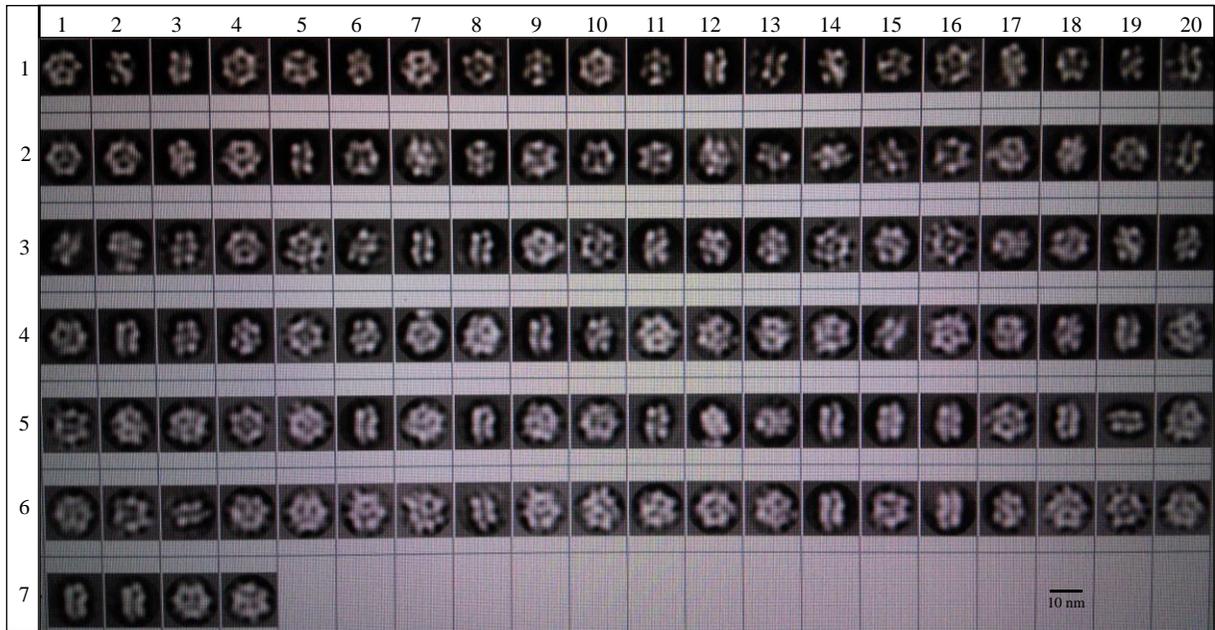


Figura 35. Clasificación de complejos hexaméricos, en función a su posición sobre la rejilla, extraídos de las fotomicrografías obtenidas durante el análisis criomicroscópico. Fuente: Elaboración propia

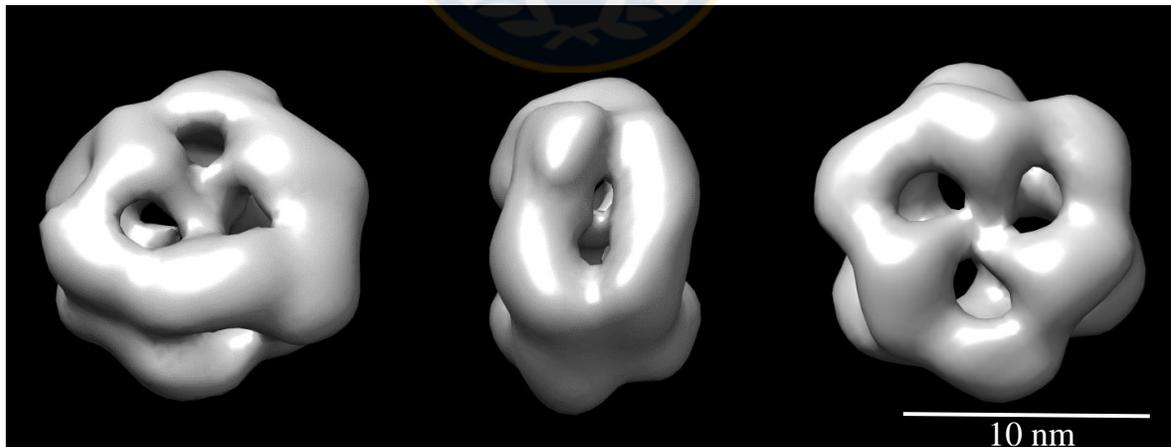


Figura 36. Diferentes vistas del modelo del complejo hexamérico R-PE en interacción con la subunidad γ^{33} , construido a partir de partículas únicas seleccionadas de fotomicrografías obtenidas mediante criomicroscopía electrónica. Fuente: Elaboración propia

Determinación de las distancias entre los cromóforos de la subunidad γ^{33} .

Durante la determinación de las distancias entre los cromóforos de la subunidad γ^{33} (Figura 37A), se asumió una unidireccionalidad, basados en los datos de Zhang *et al.* (2017), con respecto a la disposición del hexámero de ficoeritrina en la varilla del ficobilisoma en la que el extremo N-terminal de la subunidad γ^{33} se encuentra hacia la zona distal de la varilla. Las distancias calculadas entre los centros de simetría de la DL-PUB^{62/73} y las PEB¹⁷² y PEB²⁵⁹ fueron 41,6 y 34,7Å, respectivamente; mientras que entre la PUB⁹⁵ y PEB¹⁷² y PEB²⁵⁹ se determinaron distancias de 18,0 y 33,1Å, respectivamente (Figura 37B). De igual forma, se determinaron las distancias entre las mencionadas γ^{33} -PUBs, y las PEBs unidas a las Cis-82 de las subunidades β -PE, las cuales oscilaron entre 18,0Å y 45,1Å (Figura 37C).

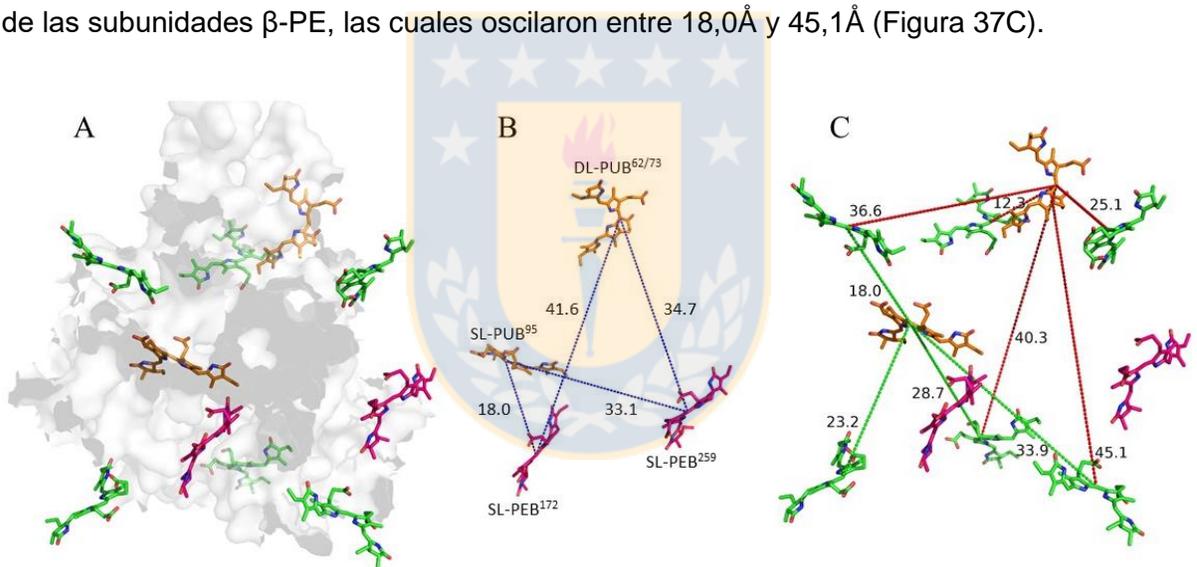


Figura 37. (A) Esquema del posicionamiento de PUBs (amarillas) y PEBs (rosadas) en la subunidad γ^{33} . Se incluyen las PEBs unidas a Cis-82 de β -PE (verdes). (B) Distancias (Å) entre las PUBs y PEBs de la subunidad γ^{33} . (C) Distancias (Å) entre las PUBs y PEBs de la subunidad β -PE. Fuente: Elaboración propia

DISCUSIÓN

A fin de obtener información en todos los niveles de organización estructural de la subunidad γ^{33} como proteína de unión dentro del ficobilisoma, este trabajo estuvo enfocado inicialmente en la caracterización con respecto a secuencia y comparada con datos experimentales, así como la determinación de los tipos de bilinas asociados a ella y finalmente la integración de información procedente de técnicas para estudios a nivel estructural como entrecruzamientos analizados mediante espectrometría de masas, tomografía electrónica y cristalografía de rayos X.

Análisis de la secuencia

La región codificante de la subunidad γ^{33} de *Gracilaria chilensis* se amplificó mediante la combinación de PCR y 3' RACE hasta su secuenciación. La secuencia es homóloga con subunidad γ^{33} de otras algas rojas y no presenta similitud con secuencias génicas ni aminoacídica de otras proteínas de unión en el PBS (Liu *et al.* 2005). En ella se identificó una extensión con 957 pares de bases, que al ser traducidos *in silico* se obtuvo una secuencia constituida por 318 aminoácidos en los que se incluyen 39 de la región N-terminal correspondientes a un péptido de transporte cloroplastidial, que no fue encontrado durante los análisis mediante espectrometría de masas de la proteína purificada, concordando con lo expuesto por Apt *et al.* (1993), quienes señalaron que el péptido de señal cloroplastidial es rápidamente escindido luego de la llegada de la proteína al cloroplasto. Este péptido de señal cloroplastidial es común y ha sido reportado en otras subunidades γ s (Apt *et al.* 1993), al igual que las repeticiones internas. Estas últimas han sido catalogadas como unidades funcionales y estructurales que pudieron haber sido originadas a partir de eventos de duplicación intragénicos, seguido de una fusión de la secuencia duplicada como los propuestos para ficobiliproteínas Apt *et al.* (1995) que incrementarían el número de sitios de cromoforilación Apt *et al.* (2001).

La presencia de estas repeticiones, pudieran estar vinculadas directamente con la función de la subunidad γ^{33} , además derivar en un tipo de especificidad por complementariedad de forma y naturaleza química, la cual determina la energía libre de unión con sus proteínas pares (Nooren & Thornton, 2003). Estas repeticiones internas en subunidades γ s, han sido recientemente denominadas por Zhang *et al.* (2017), como “dominio conservado de cromóforos en subunidades γ ” (CBD γ s) del inglés *Conserved Chromophore Binding Domain on γ subunits*, constituidos por alrededor de 210 aminoácidos. Este dominio aquí ha sido llamado, zona de repeticiones internas. En el alga roja *Griffithsia pacifica*, el CBD γ consiste de 10 α -hélices (H1-H10), los cuales están organizados de tal forma que cinco α -hélices del extremo N-terminal (H1-H5) interactúan con cinco α -hélices del extremo C-terminal (H6-H10) mediante una rotación de 180° con respecto a un eje paralelo al plano del hexámero. CBD γ se encuentra haciendo extensivos contactos en una facción simétrica con la cara interna del hexámero (Zhang *et al.*, 2017).

Si bien en las secuencias disponibles se ha determinado mayor número de cisteínas conservadas con respecto a la cantidad de cromóforos reportados en cualquiera de las subunidades γ s conocidas, la información experimental que evidencian el número, tipo y posicionamiento de cromóforos es muy limitada, debido a que en muchos casos (Apt *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2004; Apt *et al.*, 2001) la identificación de los sitios potenciales de cromoforilación han sido asignados por homología con los datos experimentales existentes hasta ese momento, únicamente en *Gastroclonium coulteri* (Klotz & Glazer, 1985), mientras que la composición de cromóforos han sido determinadas basadas en estudios espectroscópicos (Glazer & Hixson, 1977).

Investigaciones previas han postulado que las subunidades γ s de varias algas rojas tienen diferencias en la composición de cromóforos, haciendo referencia a distintos tipos de subunidades γ s. La subunidad γ^{33} de *A. neglectum* (Apt *et al.*, 1993) tiene tres PUB y una PEB al igual que en *G. coulteri*. Mientras que γ^{31} de *A. neglectum* (Apt *et al.*, 1993) presenta dos PUB y dos PEB como en *Porphyridium cruentum* (Glazer & Hixson, 1977). En ambos casos, el número de cromóforos contrasta con siete subunidades γ s reportadas en el PBS de *Griffithsia pacífica* en las que se ha determinado cinco PUB por subunidad (Zhang *et al.*, 2017) incluyendo la homóloga de γ^{33} . Basados en los resultados obtenidos aquí, es posible sugerir que puede existir diferencias en la composición o proporciones de tipos de cromóforos aún entre subunidades homólogas de diferentes especies de alga rojas.

La presencia de múltiples PEBs y PUBs (Nagy *et al.*, 1985; Blot *et al.*, 2009) en subunidades γ s es una adaptación evolutiva a hábitats con baja intensidad de luz, debido a que ellas incrementarían el número de vías de transferencia de energía dentro de la antena sin aumento en el volumen de la varillas del PBS. También es posible que la tasa global de transferencia de energía en la periferia de las varillas pueda incrementarse debido al mayor número de bilinas en las proteínas de unión ya que se acortarían distancias entre ellas (Zhang *et al.*, 20017).

Posicionamiento de cromóforos en la subunidad subunidad γ^{33} . Pruebas de una ficourobilina unida a dos residuos cisteína de la subunidad γ^{33} .

Los espectros de absorción de los diferentes tipos de ficoeritrinas o de sus subunidades componentes han sido ampliamente documentadas (Glazer & Hixson, 1977; Klotz & Glazer, 1985). Sin embargo, con respecto a las subunidades γ s, la información es escasa (Sepulveda-Ugarte *et al.*, 2011) y menos aún información relacionada a su función. Sepulveda-Ugarte *et al.* (2011) realizaron la caracterización espectroscópica de las subunidades α , β y de una de las subunidades γ s de ficoeritrina en *G. chilensis* y que ahora identificamos como γ^{33} . Interesantemente, las deconvoluciones realizadas por Sepulveda-Ugarte (2011) a estas tres subunidades concuerdan con los espectros de absorción obtenidos luego de su denaturación. Los cambios evidenciados en los espectros de absorción de cada subunidad, posterior a la denaturación, pueden ser atribuidos a alteraciones en interacciones no covalentes bilina-proteína que modifican los ambientes donde estos grupos cromofóricos se encuentran (O'Carra *et al.*, 1964). Sepulveda-Ugarte *et al.* (2011) señalan la existencia de diferentes poblaciones de PEB basados en las características espectroscópicas.

Las características espectroscópicas pueden verse afectadas por el tipo de tratamiento durante la denaturación, lo cual incide sobre el ambiente que pueda generarse alrededor del cromóforo. En las estructuras de ficoeritrina resueltas actualmente, se ha demostrado que la interacción del cromóforo con la proteína, genera mayor efecto sobre la orientación antes que en su conformación. Y que un cromóforo en particular podría presentar zonas específicas con mayor movilidad conformacional que otras (Jiang *et al.*, 1999). El cromopéptido presentó un máximo de absorción a 508nm atribuido a la DL-PUB, un efecto similar al observado cuando la subunidad γ^{33} fue sometida a denaturación (509nm). El efecto batocrómico evidenciado tanto en el cromopéptido-PUB, como luego del proceso de denaturación puede ser atribuido a

interacciones o efectos directos de aminoácidos en la vecindad de DL-PUB que pueden modificar el estado de energía vibracional del cróforo. Braiman *et al.* (1999) establecen que cadenas laterales de aminoácidos cargados, enterradas como parte de un par iónico dentro de regiones hidrofóbicas de una proteína, son más sensibles a perturbaciones, tales como cambios en la naturaleza o posición de los enlaces, alterando la formación de enlaces de hidrógeno. Efectos batocrómicos de hasta 40nm, han sido observados en ensayos de denaturación luego de la digestión trípica de ficobiliproteínas o aductos formados *in vitro* (Arciero *et al.*, 1988).

Luego de tener los indicios de una DL-PUB, una búsqueda *in silico* de posibles sitios para esa doble unión fue realizada, en la que se identificó a las cisteínas 62 y 73, caso similar al observado en la subunidad β -PUB^{50/61} de ficoeritrina. En la subunidad β de R-ficoeritrina, la distancia entre los C α de las cisteínas Cys⁵⁰ and Cys⁶¹ es 15.3Å; debido a que ambas cisteínas se encuentran en una región helicoidal de acuerdo a la información cristalográfica PDB-1EYX, (Contreras-Martel *et al.*, 2001). En la subunidad γ^{33} esta DL-PUB fue identificada como γ^{33} -DL-PUB^{62/73}. Y basados en el modelo propuesto en este trabajo, así como en el propuesto por Zhang *et al.* (2017) a partir de datos de criomicroscopía electrónica, esta región también corresponde a una α -hélice (H1). En la figura 33 se muestra la región inter-cisteínas de la subunidad β -PE de *G. chilensis* con β -DL-PUB^{50/61}; la secuencia de γ^{33} -DL-PUB^{62/73} también se muestra para comparación. La Cis73 en la subunidad γ^{33} , se encuentra conservada en todas las secuencias analizadas (Figura 13). Sin embargo, ésta no ha sido previamente considerada como un sitio de cromoforilación (Klotz & Glazer, 1985; Wang *et al.*, 2004, Zhang *et al.* 20017), mientras que la cisteína 62 está presente solo en *G. chilensis*, y ambas confieren los sitios de anclaje de la PUB sobre la subunidad γ^{33} . Por otro lado, Klotz *et al.* (1986) propusieron la existencia de las secuencias CXR y CXXR como consenso para la predicción

de sitios de cromoforilación, basados en alineamientos de subunidades α y β de ficobiliproteínas. Sin embargo, tales secuencias de predicción no aplican, por lo menos totalmente, en subunidades γ s. Después de los alineamientos realizados con las secuencias de subunidades γ s actualmente disponibles (Figura 13), es evidente que la observación de Klotz *et al.* (1986) coincide al menos con el sitio de unión en la Cis172, mientras que en las Cis62 y Cis73, que ahora son propuestas sitios de unión para una PUB, presenta similar naturaleza fisico-química (CXK). Esta secuencia CXK también ha sido designada sitio de cromoforilación en las subunidades γ^{33} de *A. neglectum* (Apt *et al.*, 1993) y *C. crispus* (Collen *et al.*, 2013).

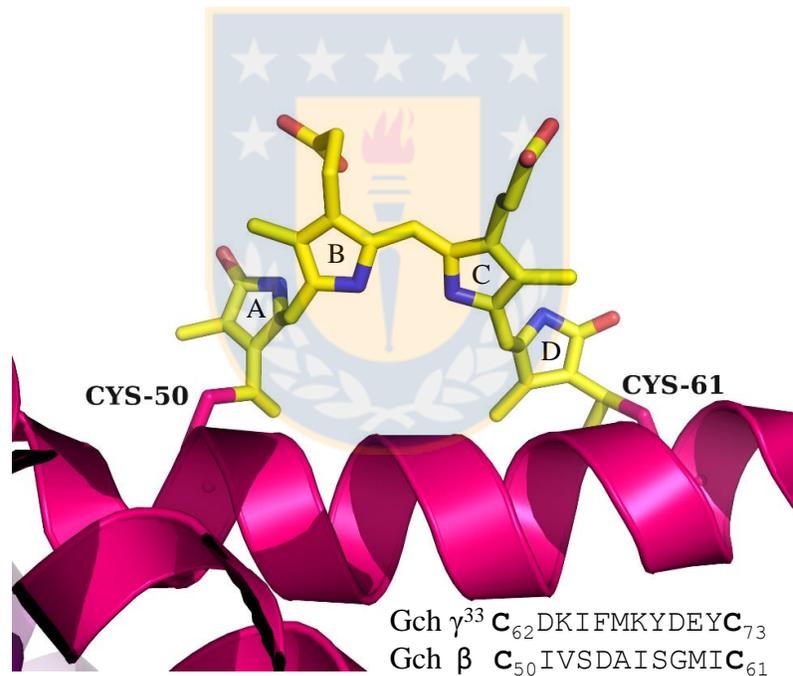


Figura 38. Región de unión de la ficourobilina unida a las Cis-50 y Cis-61 en la subunidad β de ficoeritrina y comparación con la región de dobleunión de la ficourobilina en la subunida γ^{33} .

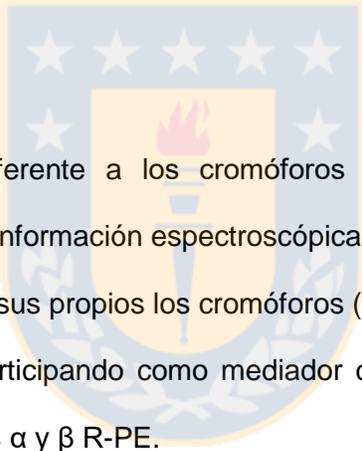
Fuente: Elaboración propia

Por otro lado, el análisis MS de un fragmento caracterizado como cromopéptido-PUB, debido a absorción a 508nm (inserto Figura 22A), permitió la confirmación experimental de un DL-PUB, específicamente unido a los residuos de cisteínas 62 y 73 (DL-PUB^{62/73}). En los resultados mostrados en la figura 22B, se hace referencia a dos péptidos identificados que se encuentran entrecruzados mediante un cromóforo PUB.

El posicionamiento de otros dos cromóforos también fue identificado durante análisis MS de péptidos provenientes del entrecruzamiento de complejos hexaméricos descritos en la metodología en la que un PUB y un PEB se encuentran unidos mediante un enlace sencillo a las cisteínas 95 y 172, respectivamente. De acuerdo a la información obtenida a partir de Klotz & Glazer (1985) y Zhang *et al.* (2017), además de los alineamientos múltiples con otras secuencias γ^{33} disponibles, los residuos de cisteína 209 y 259 son sitios potenciales de cromoforilación. Sin embargo, nuestra data cristalográfica permite ubicar un cromóforo en la Cis²⁵⁹ (Figura 34) y sin evidencias experimentales de un posible cromóforo en la Cis²⁰⁹, para el caso de *G. chilensis*. Adicionalmente, basados en los cálculos de las áreas de los máximos de absorción de la proteína purificada, la relación PUB/PEB (Figura 17B) y en los espectros de denaturación de la subunidad γ^{33} (Figura 20C), se puede sugerir que sólo uno de estos dos sitios se encuentra ocupado por una SL-PEB en lugar de una PUB identificada por Klotz & Glazer (1985) y que ahora aquí es señalada como una SL-PEB²⁵⁹ (Figura 34).

Zhang *et al.* (2017) mencionan la presencia de cinco bilinas en el, por ellos denominado, “dominio conservado de cromóforos en subunidades γ ” (CBD γ s) del inglés *Conserved Chromophore Binding Domain on γ subunits*, constituido y definido en este trabajo como repeticiones internas. Dos ubicadas en la repetición I y dos en la repetición II, mientras que la restante podría estar ubicada en la zona inter-repeticiones. La excepción, en su trabajo, la representa el CBD γ de la proteína de unión $\gamma 7$, de *Griffithsia pacifica*, el cual contiene cuatro bilinas. Sin embargo, de acuerdo a los alineamientos en la figura (Figura 13), la primera bilina

(Cis⁵⁶), está ligeramente por fuera de las repeticiones internas, mientras que la ubicación identificada del cromóforo unido en las Cis^{62/63} se encuentra dentro de la repetición I. Por otro lado, Klotz & Glazer (1985) en *G. coulteri*, también indicaron cuatro cisteínas cromoforiladas identificadas mediante espectrometría de masas de fragmentos trípticos. El alineamiento de estos fragmentos presentados en la figura 13, muestran los posibles sitios de cromoforilación indicados en las cisteínas en negritas de acuerdo a los trabajos de Klotz & Glazer (1985) y Zhang *et al.* (2017). Sin embargo, en función a los alineamientos de secuencias múltiples, muchas de las secuencias disponibles contienen mayor número de residuos de cisteínas conservadas habiéndose determinado en *G. chilensis* las Cis^{62/71}, Cis⁹⁵, Cis¹⁷² y Cis²⁵⁹ como sitios de cromoforilación.



Integrando la información referente a los cromóforos presentes en la subunidad γ^{33} , recientemente descrita, con la información espectroscópica en la que se demuestra la falta de transferencia de energía entre sus propios los cromóforos (Figura 17A), se puede sugerir que subunidad γ^{33} podría estar participando como mediador de transferencia de energía entre cromóforos de las subunidades α y β R-PE.

¿Cómo interacciona la subunidad γ^{33} con R-PE?

Con respecto al modelo estructural y datos de interacción entre subunidad γ^{33} y R-PE, las discusiones están basadas principalmente, en resultados obtenidos experimentalmente. La interacción específica de la subunidad γ^{33} con las ficoeritrobilinas en posición 82 de las subunidades β puede ser descrito como una serie de contactos ajustados que incluyen interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas entre las α -hélices H₁, H₂, H₃, H₆, H₇, H₈, y β -PE(H), β -PE(D), β -PE(L), β -PE(F), β -PE(J) y β -PE(B), respectivamente, participando en el ajuste o

mantenimiento de orientación con respecto a cromóforos contiguos para asegurar la transferencia de energía. De igual forma, la subunidad γ^{33} pudiera contribuir con la estabilización del complejo hexamérico a través de las interacciones con subunidades α -PE con las que interactúa, e inclusive, como un caso de reciprocidad, mediante la participación de la Arg-114 de la subunidad α (A), R-PE podría estar participando en la estabilización del cromóforo unido a la Cis-259 de la subunidad γ^{33} (Figura 34).

La presencia de la subunidad γ^{33} en R-PE purificada demuestra que habría una fuerte interacción entre ellas (Apt *et al.*, 2001). El modelo aquí propuesto confirma que γ^{33} interactúa con subunidades α y/o β en la cavidad interna de R-PE como lo señalaron Ritter *et al.* (1999) Contreras-Martel *et al.* (2001). De acuerdo a los múltiples alineamientos de secuencias con subunidades γ^{33} disponibles actualmente, es evidente no sólo la conservación de los residuos Cis56, Cis95, Cis172, Cis209 y Cis259, sino también aminoácidos distribuidos a lo largo de la secuencia con cargas positivas y negativas además de los aromáticos Fen y Tir y otros hidrofóbicos como Ile e Leu de preponderancia en zonas de interacción proteína/proteína, ya sea γ^{33}/α -PE o γ^{33}/β -PE (Tablas 7 y 8). La tendencia en la conservación de estos aminoácidos también es común en alineamientos de subunidades α -PE y β -PE de ficoeritrina con estructuras cristalográficas conocidas en los que se ha encontrado que muchos de estos aminoácidos participan mediante interacciones polares e hidrofóbicas en la organización del ambiente que rodea al cromóforo y en su estabilización, e incluso en las interfaces entre diferentes subunidades $\alpha\beta$ -PE (Chang *et al.*, 1996; Ritter *et al.* 1999).

Aunque en la literatura, se resalte la tendencia a evidenciarse mayoritariamente residuos hidrofóbicos en las interfaces, esto no representa un dogma, debido a que al realizar análisis de la composición aminoácidica en interfaces de complejos proteicos depositados en el PDB, se pueden encontrar casos en los que aminoácidos polares muestran mayor representación,

siendo el complejo alofococianina - "linker core" (PDB-1B33) un ejemplo de ellos. El complejo, γ^{33} /PE, muestra alta participación de residuos polares en sus interfaces, principalmente Arg y Tir. Fernandez (2002) y Moreira *et al.* (2007), señalan la frecuente participación de Arg y Tir en zonas de interfaz, con porcentajes de 13,3 y 12,3 respectivamente; que pueden formar parte mediante interacciones electrostáticas (Janin, 1999). La Arg tiene la capacidad de generar múltiples interacciones favorables, entre ellas hasta cinco puentes hidrógenos y un puente salino, por la intervención de su carga positiva en su grupo guanidino; además su cadena lateral puede contribuir cuatro veces más en la formación puentes hidrógenos que la Lis (Janin *et al.*, 1988). Por su parte, la Tir representa uno de los residuos más conservados entre zonas de interfaz debido a sus grandes contribuciones, al poder interactuar con cadenas laterales de residuos aromáticos así como con residuos polares. Éste ofrece una superficie hidrofóbica que puede generar interacciones π con residuos aromáticos además de la formación de puentes de hidrógenos, mediante su grupo reactivo zeta-hidroxilo presente en su cadena lateral. Esta última condición le confiere tres veces más probabilidad que la Fen en ser un "hot spot", demostrando una clara importancia en las zonas de interfaz en la interacción proteína-proteína (Bogan & Thorn, 1998).

En otro trabajo, Apt *et al.* (2001) sugieren la principal participación de Arg y Glu en la interacción de la subunidad γ con $\alpha\beta$ -PE. Igualmente, Ritter *et al.* (1999) mostraron que una subunidad γ interactúa con dos de las PEB82 de algunas de las subunidades β , mediante residuos de tirosina, o a través de residuos de Fen, como lo demostró Contreras-Martel *et al.* (2001) quien encontró una pequeña secuencia Fen-Arg interactuante con alguna PEB82 de las subunidades β . Si bien se observa la existencia de esta secuencia en ambas repeticiones internas y que ahora presentamos interactúan con una PEB82 en trímeros diferentes, también se hace evidente la conservación de residuos Tir y Fen que tienen la misma función en el resto de las PEB82 de β -PE (Tir72, Fen116, Tir131, Tir185, Fen230 y Tir245). Los bolsillos

hidrofóbicos de los cromóforos PEB 82 de las seis subunidades β están parcialmente constituidos también por la subunidad γ^{33} , además de subunidades β -PE. Como consecuencia, estas ficoeritobilinas se encuentran en cierta forma “protegidas o separadas” de los cromóforos de la subunidad γ^{33} mediante el esqueleto carbonado de estos residuos, bloqueando la posibilidad de contactos cercanos entre ellos, el cual dificultaría un flujo excitónico y favorecería el mecanismo de transferencia de Foster (1965).

Por otra parte, Reuter *et al.*, (1999) observaron diferencias en la orientación de los cromóforos asociados a la subunidad β de aloficocianina (APC), influenciados por la presencia o ausencia de la proteína de unión “*linker core*” ($L_c^{7,8}$). Esta idea, permite apoyar la similitud conformacional encontrada en las seis PEB asociadas a la cisteinas 82 de sus respectivas subunidades β , en los que la subunidad γ^{33} , mediante residuos aromáticos, enfrentados con los anillos D de cada PEB, participan en el mantenimiento conformacional.

El hecho que la densidad electrónica correspondiente a la subunidad γ^{33} no esté bien definida, ha sido también reportado en B-PE (Ficner *et al.*, 1992) y R-PE (Chang *et al.*, 1996; Ritter *et al.*, 1999, Contreras-Martel *et al.*, 2001), y ha sido atribuida a la incompatibilidad de la estequiometría $(\alpha\beta)_6\gamma$ con la simetría triaxial de la malla cristalina, ya que la subunidad γ no presenta simetría triaxial en su secuencia (Apt *et al.*, 1993). De esta forma, dicha proteína ha estado presente en cristales de los trabajos antes mencionados, sin embargo, su arreglo dentro del hexámero es estadístico, por lo que la densidad electrónica se ve disminuida debido a que representa un promedio.

El modelo aquí propuesto difiere de la hipótesis planteada por Wilbanks y Glazer (1985), quienes hipotetizaron que la zona C-terminal de gama es una región escindible que protruye de la cavidad hexamérica. Sin embargo, en el SDS-PAGE (Figura 16) se puede ver que el

tamaño de la proteína corresponde con una proteína íntegra, y los datos de entrecruzamientos acoplados a espectrometría de masas, en conjunto los datos cristalográficos son evidencia de la integridad de la región C-terminal y su interacción con el T₂R-PE. Por otra parte, el modelo recientemente expuesto por Zhang *et al.* (2017), propone la prominente protrusión de 22Å de la región N-terminal que no forma parte de la zona de repetición interna (Anexo 8). Esta característica difiere del modelo aquí propuesto, en el que se puede observar que al menos la α -hélice N, se encuentra totalmente en el interior de la cavidad hexamérica (Figura 31), mientras que existe una ligera protrusión constituida por la hélice N' y un largo *loop* que conecta a esta última, con la α -hélice H₁ (Figuras 25C, 28A, 29A). Los datos obtenidos a partir de criomicroscopía electrónica muestran un promedio que apoya el modelo aquí propuesto y en el que se descarta la idea de que la subunidad γ^{33} presente una prominente proyección hacia fuera de la cavidad hexamérica como la propuesta por Zhang *et al.* (2017) y apoyando la idea de Barton y Lukins (2010) (Figuras 35 y 36).

Por otro lado, Sonani *et al.* (2015) señalan que la PE de cianobacterias y algas rojas comparten significativa similaridad estructural y cerca de un 69% de identidad de secuencia. Sin embargo, ellas difieren en las proporciones de los tipos de bilinas unidas a las proteínas, así como en los microambientes de cada tipo de cromóforos. Aunque durante nuestros alineamientos de secuencias y estructurales de ficoeritrina, se observaron ciertas diferencias con respecto a los aminoácidos que rodean a los cromóforos, la naturaleza físico-química en sus alrededores es mantenida. En la figura 39 se muestran imágenes de los aminoácidos que generalmente se conservan en los microambientes de cromóforos asociados a subunidades α y β de ficobiliproteínas y a los que se les han atribuido participación durante los cambios conformacionales de las bilinas a las que colindan, así como durante el fotoproceso (Essen *et al.*, 2008; Mailliet *et al.*, 2011). En ellas se resalta la presencia del Asp que interacciona con los anillos C o B de los cromóforos, al igual que la tendencia a observar residuos de Arg o Lis

interaccionando con los grupos carboxilos de los cromóforos. Para el caso del cromóforo unido de la Cis-259 de la subunidad γ^{33} , las diferencias del microambiente se hacen más evidentes al observarse que análogo al Asp que interacciona con los anillos B o C, se encuentra sustituido por un ácido glutámico (Glu-262) (Figura 34). Este Glu-62 se encuentra conservado en todas las secuencias alineadas (Figura 12). Sineshchekov *et al.* (2014) señala el rol fundamental de este Asp (que en γ^{33} -PEB²⁵⁹ es Glu-262) sobre la estabilidad y fotoconversión del cromóforo, describiendo que Asp-207 en la estructura PDB-2VEA (el análogo a Glu-262 γ^{33}), se encuentra formando puente de hidrógeno con la bilina y que además, durante ciertos estados conformacionales de la transición de los estados de excitación del cromóforo, Asp-207 se encuentra dentro de la distancia de formación de puente de hidrógeno con la Tir-263 de PDB-2VEA, y que en la subunidad γ^{33} está representado por la Tir-255. Durante diferentes estados conformacionales del cromóforo (no estudiados aquí), el grupo hidroxilo de Tir-263 PDB-2VEA (análogo Tir-255 de γ^{33}) puede encontrarse cerca del grupo metil del anillo D, mientras que luego de un cambio conformacional, este hidroxilo hace puente de hidrógeno con el carbonil del anillo D, estabilizando diferentes cambios conformacionales durante el fotoproceso.

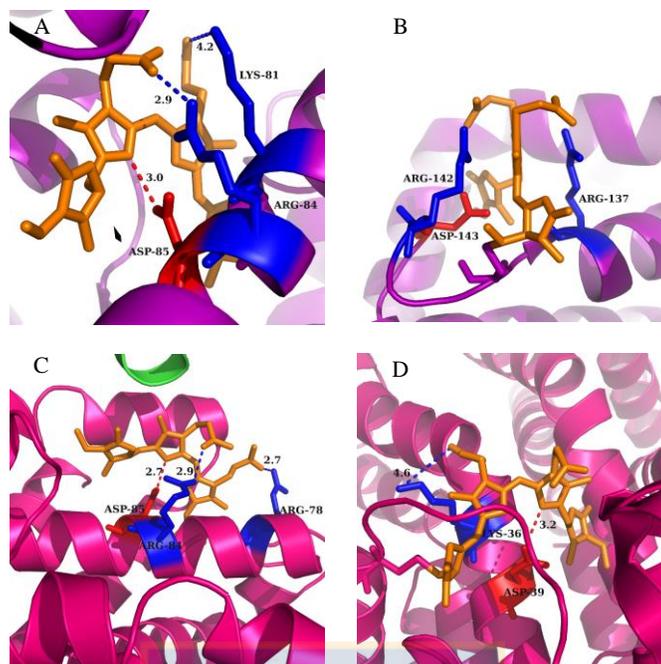


Figura 39. Aminoácidos conservados en los ambientes de cromóforos asociados a subunidades α y β ficobiliproteínas. Como referencia se muestran: Ficoeritrobilina unida a Cis82 (A) y Cis139 (B) de subunidad α R-ficoeritrina-PDB 1EYX. Ficoeritrobilina unida a Cis82 (C) y Cis158 (D) de subunidad β R-ficoeritrina-PDB 1EYX. Fuente: Elaboración propia

Gaigalas *et al.* (2006) y Singh *et al.* (2015) señalan que la conformación y configuración de los cromóforos unidos o su interacción con residuos aminoacídicos que los rodean son considerados influyentes en las propiedades ópticas y la eficiencia en la transferencia de energía. Esta idea, puede soportar las sutiles diferencias observadas en el diferencial de absorción de luz por parte del mismo tipo de cromóforo PUB entre la subunidad β -PE (495nm) con respecto a los presentes en la subunidad γ^{33} (494nm).

Con respecto a las distancias estimadas entre las bilinas propias de la subunidad γ^{33} , éstas están dentro de los valores que permiten la transferencia de energía resonante, sin embargo, de acuerdo a los datos de emisión luego de la excitación de las PUBs a 490nm, no se evidenció

transferencia de energía proveniente de las PUBs hacia los cromóforos de PEBs, concordando con lo expuesto por (Sobakinskaya *et al.*, 2018) quienes señalaron que la orientación mutua entre cromóforos, en conjunto con la distancia de separación, representan factores fundamentales para la transferencia de energía resonante. En este sentido, las subunidades α y β -PE también fueron empladas como controles, para demostrar su funcionalidad en el proceso de transferencia de energía, luego de la renaturación (Anexo 9), descartando la posibilidad, de que la ausencia de FRET sea atribuida a posibles perturbaciones durante el proceso de renaturación de la subunidad subunidad γ^{33} , que puedan generar modificaciones en el ambiente del cromóforo y en consecuencia cambios en su conformación y/o disposición espacial, el cual no fue observado, principalmente en la subunidad β -PE donde se evidenció transferencia de energía desde el PUB hacia las PEB, luego de la renaturación (Anexo 9B). Bajo este argumento, es posible sugerir que los cromóforos unidos a la subunidad γ^{33} funcionan como intermediarios mediante la captación de energía y su transferencia a cromóforos en la subunidad β -PE. Sin embargo, más estudios estructurales y espectroscópicos son necesarios.

CONCLUSIONES

La subunidad γ^{33} en estado maduro, consta de 279 residuos de aminoácidos. Su secuencia presenta dos repeticiones internas cada una con 109 y 106 aminoácidos en las regiones N y C terminal, respectivamente.

La data espectroscópica indica la presencia de cromóforos ficourobilinas y ficoeritrobilinas en una relación 1:1.

La subunidad γ^{33} presenta una PUB doblemente unida a las cisteínas 62/73 y una de unión simple en la cisteína 95, mientras que las PEB, ambas unidas de forma sencilla, se encuentran ubicadas en las cisteínas 172 y 259.

En función de los resultados obtenidos con respecto a los tipos de cromóforos determinados en la subunidad γ^{33} y su comparación con resultados previamente publicados en proteínas homologas, es posible sugerir que la posición, identidad y cantidad de cromóforos es especie-específica.

En función a la integración de diversos enfoques experimentales, el modelo de la subunidad γ^{33} presenta 11 α -hélices, seis de las cuales se encuentran formando parte de los bolsillos que alojan las ficoeritrobilinas en posición 82 de las subunidades β .

La subunidad γ^{33} interacciona íntegramente con las subunidades α y β R-ficoeritrina, principalmente en tres zonas específicas de cada unidad trimérica. Además ambos extremos de la proteína se encuentran insertos en la cavidad hexamérica.

Con características hidrofóbicas, como todos los presentes en el complejo hexamérico, los ambientes circundantes de las ficoeritrobilinas en posición 82 de las subunidades β presentan diferencias en los aminoácidos que los rodean; manteniendo como constante su estabilización mediante la interacción de un ácido aspártico con los nitrógenos de los anillos B o C de las PEB.

La subunidad γ^{33} interactúa por dentro de la cavidad del hexámero de R-ficoeritrina.



BIBLIOGRAFIA

Adir N. 2005. Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant. *Photosynth. Res.* **85**: 15-32.

Afonine PV., Grosse-Kunstleve RW., Echols N., Headd JJ., Moriarty NW., Mustyakimov M., Terwilliger TC., Urzhumtsev A., Zwart PH & Adams PD. 2012. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**: 352-67.

Amunts A., Toporik H., Borovikova A. & Nelson N. 2010. Structure determination and improved model of plant photosystem I. *J. Biol. Chem.* **285**: 3478-3486.

Anderson LK & Toole CM. 1998. A model for early events in the assembly pathway of cyanobacterial phycobilisomes. *Mol Microbiol.* **30**(3): 467-474.

Apt KE., Metzner S. & Grossman AR. 2001. The γ Subunits of phycoerythrin from a red alga: position in phycobilisomes and sequence characterization. *Journal of Phycology.* **37**: 64-70.

Apt K., Hoffmah N.E. & Grossman A. 1993. The γ Subunit of R-phycoerythrin and Its Possible Mode of Transport into the Plastid of Red Algae. *The Journal of Biological Chemistry.* 268 (22): 16208-16215.

Apt K.E., Collier J.L. & Grossman A.R. 1995. Evolution of the phycobiliproteins. *Journal of Molecular Biology.* **248**: 79-96.

Arciero D, Bryant D. & Glazer A. 1988. In vitro Attachment of bilins to apophycocyanin. *The Journal of Biological Chemistry* **263**(34): 18343-18349.

Barros, T.; Royant, J.; Standfuss, A.; Dreuw, W. & Kuhlbrandt, W. 2009. Crystal structure of plant light-harvesting complex shows the active, energy-transmitting state. *EMBO J.* **28**: 298-306.

Barton C & Lukins P. 2010. STM of isolated of R-phycoerythrin: direct observation of the γ subunit at the centre of the complex. *Micron* **47**: 915-918.

Biegert A. & Söding J. 2008. De novo identification of highly diverged protein repeats by probabilistic consistency. *Bioinformatics (Oxford, England)* **24**(6): 807-814.

Bryant DA, Hixson CS. & Glazer AN. 1978. Structural studies on phycobiliproteins. III. Comparison of bilin-containing peptides from the subunits of C-phycoerythrin, R-phycoerythrin, and phycoerythrocyanin. *J. Biol. Chem.* **253**: 220-225.

Buchan DWA, Minneci F, Nugent TCO, Bryson K. & Jones DT. 2013. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research* **41**: 349-57.

Bui K.H., von Appen A., DiGuilio A.L., Ori A., Sparks L., Mackmull M.T., Bock T., Hagen W., Andres-Pons A., Glavy J.S. & Beck M. 2013. Integrated structural analysis of the human nuclear pore complex scaffold. *Cell*. **155**: 1233-1243.

Bunster M, Tellez J. & Candia A. (1997) Characterization of phicobiliproteins present in *Gracilaria chilensis*. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* **42**: 449-455.

Carra, P.O.; hEocha, O. & Carroll, D.M. 1964. Spectral Properties of the Phycobilins. II. Phycoerythrobilin. *Biochemistry*. **3**(9): 1343-1350.

Carroni M. & Saibil H. 2016. Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes. *Methods* **95**: 78-85.

Chang W, Jiang T, Wan Z, Zhang J, Yang Z & Liang D. 1996. Crystal structure of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol*. **262**: 721-731.

Cogdell, R.; Gardiner, A.; Hashimoto, H. & Brotsudarmo T. 2008. A comparative look at the first few milliseconds of the light reactions of photosynthesis. *Photochem Photobiol. Sci.* **7**: 1150-1158.

Cogdell, R.; Gardiner, A.; Roszak, A.; Law, C.; Southall, J. & Isaacs, N. 2004. Rings, ellipses and horseshoes: how purple bacteria harvest solar energy. *Photosynthesis Research*. **81**: 207-214.

Collen J, Porcel B, Carré W, Ball SG, Chaparro C, Tonon T, Barbeyron T, Michel G, Noel B, Valentin K, Elias M, Artiguenave F, Arun A, Aury JM, Barbosa-Neto JF, Bothwell JH, Bouget FY, Brillet L, Cabello-Hurtado F, Capella-Gutiérrez S, Charrier B, Cladière L, Cock JM, Coelho SM, Colleoni C, Czjzek M, Da Silva C, Delag L, Denoeud F, Deschamps P, Dittami SM, Gabaldón T, Gachon CM, Groisillier A, Hervé C, Jabbari K, Katinka M, Kloareg B, Kowalczyk N, Labadie K, Leblanc C, López PJ, McLachlan DH, Meslet-Cladiere L, Moustafa A, Nehr Z, Nyvall-Collén P, Panaud O, Partensky F, Poulain J, Rensing SA, Rousvoal S, Samson G, Symeonidi A, Weissenbach J, Zambounis A, Wincker P. & Boyen C. 2013. Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. *Proc Natl Acad Sci* **110**(13): 5247-52.

Contreras-Martel, C.; Martínez-Oyanedel, J.; Bunster, M.; Legrand, P.; Piras, C.; Vernede, X. & Fontecilla-Camps, J.C. 2001. Crystallization and 2.2 Å resolution structure of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*: a case of perfect hemihedral twinning. *Acta Crystallogr D Biol. Crystallogr*. **57**: 52-60.

Croce, R. & Van Amerongen, H. 2014. Natural strategies for photosynthetic light harvesting. *Nature Chemical Biology*. **10**: 492-501.

David, L.; Marx, A. & Adir, N. 2011. High-resolution crystal structures of trimeric and rod phycocyanin. *J. Mol. Biol.* **405**: 201-213.

David, L.; Prado, M.; Arteni, A.; Elmlund, D.; Blankenship, R. & Adir, N. 2014. Structural studies show energy transfer within stabilized phycobilisomes independent of the mode of rod-core assembly. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1837**: 385-395.

De la Rosa-Trevin, J. M., A. Quintana, L. Del Cano, A. Zaldivar, I. Foche, J. Gutierrez, J. Gomez-Blanco, J. Burguet-Castell, J. Cuenca-Alba, V. Abrishami, J. Vargas, J. Oton, G. Sharov, J. L. Vilas, J. Navas, P. Conesa, M. Kazemi, R. Marabini, C. O. Sorzano & J. M. Carazo. 2016. Scipion: A software framework toward integration, reproducibility and validation in 3D electron microscopy. *J Struct Biol* **195**: 93-99.

Debreczeny MP, Sauer K, Zhou J & Bryant DA. 1995. Comparison of calculated and experimentally resolved rate constant for excitation energy transfer in C-phycocyanin monomers. *The Journal of Physical Chemistry.* **99**(20): 8412-8419.

Di Tommaso P, Moretti S, Xenarios I, Orbitg M, Montanyola A, Chang JM, Taly JF. & Notredame C. 2011. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res.* W13-17.

Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**(5): 1792-1797.

Emanuelsson O, Brunak S, Heijne G von, Nielsen H (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols* **2**: 953–971.

Emsley P. & Cowtan K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **60**: 2126-2132.

Essen LO; Mailliet J. Hughes J. 2008. The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state. *PNAS*, **105**(38): 14709-14714.

Fernandez A. 2002. Desolvation shell of hydrogen bonds in folded proteins, protein complexes and folding pathways. *FEBS Lett.* **527**: 166-170.

Ficner R, Lobeek K, Schmidt G & Huber R. 1992. Isolation crystallization, crystal structure analysis and refinement of B-phycoerythrin from the red alga *Porphyridium sordidum* at 2.2 Å resolution. *J. Mol Biol.* **228**: 935-950.

Ficner, R. & Huber, R. 1993. Refined crystal structure of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* at 2.3 Å resolution and localization of the gamma subunit. *Eur J Biochem.* **218**: 103-106.

Fiser A. 2010. Template-Based Protein Structure Modeling. *Methods Mol Biol.* **673**: 73-94.

Föster T. 1948. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen Der Physik*, 248(1938). Retrieved from http://onlinelibrary.wiley.com/doi.org/10.1007/978-0-387-78518-9_12

Gaigalas A, Gallagher T, Cole KD, Singh T, Wang L. & Zhang YZ. 2006. A multistate model for the fluorescence response of R-phycoerythrin. *Photochem Photobiol.* **82**(3): 635-44.

- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD. & Bairoch A. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* **31**(13): 3784-3788.
- Glazer AN. & Hixson CS. 1977. Subunit structure and chromophore composition of Rhodophytan phycoerythrins. *The Journal of Biological Chemistry.* 252: 32-42.
- Glazer AN. 1989. Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *The Journal of Biological Chemistry.* **264**: Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2491842>. Glazer, A. 1985. Light harvesting by phycobilisomes, *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* **14**: 47-77.
- Glazer, A.; West, J. & Chan, C. 1982. Phycoerythrins as chemotaxonomic markers in red algae: A survey. *Biochemical Systematics and Ecology*, **10**(3): 203-215.
- Holding A.N., Lamers M.H., Stephens E., Skehel J.M. 2013. Hekate: software suite for the mass spectrometric analysis and three-dimensional visualization of cross-linked protein samples. *J. Proteome Res.* **12**: 5923-5933.
- Holzwarth G. & Doty P. 1965. The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **87**: 218-228.
- Isailovic, D.; Li, H. & Yeung E. 2004. Isolation and characterization of R-phycoerythrin subunits and enzymatic digests. *Journal of Chromatography A* **1051**(1-2): 119-13
- Janin J. 1999. Wet and dry interfaces: the role of solvent in protein-protein and protein-DNA recognition. *Struct Fold Des.* **7**: 277-279.
- Janin, J.; Miller S. & Chotia C. 1988. Surface, Subunit interfaces and interior de oligomeric proteins. *J. Mol. Biol.* **204**: 155-164.
- Klotz AV. & Glazer AN. 1985. Characterization of the bilin attachment sites in R-phycoerythrin. *Journal of Biological Chemistry.* **260**(8): 4856-4863.
- Klotz, A.V. & Glazer, A.N. 1986. Phycobiliprotein-Bilin Linkage Diversity. II. Structural studies on A and D-ring-linked phycoerythrobilins. *The Journal of Biological Chemistry.* **261**(15): 6797-6805.
- Korbie DJ. & Mattick JS. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc.* **3**(9):1452-1456.
- Kumar V, Sonani R, Sharma M, Gupta G, Madamwar D. 2016. Crystal structure analysis of C-phycoerythrin from marine cyanobacterium *Phormidium* sp. A09DM. *Photosynth Res* **129**: 17-28.
- Lasker K, Förster F, Bohn S, Walzthoeni T, Villa E, Unverdorben P, Beck F, Aebersold R, Sali A. & Baumeister W. 2012. Molecular architecture of the 26S proteasome holocomplex determined by an integrative approach. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**(5):1380-1387.
- Laskowski RA. Moss DS. & Thornton JM. 1993. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J Mol Biol.* **231**: 1049.

Leitner A, Walzthoeni T. & Aebersold R. 2014b. Lysine-specific chemical cross-linking of protein complexes and identification of cross-linking sites using LC-MS/MS and the xQuest/xProphet software pipeline. *Nature Protocols*. **9**: 120-136.

Leitner, A.; Joachimiak, L.; Unverdorben, P.; Walzthoeni, T.; Frydman, J.; Foster, F. & Aebersold, R. 2014a. Chemical cross-linking/mass spectrometry targeting acidic residues in proteins and proteins complexes. *PNAS*: **111**(26): 9455-9460.

Liu LN, Chen XL, Zhang YZ, Zhou BC. 2005. Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1708**(2):133-142.

Liu, Z.; Yan, H.; Wang, K.; Kuang, T.; Zhang, L.; Gui, An, Z. & Chang, W. 2004. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72Å resolution. *Nature* **428**: 287-292.

Lundell D, Glazer A, DeLange R. & Brown D. 1984. Bilin attachment sites in the alpha and beta subunits of B-phycoerythrin. Amino acid sequence studies. *Journal of Biological Chemistry* **259**(9): 5472-5480.

Mailliet J; Psakis G; Feilke K; Sineshchekov V; Essen LO; Hughes J. 2011. Spectroscopy and a high-resolution crystal structure of Tyr263 mutants of cyanobacterial phytochrome Cph1. *J. Mol. Biol.* **413**: 115-127.

Mastrorade DN. 2005. Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J Struct Biol.* **152**(1): 36-51.

McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr.* **40**: 658-674.

Moreira I.; Fernandes P.A. & Ramos. M 2007. Hot spots-A review of the protein–protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins* **68**: 803-812.

Munier M, Jubeau S, Wijaya A, Morançais M, Dumay J, Marchal L, Jaouen P & Fleurence J. 2014. Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Gratoloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*. **150**: 400-407.

Nooren IM. & Thornton JM. 2003. Diversity of protein-protein interactions. *The EMBO Journal*. **22**(14): 3486-92.

Otálora F; Gaviria JA; Ng J; García-Ruíz JM. 2009. Counterdiffusion methods applied to protein crystallization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. **101**: 26-37.

Politis A., Stengel F., Hall Z., Hernandez H., Leitner A., Walzthoeni T., Robinson C.V. & Aebersold R. 2014. A mass spectrometry-based hybrid method for structural modeling of protein complexes. *Nat. Methods*. **11**: 403-406.

Rasmussen M.I., Refsgaard J.C., Peng L., Houen G. & Hojrup P. 2011. CrossWork: software-assisted identification of cross-linked peptides. *J. Proteomics*. **74**: 1871-1883.

Rinner O, Seebacher J, Walzthoeni T, Mueller L, Beck M, Schmidt A, Mueller M & Aebersold R. 2008. Identification of cross-linked peptides from large sequence databases. *Nature Methods*. **5**: 315-318.

Ritter S, Hiller RG, Wrench PM, Welte W. & Diederichs K. 1999. Crystal structure of a phycourobilin-containing phycoerythrin at 1.90Å resolution. *Journal of Structural Biology*. **126**(2): 86-97.

Rohou, A. & Grigorieff N. 2015. CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *J Struct Biol* **192**(2): 216-221.

Sali A. & Blundell T.L. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**: 779-815.

Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*. **1**: 16-22.

Scheres, S. H. 2012. A Bayesian view on cryo-EM structure determination. *J Mol Biol* **415**(2): 406-418.

Scotto-Lavino, E.; Du, G. & Frohman, M.A. 2006. 3' End cDNA amplification using classic RACE. *Nature Protocols*. **1**(6): 2742-2745.

Sepúlveda-Ugarte, J. 2010. Estudio espectroscópicos de R-ficoeritrina de *Gracilaria chilensis*. Tesis para optar al título de Magister en Bioquímica y Bioinformática. Universidad de Concepción. 133 p.

Sepúlveda-Ugarte J, Brunet JE, Matamala AR, Martínez-Oyanedel J, Bunster M. 2011. Spectroscopic parameters of phycoerythrobilin and phycourobilin on phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*. *J Photochem Photobiol A: Chem.* **219**:211-216.

Singh NK, Sonani RR, Rastogi RP & Madamwar D. 2015. The phycobilisomes: an early requisite for efficient photosynthesis in cyanobacteria. *EXCLI J.* **14**: 268-289.

Sonani RR; Roszak AW; Ortmann de Percin Norhuberland C; Cogdell RJ. 2018. An improved crystal structure of C-phycoerythrin from the marine cyanobacterium *Phormidium* sp. A09DM. *Photosynth Res.* **135**(1-3): 65-78.

Stadnichuh, I.; Khokhlachev A. & Tikhonova, Y. 1993. Polypeptide γ -subunits of R-phycoerythrin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **18**: 169-175.

Sobakinskaya E; Schmidt am Busch M; & Renger T. 2018. Theory of FRET "Spectroscopic Ruler" for Short Distances: Application to Polyproline. *J. Phys. Chem. B.* **122**: 54-67.

Stothard, P. 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques* **28**: 1102-1104.

Sukhwai A. & Sowdhamini R. 2015. PPCheck: A Webserver for the Quantitative Analysis of Protein-Protein Interfaces and Prediction of Residue Hotspots. *Bioinform Biol Insights.* **9**: 141-151.

Sun, L.; Wang S.; Gong X., Zhao M.; Fu X. & Wang L. 2009. Isolation, purification and Characteristics of R-phycoerythrin from marine macroalga *Heterosiphonia japonica*. *Protein Expression and Purification.* **64**: 146-154.

Sun, L.; Wang, S.; Gang, X. & Chen, L. 2004. A rod-linker-contained R-phycoerythrin complex from the intact phycobilisome of the marine red alga *Polysiphonia urceolata*. *J. Photochem. Photobiol B: Biol.* **76**: 1-11.

Suter GW & Holzwarth AR. 1987. A kinetic model for the energy transfer in phycobilisomes. *Biophys J.* **52**: 673-683.

Talarico, L. 1990. R-phycoerythrin from *Audouinella saviana* (Nemaliales, Rhodophyta). Ultrastructural and biochemical analysis of aggregates and subunits. *Phycology* **29**(3): 292-302.

Tamary, E.; Kiss, V.; Nevo, R.; Adams, Z.; Bernát, G.; Rexroth, S.; Rögner, M. & Reich, Z. 2012. Structural and functional alterations of cyanobacterial phycobilisomes induced by high-light stress. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1817**: 319-327.

Tang, G., L. Peng, P. R. Baldwin, D. S. Mann, W. Jiang, I. Rees and S. J. Ludtke 2007. EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *J Struct Biol* **157**: 38-46.

Tosi A., Haas C., Herzog F., Gilmozzi A., Berninghausen O., Ungewickell C., Gerhold C.B., Lakomek K., Aebersold R., Beckmann R. & Hopfner K.P. 2013. Structure and subunit topology of the INO80 chromatin remodeler and its nucleosome complex. *Cell.* **154**:1207-1219.

Van der Weij-De Wit CD, Doust AB, van Stokkum IHM, Dekker JP, Wilk KE, Curmi PMG, & van Grondelle R. 2006. How energy funnels from the phycoerythrin antenna complex to photosystem I and photosystem II in the cryptophyte *Rhodomonas CS24* cells. *The Journal of Physical Chemistry. B*, **110**(49): 25066-2506673.

Van Montfort BA, Doeven MK, Canas B, Veenhoff LM, Poolman B, & Robillard GT. 2002. Combined in-gel tryptic digestion and CNBr cleavage for the generation of peptide maps of an integral membrane protein with MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta.* **1555**(1-3): 111-115.

Vangone, A., Spinelli, R., Scarano, V., Cavallo, L. & Oliva, R. 2011. COCOMAPS: a web application to analyse and visualize contacts at the interface of biomolecular complexes, *Bioinformatics.* **27**: 2915-2916.

Vargas, J., V. Abrishami, R. Marabini, J. M. de la Rosa-Trevin, A. Zaldivar, J. M. Carazo & Sorzano C.O. 2013. Particle quality assessment and sorting for automatic and semiautomatic particle-picking techniques. *J Struct Biol* **183**(3): 342-353.

Walzthoeni T, Claassen M, Leitner A, Herzog F, Bohn S, Förster F, Beck M, & Aebersold R. 2012. False discovery rate estimation for cross-linked peptides identified by mass spectrometry. *Nature Methods.* **9**: 901-903.

Wang, S.; Zhong F.D.; Wu, Z.J.; Lin, Q.Y. & Xie, L.H. 2004. Cloning and Sequencing the g Subunit of R-Phycoerythrin from *Corallina officinalis*. *Acta Botanica Sinica.* **46**(10): 1135-1140.

- Wang L, Wang S, Fu X, & Sun L. 2015. Characteristics of an R-Phycocerythrin with Two γ Subunits Prepared from Red Macroalga *Polysiphonia urceolata*. *Plos ONE*. **10**(3): e0120333.
- Wedemayer, G.; Kidd, D.; Wemmer, D. & Glazer, A. 1992. Phycobilins of Cryptophycean algae: Occurrence of dihydrobiliverdin and mesobiliverdin in Cryptomonad biliproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **267**(11): 7315-7331.
- Wernersson R & Pedersen AG. 2003. RevTrans: Multiple alignment of coding DNA from aligned amino acid sequences. *Nucleic Acids Res.* **31**(13): 3537-3539.
- Wiederstein, M. & Sippl, M.J. 2007. ProSA-Web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acid Research*. **35**: W407-W410.
- Wiethaus, J.; Busch, A.; Kock, K; Leichert, L.; Herrmann, C. & Frankenberg-Dinkel N. 2010. Lyase specific for attachment of 3Z-PEB to Cys⁸² of B-phycocerythrin from *Prochlorococcus marinus* MED4. *The Journal of Biological Chemistry*. **285**(48): 3761-3769.
- Wilbanks SM, & Glazer, AN. 1993. Rod structure of a phycocerythrin II-containing phycobilisome: II. Complete sequence and bilin attachment site of a phycocerythrin gamma subunit. *J. Biol. Chem* **268**: 1236-1241.
- Xu H., Zhang L., & Freitas M.A. 2008. Identification and characterization of disulfide bonds in proteins and peptides from tandem MS data by use of the MassMatrix MS/MS search engine. *J. Proteome Res.* **7**:138-144.
- Yang B., Wu Y.J., Zhu M., Fan S.B., Lin J., Zhang K., Li S., Chi H., Li Y.X., Chen H.F., Luo S.K., Ding Y.H., Wang L.H., Hao Z., Xiu L.Y., Chen S., Ye K., He S.M., & Dong M.Q. 2012. Identification of cross-linked peptides from complex samples. *Nat. Methods*. **9**: 904-906.
- Yu, F.; Li, N. & Yu, W. 2016. ECL: an exhaustive search tool for the identification of cross-linked peptides using whole database. *BMC Bioinformatics*. **17**: 217-224.
- Yu, M.H.; Glazer, A. Spencer K. & West, J. 1981. Phycocerythrins of Red Alga *Callithamnion*. *Plant Physiol*, **68**: 482-488.
- Zhang J, Ma J, Liu D, Qin S, Sun S, Zhao J, & Sui SF. 2017. Structure of phycobilisome from the red alga *Griffithsia pacifica*. *Nature* **551**: 57-63.
- Zhao KH, Zhu JP, Song B, Zhou M, Storf M, Böhm S, Bubenzer C. & Sheer H. 2004. Non-enzymatic chromophore attachment in biliproteins: conformational control by the detergent Triton X-100. *Biochim Biophys Acta*. **1657**: 131-145.
- Zhao, K.H.; Su, P.; Böhm, S.; Song, B.; Zhou, M.; Bubenzer, C. & Scheer, H. 2005. Reconstitution of phycobilisome core-membrane linker, Lcm, by autocatalytic chromophore binding to ApcE. *Biochim Biophys Acta* **1706**: 81-87.
- Zhao, M.; Sun, L.; Fu X. & Gong X. 2010. Influence of Ionic strength, pH, and SDS concentration on Subunits Analysis of Phycocerythrins by SDS-PAGE. *Appl Biochem Biotechnol*. **162**: 1065-1079.
- Zhao, M.; Sun, L.; Sun, S.; Gong, X.; Fu, X. & Chen, M. 2013. The 42.1 and 53.7 kDa bands in SDS-PAGE of R-phycocerythrin from *Polysiphonia urceolata*. *International Journal of Biological Macromolecules*. **60**: 405-411.

Zhao, M.; Sun, L.; Sun, S.; Gong, X.; Fu, X. & Chen, M. 2015. Phycoerythrins in phycobilisomes from the marine red alga *Polysiphonia urceolata*. *International journal of Biological Macromolecules*. **73**: 58-64.

Zhou W, Ding WL, Zeng XL, Dong LL, Zhao B, Zhou M, Scheer H, Zhao KH, & Yang X. 2014. Structure and mechanism of the phycobiliprotein lyase CpcT. *J Biol Chem*. **289**(39): 26677-26689.

Zhu H., Domingues F.S., Sommer I. & Lengauer T. 2006. NOXclass: prediction of protein-protein interaction types. *BMC Bioinformatics*. **7**: 27.



AGRADECIMIENTOS

A la comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) por todos sus financiamientos a través del Programa “BECA DE DOCTORADO NACIONAL PARA ESTUDIANTES EXTRANJEROS(AS), SIN PERMANENCIA DEFINITIVA EN CHILE, AÑO ACADÉMICO 2013”. Folio 63130071.

A la Universidad de Concepción por abrirme las puertas en la Facultad de Ciencias Biológicas, a través de su Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Área Biología Celular y Molecular, y en las personas de la Dra Marta Bunster Balocchi y el Dr. José Martínez Oyanedel por recibirme en el Laboratorio de Biofísica Molecular, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

A los Doctores Alexander Leitner y Rudolf Aebersold, integrante y jefe, respectivamente del “Aebersold Team” del *Institute of Molecular Systems Biology, Swiss Federal Institute of Technology*, ETH Zürich, Suiza, por su disposición para permitirme realizar, junto a parte de su equipo de laboratorio, análisis de espectrometría de masas de péptidos químicamente entrecruzados.

Al Dr Carlos Contreras Martel del "*Bacterial Pathogenesis Group*" en el *Institut de Biologie Structurale*, Grenoble, Francia. Por su valioso aporte en la difracción de los cristales.

Al Dr. Andrew Cronshaw, del instituto de Biología Estructural y Molecular (ISMB), Universidad de Edimburgo, Escocia por su apoyo mediante los análisis de espectrometría de masa.

Al Dr José López Carrascosa, jefe del Grupo: “Análisis de Complejos Macromoleculares” y del laboratorio de “Estructura de Complejos Macromoleculares”, adscrito al Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) Madrid, España. Por recibirme en su laboratorio para realizar estudios de criomicroscopía electrónica. De igual manera al Dr Francisco Javier Chichón García y a todo el equipo de trabajo por su apoyo durante mi estadía en las instalaciones del Centro Nacional de Biotecnología.

Al Proyecto Fondecyt N° 113.0256 por su aporte financiero en pro del estudio y caracterización estructural de la interacción entre la subunidad γ^{33} y ficoeritrina de *Gracilaria chilensis*.

Al Proyecto MECESUP UCO-1113 de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, por su aporte parcial en pro del estudio de interacción entre la subunidad γ^{33} y ficoeritrina de *Gracilaria chilensis*.

Al Proyecto Fondecup N° EQM140151, que permitió ejecutar, mediante la adquisición del espectrofotómetro de DC Jasco J-1500, los análisis de Dicroísmo Circular en el Centro de estudios para el desarrollo de la química (CEPEDEQ) de la Universidad de Chile.

ANEXOS

Anexo 1. Secuencia nucleotídica de la región 1-885 del gen de la subunidad γ^{33} de *Gracilaria chilensis*. Codón de inicio remarcado en negritas.

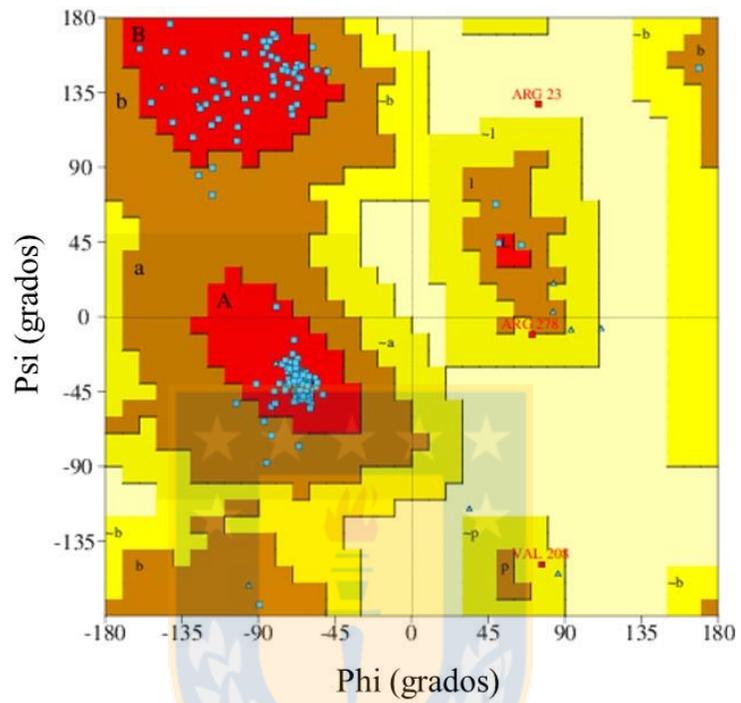
001	ATG GAAGCCC	CCGCTTTTGC	TGTCAATGGA	ATGTTCTCGG	CCGTCAAGGT	050
051	CCGCACGTCT	TCCTTCACTG	CCAACAATGT	GTCACCTCGC	ACCGGCACCG	100
101	CTTCTCCGCC	AGCCGTCACC	ATGGCGGTCG	ACGCCTTCCA	GAAGAAGTTT	150
151	CAGAGCTTTG	GAAAAATCAA	CATTGACTAC	TCGCGCCCGA	AGAAACTAGC	200
201	CTCCTTCAAG	CGAGCAGGCT	ACCCAGTCAG	CTTTGACTAC	CCCAACTCCC	250
251	CCGCCATGGC	CGGGCACTAC	TCAATCTCCA	ACTGCAATGT	ACCCAGCGCG	300
301	TGCGACAAAA	TTTTCATGAA	GTACGACGAG	TACTGCGCAA	AAGGAATGAT	350
351	GCAAGTG TTC	AAGCGTTCGG	CTGTTCCATT	CGGTACCTAC	ACCACCAAGT	400
401	GCACCGAGGG	CACCGTTCCG	CAGCAAGCGT	TTGCGAAGCG	CGTGTTCAAC	450
451	CGTACCAAGG	CATTCCGTCA	GGCGCAGAAG	CCAATTAACG	TACGTCTCGC	500
501	CGAGCGTTAT	GAAAACCGAC	GTCTTGCTTT	CACTATGGCC	AACGGCTGTC	550
551	ACAGAGAGGA	GCAGCAATTC	TCGACAATGC	CCATGTCAGC	CGCCACCTAC	600
601	CTTGCGGGCC	GCGCCGAGGC	CATGGGAACC	TGCTACAGAG	TAGTTACTCC	650
651	AACCTCGATT	GCTGAGGACT	ACATGGCAGC	CGGTGTGCGC	GCGCAGATCA	700
701	CTGCCAAGGC	CCATCCGTCG	GGCGTTTACC	GCGTGGGTGT	GTGCGAGGAC	750
751	GGCTACGCGA	AGGGTGATGC	CGAAAACCTC	CGTGTTGCCG	CTTTGGCAGC	800
801	TGAGTTCCGT	GCCGGGCAGC	AGTCTCCTAG	TACCGTAACC	GGTCAGCAGT	850
851	ATGAGTCTGC	CCGCACGGCT	CGCAAGCTGT	ATGCC-----	-----	885

Fuente: Elaboración propia

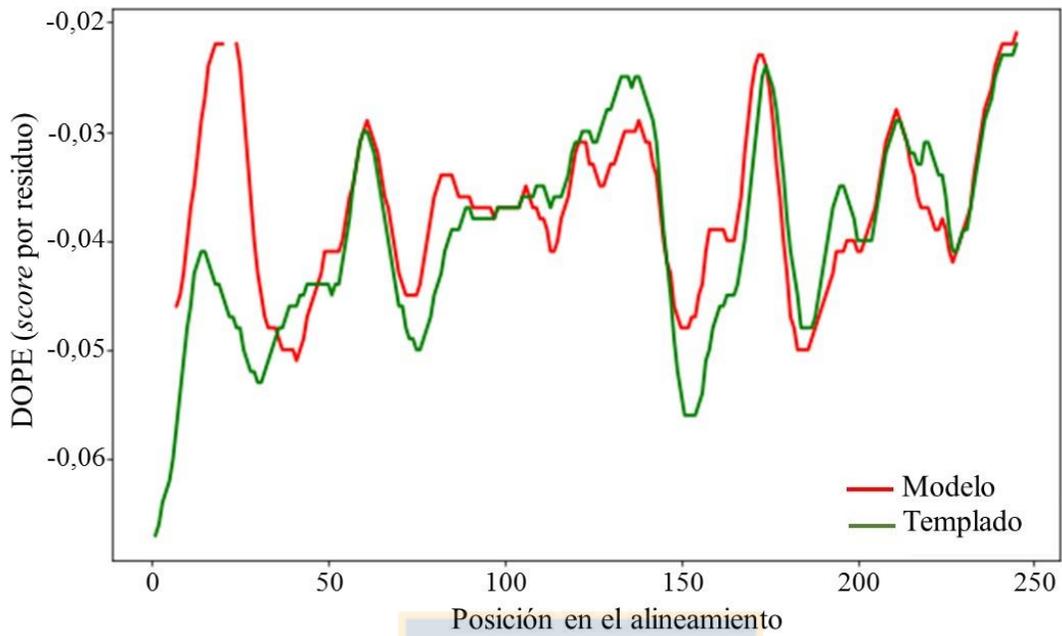
Anexo 2: Secuencia nucleotídica de la región 3' del gen de la subunidad γ^{33} de *Gracilaria chilensis*, obtenida mediante 3' RACE. El codón de término se destaca en negritas.

001	AGCGCAGAGC	CATTAGCGTA	CGTCTCGCCG	AGCGTTATAA	AACCGACGTC	050
051	TTGCTTTCAC	TATGGCCAAC	GGCTGTCACA	GAGAGGAGCA	GCAATTCTCG	100
101	ACAATGCCCA	TGTCAGCCGC	CACCTACCTT	GCGGGCCGCG	CCGAGGCCAT	150
151	GGGAACCTGC	TACAGAGTAG	TTACTCCAAC	CTCGATTGCT	GAGGACTACA	200
201	TGGCAGCCGG	TGTGCGCGCG	CAGATCACTG	CCAAGGCCCA	TCCGTCGGGC	250
251	GTTTACCGCG	TGGGTGTGTG	CGAGGACGGC	TACGCGAAGG	GTGATGCCGA	300
301	AAACCTCCGT	GTTGCCGCTT	TGGCAGCTGA	GTTCCGTGCC	GGGCAGCAGT	350
351	CTCCTAGTAC	CGTAACCGGT	CAGCAGTATG	AGTCTGCCCG	CACGGCTCGC	400
401	AAGCTGTACG	CTAGCACTTG	CCATCACGAA	GAGACTCAA	TCTTCGCGTA	450
451	CCCTGCCGTT	GCAGCCGCCA	TGTGCCGCGA	CTGA GTTTTTC	TTTCTGTCAC	500
501	AGTCCCCTG	ATATGTTTGT	CATAGTTCTT	TCCTTTTGGT	ATGCGCGACA	550
551	GTGTTCGCCT	CAACTGCAGC	CATGAATCTC	TTAGTTCTAT	TGGTAAAGAA	600
601	ATACCTGTGC	TTGCTGAA--	-----	-----	-----	618

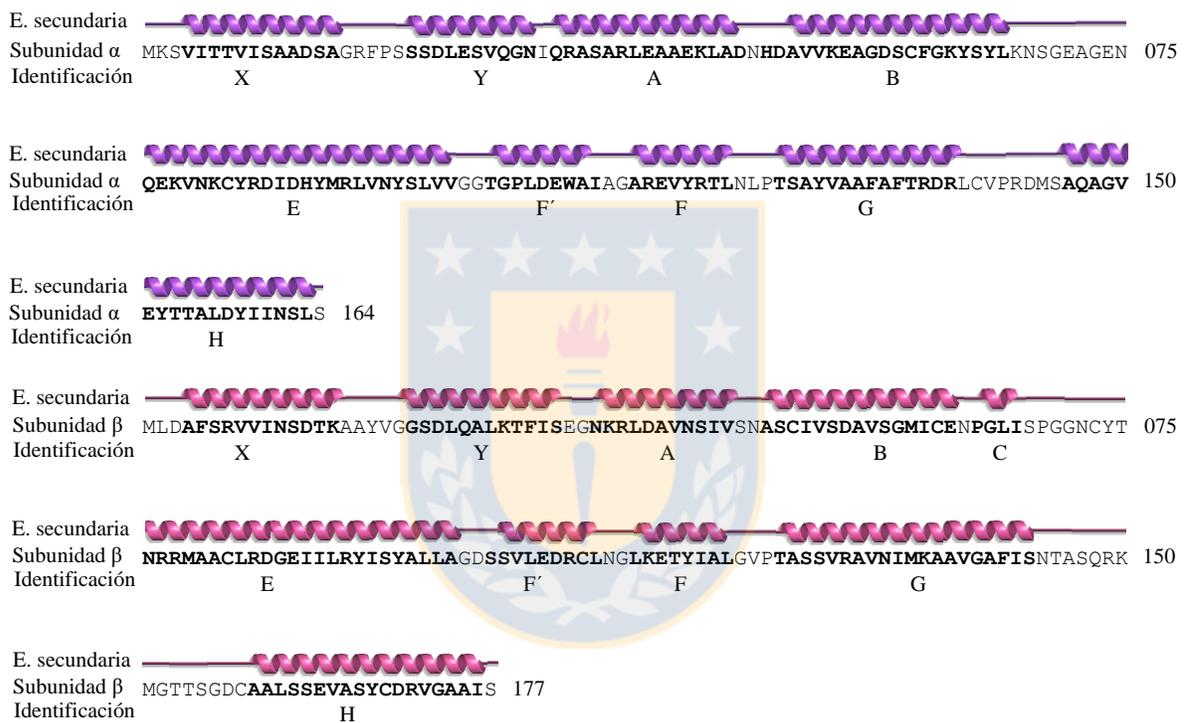
Fuente: Elaboración propia



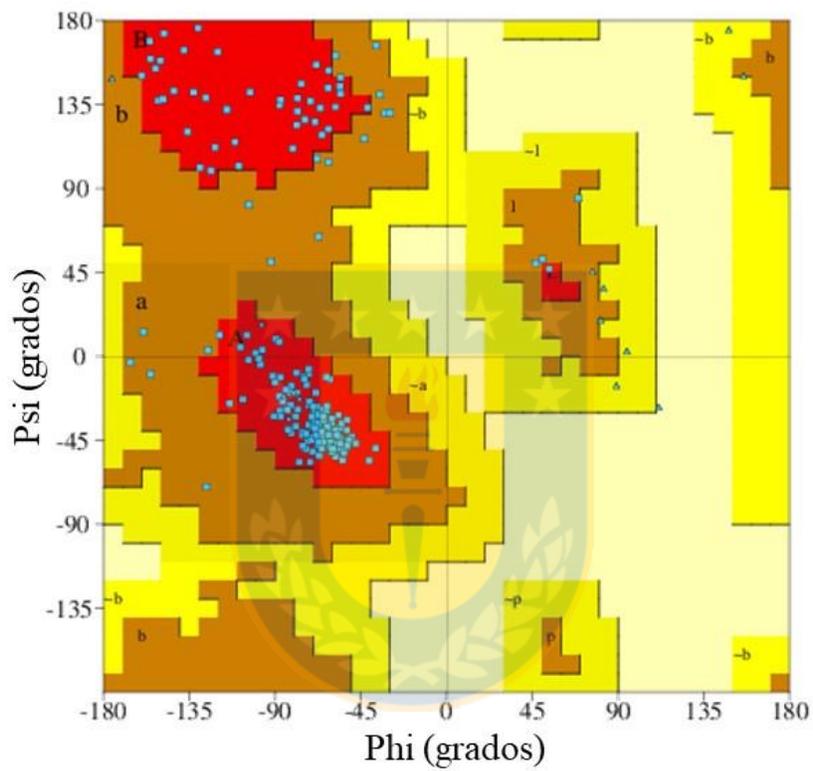
Anexo 3. Representación de Ramachandran del modelo obtenido por homología seleccionado. Fuente: Elaboración propia



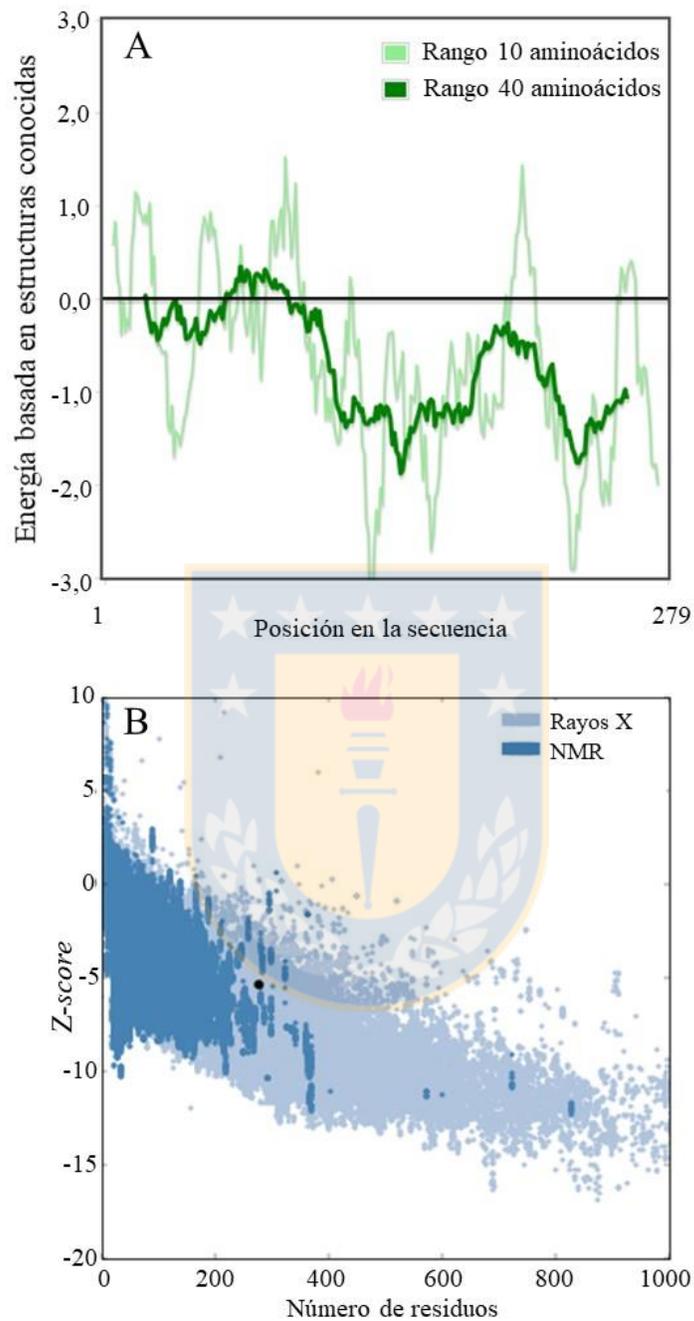
Anexo 4. Diagrama de energía (DOPE), del modelo obtenido por homología seleccionado.
Fuente: Elaboración propia



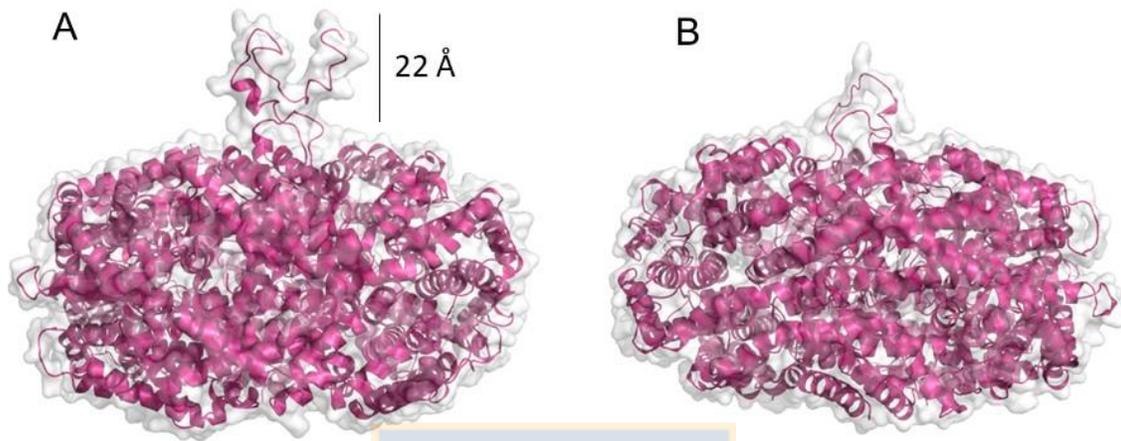
Anexo 5. Identificación de estructuras secundarias en subunidades α y β R-ficoeritrina de *Gracilaria chilensis*, basada en la nomenclatura de Ritter *et al.* 1999. En negritas los aminoácidos involucrados sus respectivas hélices. Fuente: Elaboración propia



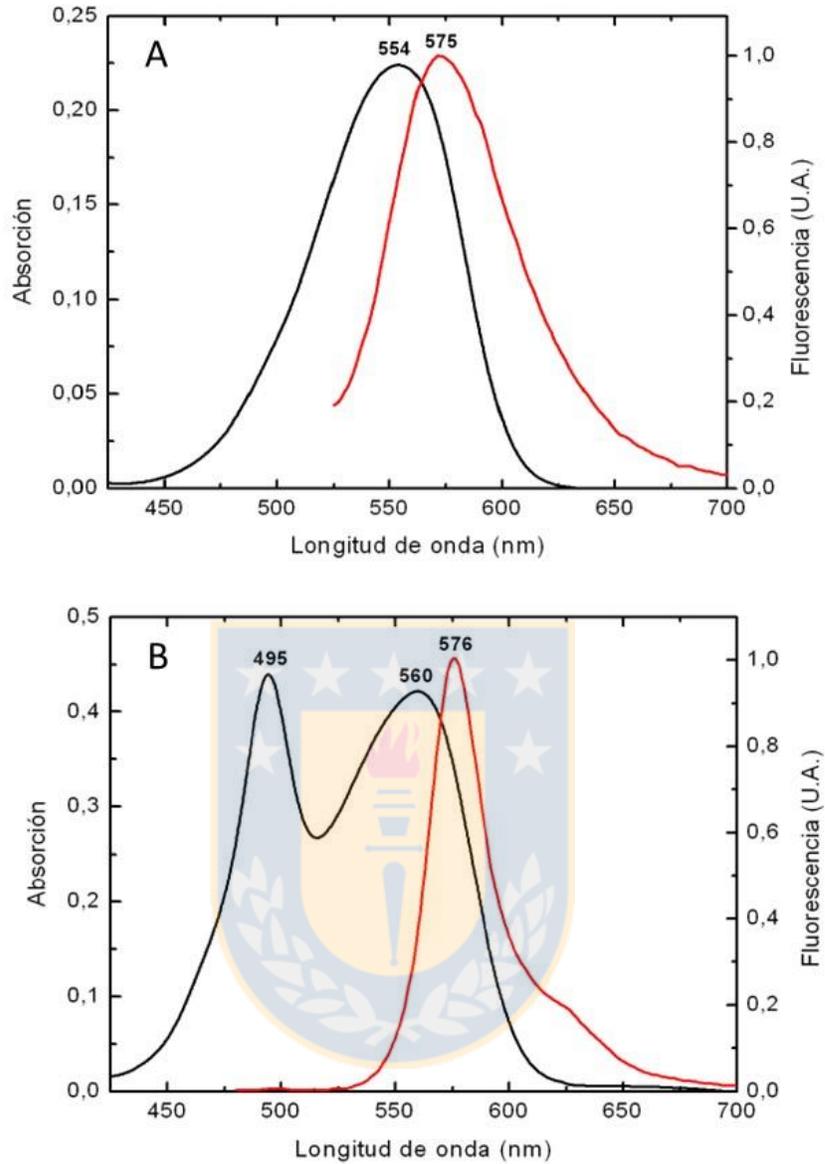
Anexo 6. Representación de Ramachandran del modelo de la subunidad γ^{33} corregido.
Fuente: Elaboración propia



Anexo 7. Evaluación energética (A) y estructural (B), del modelo corregido de la subunidad γ^{33} de *Gracilaria chilensis*. Fuente: Elaboración propia



Anexo 8. Comparación entre los modelos de complejo hexamérico R-ficoeritrina asociado la subunidad γ^4 de *Griffithsia pacifica* (PDB-5Y6P) (A) y *Gracilaria chilensis* (B). Obsérvese la protrusión de 22Å en el modelo de *G. pacifica*. Fuente: Elaboración propia



Anexo 9. Espectro de absorción (línea negra) y emisión de fluorescencia (línea roja) de subunidades α (A) y β (B) ficoeritrina de *Gracilaria chilensis*. U.A = unidades arbitrarias. Adaptado de Sepúlveda-Ugarte, 2010.