



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Magister en Bioquímica y Bioinformática

ANÁLISIS DE LA REGIÓN CATALÍTICA DE
AGMATINASE LIKE PROTEIN (ALP)

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN BIOQUÍMICA Y BIOINFORMÁTICA

ALUMNO: María Belén Reyes Cuevas

PROFESOR GUÍA: Dra. Elena Amparo Uribe

PROFESOR CO-GUÍA: Dr. José Martínez-Oyanedel

Concepción, Chile 2023

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

© 2023, María Belén Reyes Cuevas.

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

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

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

Dr. José Antonio Martínez-Oyanedel
Profesor Co-Guía
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Maximiliano Figueroa Yévenes
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Carlos Felipe Burgos Arias
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Vasthi López Palma
Facultad de Medicina
Universidad Católica del Norte

Concepción, Chile 2023.

INDICE

1. RESUMEN	XIII
2. ABSTRACT	XIV
3. INTRODUCCIÓN	1
3.1 Agmatina	1
3.2 Funciones biológicas de la agmatina.....	3
3.3 Agmatinasa	5
3.4 <i>Agmatinase like protein (ALP)</i>	8
3.5 Región catalítica y requerimientos de Mn^{2+} para la actividad de ALP.....	14
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVO GENERAL.....	18
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
7.1 Reactivos químicos	19
7.2 Soluciones generales	19
7.3 Cepas bacterianas	20
7.4 Medios de cultivo	20
7.5 Oligonucleótidos.....	21
7.6 Vectores.....	21
7.7 Modelamiento estructural del sitio de unión a Mn^{2+} en Δ LIM-ALP.	23
7.8 Mutagénesis sitio dirigida de Δ LIM-ALP.....	24
7.9 Secuenciación de plásmidos.....	26
7.10 Cuantificación de ADN.....	26
7.11 Expresión proteica de las variantes proteicas de Δ LIM-ALP.....	27
7.12 Purificación de las variantes mutadas y Δ LIM-ALP.....	27
7.13 Electroforesis en geles de agarosa.....	28
7.14 Ensayos de <i>Western Blot</i>	28

7.15	<i>Dot Blot</i>	29
7.16	Cuantificación de la actividad Agmatinasa.....	29
7.17	Ensayos de activación enzimática.....	30
8.	RESULTADOS	31
8.1	Generación de un modelo estructural de Δ LIM-ALP.....	31
8.2	Expresión y purificación de las variantes mutadas E288A/K290A y N213A/Q215A/D217A.....	53
8.3	Análisis de las variantes mutadas N213A, Q215A, D217A, E288A y K290A.	58
8.4	Expresión y purificación de las variantes simples mutadas.....	60
8.5	Ensayos de actividad enzimática de las variantes de Δ LIM-ALP mutadas.	65
9.	DISCUSIÓN	67
10.	CONCLUSIONES	72
11.	BIBLIOGRAFÍA	73

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencia de oligonucleótidos para la obtención de las mutantes simples N213A, Q215A, D217A, E288A y K290A de Δ LIM -ALP.....	21
Tabla 2: Resumen de valores <i>Z-score</i> de los diez mejores modelos obtenidos por Modeller y analizados con ProSa.	40
Tabla 3: Análisis estadístico de gráfico de Ramachandran del modelo de Δ LIM-ALP.	46
Tabla 4: Análisis comparativo de residuos propuestos para el sitio de unión de Mn^{2+} en Δ LIM-ALP.....	52
Tabla 5: Resumen de parámetros cinéticos de ALP y sus variantes.	66

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1: Participación de agmatina como vía alternativa en la síntesis de poliaminas y compuestos relacionados.	2
Figura 2: Esquema del sitio de unión a Mn^{2+} en AGM de <i>E. coli</i>	6
Figura 3: Alineamiento de secuencias aminoacídicas de ALP, la AGM humana y de <i>E. coli</i>	9
Figura 4: Esquema comparativo de ALP, sus Isoformas y valores de k_{cat}	11
Figura 5: Representación del dominio LIM presente en ALP.	13
Figura 6: Esquema de los residuos del sitio de unión de Mn^{2+} en ureohidrolasas	16
Figura 7: Vector H6pQE60.	22
Figura 8: Esquema metodológico de la mutagénesis sitio dirigida para la obtención de las variantes mutadas de Δ LIM-ALP.	25
Figura 9. Modelo de Δ LIM-ALP obtenido por Phyre2 utilizando el método de <i>threading</i>	32
Figura 10. Modelos de Δ LIM-ALP obtenidos por I-TASSER por el método de <i>threading</i>	33
Figura 11: Alineamiento de secuencias de estructuras resueltas de la familia de ureohidrolasas y Δ LIM-ALP.	36
Figura 12: Alineamiento de secuencias y estructura secundaria de estructuras resueltas de la familia de ureohidrolasas y Δ LIM-ALP.	39
Figura 13. Análisis de calidad por ProSa del mejor modelo obtenido por Modeller.	42
Figura 14. Evaluación del modelo final de Δ LIM-ALP a través de ProSA.	44

Figura 15. Gráfico de Ramachandran del modelo de Δ LIM-ALP por PROCHECK.	45
Figura 16. Modelo final propuesto para Δ LIM-ALP generado con Modeller.....	48
Figura 17. Alineamiento estructural de modelo final propuesto para Δ LIM-ALP con estructuras de miembros de las ureohidrolasas.....	49
Figura 18: Esquema de residuos propuestos para el sitio de unión de Mn^{2+} en Δ LIM-ALP.	51
Figura 19: Western Blot de la estandarización de la expresión de Δ LIM-ALP en distintas condiciones.....	54
Figura 20: Cromatograma de Δ LIM-ALP y las variantes mutadas, desde columna de intercambio iónico-DEAE celulosa.....	55
Figura 21: Identificación por Western blot de la variante doble y triple mutadas obtenidas por cromatografía de intercambio iónico-DEAE celulosa	57
Figura 22: Análisis de restricción de las mutantes simples de Δ LIM-ALP en el vector H6pQE60.	59
Figura 23: Cromatograma de las variantes mutadas D217A y E288A, desde columna de intercambio iónico-DEAE celulosa.....	61
Figura 24: Dot Blot de las fracciones obtenidas de las variantes mutadas D217A y E288A, desde columna de intercambio iónico-DEAE celulosa	63
Figura 25: Identificación de fracciones eluidas de Δ LIM-ALP/D217A mediante gel de poliacrilamida SDS-PAGE y <i>Western blot</i>	64

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Archivo de alineamiento de secuencias en formato <i>.pir</i> para ejecutar Modeller en la realización del modelo estructural de Δ LIM-ALP.	77
ANEXO 2 Script utilizado para ejecutar Modeller para generar modelo estructural de Δ LIM-ALP.....	78
ANEXO 3: Informe de PROCHECK de la estructura secundaria, secuencia y regiones de gráfico de Ramachandran del modelo estructural de Δ LIM-ALP.	79

1. RESUMEN

La agmatina es una amina que es hidrolizada por la enzima agmatinasa a putrescina y urea generando una vía alternativa de la síntesis de poliaminas. Esta amina posee propiedades de neurotransmisor y múltiples acciones farmacológicas. En el Laboratorio de Enzimología de la Universidad de Concepción se realizó el clonamiento de una proteína expresada en cerebro de rata con actividad agmatinasa *in vitro*, la cual fue denominada “*agmatinase like protein*” (ALP). Esta enzima contiene en su C-terminal un dominio LIM, el cual cumple un rol de regulación auto inhibitoria. ALP requiere manganeso para su actividad catalítica, al igual que las enzimas de la familia ureahidrolasas, sin embargo, posee un bajo grado de identidad con respecto a otras agmatinasas conocidas, por lo que, se desconoce la región y los residuos críticos en la secuencia que participan en la interacción con el cofactor metálico y en el proceso catalítico. En este trabajo a través de herramientas bioinformáticas, se generó un modelo comparativo estructural de ALP a partir del cual se han propuesto residuos putativos que estarían coordinando con los iones de Mn^{2+} . Utilizando este modelo se generaron dos mutantes simples (E288A y D217A), una mutante doble (E288A/K290A) y una mutante triple (N213A/Q215A/D217A), ninguna de las cuales presentó actividad agmatinasa. Estos resultados apoyan nuestro modelo propuesto para los residuos que serían relevantes en la actividad catalítica de ALP y que se dan a conocer en el presente trabajo.

2. ABSTRACT

Agmatine is an amine that is hydrolyzed by the enzyme agmatinase to putrescine and urea, generating an alternative pathway for polyamine synthesis. This amine possesses neurotransmitter properties and multiple pharmacological actions. In the Enzymology Laboratory of the University of Concepción, the cloning of a protein expressed in rat brain with *in vitro* agmatinase activity was carried out, which was called "*agmatinase like protein*" (ALP), this enzyme contains in its C-terminal a LIM domain, which fulfills a role of auto-inhibitory regulation. ALP requires manganese for its catalytic activity, like the enzymes of the ureahydrolase family, however, it has a low degree of identity with respect to other known agmatinases, therefore, the region and critical residues in the sequence that they participate in the interaction with the metallic cofactor and in the catalytic process. In this work, through bioinformatics tools, a structural comparative model of ALP was generated, from which putative residues that would be coordinating with Mn^{2+} ions have been proposed. Two single mutants (E288A and D217A), one double mutant (E288A/K290A) and one triple mutant (N213A/Q215A/D217A) were generated from this model, none of which did present agmatinase activity. These results support our proposed model for the residues that would be relevant in the catalytic activity of ALP and that are disclosed in the present work.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Agmatina

La agmatina (N-4-aminobutil guanidina) es generada por la descarboxilación de la L-arginina por la arginina descarboxilasa (ADC) y está presente en varios tejidos de mamíferos, entre los cuales se incluyen cerebro, riñón, estómago e intestino (Raasch *et al.*, 2001). La agmatina fue detectada por primera vez en cerebro de murinos y de bovinos mediante espectroscopía de masas cuando se buscaba un ligando endógeno para receptores de imidazolina, descubriendo que agmatina se une a los receptores α 2-adrenérgicos y de imidazolina estimulando la liberación de catecolaminas de las células cromafines suprarrenales, esta observación inicial condujo al estudio de la agmatina como una molécula de interés (Li *et al.*, 1994).

La agmatina está implicada en vías alternativas de la síntesis de poliaminas. Ésta se hidroliza a putrescina y urea por la agmatinasa (AGM), donde la putrescina es el precursor de la síntesis de las poliaminas, espermidina y espermina, que son esenciales para la proliferación, diferenciación y migración de células de mamíferos (Agostinelli *et al.*, 2010) (Figura 1).

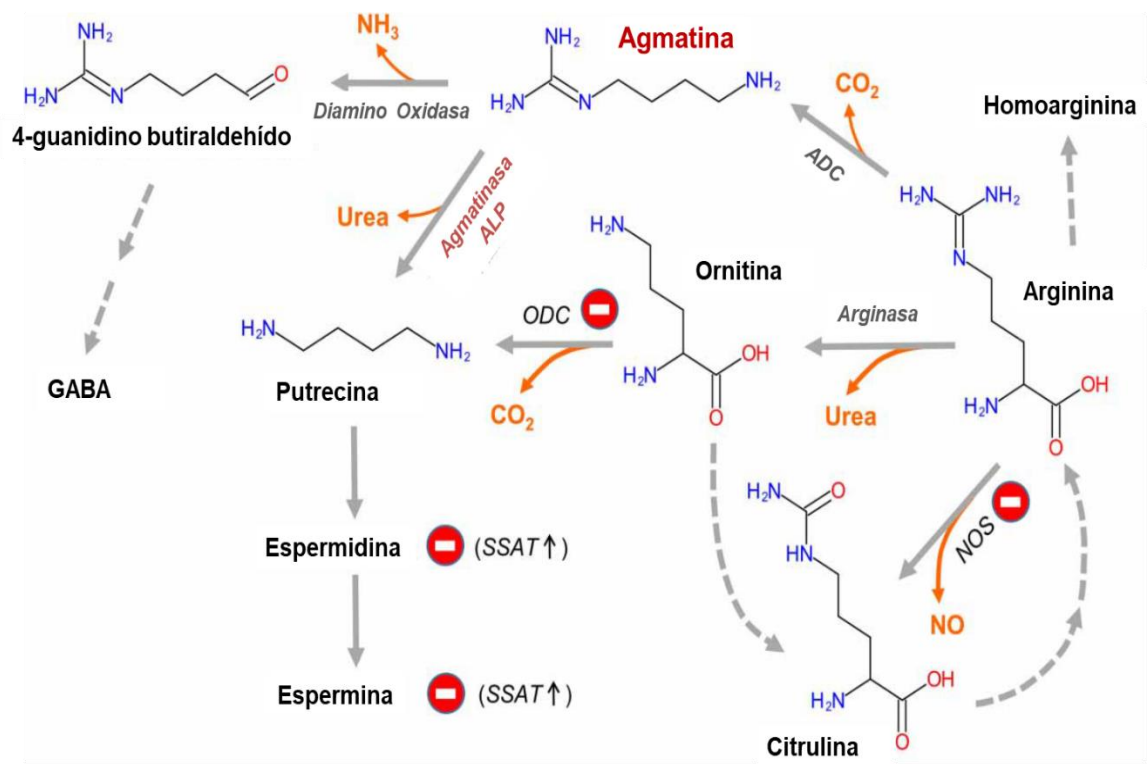


Figura 1: Participación de agmatina como vía alternativa en la síntesis de poliaminas y compuestos relacionados. La agmatina se sintetiza a partir del aminoácido arginina por descarboxilación y es un precursor en la síntesis de putrescina y participa en la síntesis del neurotransmisor GABA (ácido gamma amino butírico). La agmatina inhibe la síntesis de poliaminas al nivel de ODC (ornitina descarboxilasa) a través de la inducción de antizima de ODC y al agotar los grupos de poliaminas mediante la regulación positiva de SSAT (espermidina/espermina N1 acetiltransferasa). Además, la agmatina también es un inhibidor del óxido nítrico sintasa (NOS). La agmatina puede degradarse por hidrólisis eliminando urea, catalizada por agmatinasa o ALP (*agmatinase like protein*), o por oxidación, catalizada por diamino oxidasa (adaptado de Laube & Bernstein, 2017).

3.2 Funciones biológicas de la agmatina.

La agmatina participa en diferentes funciones fisiológicas como la regulación de la excreción renal de sodio (Penner & Smyth, 1996), modulación de la liberación de insulina por parte de las células pancreáticas (Su *et al.*, 2009) efectos neuro protectores contra apoptosis en células ganglionares de la retina (Hong *et al.*, 2012), como en cultivos primarios de astrocitos deprivados de oxígeno y glucosa (Lee *et al.*, 2009). Además de esto, la agmatina, es capaz de inhibir en forma reversible la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Satriano *et al.*, 2008), y de manera irreversible la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS). (Demady *et al.*, 2001).

Estudios preclínicos han demostrado los efectos beneficiosos de la administración de agmatina para su uso en el tratamiento de la depresión, la ansiedad, la isquemia hipóxica, la nocicepción, la tolerancia a la morfina, la memoria, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, los trastornos relacionados con la lesión cerebral traumática y la epilepsia. (Barua *et al.*, 2019; Moretti *et al.*, 2014)

Debido a la participación de agmatina en múltiples funciones cerebrales, se han realizado estudios para identificar la distribución de esta poliamina en cerebro de rata usando un mapeo con anticuerpos anti-agmatina. Los resultados de estos estudios permitieron concluir que la distribución de la agmatina se encuentra principalmente en la corteza cerebral, hipotálamo, encéfalo, médula

oblonga, hipocampo, telencéfalo subcortical, tálamo y regiones subcorticales que son fundamentales en la respuesta adaptativa al estrés, en el control neuroendocrino y en sectores que procesan las emociones, la percepción del dolor y la cognición (Reis & Regunathan, 2000). De igual manera se ha podido comprobar su participación en la sinapsis mediante su presencia en dendritas, axones y terminales axónicos (Madai *et al.*, 2012; Sastre *et al.*, 2002).

Agmatina cumple con los requisitos necesarios de un neurotransmisor, la cual es sintetizada en el cerebro, así como en la espina cordal, almacenada en vesículas sinápticas en neuronas heterogéneamente distribuidas, inactivada por recaptación, degradada enzimáticamente y liberada en terminales axónicos en respuesta a depolarización (Uzbay, 2012).

Los múltiples procesos biológicos asociados con la agmatina requieren mecanismos eficientes que regulen sus concentraciones celulares, destacando así la importancia central de la síntesis e hidrólisis de agmatina, especialmente en el cerebro.

3.3 Agmatinasa

Agmatina es hidrolizada por la enzima agmatinasa (AGM), actividad enzimática que fue detectada por primera vez en cerebro de rata (Sastre *et al.*, 2002), y células de macrófagos murinos (Sastre *et al.*, 1998). Esta enzima forma parte de la superfamilia de las ureohidrolasas por la similitud de su secuencia y estructura terciaria. Posee un centro binuclear de manganeso y se conservan los residuos claves para la unión al cofactor metálico, y los residuos necesarios para el posicionamiento e hidrólisis del sustrato, conocidos como marcas de familia (Figura 2). (Hyung *et al.*, 2004)

Existen estructuras resueltas por cristalografía y difracción de rayos X para varias agmatinasas de procariontes, como la agmatinasa de *Deinococcus radiodurans* (PDB ID: 1WOH) (Hyung *et al.*, 2004), la agmatinasa de *Escherichia coli* (PDB ID: 7LOL) recientemente publicada (Maturana *et al.*, 2021) y dos agmatinasas putativas de *Clostridium difficile* (PDB ID: 3LHL) y *Burkholderia thailandensis* (PDB ID: 4DZ4) (Baugh *et al.*, 2013). En estas enzimas, se sabe que el aspartato y la histidina son ligandos para el cofactor metálico, al igual que en los demás miembros de la familia de las ureohidrolasas. (Hyung *et al.*, 2004)

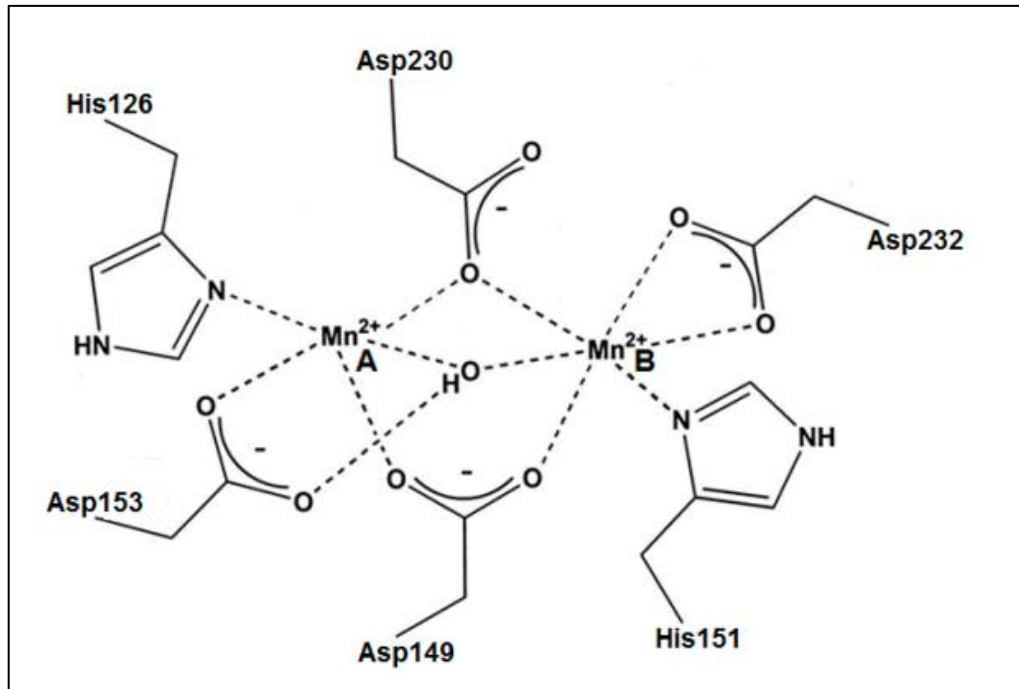


Figura 2: Esquema del sitio de unión a Mn^{2+} en AGM de *E. coli*. La enzima puede acomodar dos iones de Mn^{2+} estrechamente espaciados en sus sitios activos, los cuales interactúan con aminoácidos altamente conservados. El ion hidroxilo, que se observa en el centro del esquema, reaccionaría nucleofílicamente con el carbono guanidínico del respectivo sustrato. (Uribe *et al.*, 2020).

Actualmente, la agmatinasa mejor caracterizada es la de *Escherichia coli*, que presenta una k_{cat} de $140 \pm 8 \text{ seg}^{-1}$, y una K_m para agmatina de $1.5 \pm 0.2 \text{ mM}$, (Satishchandran & Boylet, 1986), la cual se encuentra conformada en trímeros (Maturana *et al.*, 2021). Presenta un clúster binuclear de Mn^{2+} en su sitio activo (Figura 2) y los residuos involucrados en la coordinación de metales juegan un rol fundamental en la estabilidad térmica y función catalítica de la proteína. A través de estudios de mutaciones puntuales realizadas a los aminoácidos que conforman el clúster de manganeso se ha comprobado que un primer ion estaría unido fuertemente y sería esencial para la actividad de la enzima y un segundo Mn^{2+} más débilmente unido, cuya unión resulta en la activación total de la enzima (Scolnick *et al.*, 1997).

En esta familia de enzimas la función que cumpliría el cofactor sería disminuir el valor del pK_a de una molécula de agua, para generar el ion hidroxilo que ataca nucleofilicamente al carbono guanidinico del respectivo sustrato (Figura 2). (Kanyo *et al.*, 1996).

Con respecto a las agmatinasas de mamífero, en el año 2002, dos grupos de investigación simultáneamente informaron el clonamiento de la secuencia que codifica para la agmatinasa humana, pero la proteína recombinante prácticamente no presentó actividad *in vitro*, por lo cual no fue posible su caracterización cinética (Iyer *et al.*, 2002; Mistry *et al.*, 2002).

3.4 Agmatinase like protein (ALP)

En el laboratorio de Enzimología de la Universidad de Concepción, a partir de una librería de ADNc de cerebro de rata, se identificó una secuencia cuya expresión en *E. coli* generó una proteína con actividad agmatinasa. Esta proteína recombinante fue denominada “*agmatinase like protein*” (ALP), está compuesta por 523 aminoácidos, posee una masa molar de 60 kDa y es la primera proteína recombinante de mamífero con actividad agmatinasa significativa *in vitro*, y también se ha demostrado su actividad *in vivo*, utilizando una cepa de levaduras deficiente en la síntesis de poliaminas, muestra un 13% de identidad y un 19% de similitud con la agmatinasa humana, pero no posee los residuos definidos como ligandos para el cofactor metálico de Mn^{2+} , necesario para su actividad catalítica, los cuales se señalan en la Figura 3 (Uribe *et al.*, 2007). Los valores de las constantes cinéticas para la hidrólisis de agmatina son, una k_{cat} de $0.9 \pm 0.2 \text{ sec}^{-1}$ y una K_m de $3.0 \pm 0.2 \text{ mM}$. (Castro *et al.*, 2011)

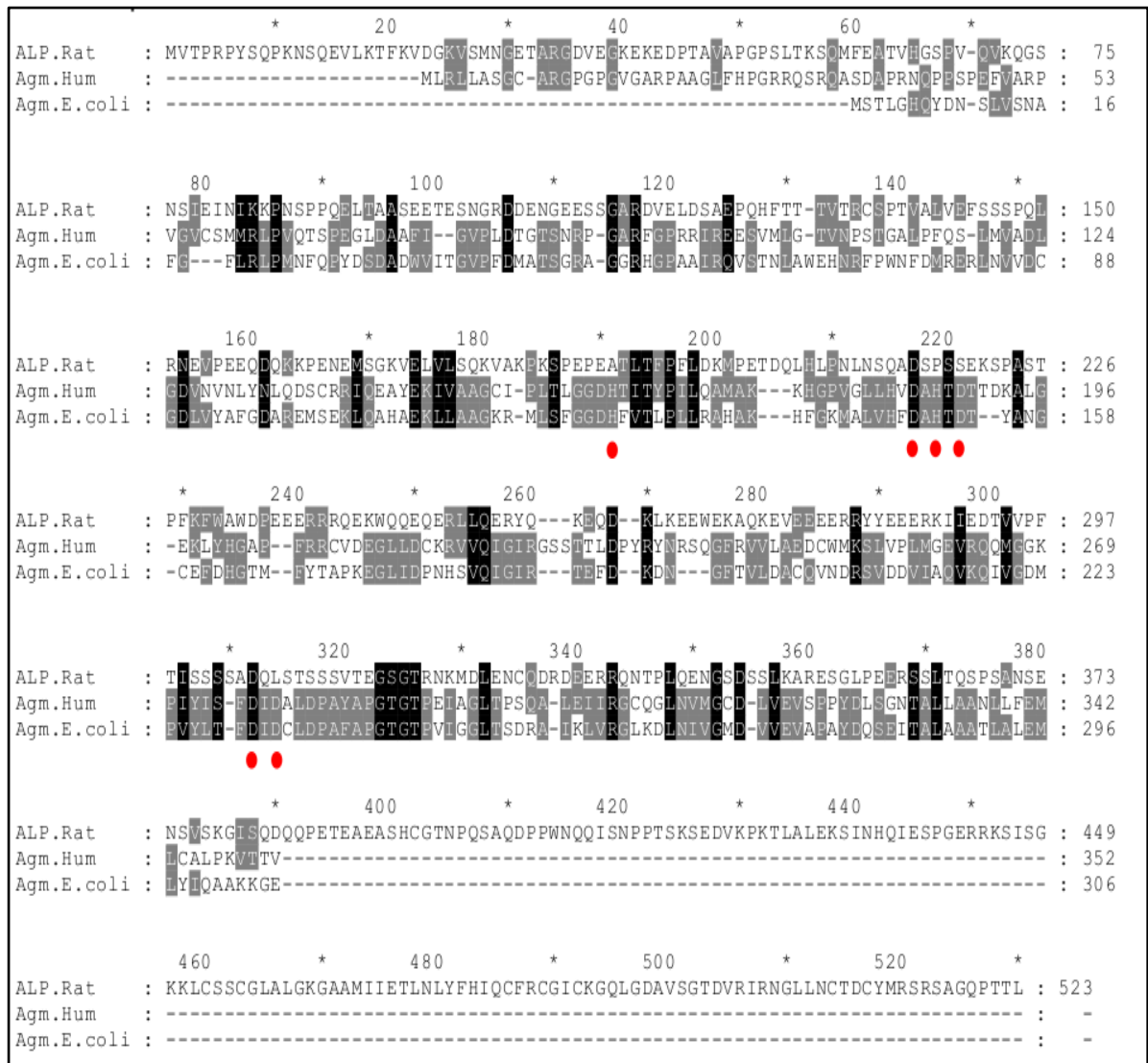


Figura 3: Alineamiento de secuencias aminoacídicas de ALP, la AGM humana y de *E. coli*. En círculos rojos se señalan los aminoácidos altamente conservados en la familia de las ureohidrolasas involucrados en la coordinación del cofactor metálico.

Al realizar una búsqueda de secuencia de ALP en las bases de datos de Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) y National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) revelaron una serie de transcritos bajo el nombre de LIMCH1, que poseen el extremo 3' idéntico a ALP, de los cuales se realizó el clonamiento de dos de estos transcritos desde hipotálamo de cerebro de rata, denominados Isoforma I de LIMCH1 de 3177 pb y la Isoforma II de LIMCH1 de 2709 pb, las cuales fueron catalíticamente activas con agmatina, similar a lo observado para ALP (Figura 4). Los parámetros cinéticos calculados para ambas isoformas no muestran diferencias significativas con respecto a los de ALP, por lo cual es posible que el sitio activo esté conservado en estas proteínas y que las regiones adicionales de LIMCH1 no participen en la catálisis.

ALP presenta en su extremo carboxilo-terminal un dominio LIM compuesto por 67 residuos que poseen la siguiente secuencia consenso: C-X₂-C-X₁₉-H-X₂-C-X₂-C-X₂-C-X₂₁-C-X₂-C, donde X corresponde a cualquier aminoácido. Este dominio se encuentra estabilizado por dos iones Zn²⁺, es capaz de plegarse en forma independiente y se le asignan funciones como dominios adaptadores, competidores, auto inhibidores y localizadores de las proteínas a las cuales pertenecen (Castro *et al.*, 2011). Las proteínas que contienen dominios LIM han sido implicadas en la diferenciación celular y el control del crecimiento celular y desempeñan papeles cruciales como reguladores de la expresión génica, cito arquitectura, adhesión celular, motilidad celular y transducción de señales (Kadmas & Beckerle, 2004).

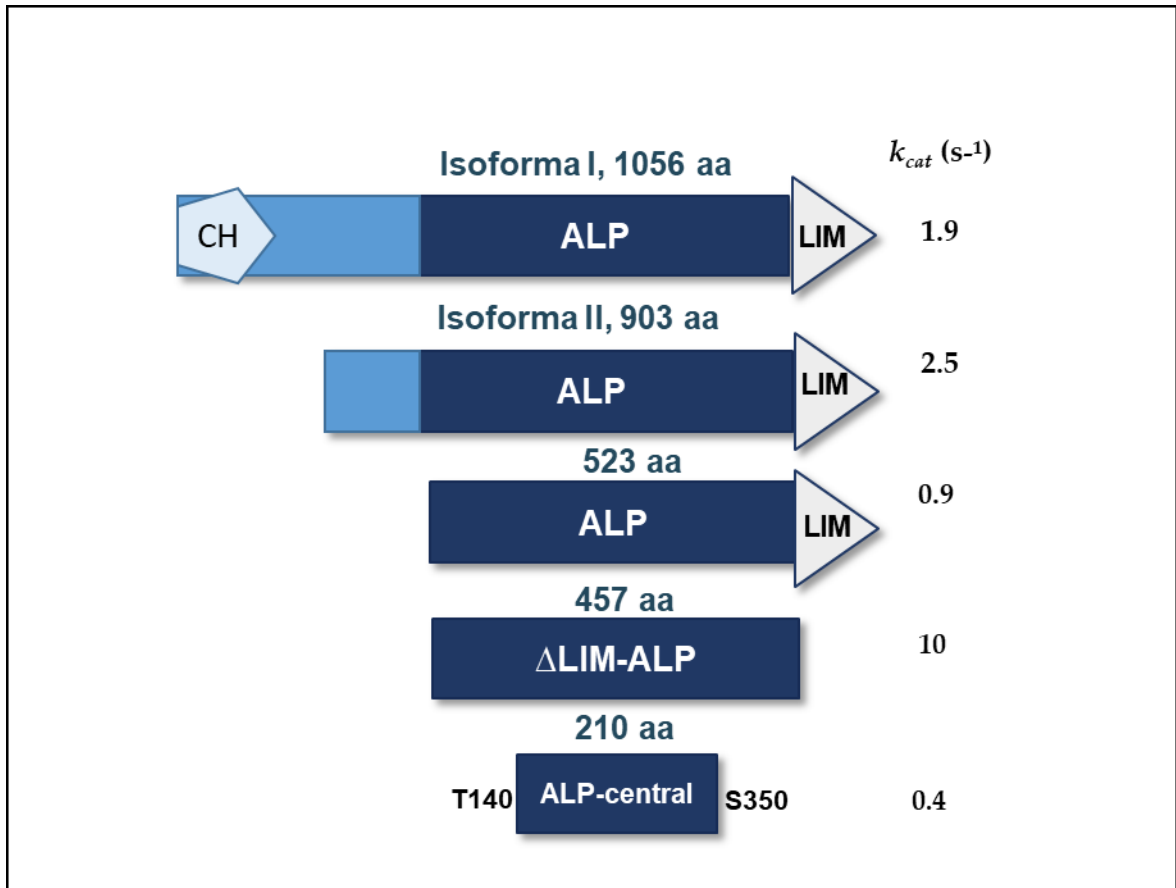


Figura 4: Esquema comparativo de ALP, sus Isoformas y valores de k_{cat} . Las regiones señaladas en color azul oscuro son idénticas entre las isoformas de ALP.

En base a los conocimientos existentes respecto a la organización de los dominios LIM, se ha propuesto una representación esquemática del dominio presente en la ALP, indicando los posibles ligandos para los iones Zn^{2+} (Figura 5), siendo la presencia de estos iones detectada en fracciones purificadas de ALP (Castro *et al.*, 2011), y además se generó un modelo estructural de este dominio, donde se aprecia la posible ubicación de los iones Zn^{2+} (Cofre *et al.*, 2014)

Con el fin de analizar la función de este dominio en ALP, se generaron especies truncas sin el dominio LIM (Δ LIM-ALP), cuyos resultados obtenidos indicaron que Δ LIM-ALP presenta un incremento de 10 veces su actividad catalítica con una k_{cat} de $10 \pm 1 \text{ sec}^{-1}$ y una disminución de 3 veces en su K_m , de $1,2 \pm 0,5 \text{ mM}$ para agmatina (Figura 4). Ambas especies (ALP silvestre y Δ LIM-ALP) son capaces de sustentar la síntesis de poliaminas *in vivo* a partir de agmatina. También se determinó que la remoción del dominio LIM genera un cambio conformacional detectable mediante cambios en la fluorescencia intrínseca de triptófanos. Estos resultados sugieren que el dominio LIM ejerce un papel de auto inhibición en la ALP y dado que los dominios LIM participan en interacciones proteína-proteína, se propone que la inhibición podría ser revertida por la interacción del dominio con alguna proteína presente en el cerebro y que aún no está definida (Castro *et al.*, 2011).

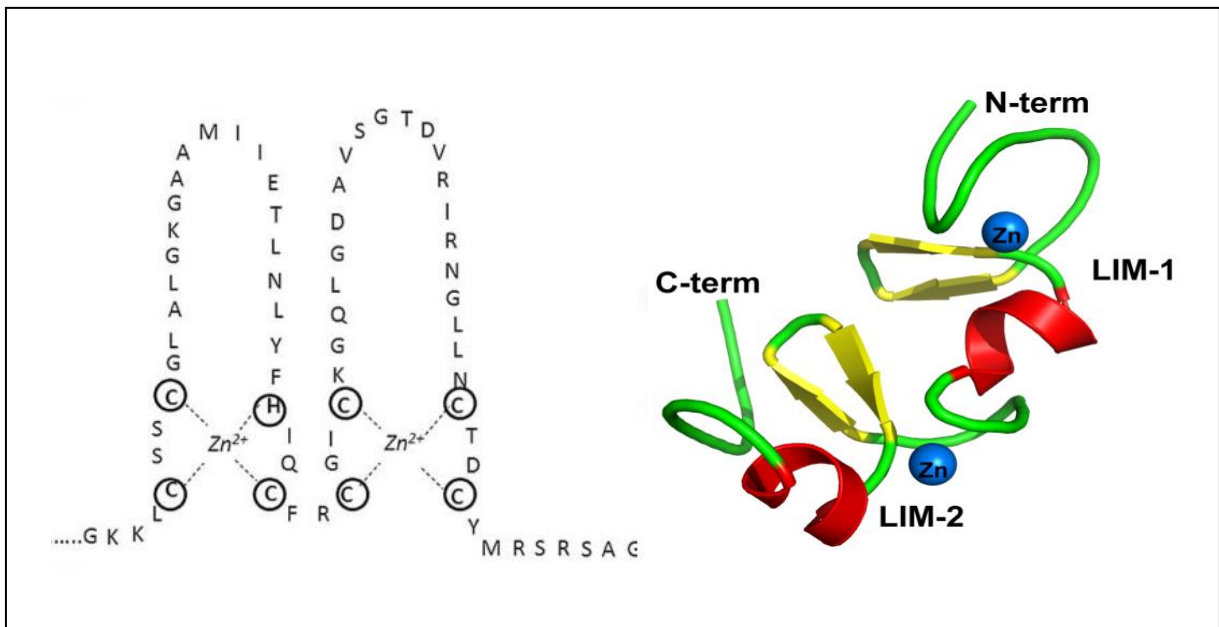


Figura 5: Representación del dominio LIM presente en ALP. Izquierda: Topología de la coordinación de iones zinc para un dominio LIM en ALP (Castro *et al.*, 2011). **Derecha:** Modelo estructural del dominio LIM en ALP (Cofre *et al.*, 2014).

3.5 Región catalítica y requerimientos de Mn²⁺ para la actividad de ALP.

Aunque ALP no presenta los residuos conservados que estabilizan a él cofactor Mn²⁺ en las ureohidrolasas, tratamientos con EDTA provocan la inactivación total de la enzima y este efecto es revertido por la adición del ion metálico (Cofré *et al.*, 2013; Quiñones *et al.*, 2015), por lo que se comporta como todos los miembros bien caracterizados de la familia ureohidrolasas, que incluye arginasas humanas y de rata (Alarcón *et al.*, 2006) y AGM de *E. coli* (Carvajal *et al.*, 1999; Salas *et al.*, 2004). Como se ha mencionado, se sabe que en las ureohidrolasas el aspartato y la histidina son ligandos para el cofactor metálico, y con el objetivo de saber cuáles podrían ser los aminoácidos involucrados en su coordinación en ALP se realizó la mutación individual de cada uno de los 5 residuos de histidina de ALP, sin embargo, sólo generó cambios menores en los parámetros cinéticos y en la afinidad de unión por Mn²⁺, con la única excepción de una afinidad disminuida de 10 veces en el caso de la variante H206A (Quiñones *et al.*, 2015). Sin embargo, debido a la falta de información estructural y al bajo grado de identidad de secuencia entre ALP y todas las ureohidrolasas conocidas, no se han podido determinar los residuos que interaccionan con el ion Mn²⁺ en el sitio activo de ALP, ni se ha delimitado su región catalítica.

A la fecha no existe información estructural sobre ALP, por lo que mediante herramientas bioinformáticas en el Laboratorio de Biofísica Molecular de la Universidad de Concepción se han propuesto algunos residuos como posibles ligandos del cofactor Mn^{2+} a través de un modelo estructural comparativo de ALP preliminar, construido pese a la baja identidad de secuencia entre ALP y las estructuras moldes (1WOH 32%, 3LHL 38%, 4DZ4 30%), donde se proponen los residuos que participarían en la unión del cofactor metálico (Figura 6). La secuencia de la proteína ALP contiene numerosas variaciones en el sitio previsto para la interacción con Mn^{2+} lo que sugiere la presencia nuevos ligandos de interacción para los iones metálicos.

Basados en este modelo, recientemente se expresó una región de 210 aminoácidos que incluye los ligandos propuestos para el cofactor metálico en ALP (Figura 4). Esta región se denominó variante ALP-central, la cual mantiene la actividad agmatinasa, pero con baja eficiencia y se activa por Mn^{2+} . (Reyes *et al.*, 2020)

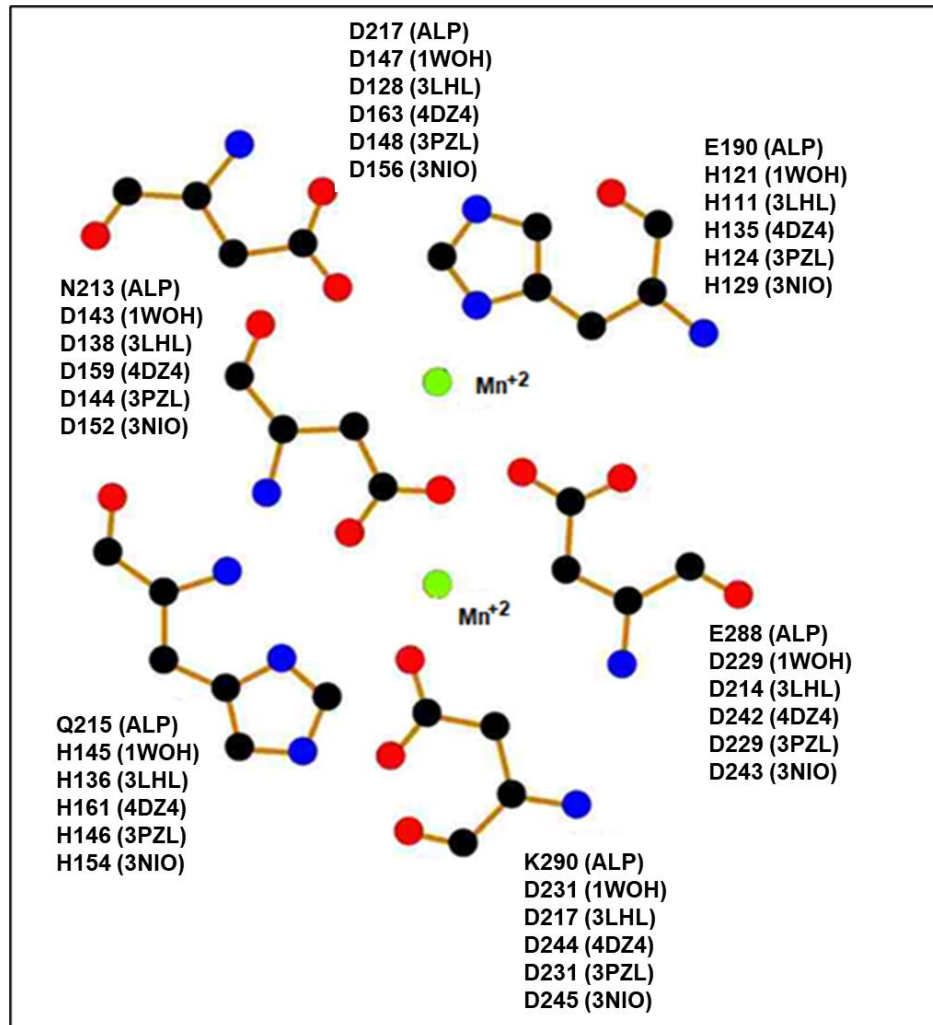


Figura 6: Esquema de los residuos del sitio de unión de Mn²⁺ en ureohidrolasas. En el esquema se proponen residuos que estarían coordinando con el cofactor Mn²⁺ en ALP a partir de la agmatinasa de *Deinococcus radiodurans* (1WOH), incluyendo aminoácidos presentes en las estructuras cristalinas de la agmatinasa de *Clostridium difficile* (3LHL), *Burkholderia thailandensis* (4DZ4), *Thermoplasma vulcanus* (3PZL) y guanidina butirasa de *Pseudomonas Aeruginosa* (3NIO).

Teniendo en cuenta las múltiples e importantes acciones asociadas a la agmatina, en este estudio se busca contribuir a aclarar interrogantes importantes y aún no resueltas sobre ALP, una enzima crítica para el control de los niveles de agmatina, especialmente en el cerebro, por lo que esta tesis tiene como objetivo dilucidar cuáles son los residuos de aminoácidos específicos que interactúan con Mn^{2+} en el sitio activo de ALP, mediante la generación de un modelo estructural y la utilización de mutagénesis sitio dirigida.

4. HIPÓTESIS

En ALP los residuos N213, Q215, D217, E288 y K290 participan en la coordinación del cofactor Mn^{2+} y son relevantes para su actividad catalítica.

5. OBJETIVO GENERAL

Generar un modelo estructural de Δ LIM-ALP y determinar la participación de los aminoácidos propuestos N213, Q215, D217, E288 y K290 en la unión del cofactor Mn^{2+} y en la actividad catalítica.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar un modelo estructural de Δ LIM-ALP y del sitio de unión a Mn^{2+} .
2. Determinar la actividad catalítica y los parámetros cinéticos de mutantes de los residuos propuestos para interaccionar con el cofactor Mn^{2+} .

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Reactivos químicos

Los reactivos químicos generales, amortiguadores, sales y sustratos utilizados son de grado analítico y biología molecular de los proveedores Sigma y Merck.

7.2 Soluciones generales

TAE 10X: se adicionaron 48.4 g de Tris, 11.4 mL de ácido acético glacial y 20 mL de EDTA 0.5 M se ajustó a pH 8.0 y se completó a volumen de 1 L con agua destilada.

TBS-tween: se adicionaron 1.21 g de Tris, 8.775 g de NaCl y 500 μ L de Tween 20, la solución fue ajustada a pH 7.4 y se completó a volumen de 1 L con agua destilada

Buffer TG-SDS10X: se agregaron 30 g de Tris, 144 g de glicina y 10 g de dodecilsulfato de sodio (SDS), la solución fue ajustada a pH 8.4 y se completó a volumen de 1 L con agua destilada.

Buffer de transferencia: se adicionaron 3.02 g de Tris, 14 g de glicina, 200 mL de metanol, 0.37 g de SDS y se completó a volumen de 1L con agua destilada.

Solución Mezcla ácida: esta mezcla fue preparada con ácido ortofosfórico al tomando un volumen de 270 mL (23%) y 90 mL de ácido sulfúrico (9%) y se completó a volumen de 1L con agua destilada.

Buffer TE 10X: esta solución amortiguadora fue preparada a partir de una solución de 10 mM de EDTA y 100 mM Tris-HCl pH 7.5.

7.3 Cepas bacterianas

La cepa de *E. coli* JM109, cuyo genotipo es *recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thi⁺(lac-proAB)F', tra D36 pro AB+ lacIq lacZ⁺M15*, fue utilizada para la expresión de las mutantes doble, triple y la región central de Δ LIM-ALP.

7.4 Medios de cultivo

El medio Luria Bertani (LB), fue preparado usando 10 g/L de Bacto-triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl con posterior autoclavado.

El medio Terrific Broth (TB), fue preparado usando 12 g/L de Bacto-triptona, 24 g/L de extracto de levadura y 100 mL/L de una solución amortiguadora tipo fosfato autoclavada (KH_2PO_4 0.17 M, K_2HPO_4 0.72 M), la cual fue adicionada al medio de cultivo también autoclavado.

A los medios de cultivo se les agregó el antibiótico ampicilina (10 ug/ml).

7.5 Oligonucleótidos.

Con el fin de generar las mutaciones sitio dirigidas de Δ LIM-ALP en el vector H6pQE60, se diseñaron y utilizaron los oligonucleótidos presentados en la Tabla 1. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc.

7.6 Vectores.

H6PQE60: Vector de expresión en procariontes de 3439 pb, posee un sitio de unión al ribosoma (RBS II) y confiere resistencia a ampicilina y cloranfenicol. Además, contiene un sitio de término de la transcripción del fago λ t_0 y el promotor fuerte del bacteriófago T7, ubicado río arriba de dos operones lac, lo que permite la inducción de la expresión del gen subclonado por IPTG (Figura 7).

Tabla 1: Secuencia de oligonucleótidos para la obtención de las mutantes simples N213A, Q215A, D217A, E288A y K290A de Δ LIM -ALP.

Nombre	Secuencia
F-ALP-Tr N213A	5'- GACCAACTACATTTGCCAAATCTC GCC TCTCAAGCGGATTCCCCAAGC -3'
R-ALP-Tr N213A	5'- GCTTGGGGAATCCGCTTGAGA GGC GAGATTTGGCAAATGTAGTTGGTC -3'
F-ALP-Tr Q215A	5'- CATTGCCAAATCTCAATTCT GCG GCGGATTCCCCAAGCAGTGAG -3'
R-ALP-Tr Q215A	5'- CTCACTGCTTGGGGAATCCGC GCG AGAATTGAGATTTGGCAAATG -3'
F-ALP-Tr D217A	5'- CCAAATCTCAATTCTCAAGCG GCG TCCCCAAGCAGTGAGAAGTCC -3'
R-ALP-Tr D217A	5'- GGACTTCTCACTGCTTGGGGA GCG CGCTTGAGAATTGAGATTTGG -3'
F-ALP-Tr E288A	5'- GCAGATACTATGAGGAG GCC CGTAAGATAATTGAGGACACCGTGG -3'
R-ALP-Tr E288A	5'- CCACGGTGTCTCAATTATCTTACG GGC CTCCTCATAGTATCTGC -3'
F-ALP-Tr K290A	5'- GATACTATGAGGAGGAGCGT GCG ATAATTGAGGACACCGTGGTTC -3'
R-ALP-Tr K290A	5'- GAACCACGGTGTCTCAATTAT GCG ACGCTCCTCCTCATAGTATC -3'

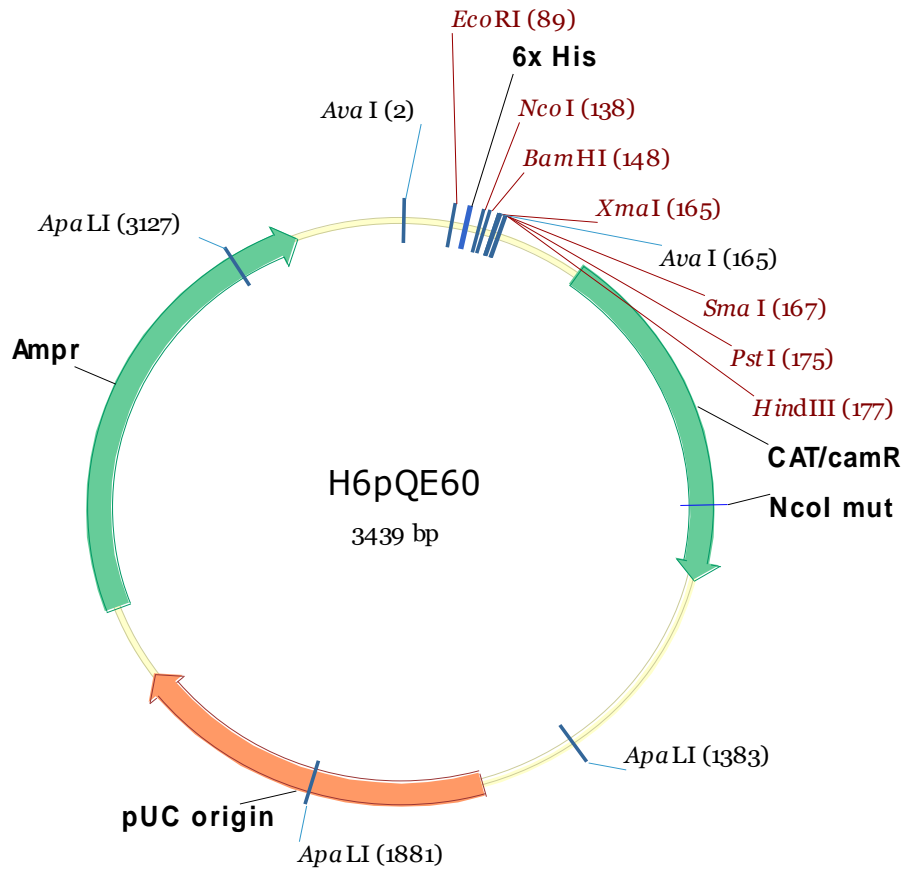


Figura 7: Vector H6pQE60, utilizado para clonamiento de Δ LIM-ALP y mutagénesis sitio dirigida para la generación de las variantes mutadas de Δ LIM-ALP.

7.7 Modelamiento estructural del sitio de unión a Mn^{2+} en Δ LIM-ALP.

Para realizar el modelo estructural de Δ LIM-ALP inicial, se realizó la búsqueda de posibles moldes utilizando la plataforma Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

En paralelo se utilizaron los servidores I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER>) y Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) para realizar una predicción de la estructura por otros principios, ambos trabajan con *Protein threading* (predicción de plegamiento o enhebrado de la secuencia). Al no obtener los resultados esperados, el modelamiento del sitio de unión se llevó a cabo utilizando el software MODELLER versión 9.22, utilizando las estructuras disponibles en la base de datos Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>) de la familia de ureohidrolasas. Se seleccionaron las estructuras de las Agmatinasas de *Deinococcus radiodurans* (1WOI), *Clostridium difficile* (3LHL), *Burkholderia thailandensis* (4DZ4), *Thermoplasma vulcanus* (3PZL) y guanidina butirasa de *Pseudomonas Aeruginosa* (3NIO), y proclavamidato amidino hidrolasa de *Streptomyces clavuligerus* (1GQ6) como posibles moldes, las cuales presentaron porcentaje de identidad bajo 30% pero similitud mayor a 30%. El alineamiento de las secuencias de los moldes se realizó con el servidor web Clustal Omega utilizando una matriz BLOSUM45; el alineamiento fue mejorado mediante el alineamiento estructural con el programa PyMol (<https://pymol.org/2/>) para

reubicar los “gaps” a zonas libres de elementos de estructura secundaria. Se realizaron 100 modelos y se jerarquizaron por DOPE.

Los 10 mejores modelos fueron analizados y comparados utilizando los servidores ProSA (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) que indica la calidad total del modelo y el servidor PROCHECK (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>). y refinados por el servidor web GalaxyRefine (<https://galaxy.seoklab.org/>). El modelo mejor evaluado se sometió a una minimización energética con el servidor Yasara (<http://www.yasara.org/minimizationserver.htm>).

7.8 Mutagénesis sitio dirigida de Δ LIM-ALP.

La mutagénesis de las variantes simples, doble y triple de Δ LIM-ALP se realizó por reacción en cadena por polimerasa (PCR), en el vector de expresión H6pQE60 (H6pQE60- Δ LIM-ALP), previamente subclonado usando la DNA polimerasa KOD Hot Start (Sigma-Aldrich) de alta fidelidad y los oligonucleótidos indicados en la Tabla 1 que contienen el codón mutado a Alanina; el templeado del producto amplificado fue digerido con la enzima DpnI a 37°C por un periodo de 16 horas, para luego transformar con el plásmido mutado la cepa *E. coli* JM109. Ver esquema de la Figura 8.

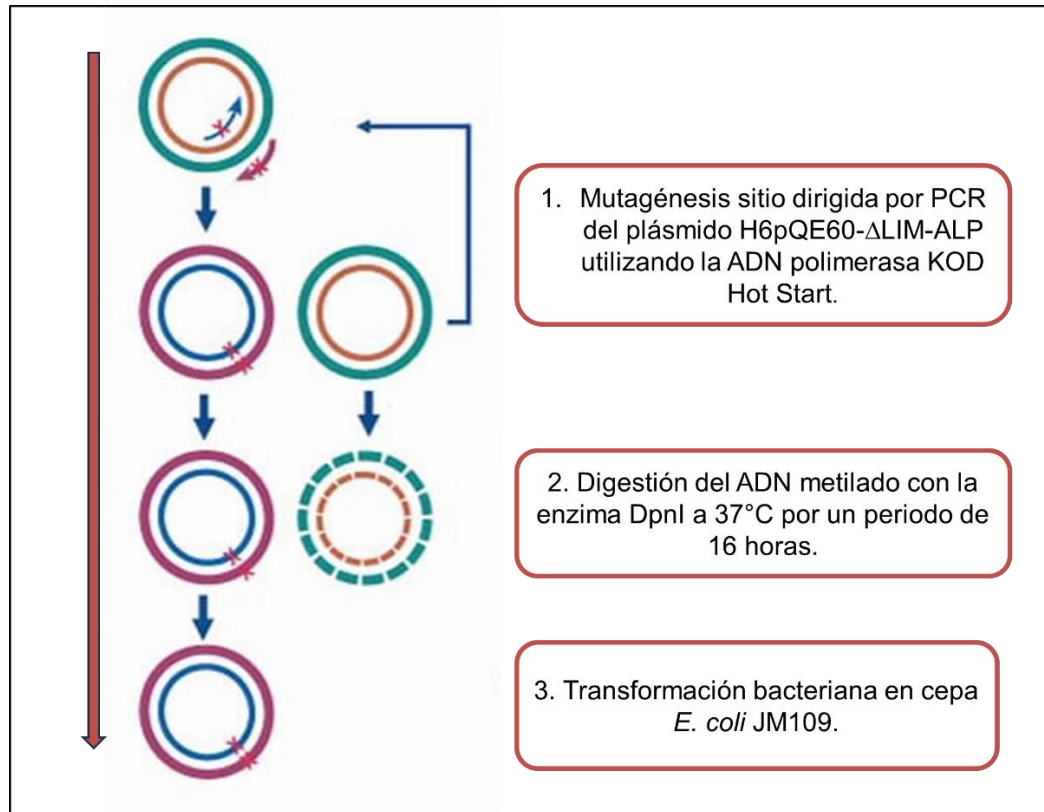


Figura 8: Esquema metodológico de la mutagénesis sitio dirigida para la obtención de las variantes mutadas de Δ LIM-ALP. En los recuadros con texto del esquema se simplifica en 3 puntos principales los pasos realizados para la obtención de las secuencias mutadas de Δ LIM-ALP a partir del plásmido H6pQE60- Δ LIM-ALP donde el resultado final con la secuencia mutada por alanina se esquematiza con “x”.

Las bacterias transformadas se incubaron en placas LB-agar con ampicilina a 37°C por 16 horas, obteniendo colonias aisladas con las mutaciones correspondientes. Los plásmidos se purificaron utilizando el Kit “E.Z.N.A. Plasmid miniprep Kit II” (Omega Biotek, USA) y fueron secuenciados para confirmar la presencia de las mutaciones.

7.9 Secuenciación de plásmidos.

Los plásmidos de interés fueron enviados al Servicio de Secuenciación Automática de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los resultados de secuenciación fueron analizados con el programa ChromasPro versión 1.5 y el servidor web Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

7.10 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se realizó por espectrofotometría utilizando el equipo UV-Vis Spectrophotometer modelo Q5000 marca Quawell.

7.11 Expresión proteica de las variantes proteicas de Δ LIM-ALP.

Para la expresión proteica de Δ LIM-ALP y sus variantes mutadas se crecieron bacterias *E. coli* JM109 en medio de cultivo TB, con agitación a 37°C hasta una absorbancia cercana de 0,600 a una longitud de onda de 600nm, donde se indujo la expresión de las proteínas con IPTG a 30°C, realizando previamente una estandarización de la expresión variando las concentraciones de IPTG y tiempos de inducción. A continuación, las bacterias se cosecharon por centrifugación y se lavaron en buffer Tris 10 mM, pH 7,5. El precipitado bacteriano se resuspendió en buffer de lisis (KCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, putrescina 2 mM, Mn²⁺ 5 mM, p-metilsulfonilfluoruro (PMSF) 0,1 mM y DL-ditiotreitol (DTT) 2 mM), lisando las bacterias por sonicación en ciclos de 15 segundos de sonicación cada 30 segundos de reposo, por 6 minutos totales de sonicación, a 80% de amplitud en el equipo *Sonics* modelo VCX 130 (Sonics & Materials INC.) ; el resultado de esta sonicación se centrifugó a 200.000 g por 20 minutos con el fin de obtener el extracto proteico.

7.12 Purificación de las variantes mutadas y Δ LIM-ALP.

La purificación de Δ LIM-ALP y sus variantes mutadas se realizó a través de cromatografía de intercambio aniónico usando una columna de DEAE-celulosa equilibrada con Tris-HCl 10 mM pH 7.5, lavada con KCl 150 mM hasta obtener una densidad óptica cercana a 0.01 a 280 nm, la elución de la enzima se realizó con 250 mM de KCl, según estandarización previa

7.13 Electroforesis en geles de agarosa.

Los geles de agarosa fueron preparados a una concentración de 1% de agarosa en una solución TAE 1X y bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. Las muestras fueron resuspendidas en una mezcla de carga que contenía azul de bromofenol al 0,25% y glicerol al 10%. Como patrón de peso molecular se utilizó el marcador cuantificable de 1kb "Gene Ruler 1kb DNA Ladder" (Fermentas). El ADN en los geles fue detectado mediante un transiluminador UV.

7.14 Ensayos de Western Blot.

Para los ensayos de Western Blot se realizó la separación de las proteínas mediante geles de poliacrilamida-SDS al 12%, las cuales se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 2 horas en 250 mA a 4°C. El bloqueo de cada membrana se realizó con TBS 1X-Tween 20 en solución de leche descremada al 0,5% p/v durante una hora y luego se incubó con el primer anticuerpo (anti-ALP) en dilución 1:2000 durante 16 horas con agitación constante a 4°C. Se realizaron lavados 5 lavados sucesivos con TBS Tween 20 de 10 minutos cada uno y luego se incubó con el segundo anticuerpo de cabra IgG anti-conejo con dilución 1:10000 en TBS-Tween 20 más leche al 0,5% p/v por una hora. La membrana fue revelada con sistema quimioluminiscente Amersham ECL Western Blotting Detection, siguiendo instrucciones del

fabricante, y se detectó la emisión quimioluminiscente mediante Fotodocumentador ChemiScope 3000 modelo 3100 de la empresa Clinix Science Instruments Co. Ltd.

7.15 Dot Blot.

Se agregaron 2 uL de muestra seguido por 3 min de secado hasta completar un volumen total de 10 uL a una membrana de nitrocelulosa. Se bloqueó la membrana con TBS-Tween 20 leche 0.5% p/v durante 1 hora a 4°C en agitación. Se adicionó el anticuerpo primario en TBS-Tween 20 más leche al 0.5% p/v y se incubó durante toda la noche en agitación suave a 4°C, luego se realizaron 5 lavados sucesivos con TBS-Tween 20 de 10 minutos cada uno. Se agregó el anticuerpo secundario en TBS-Tween 20 más leche 0.5% y se incubó 1 hora, bajo agitación suave a temperatura ambiente y luego se realizaron nuevamente los lavados con TBS-Tween.20 Se reveló con el kit comercial quimioluminiscente Amersham ECL *Western Blotting Detection*, y se visualizó en el Fotodocumentador ChemiScope 3000 modelo 3100 de la empresa Clinix Science Instruments Co. Ltd.

7.16 Cuantificación de la actividad Agmatinasa.

La actividad agmatinasa fue ensayada a 37°C, midiendo la cantidad de urea producida como resultado de la hidrólisis del sustrato agmatina, empleando α -isonitroso propiofenona como reactivo colorimétrico (Archibald *et al.*, 1945) y

glicina-NaOH 50 mM (pH 9,5) como amortiguador. Las reacciones fueron iniciadas agregando la enzima a soluciones de sustrato y amortiguador previamente equilibrados a 37°C y detenidos a los tiempos apropiados, agregando 1 ml de solución de mezcla ácida (ácido ortofosfórico al 23% y sulfúrico al 9%). Luego se agregó 0.1 ml de α -isonitroso propiofenona al 3% en etanol y se calentó por una hora a 100°C. Después de enfriar en oscuridad, se midió la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro modelo UV-1700 marca Shimadzu.

7.17 Ensayos de activación enzimática.

La estabilidad térmica de Δ LIM-ALP y ALP central fueron comparadas incubando cada preparación a 65°C por tiempos definidos hasta 10 minutos de incubación. Las proteínas contenidas en tampón glicina-NaOH 50 mM pH 9.5, fueron calentadas en presencia y ausencia de Mn^{2+} . Posterior a la incubación, cada muestra fue depositada en hielo y se determinó su actividad enzimática utilizando como sustrato Agmatina 30 Mm, por el método de Archibald a 37°C. Los resultados fueron expresados como porcentaje de actividad enzimática con respecto a la actividad de la enzima no calentada.

8. RESULTADOS

8.1 Generación de un modelo estructural de Δ LIM-ALP.

Para la generación del modelo estructural de Δ LIM-ALP, en primer lugar, se realizó la búsqueda de estructuras moldes para el modelaje comparativo utilizando Modeller. La búsqueda se realizó en la plataforma Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), con la base de datos PDB (<https://www.rcsb.org>), donde los resultados no mostraron modelos almacenados con un porcentaje de identidad aceptable (> 35%).

Debido a ello se realizaron las predicciones utilizando I-TASSER y Phyre2 cuyos resultados se observan en la Figura, respectivamente 9 y 10. Se puede apreciar una baja predicción tanto de estructura secundaria como terciaria, obteniendo en el caso de I-TASSER una estructura altamente desordenada, con un 7 % de estructura α -hélice y 3% de estructura lámina β plegada. Por su parte el servidor web I-TASSER entrega 5 modelos finales en su predicción por método *threading*, donde en la Figura 10 se presentan el peor y mejor evaluado por el mismo servidor entregando valores de *Z-score* de -1.76 y -3.3. Los resultados observables muestran que estos modelos son estructuras altamente desordenadas, similares a los resultados obtenidos con el que con el servidor Phyre2.



Figura 9. Modelo de Δ LIM-ALP obtenido por Phyre2 utilizando el método de *threading*. Modelo obtenido para Δ LIM-ALP en servidor Phyre2 con modo de trabajo "*Intensive*". (loops en color verde, hélices α en color rojo)

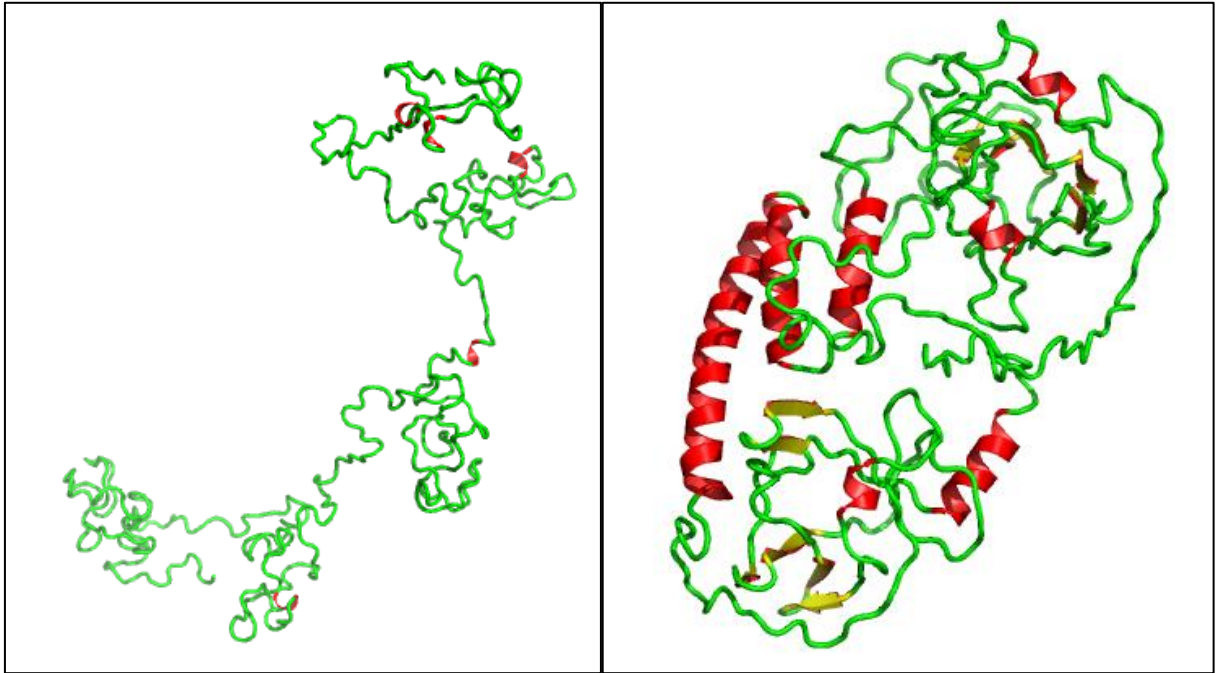


Figura 10. Modelos de Δ LIM-ALP obtenidos por I-TASSER por el método de *threading*. Se presentan 2 modelos entregados por el servidor web de predicción I-Tasser, para Δ LIM-ALP con un Z-score de -1.76 y -3.3, valores correspondientes a cada modelo de izquierda a derecha.

Ante la imposibilidad de realizar predicciones por *Protein threading* se realizó el modelamiento comparativo. Las secuencias de las estructuras resueltas seleccionadas para realizar el modelo fueron alineadas utilizando el servidor web Clustal Omega utilizando una matriz BLOSUM45 y comparadas con la secuencia de Δ LIM-ALP (Figura 11).

Como se observa en el alineamiento las secuencias poseen un muy bajo porcentaje de identidad (indicado por la intensidad de color) y similitud, con respecto a Δ LIM-ALP, siendo estos valores para 1GQ6 de 22% de identidad y 33% de similitud; 1 WOI, 22% de identidad y 33% de similitud; 3LHL, 22% de identidad y 32% de similitud; 3PZL, 21% de identidad y 33% de similitud; 4DZ4, 22% de identidad y 31% de similitud; 3NIO, 22% de identidad y 33% de similitud.

A partir del alineamiento presentado se puede observar que los ligandos clásicos del clúster de manganesos no son compartidos por Δ LIM-ALP con respecto a los miembros de las ureohidrolasas, ver Figura 11. También se puede apreciar que Δ LIM-ALP posee 3 regiones extensas de su secuencia que no presentan complementariedad a las otras secuencias. Estas 3 zonas son: S57-P91 (34 residuos), A142-V176 (34 residuos) y S348-T418 (70 residuos).

```

          *           20           *           40           *           60
1GQ6 : -----SPRYAQT-----PTFMRLPHD-PQ---PRGYDVVVI GAPYDG : 33
1WOI : G-----PAHLFYGGI-----PTFARAPLV-QPD-GDWQADVAALGVPFDI : 38
3LHL : -----N---YVESNLIVFVGVGFDG : 16
3NIO : NLHQP-----LGGNEMPRFGGI-----ATMMRLPHV-QSPAELDADAAAFVGVFLDI : 46
3PZL : -----ASELRSI-----FSLKKIADA-VN--GYEEAKYVVFVGFIPFDN : 34
4DZ4 : TLYGDGAIRRPSVYVGSSIENIVAGV-----LSFMRRNYT-RD--LDGVDVVVSGVFLDL : 51
ALP : M-----VTPREVSQPKNSQEVLKTETKVDGKVS MN---GETARGDVEGKEKED : 44

```

```

          *           80           *           100           *           120
1GQ6 : GTSYREGARFGP-----QAIRSESGL-THGVG : 59
1WOI : ALGFREGARFAP-----RALREASLRVPPFT : 65
3LHL : TTSNREGARFAS-----SSMKEFYGLETYS : 42
3NIO : GTSLRSGTRFGP-----REIRAESVM-IRPNY : 72
3PZL : TSSYRRGSKYAP-----DSIRGAYVN-LESYE : 60
4DZ4 : ATTFREGARLGE-----SAVGAASVQ-LAELN : 77
ALP : PIAVAEFGPSLTKSQMFEGVATVHGSFVQVKQGSNSIEINIKKPNSPFQELTAASEE-T---- : 101

```

```

          *           140           *           160           *           180
1GQ6 : -IDRCPGTFDLINCVLAGDINLTPFDNMNIALDTAQSHLSGI----- : 99
1WOI : -GLDGKTRLQGVTFADAGDVIILPSLEFPQLAHDRI TEAARQV : 105
3LHL : -PFLDL-LEDYNTICYGDL ETSVSGSTEQV LKEIYQET YKI : 81
3NIO : -MATGAAPFDSLNVADIGDVAINTFNLLAVRI TEQYDRI : 112
3PZL : -YSYGI-LLASGMADLGDMEES-EDVEYVIDTVESVVS AV : 98
4DZ4 : PYPWGFDPFDLLAVIDYGD CWFDAHHP LSIKPAI VEHARTI : 118
ALP : -ESNGRDENGEESSGARDVETLDSAE PQHF TTTVTRCSPTVALVEFSSSPQLRNEVP EEQDQ : 162

```

```

          *           200           *           220           *           240
1GQ6 : -----L-KANA AFLMIGGDHSLTVAALRAYAEQHG-PIAVVHLD AHS D TNPAF : 145
1WOI : -----R-GRCRVFVFLGGDHSVSYPELLRAFADV-P-DLHV VQLDAHLDFTDTR : 150
3LHL : -----V-RDSKVFEMIGGEHLVTLPAFKAVHEKYN-DIYVIHFD AHTDLRE EY : 127
3NIO : -----L-GHGILPLTLGGDHTITLPI LR A I K K K H G -K V G L V H V D A H A D V N D H M : 158
3PZL : -----M-SDGKIPIMLGGGHSITVGA VRALPK---D V D L V I V D A H S D F R S S Y : 141
4DZ4 : -----L-QSDARMLTLGGDHYIITYPELLI AHAC KYGKELSLIHFD AHD TWADD : 165
ALP : KKPENEMSGKVELVLSQKVAKEKSP E E A L T L T F F L D K M F E T - D - Q L H L P N L N S Q A D S P S -- : 220

```

```

          *           260           *           280           *           300           *
1GQ6 : YGGRYHNGT PFRHGI DEKLI DPAA MVQIGIRGHNPKPDSL DYA-----RGH-----GVRVVVTA : 198
1WOI : NDTKWSNSSPFRACE-ALPNLVHITTVGLRGLRFDPEAVAAA-----RAR-----GHTIIPM : 202
3LHL : NNSKNSHATVIKRIWD--IVGDNKIFQFGIRSGTK--EEFKFA-----TEE-----KHTYM-- : 174
3NIO : FGEKIAHGTFERRAVEEDLLDCDRVQIGLRAQGYTAE DFNWS-----RKO-----GFRVVQA : 211
3PZL : MGNKYNHACVTRALD--LLGEGRITSIGIRSVSR--EFEDP-----DFR-----KVSFISS : 190
4DZ4 : APDSLNHGTMFYKAVKDGLIDPKASVQVGIRTWND--DY-----L-----GINVLDA : 210
ALP : -SEKSPASTPEKF-----WAWDP E E R R R Q E K W Q E Q E R L L Q E R Y Q K E : 262

```

```

          320           *           340           *           360           *
1GQ6 : DEFGE L G V G G T A D I I R E K V G Q R P V Y V S V D I D V D P A F A P G T G T E - A P G G L -----L S : 249
1WOI : D D V T A - D L A G V L A Q L --- P R G Q N V Y F S V D V D G F D P A V I P G T S S E - E P D G L -----T Y : 249
3LHL : ----E I S G I D T F E N I V N M L N G K N I Y L T I D L D V L D A S V E P G T G T E - E P G G V -----N Y : 221
3NIO : E E C W H K S L E P L M A E V R E K V G G G P V Y L S E D I D G I D P A W A P G T G T E - E I G G L -----T T : 262
3PZL : F D V K K N G I D K Y I E E V D R -- K S R R V Y I S V D M D G I D P A Y A P A V G T E - E F F G L -----A D : 239
4DZ4 : A W V H E H G A R A T L E R I E S I V G G R P A Y L T F D I D C L D P A F A P G T G T E - V A G G L -----S S : 261
ALP : Q D K L K E E W E K A Q K E V E E -- E E R - R Y E E E R K I I E D T V V E F I I S S S S A D Q L S T S S S V T E G S G T : 321

```

```

          380          *          400          *          420          *
1GQ6 : REVLALLRCV--GDLKRVGFDVMEVSPLYDHG----- : 279
1WOI : AQQMKILAAA--AANNTVVGLDLVELAPNLDPT----- : 280
3LHL : REFQEIFKIIKNSNINIVGCDIVELSPDYDTT----- : 253
3NIO : IQAMEIIRGC--QGLDLIGCDLVEVSPFYDTT----- : 292
3PZL : TDVRRLIERL---SYKAVGFDIVEEFLYDN----- : 267
4DZ4 : AQALAIIRGL--GGVNLIGADVVEVAPAYDQS----- : 291
ALP  : RNKMIILENC---QDR---DKERRQNTLEQENDSDSSLKARESGLPEEHSSTLQSPSANSENS : 377

          440          *          460          *          480          *
1GQ6 : -----GITSILATEIGAEILLYQY--- : 297
1WOI : -----GRSELLMARLVMETLCEV--- : 298
3LHL : -----GVSTVIACKILREICLII--- : 271
3NIO : -----GNTSLLGANLLYEMLCVL--- : 310
3PZL : -----GNTSMLAAKLLQVFIASR--- : 285
4DZ4 : -----ETTAIAAAHVACDLLCLW--- : 309
ALP  : VSKGISQDQQPETEAEASHCGTNPQSAQDPPWNQQISNPFPTSKSEDVKKPKTL-ALEKSIHQ : 438

          500          *
1GQ6 : ---AR-A--H----- : 301
1WOI : ---FD-HV-L----- : 303
3LHL : ---SD-KI-K----- : 276
3NIO : ---PG-VVRR----- : 316
3PZL : ---EK-YY-K----- : 290
4DZ4 : ---RQRKAGA----- : 316
ALP  : IESPGERRKSIHGKLCSS : 457

```

Figura 11: Alineamiento de secuencias de estructuras resueltas de la familia de ureohidrolasas y Δ LIM-ALP. Alineamiento obtenido del servidor web Clustal Omega utilizando una matriz BLOSUM45. En círculos rojos se señalan los aminoácidos altamente conservados en la familia de las ureohidrolasas involucrados en la coordinación del cofactor metálico. Intensidad de color indica mayor porcentaje de identidad entre las secuencias alineadas. **Códigos PDB:** Agmatinasas de *Streptomyces clavuligerus* (1GQ6), *Deinococcus radiodurans* (1WOI), *Clostridium difficile* (3LHL), *Burkholderia thailandensis* (4DZ4), guanidina butirasa de *Pseudomonas Aeruginosa* (3NIO), y proclavamidato amidino hidrolasa de *Thermoplasma vulcanus* (3PZL).

A partir del alineamiento de secuencia de la Figura 11, se realizó un análisis a nivel de estructura secundaria, corrigiendo manualmente interrupciones de α -hélices y estructuras extendidas, de tal forma que las estructuras secundarias no se interrumpían por la aparición de “gaps”, como se plantea en la Figura 12. Este arreglo del alineamiento fue utilizado para crear el archivo de secuencias alineadas en formato *.pir* (Anexo 1) para generar el modelo de Δ LIM-ALP utilizando el programa Modeller.

Una vez ejecutado el programa Modeller, con el script que se presenta en el Anexo 2, se obtuvieron inicialmente 100 modelos (ALP001 al ALP100), de los cuales se seleccionó los 10 mejores según los valores de *DOPE score*. A los modelos seleccionados se les realizó una etapa de refinamiento en el servidor web GalaxyRefine, y un análisis de calidad por el servidor ProSa, que permite la identificación de errores de estructuras tridimensionales. Los puntajes de calidad son arrojados en el contexto de todas las estructuras de proteínas conocidas donde la energía es evaluada mediante el *Z-score*. Este *score* indica la calidad total del modelo y mide la desviación total de la energía de la estructura con respecto a la distribución de energía derivada de conformaciones al azar. Es así que valores negativos de *Z-score* son indicativos de una buena calidad del modelo (Wiederstein & Sippl, 2007). Los valores de la calidad *Z-score* de los 10 mejores modelos luego del refinamiento por GalaxyRefine se muestran en la Tabla 3.

Nombre	Secuencia / Estructura Secundaria
1GQ6	-----SPRYAQIPTFMRPLH-----DPQ-PRGYDVVIGAPYDGGTSYRPGARFGPQAIRSESL -----EEEEEE-----HHHHHHHHHHHH
1WOI	-----GPAHLPYGGIPTFARAPL-----VQPDG-DWQADVAAALGVFPDIALGFRPGARFAPRALREASL -----EEEEEE-----HHHHHHHHHHHH
3LHL	-----NNYEESNLIVFGVFGDGTTSNRPGARFASSSMRKEFY -----EEEEEE-----HHHHHHHHHHHH
3NIO	-----NLHQPLGGNEMPRFGGIATMMRLPH-----VQSPAELDALDAAFVGVPLDIGTSLRSGRTRFGPREIRAESV -----EEEEEE-----HHHHHHHHHHHH
3PZL	-----ASELRSIFSLKKIAD-----AVN-G-YEEAKYVVFVGFDFNTSSYRRGSKYAPDSIRGAYV -----EEEEEE-----HHHHHHHHHHHH
4DZ4	TLYGDGAIIRPSVYGSSIENTYAGVLSFMRRNY-----TRDLGVDVVVSGVPLDLATFRSGARLGFSAVRAASV -----EEEEEE-----HHHHHHHHHHHH
1ALP	-----MVTPRPYSQPKNSQEVLLKTFKVDGKVSMMGETARGDVEGKEKEDPTAVAPGPSLTKSQMFEQVA

Nombre	Secuencia / Estructura Secundaria
1GQ6	IHGV-----GIDRGPFTDLINCVDAAGDINLTPFDMNIAIDTAQSHLSGLL -----HHHHHHHHHHHHHHHHHH
1WOI	RSVPPF-----TGLDGKTRLQGVTFADAGDVILPSLEPQLAHDRI TEAARQVR HHH-----HHHHHHHHHHHHHHHHHH
3LHL	GLETY-----SPFL-DLDLEDYNICDYGDLEISVGSTEQVLEKIYQETYSKIV -----EEEE-----HHHHHHHHHHHHHHHHHH
3NIO	MIRPY-----NMGATGAAPFDSLNVADIGDVAINFNLLAVRIIEQEQYDRIL H-----HHHHHHHHHHHHHHHHHH
3PZL	NLESY-----EYSYGIDLL-ASGMADLGDMEES-EDVEYVIDIVESVVSAMV H-----HHHHHHHHHHHHHHHHHH
4DZ4	QLAEL-----NPYPWFDFPFDLAVIDYGDGCFDAHHPLSIKPAIVEHARTIL HH-----HHHHHHHHHHHHHHHHHH
1ALP	TVH-GSPVQVKQGSNSIEINIKKPNPPELTAASEET-ESNGRDDENGEESGARDVELDSAEQHFHTTVTRCSPTVA

Nombre	Secuencia / Estructura Secundaria
1GQ6	-----KANAFLMIGGDHSLTVAALRAVAEQHG-PLAVVHLDAHSDTNP -----EEEEEE-----HHHHHH-----EEEE-----
1WOI	-----GRCRVVFLGGDHSVSYPLLRADFADV-P-DLHVQQLDAHLDFTD -----EEEEEE-----HHHHHHHH-----EEEE-----
3LHL	-----RDSKVPFMIGGEHLVTLPAFKAVHEKYN-DIYVIHFDAHTDLRE -----EEEEEE-----HHHHHHHH-----EEEEEE-----
3NIO	G-----HGILPLTLGGDHTITLPLILRAIKKKHG-KVGLVHVDAHADVND H-----EEEE-----HHHHHHHHHH-----EEEEEE-----
3PZL	-----SDGKIPIMLGGEHSITVGAVRALPKD---VDLVIVDHSDFRS -----EEEEEE-----HHHHHH-----EEEE-----
4DZ4	Q-----SDARMLTLGGDHYITYPLLIHAQAQYKPLSLIHFDAHCDTWA H-----EEEEEE-----HHHHHHHHHHHH-----EEEEEE-----
1ALP	LVEFSSSPQLRNEVPEEQDKKPENEMSGKVELVLVLSQKAKPKSPEPEATLTFPFLDKMPET-D-QLHLPLNLSQADSP-

Nombre	Secuencia / Estructura Secundaria
1GQ6	AFYGGRYHHGTPFRHGIDEKLIDPAAMVQIGIRGHNPKPDSLDYARGHGVRVVTAEFGELGVGGTADLIREKV-GQRPV -----HHHHHH-----EEEEEE-----HHHHHHHH-----EEEE-----HHHHHHHHHHHH-----E
1WOI	TRNDTKWSNSSPFRACEA-LPNLVHITVGLRGLRFDPEAVAAARARGHTIIPMDVDTADLAGVLAQLP-----RQNV -----HHHHHHHH-----EEEEEE-----HHHHHHHHHH-----EEEE-----HHHHHHHHHHHH-----EE
3LHL	EYNNKNSHATVIKRIWD--IVGDNKIFQFGIRSGTK--EEFKFATEEKHTYMEI-----GGIDTFENIVNML-NGKNI -----HHHHHHHH-----EEEEEE-----HHHHHHHH-----EEEE-----HHHHHHHHHHHH-----E
3NIO	HMFGEKIAHGTTFRRAVEEDLLDCDRVQIGLRAQGYTAEDFNWSRKQGFVQAECEWHKSLPLMAEVREKV-GGGPV -----HHHHHHHH-----EEEEEE-----HHHHHHHHHH-----EEEEEE-----HHHHHHHHHHHH-----E
3PZL	SYMGNKYNHACVTRRALD--LLGEGRITSIGIRSVSREEFEDPDF--RKVSFISSFVVKNGIDKYIEEVDR---KSRRV -----EE-----EEEEEE-----HHHHHHHHHH-----EEEEEE-----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----E
4DZ4	DDAPDSLNHGTMFYKAVKGLIDPKASVQVGIWDDYLGINVLDAAWH-----EHGARATLIERIESIV-GRRPA -----HHHHHH-----EEEEEE-----HH-----E
1ALP	--SSEKSPASTPFKFWAD-----PEEERRRQE---KWQEQERLLQERYQKQD---KLKEWEKAQKEVEEEERR

Nombre	Secuencia / Estructura Secundaria
1GQ6	YVSV DIDV V D P A-----F A P G T G T P A P G G L L S R E V L A L L R C V G--D L K F V G F D V M E V S P L Y D H G-- E E E E E-----H H H H H H H H H H-----E E E E E E E E
1WOI	Y F S V D V D G F D P A-----V I P G T S S P E P D G L T Y A Q G M K I L A A A A A--N N T V V G L D L V E L A P N L D P T G-- E E E E-----H H H H H H H H H H-----E E E E E E E E
3LHL	Y L T I D L D V L D A S-----V F P G T G T P E P G G V N Y R E F Q E I F K I I K N S N I N I V G C D I V E L S P D Y D T T G-- E E E E E-----H H H H H H H H H H-----E E E E E E E E
3NIO	Y L S F D I D G I D P A-----W A P G T G T P E I G G L T T I Q A M E I I R G C Q--G L D L I G C D L V E V S P P Y D T T G-- E E E E-----H H H H H H H H H H-----E E E E E E E E
3PZL	Y I S V D M D G I D P A-----Y A P A V G T P E P F G L A D T D V R R L I E R L---S Y K A V G F D I V E F S P L Y D N G-- E E E E E-----H H H H H H H H H H-----E E E E E E E E
4DZ4	Y L T F D I D C L D P A-----F A P G T G T P V A G G L S S A Q A L A I V R G L G--G V N L I G A D V V E V A P A Y D Q S E-- E E E E E-----H H H H H H H H H H-----E E E E E E E E
1ALP	Y Y E E E R K I I E D T V W P F T I S S S S A-----D Q L S T S S S V T E G--S G T R N K M D L E N C Q---D R D K E R R Q N T P L Q E N D S D

Nombre	Secuencia / Estructura Secundaria
1GQ6	-----G I T S I L A T E I H H H H H H H H H H
1WOI	-----R S E L L M A R L H H H H H H H H H H
3LHL	-----V N S T V I A C K I H H H H H H H H H H
3NIO	-----N T S L L G A N L H H H H H H H H H H
3PZL	-----N T S M L A A K L H H H H H H H H H H
4DZ4	-----I T A I A A A H V H H H H H H H H H H
1ALP	S S L K A R E S G L P E E H S S L T Q S P S A N S E N S V S K G I S Q D Q Q P E T E A E A S H C G T N P Q S A Q D P P W N Q Q I S N P P T S K S E D V K P K T L

Nombre	Secuencia / Estructura Secundaria
1GQ6	G A E L L Y Q Y A R A H----- H H H H H H H H H H
1WOI	V M E T L C E V F D H V L----- H H H H H H H H H H
3LHL	L R E L C L I I S D K I K----- H H H H H H H H H H
3NIO	L Y E M L C V L P G V V R R----- H H H H H H H H H H
3PZL	L Q V F I A S R E K Y Y K----- H H H H H H H H H H
4DZ4	A C D L L C L W R Q R K A G A----- H H H H H H H H H H
1ALP	A L E K S I N H Q I E S P G E R R K S I S G K K L C S S

Figura 12: Alineamiento de secuencias y estructura secundaria de estructuras resueltas de la familia de ureohidrolasas y Δ LIM-ALP.

Alineamiento de secuencia correspondiente al de la figura 11, obtenido del servidor web Clustal Omega utilizando una matriz BLOSUM45 el cual se encuentra alineado a la estructura secundaria resuelta y dispuesta en el archivo PDB de cada una de las estructuras moldes a utilizar en MODELLER.

***Códigos PDB:** Agmatinasas de *Streptomyces clavuligerus* (1GQ 6), *Deinococcus radiodurans* (1WOI), *Clostridium difficile* (3LHL), *Burkholderia thailandensis* (4DZ4), guanidina butirasa de *Pseudomonas Aeruginosa* (3NIO), y proclavamidato amidino hidrolasa de *Thermoplasma vulcanus* (3PZL).

Tabla 2: Resumen de valores Z-score de los diez mejores modelos obtenidos por Modeller y analizados con ProSa.

MODELO OBTENIDO POR MODELLER	PROSA (Z-SCORE)
ALP022	-1.44
ALP026	-0.68
ALP030	-0.65
ALP034	-1.26
ALP041	-0.82
ALP042	-1.08
ALP060	-0.45
ALP064	-0.56
ALP088	-0.44
ALP095	-0.18

Del análisis de estos resultados se seleccionó el modelo n°22 (ALP022) como mejor modelo obtenido, ya que fue el que presento mejores parámetros de calidad *Z-score* con un valor de -1.44, estos resultados se presentan en la Figura 13-A.

El servidor ProSa genera, además, un gráfico de la energía obtenida para los aminoácidos de forma individual en función de su posición en la secuencia, en este caso, valores positivos indican partes erróneas en la estructura. El análisis de la energía de cada residuo de forma individual dentro de la secuencia del gráfico resultante se muestra en la Figura 13-B, donde se observa que hay regiones del modelo que no poseen una baja energía (<0), necesaria para indicar un buen posicionamiento.

El modelo seleccionado (modelo n°22) se volvió a refinar en el servidor web de Yasara de minimización energética, para mejorar los parámetros de calidad, ya que los valores obtenidos están en el límite inferior de calidad. El modelo obtenido de la minimización energética fue analizado y comparado nuevamente por el servidor PsoSa y, además, por el servidor PROCHECK para evaluar la calidad estereoquímica de la estructura.

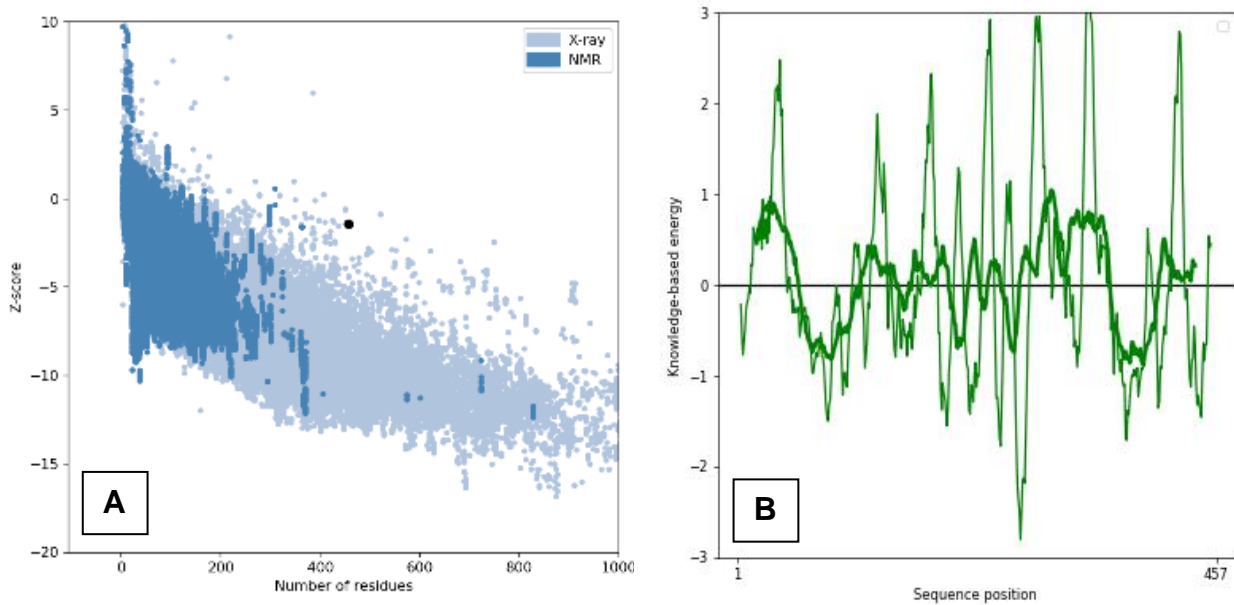


Figura 13. Análisis de calidad por ProSA del mejor modelo obtenido por Modeller. A) Gráfico obtenido del servidor ProSA al comparar el *z-score* del modelo ALP022, con los *Z-score* de proteínas de tamaño y estructura similar, el valor obtenido corresponde a un *Z-score* de -1.44. **B)** Gráfico de la evaluación energética a lo largo de la secuencia del modelo obtenido con ProSA, el cual calcula la energía promedio cada 40 aminoácidos en color verde oscuro y cada 10 aminoácidos en color verde más atenuado.

Al analizar los resultados obtenidos por ProSa en la Figura 14 para el modelo luego de la minimización energética, se obtuvo un *Z-score* de -2.72, y aunque este valor no es ideal, es más bajo y se encuentra cercano al rango esperado para proteínas con estructura definida de tamaño similar. El análisis de la energía de cada residuo de forma individual dentro de la secuencia presentado en la Figura 14-B continúa mostrando, después de la minimización energética, que hay regiones en el modelo que aún poseen energías mayores a cero, pero al comparar este resultado con el obtenido previamente a la minimización energética con Yasara, se observa una mejora en las regiones presentadas en color verde oscuro.

En relación a la evaluación estereoquímica del modelo escogido se utilizó PROCHECK para realizar el respectivo análisis cuyo resultado principal corresponde al gráfico de Ramachandran presentado en la Figura 15, en el cual se puede apreciar que los residuos del modelo generado se encuentran en un 84,2% en zonas color rojo energéticamente favorables con ángulos de enlace peptídico permitidos, y un 13.7 % en regiones permitidas adicionales en color amarillo obteniendo un total del 97,9% de residuos con una estereoquímica aceptable y un 2% de residuos estarían en zonas con problemas en su estereoquímica, resultados que se aprecian mejor en la Tabla 3 del análisis estadístico del gráfico de Ramachandran.

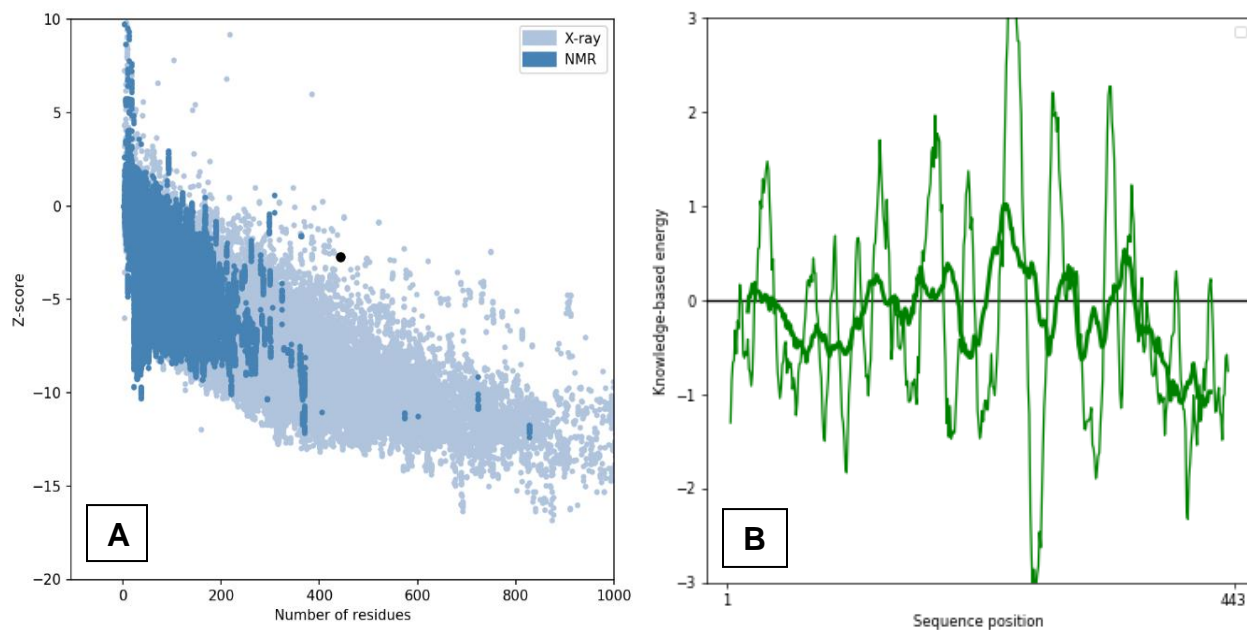


Figura 14. Evaluación del modelo final de Δ LIM-ALP a través de ProSA. A) Gráfico obtenido del servidor ProSA al comparar el z-score del modelo con los Z-score de proteínas de tamaño y estructura similar, el valor obtenido corresponde a un Z-score de -2.72. **B)** Gráfico de la evaluación energética a lo largo de la secuencia del modelo obtenido con ProSA, el cual calcula la energía promedio cada 40 aminoácidos en color verde oscuro y cada 10 aminoácidos en color verde más atenuado.

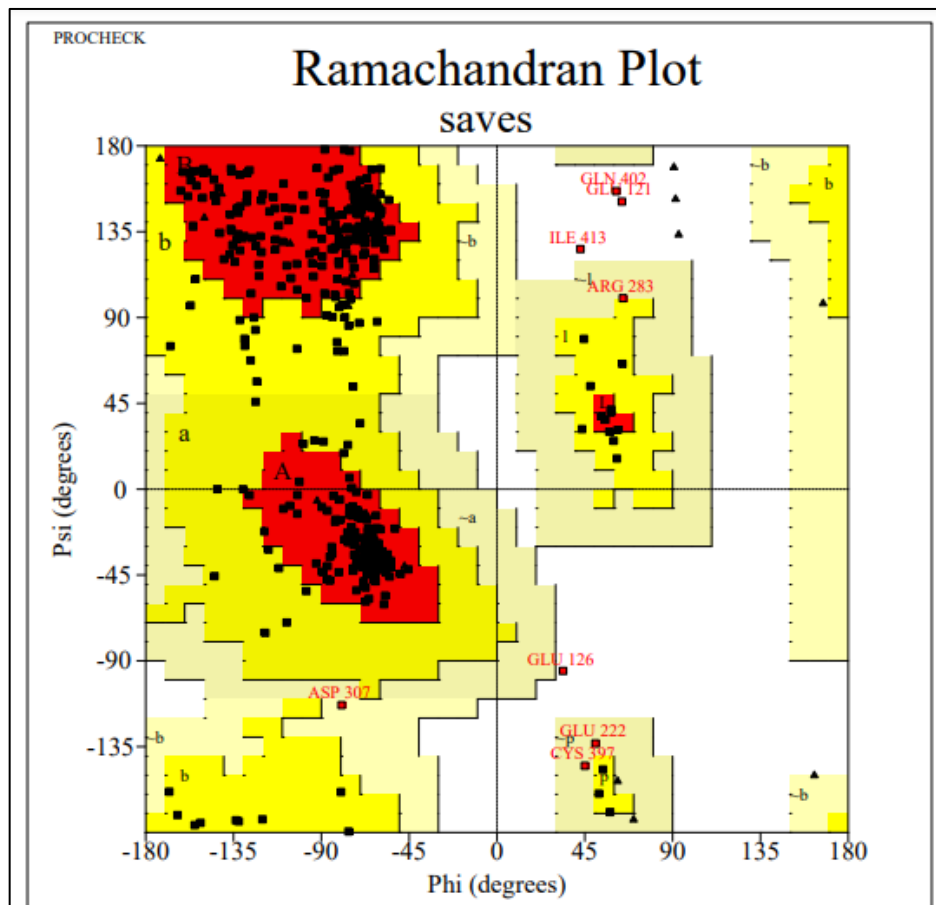


Figura 15. Gráfico de Ramachandran del modelo de Δ LIM-ALP por PROCHECK. Evaluación de la calidad estereoquímica del modelo refinado, donde en color rojo correspondería a las zonas de residuos favorablemente permitidas, en amarillo las zonas adicionalmente permitidas, y en amarillo pálido las generosamente permitidas. Se destacan en letras rojas los residuos E222, R283, D307, C397 en zonas generosamente permitidas y los residuos E121, E126, I143, y Q402 en zonas de valores no permitidos.

Tabla 3: Análisis estadístico de gráfico de Ramachandran del modelo de Δ LIM-ALP.

	N° de residuos	%
<i>Regiones más favorecidas [A.B.L]</i>	326	84.2
<i>Regiones permitidas adicionales [a,b,l,p]</i>	53	13.7
<i>Regiones generosamente permitidas [~a,~b,~l,~p]</i>	4	1.0
<i>Regiones no permitidas</i>	4	1.0
-----	-----	-----
<i>Residuos Totales (excl. Gly Y Pro)</i>	387	100.0
<i>Residuos Terminales (excl. Gly Y Pro)</i>	1	
<i>Residuos de Glicina (triángulos)</i>	18	
<i>Residuos De Prolina</i>	37	
-----	-----	-----
<i>Número total de residuos</i>	443	

El modelo obtenido se presenta en la Figura 16-A, en el cual se observa un plegamiento general de las proteínas de la familia de ureohidrolasas, presentando una conformación tipo sandwich con 8 estructuras extendidas centrales, rodeando 7 α -hélices y se destacan 3 regiones de la secuencia aminoacídica que estarían conformando grandes loops que van desde el aminoácido T65 a E112, L143 a K183, y N340 a K420, las cuales no se alinean con las secuencias de las proteínas de la familia de las ureohidrolasas y tampoco con otras secuencias. Para una mayor apreciación del modelo, se presenta el modelo sin estos loops en la Figura 16-B.

Al comparar el modelo final obtenido para Δ LIM-ALP sin las secuencias de los *loops*, a través de un alineamiento estructural, con algunas de las estructuras utilizadas para el modelamiento (1GQ6, 1WOI y 3LHL) en la Figura 17, se aprecia que el modelo de Δ LIM-ALP, presenta similitud estructural con las estructuras de las ureohidrolasas, donde se obtuvo una mayor similitud estructural con la agmatinasa de *E. coli* (1WOI) con un valor de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de 1,046.

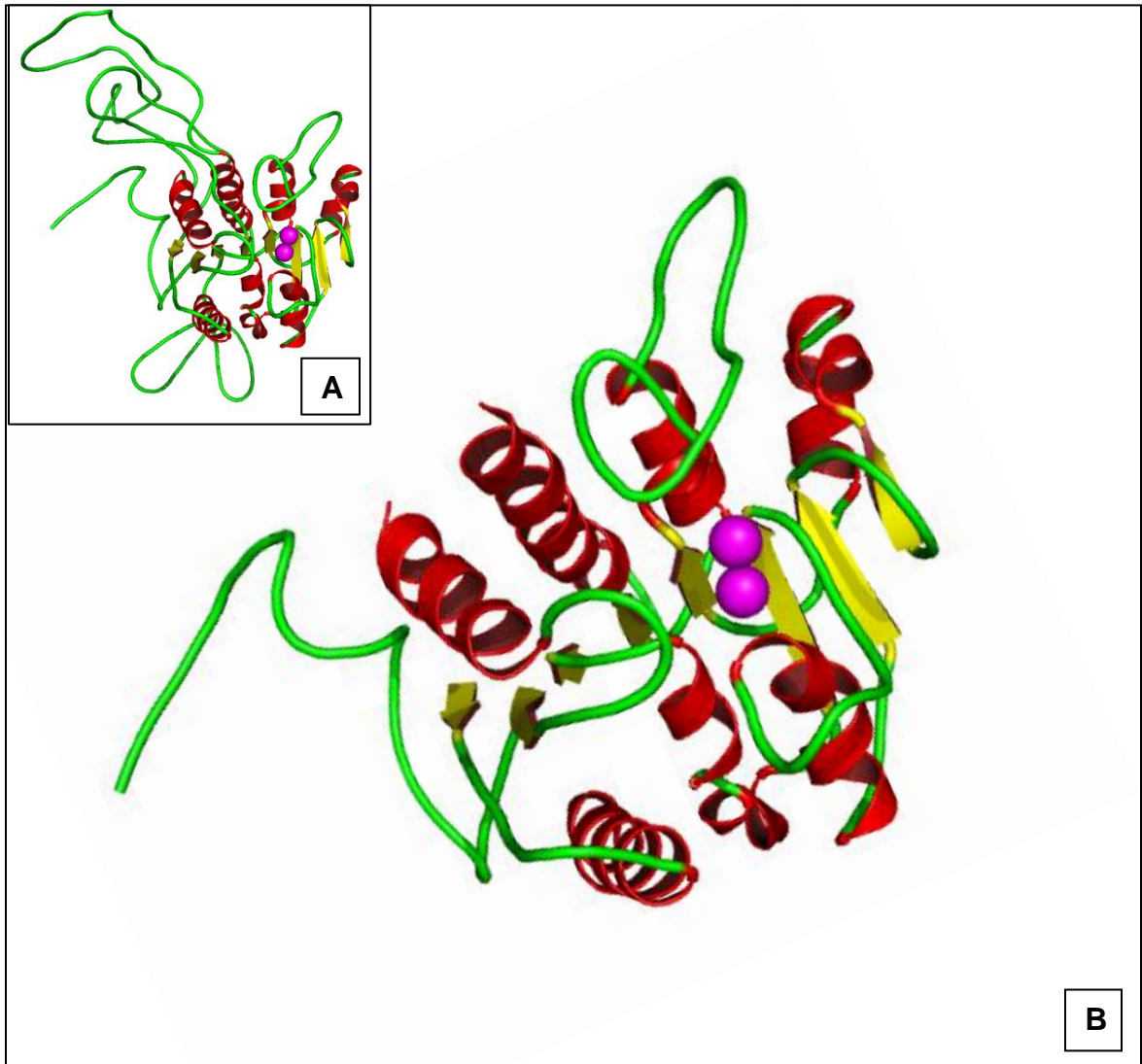


Figura 16. Modelo final propuesto para Δ LIM-ALP generado con Modeller.

En **A** se presenta modelo final obtenido de la secuencia completa de Δ LIM-ALP entregada por Modeller, donde se aprecian en color rojo 7 α -hélices, 8 estructuras extendidas en el centro de la estructura en color amarillo, y loops en color verde de Δ LIM-ALP, en **B** se presenta el modelo de Δ LIM-ALP sin las regiones de secuencia que contemplan los loops desde T65 a E112, L143 a K183, y N340 a K420.

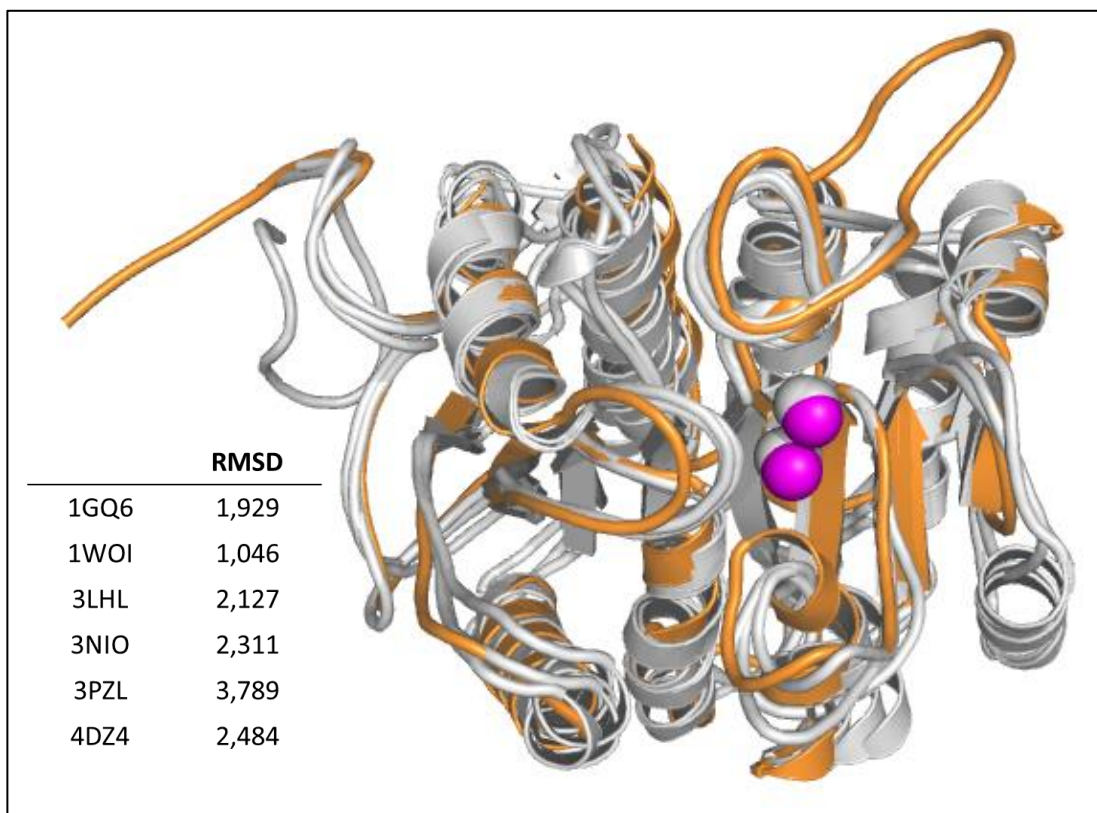


Figura 17. Alineamiento estructural de modelo final propuesto para Δ LIM-ALP con estructuras de miembros de las ureohidrolasas. Se presenta alineamiento estructural del modelo final de Δ LIM-ALP en color naranja, con los iones de Manganeso en color magenta, sin las regiones de secuencia que contemplan los loops desde T65 a E112, L143 a K183, y N340 a K420, alineada con las estructuras 1GQ6, 1WOI y 3LHL en color gris, que mostraron los tres mejores valores de RMSD, los cuales se presentan en la esquina inferior izquierda junto a los resultados de RMSD con las demás estructuras de agmatinasas utilizadas para el modelamiento, calculadas con el método “*super*” en PyMol.

Los valores de RMSD obtenidos que se presentan en la Figura 17 con las estructuras de las agmatinasas utilizadas como molde en MODELLER, fueron calculados con el método “*super*” del programa PyMol que realiza una alineación de programación dinámica basada en la estructura, independiente de la secuencia aminoacídica.

Finalmente, en la Figura 18 se presentan los aminoácidos que estarían coordinando con el cofactor de Mn^{2+} en el modelo final para Δ LIM-ALP, los cuales serían E190, N213, Q215, D217, E288, K290 y N340. Al analizar estos aminoácidos en un alineamiento estructural de Δ LIM-ALP con los aminoácidos del clúster de Mn^{2+} en la familia de ureohidrolasas se proponen que E190, N213, Q215, D217, E288 y K290 estarían coordinando con los iones de Mn^{2+} o cumpliendo el rol de los aminoácidos altamente conservados en la familia de ureohidrolasas los cuales se presentan en la tabla 5.

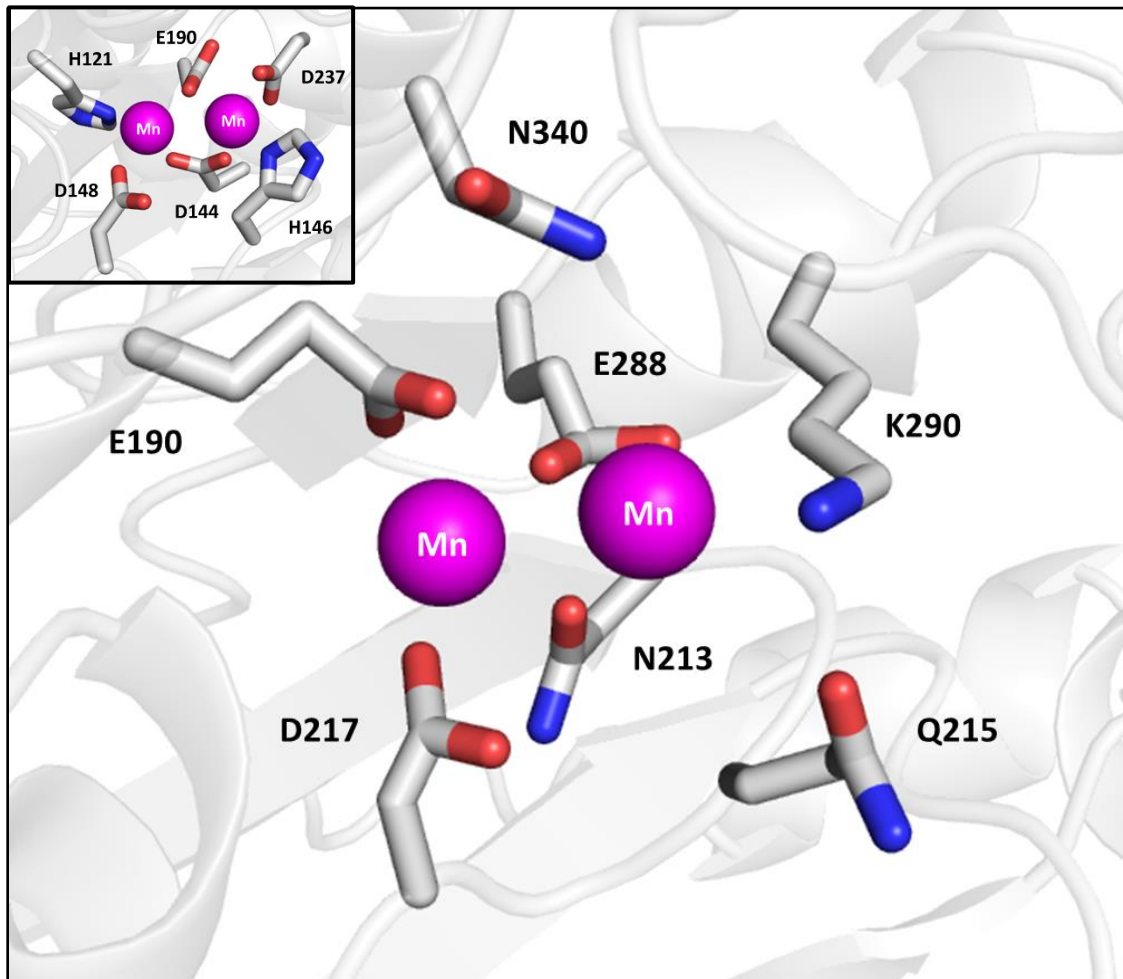


Figura 18: Esquema de residuos propuestos para el sitio de unión de Mn^{2+} en Δ LIM-ALP. Se presentan los grupos radicales de los residuos que estarían interaccionando con el cofactor de manganeso los cuales serían E190, N213, Q215, D217, E288, K290 y N340, y en la esquina superior izquierda a modo de comparación se presentan los residuos de la AGM de *E coli*. (1WOI) los cuales son altamente conservados. En el esquema se representan en color magenta los iones de manganeso, en rojo los átomos de oxígeno y en azul los átomos de nitrógeno.

Tabla 4: Análisis comparativo de residuos propuestos para el sitio de unión de Mn²⁺ en ΔLIM-ALP.

ALP	1GQ6	1WOI	3LHL	3NIO	3PZL	4DZ4
E190	H121	H121	H111	H129	H124	H135
N213	D144	D143	D138	D152	D144	D152
Q215	H146	H145	H136	H154	H146	H161
D217	D148	D147	D128	D156	D148	D163
E288	D235	D229	D214	D243	D229	D242
K290	D237	D231	D217	D245	D231	D244

***Códigos PDB:** Agmatinasas de *Streptomyces clavuligerus* (1GQ6), *Deinococcus radiodurans* (1WOI), *Clostridium difficile* (3LHL), *Burkholderia thailandensis* (4DZ4), guanidina butirasa de *Pseudomonas Aeruginosa* (3NIO), y proclavamidato amidino hidrolasa de *Thermoplasma vulcanus* (3PZL).

8.2 Expresión y purificación de las variantes mutadas E288A/K290A y N213A/Q215A/D217A.

Previo a la expresión proteica en *E. coli* JM109, se realizó una estandarización en diferentes condiciones, variando la concentración de IPTG y el tiempo de inducción a 30°C, cuyos resultados se muestran en la Figura 19 a través de western blot. Se seleccionó por análisis densitométrico la condición donde se utilizó 0,5 mM de IPTG durante 16 horas a 30°C y bajo estas condiciones se realizaron las posteriores expresiones.

La obtención de las variantes E288A/K290A y N213A/Q215A/D217A generadas en el vector H6pQE60- Δ LIM-ALP mediante PCR, se verificaron mediante secuenciación automática y los resultados se analizaron con el programa ChromasPro 1.5 y el servidor web Clustal Omega, donde se corroboró el cambio de los aminoácidos propuestos como ligandos del cofactor Mn²⁺ por Alanina. Las mutantes doble (E288A/K290A) y triple (N213A/Q215A/D217A) de Δ LIM-ALP se expresaron en bacterias *E. coli* JM109 y se purificaron parcialmente a través de cromatografía de intercambio iónico DEAE-celulosa, columna equilibrada con Tris 10 mM, pH 7,5. Como se mencionó en la metodología, Δ LIM-ALP eluye de la columna con una concentración de 250 mM de KCl, que corresponde al primer máximo de actividad enzimática que se observa en la Figura 20-A, como control.

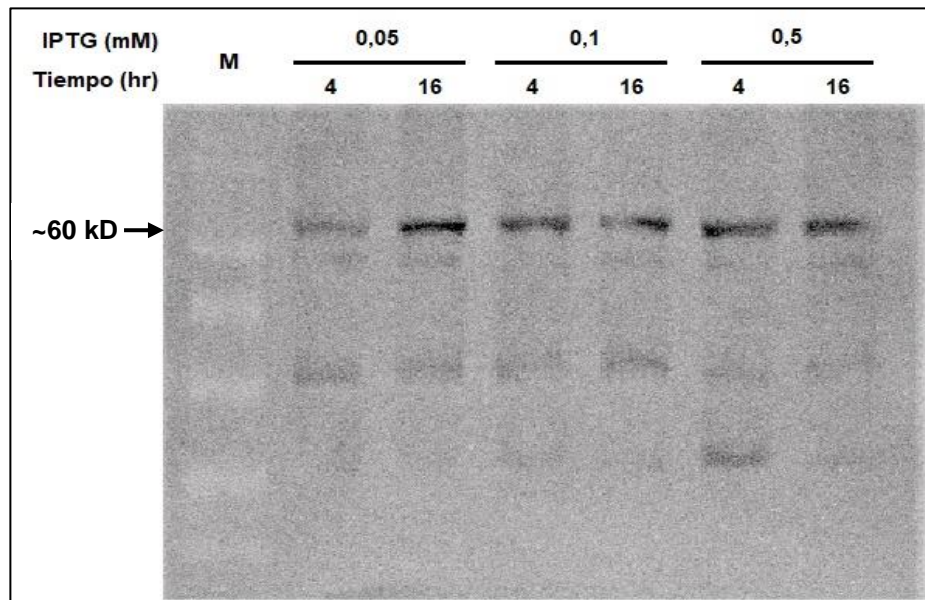


Figura 19: Western Blot de la estandarización de la expresión de Δ LIM-ALP en distintas condiciones. La expresión proteica de Δ LIM-ALP con tiempos de 4 y 16 horas de incubación a 30°C, y distintas concentraciones de IPTG (0.05 mM, 0.1 mM y 0.5 mM). Se señalan con flecha negra el tamaño en pb correspondiente a Δ LIM-ALP. Se utilizó el anticuerpo anti-ALP dilución 1:2000.

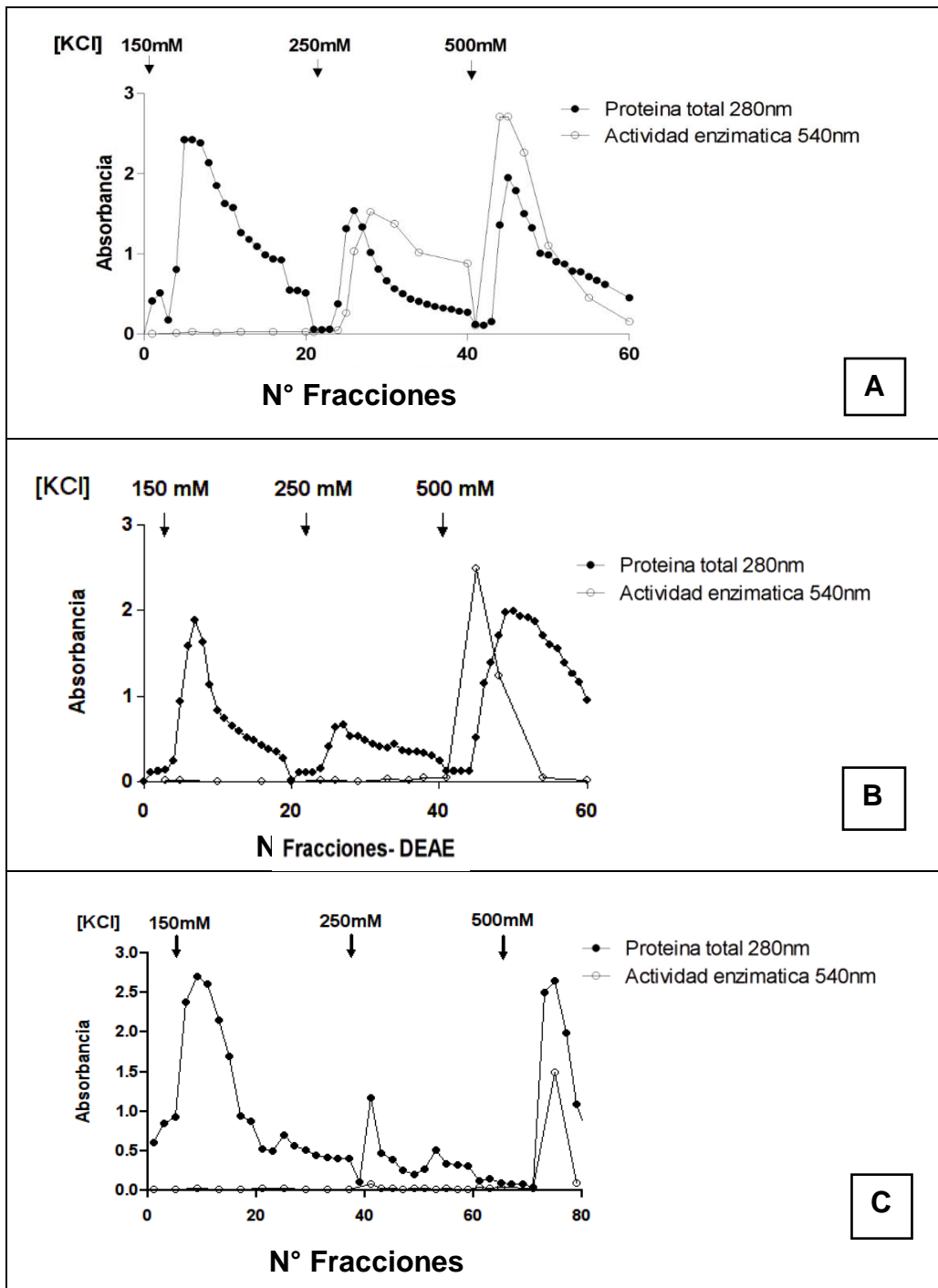


Figura 20: Cromatograma de Δ LIM-ALP y las variantes mutadas, desde columna de intercambio iónico-DEAE celulosa (Tris 10 mM, pH 7,5). Se presenta el perfil de proteínas totales medidas a λ 280 nm (círculos negros) y la actividad agmatinasa medidas a λ 540 nm (círculos blancos) en (A) Δ LIM-ALP, (B) mutante doble, y (C) de la mutante triple expresadas. Con flechas se indican las fracciones en las que comienza la elución a las distintas concentraciones de KCl.

Al eluir las variantes mutadas de la columna DEAE las variantes mutadas, como se muestra en los perfiles cromatográficos de la mutante doble y triple (Figura 20 B-C), se observa sólo un máximo de actividad enzimática que eluye con 500 mM de KCl y que corresponde a la actividad agmatinasa endógena de *E. coli*, lo cual ha sido estandarizado previamente en nuestro laboratorio.

La purificación parcial de Δ LIM-ALP y las variantes mutadas se realizó en una cromatografía de intercambio aniónico por DEAE-celulosa, a pesar de poseer el epítotope 6xHis, debido a que estas variantes de ALP no se retienen en la columna de Ni²⁺-NTA agarosa.

La presencia de las especies mutadas inactivas, en las fracciones eluidas con 250 mM de KCl, se verificó a través de ensayos western blot donde se identificó la presencia de la mutante doble y triple, utilizando un anticuerpo policlonal específico para ALP (anti-ALP) en una dilución de 1:2000, y se observó una banda de aproximadamente 60 kDa, valor esperado para Δ LIM-ALP como se muestra en la Figura 21. El grado de pureza de las fracciones eluidas fue determinado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE al 12%).

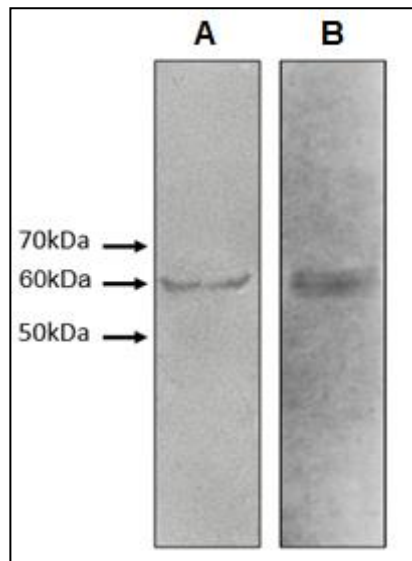


Figura 21: Identificación por Western blot de la variante doble y triple mutadas obtenidas por cromatografía de intercambio iónico-DEAE celulosa. En el carril **A** se observa banda de 60 kDa aproximadamente correspondiente a la mutante doble y en el carril **B** a la mutante triple de Δ LIM-ALP. Se utilizó un anticuerpo anti-ALP dilución 1:2000.

8.3 Análisis de las variantes mutadas N213A, Q215A, D217A, E288A y K290A.

La obtención de las variantes mutadas generadas Δ LIM-ALP en el vector H6pQE60- Δ LIM-ALP mediante PCR, fueron analizadas preliminarmente a través de ensayos de restricción realizados al producto PCR obtenido para verificar la presencia de la secuencia codificante de Δ LIM-ALP, donde se obtuvieron los tamaños esperados, tanto del vector de 3400 pb, como del inserto de 1500pb aproximadamente, que se puede observar en la Figura 22, para cada una de las variantes. Los mismos productos PCR señalados en la Figura 22 se verificaron mediante secuenciación automática y los resultados se analizaron con el programa ChromasPro 1.5 y el servidor web Clustal Omega, donde se corroboró el cambio de los aminoácidos propuestos como ligandos del cofactor Mn^{2+} por Alanina en la secuencia codificante de los aminoácidos propuestos, donde no se observaron mutaciones no deseadas.

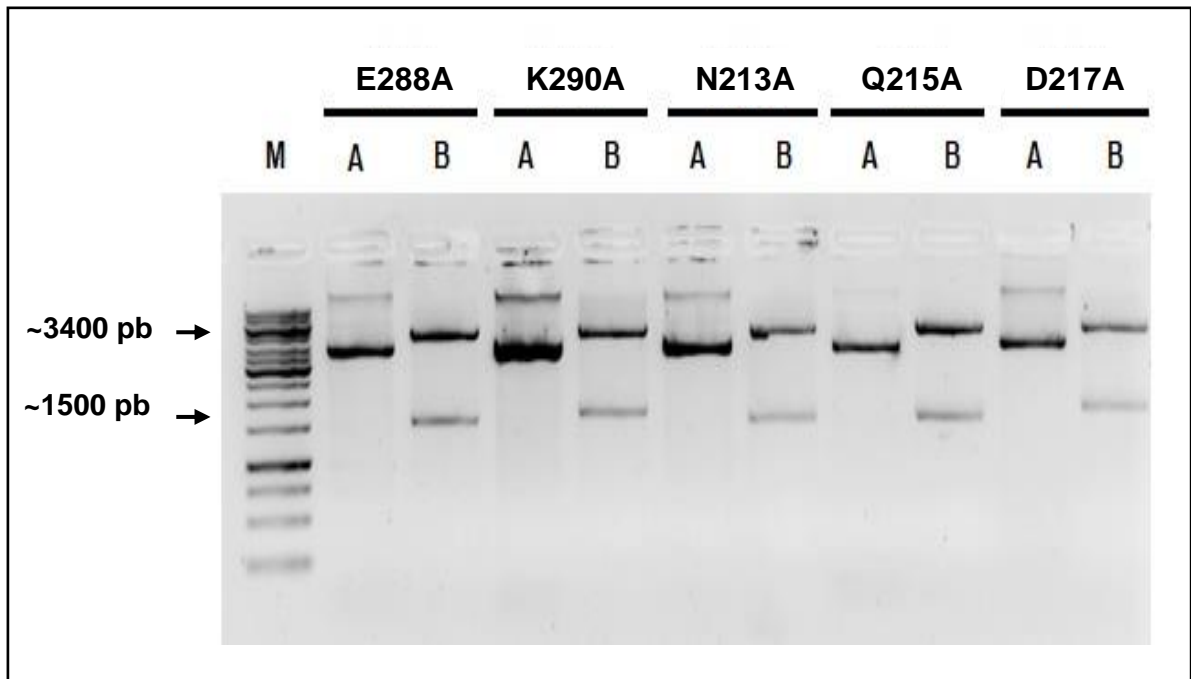


Figura 22: Análisis de restricción de las mutantes simples de Δ LIM-ALP en el vector H6pQE60. Resultados obtenidos de electroforesis en gel de agarosa al 1%. En el carril **M** se observa perfil electroforético del marcador de peso molecular de 1Kb, en los carriles **A** el vector H6pQE60 sin digerir como control y en **B** el vector digerido de cada mutante de Δ LIM-ALP correspondiente. Se señalan con flechas negras los tamaños aproximados en pb de las bandas correspondiente.

8.4 Expresión y purificación de las variantes simples mutadas.

Las mutantes D217A, E288A, y Δ LIM-ALP se expresaron en bacterias *E. coli* JM109 y se realizó una cromatografía por columna de intercambio iónico DEAE-celulosa equilibrada con Tris 10 mM, pH 7,5. Como se mencionó en la metodología, Δ LIM-ALP eluye de la columna con una concentración de 250 mM de KCl, que corresponde al primer máximo de actividad enzimática que se observa en la Figura 20-A como control. Al someter a la columna DEAE las variantes mutadas, como se muestra en los perfiles cromatográficos de la mutante D217A y E288A en la Figura 23, se observa sólo un máximo de actividad enzimática que eluye con 500 mM de KCl y que corresponde a la actividad agmatinasa endógena de *E. coli*, lo cual ha sido estandarizado previamente en nuestro laboratorio.

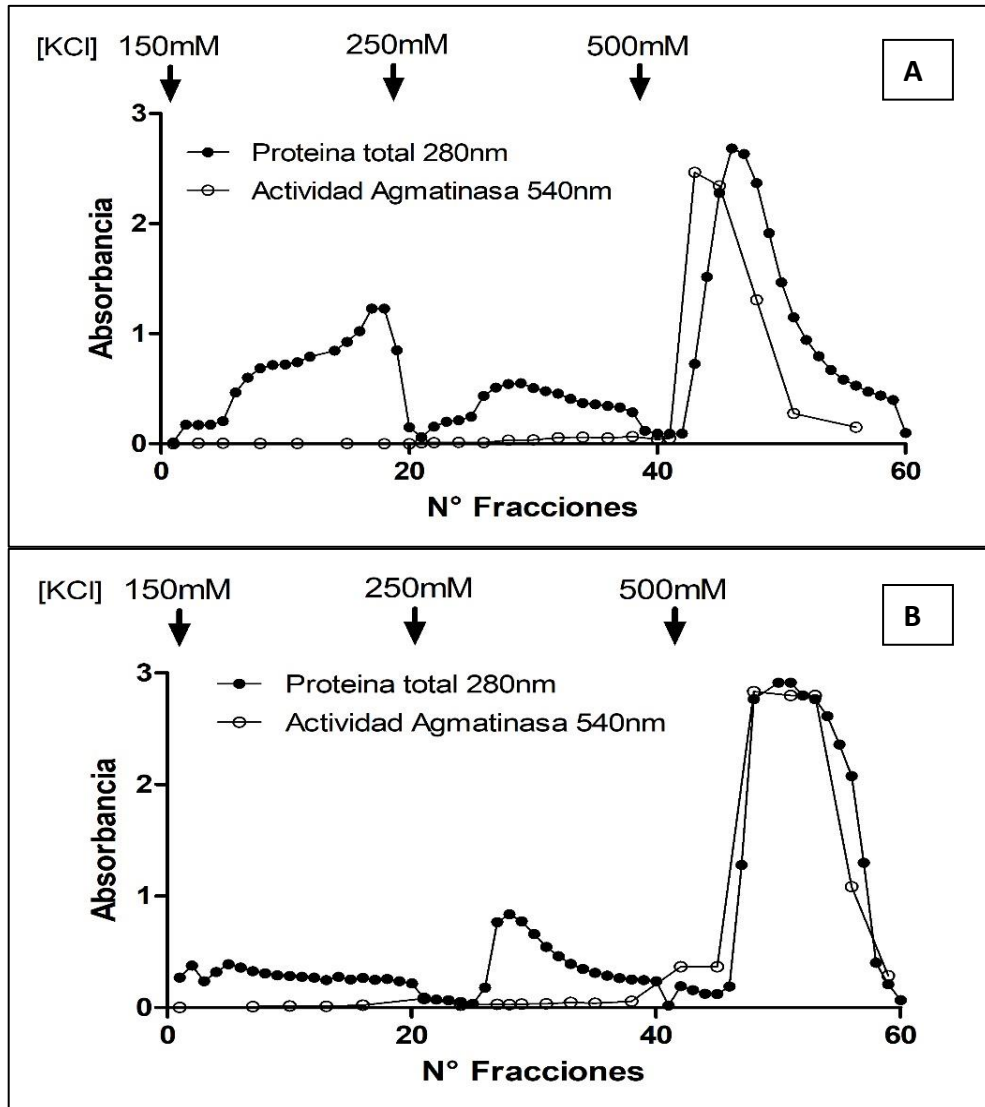


Figura 23: Cromatograma de las variantes mutadas D217A y E288A, desde columna de intercambio iónico-DEAE celulosa (Tris 10 mM, pH 7,5). Se presenta el perfil de proteínas totales cuantificadas a λ 280 nm (círculos negros) y la actividad agmatinasa cuantificada a λ 540 nm (círculos blancos) en **A de D217A, en **B** de E288A. Con flechas se indican las fracciones en las que se adiciona las distintas concentraciones de KCl.**

La purificación parcial de Δ LIM-ALP y sus variantes D217A y E288A se realizó en una cromatografía de intercambio aniónico por DEAE-celulosa, a pesar de poseer el epítotope 6xHis, debido a que esta variante de ALP no se retienen en la columna de Ni^{2+} -NTA agarosa.

La presencia de las especies mutadas inactivas, en las fracciones eluidas con 250 mM de KCl, se verificó a través de ensayos Dot blot para ambas variantes cuyos resultados se observan en la Figura 24, donde para las distintas fracciones se observa presencia tanto de D217A, como de la variante E288A de Δ LIM-ALP.

Por otra parte, el Western blot realizado para la variante D217A de Δ LIM-ALP, que se muestra en la Figura 25, donde se identificó la presencia de las mutantes D217A y E288A, utilizando un anticuerpo policlonal específico para ALP (anti-ALP) en una dilución de 1:2000, y se observó una banda de aproximadamente 60 kDa para las fracciones 27 a la 32 de la cromatografía realizada para la variante D217A, valor esperado para Δ LIM-ALP.

El grado de pureza de las fracciones eluidas fue determinado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%, en condiciones denaturantes (Figura 25).

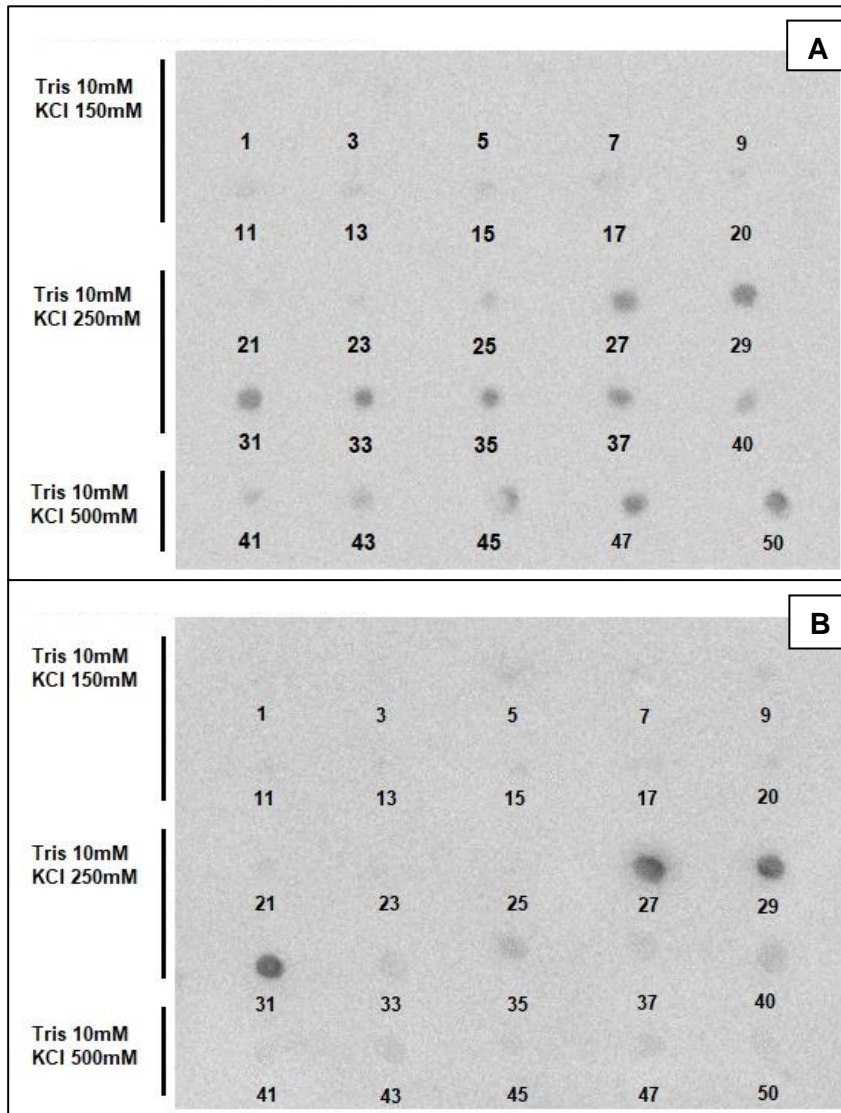


Figura 24: Dot Blot de las fracciones obtenidas de las variantes mutadas D217A y E288A, desde columna de intercambio iónico-DEAE celulosa (Tris 10 mM, pH 7,5). En (A) se detecta la presencia de D217A, y en (B) la variante E288A, en las fracciones eluidas que se presentan en los cromatograma de la figura 22 correspondiente a cada variante. Se utilizó un anticuerpo anti-ALP con dilución 1:2000 por 16 horas a 4°C.

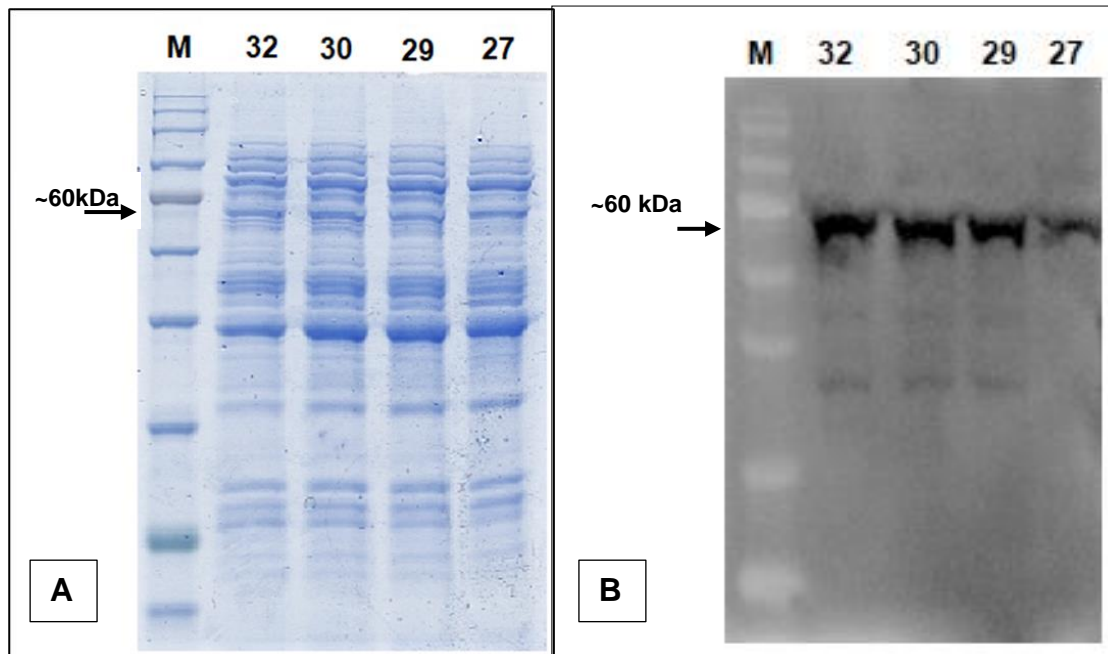


Figura 25: Identificación de fracciones eluidas de Δ LIM-ALP/D217A mediante gel de poliacrilamida SDS-PAGE y Western blot. En **A** se presenta separación de las proteínas por gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% con tinción de azul de comassie de las fracciones colectadas 27, 29, 30 y 32 correspondientes obtenidas durante la elución del perfil cromatográfico que se indica en la Figura 23, y en **B** se presenta la identificación de Δ LIM-ALP/D217A a través de la técnica *western blot* de estas fracciones, donde se utilizó anticuerpo anti-ALP dilución 1:2000 por 16 horas a 4°C.

8.5 Ensayos de actividad enzimática de las variantes de Δ LIM-ALP mutadas.

A pesar de no observar actividad enzimática luego de realizar la elución desde la columna de intercambio iónico, se realizaron ensayos en presencia y ausencia del cofactor Mn^{2+} 5 mM, previamente incubada a 65°C por 5 min y sin incubar, determinando la actividad agmatinasa a 37°C, donde la mutantes simple D217A, doble (E288A/K290A) y triple (N213A/Q215A/D217A) en Δ LIM-ALP, resultaron ser inactivas catalíticamente como agmatinasas *in vitro* en presencia de Mn^{2+} adicionando, incluso calentando previamente con Mn^{2+} .

Tabla 5: Resumen de parámetros cinéticos de ALP y sus variantes.

	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)
ALP-wt	3,0 ± 0.20	0,9 ± 0.2
ΔLIM-ALP	1,2 ± 0,04	10 ± 1
ALP-central	1,2 ± 0,37	0,4
ΔLIM-ALP/D217A	Sin Actividad	Sin Actividad
ΔLIM-ALP/E288A	Sin Actividad	Sin Actividad
ΔLIM-ALP/E288A/K290A	Sin Actividad	Sin Actividad
ΔLIM-ALP/N213A/Q215A/D217A	Sin Actividad	Sin Actividad

9. DISCUSIÓN

Dadas las importantes funciones que presenta agmatina en mamíferos (neurotransmisoras, regulación de la excreción de sodio, regulación de la liberación de insulina, ansiolítico, anti convulsionante, etc.), el estudio de las enzimas involucradas en la regulación de sus niveles endógenos es especialmente relevante. Hasta ahora solo se conocen dos enzimas capaces de hidrolizar la agmatina a putrecina y urea, la agmatinasa y la ALP. De las agmatinasas de mamíferos es muy poco lo que se sabe dado que su expresión *in vitro* genera una proteína prácticamente inactiva. La ALP, sin embargo, cataliza la hidrólisis de agmatina, manteniendo las propiedades de pH, activación por Mn^{2+} y K_m propias de las agmatinasas. No obstante, aún no está claro como esta proteína (ALP) realiza la hidrólisis de agmatina, cuya secuencia diverge mucho de las agmatinasas y no es posible identificar los residuos característicos de unión al cofactor metálicos Mn^{2+} y otros residuos catalíticos.

Modelo estructural del sitio de unión para Mn^{2+} de Δ LIM-ALP

Debido que hasta ahora no existe información estructural sobre ALP, mediante herramientas bioinformáticas en esta tesis se proponen residuos que implican un nuevo tipo de interacciones entre los aminoácidos propuestos E190, N213, Q215, D217, E288, K290, N340 y los iones Mn^{2+} .

Al realizar una búsqueda bibliográfica, residuos similares se han observado interactuar con los iones Mn^{2+} en otras proteínas. Si bien el aspartato a menudo se encuentra estabilizando los centros de metales binucleares, los residuos como el glutamato y la asparagina también pueden desempeñar este papel (Mitic *et al.*, 2014). Por ejemplo, se ha informado de una metalofosfoesterasa en una bacteria marina que el aminoácido Asn81 estabiliza el centro binuclear de Mn^{2+} (Wei *et al.*, 2018). Además, se ha descrito que los residuos glutámicos (Glu235 y Glu204) estabilizan el centro binuclear Co^{2+} de una metionina aminopeptidasa de *E. coli* (Mitic *et al.*, 2014) y el centro binuclear Mn^{2+} (Glu 56-57-58) de una pirofosfohidrolasa de *E. coli* (Harris *et al.*, 2000). Por otro lado, los residuos de Gln y Lys no se han descrito con tal función, sin embargo, Gln muestra propiedades fisicoquímicas similares a las de Asn, y Lys se ha relacionado con las interacciones de la segunda esfera de coordinación de los iones metálicos (Dudev *et al.*, 2003).

Con respecto a la calidad del modelo obtenido, los valores alejados de los ideales tanto de posicionamiento y energía entregados por ProSa, son esperados debido a la singularidad de secuencia que presenta ALP, y en relación al análisis de calidad estereoquímica de la estructura, aunque algunos residuos como E222, R283, D307 y C397 están fuera de las regiones permitidas en el gráfico de Ramachandran, estos no estarían formando parte de la zona estructurada del modelo (ver anexo 3).

Finalmente, se requiere de la estructura obtenida experimentalmente de ALP para validar el modelo obtenido en este trabajo y respaldar los aminoácidos propuestos que estarían interactuando en la unión de los iones Mn^{2+} .

Mutagénesis de los residuos propuestos como coordinantes de Mn^{2+} .

Para corroborar la función de los aminoácidos propuestos como posibles ligandos del cofactor Mn^{2+} a través del modelo generado, se reemplazaron mediante mutagénesis sitio-dirigida los aminoácidos N213, Q215, D217, E288 y K290 de Δ LIM-ALP por residuos de alanina, de los cuales se expresaron D217 y E288 como mutantes simples y además como primera aproximación una mutante doble E288A/K290A y triple N213A/Q215A/D217A, las cuales resultaron ser inactivas catalíticamente como agmatinasas *in vitro* en presencia de Mn^{2+} adicionando, incluso calentando previamente con Mn^{2+} . Estos resultados nos indican que estos residuos serían relevantes para la actividad catalítica de ALP y posiblemente la enzima tiene problemas para coordinar el metal activador, dado que el metal es esencial para la actividad catalítica. Para todos los análisis se utilizó la variante de ALP más activa, que corresponde a una ALP sin su dominio LIM, ya que este dominio genera un efecto auto inhibitorio en la enzima.

Los resultados obtenidos de las mutaciones simples, doble y triple son interesantes al relacionarlos con trabajos anteriores donde se realizaron mutantes simples para cada uno de los 5 residuos de histidina de ALP (Quiñones

et al., 2015), a partir del conocimiento que en las ureohidrolasas residuos de aspartato e histidinas son ligandos para el cofactor metálico. En estas mutantes no hubo cambios en la actividad catalítica ni en la interacción con Mn^{2+} y solo en una (H206A), la afinidad por el metal activador disminuyó 10 veces a diferencia de las mutantes generadas en esta tesis, que anularon la actividad agmatinasa de ALP, lo que apunta a la relevancia de estos residuos.

Por otra parte en cómo se mencionó anteriormente, se realizó una primera aproximación de cual podría ser el sitio activo de ALP, donde se expresó una región central de ALP denominada ALP-central (desde T140 – S350), la cual mantiene la actividad agmatinasa, pero con baja eficiencia y es activada por Mn^{2+} , lo cual confirmaría que el sitio activo de la enzima ALP reside en esta región, conteniendo los ligandos necesarios para la unión del cofactor de Mn^{2+} , los cuales involucran a los aminoácidos propuestos es nuestro modelo. (Reyes *et al.*, 2020)

Hasta el momento no se ha podido determinar cuáles son los aminoácidos en el sitio activo de ALP, pero los resultados de este trabajo muestran una primera aproximación de cuales podrían estar cumpliendo esta función, por otra parte, la actividad agmatinasa de ALP-central, confirmaría que el sitio activo de la enzima ALP reside en esta región, conteniendo los ligandos necesarios para la unión del cofactor de Mn^{2+} , los cuales involucran a los aminoácidos propuestos es nuestro modelo.

Considerando que ALP es la única enzima de mamíferos con actividad agmatinasa caracterizada *in vivo* e *in vitro*, es de gran importancia aclarar aspectos importantes como los son su sitio activo y los posibles nuevos aminoácidos involucrados en el sitio de unión al metal activador. Por este motivo como proyecciones a partir de este trabajo, se propone estudiar más a fondo esta región de ALP, expresando las mutantes simples de los ligandos propuestos para el cofactor Mn^{+2} en el modelo estructural comparativo que quedaron pendiente en este trabajo de realizar las cuales serían, N213, Q215, K290 y realizar un estudio de su actividad enzimática, en presencia y ausencia del cofactor de Mn^{+2} , además de estudiar el contenido de este cofactor para todas las variantes generadas. Una comprensión detallada de su interacción con Mn^{2+} y cómo se controla su actividad será esencial para definir esta enzima como un objetivo farmacológico prometedor.

10. CONCLUSIONES

- Fue posible generar un modelo estructural mediante modelaje comparativo de Δ LIM-ALP, sin embargo, algunos de los residuos no se encuentran en la posición energética correcta, por lo que este modelo debe ser refinado.
- Nuestro modelo propone nuevos residuos para el sitio de unión de Mn^{2+} y los resultados de los mutantes expresadas D217A, E288A, E288A/K290A y N213A/Q215A/D217A de Δ LIM-ALP indican la importancia de estos para la actividad agmatinasa en ALP.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Agostinelli, E., Marques, M. P. M., Calheiros, R., Gil, F. P. S. C., Tempera, G., Viceconte, N., Battaglia, V., Grancara, S., & Toninello, A. (2010). Polyamines: Fundamental characters in chemistry and biology. *Amino Acids*, *38*(2), 393–403.
- Alarcón, R., Orellana, M. S., Neira, B., Uribe, E., García, J. R., & Carvajal, N. (2006). Mutational analysis of substrate recognition by human arginase type I - Agmatinase activity of the N130D variant. *FEBS Journal*, *273*(24), 5625–5631.
- Archibald, R. M., Ortiz, P., Stroh, E., & Bronner, J. (1945). Colorimetric determination of urea. *The Journal of Biological Chemistry*, *157*, 507–519.
- Barua, S., Youl, J., Jae, K., Kim, Y., Hwan, J., Jong, K., Lee, E., & Kim, J. Y. (2019). Therapeutic Effect of Agmatine on Neurological Disease : Focus on Ion Channels and Receptors. *Neurochemical Research*, *44*, 735–750.
- Baugh, L., Gallagher, L. A., Patrapuvich, R., Clifton, M. C., Gardberg, A. S., Edwards, T. E., Armour, B., Begley, D. W., Dieterich, S. H., Dranow, D. M., Abendroth, J., Fairman, J. W., Fox, D., Staker, B. L., Phan, I., Gillespie, A., Choi, R., Nakazawa-Hewitt, S., Nguyen, M. T., Van Voorhis, W. C. (2013). Combining Functional and Structural Genomics to Sample the Essential Burkholderia Structome. *PLoS ONE*, *8*(1).
- Carvajal, N., Lo, V., Uribe, E., Herrera, P., & Cerpa, J. (1999). Manganese Is Essential for Catalytic Activity of Escherichia coli Agmatinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *811*, 808–811.
- Castro, V., Fuentealba, P., Henríquez, A., Vallejos, A., Benítez, J., Lobos, M., Díaz, B., Carvajal, N., & Uribe, E. (2011). Evidence for an inhibitory LIM domain in a rat brain agmatinase-like protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *512*(1), 107–110.
- Cofré, J., Montes, P., Vallejos, A., Benítez, J., García, D., Martínez-oyanedel, J., Carvajal, N., & Uribe, E. (2013). Further insight into the inhibitory action of a LIM / double zinc- finger motif of an agmatinase-like protein. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *2*, 10–13.
- Cofre, J., Montes, P., Vallejos, A., Benítez, J., García, D., Martínez-Oyanedel, J., Carvajal, N., & Uribe, E. (2014). Further insight into the inhibitory action of a LIM/double zinc-finger motif of an agmatinase-like protein. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *132*(1), 92–95.
- Demady, D. R., Jianmongkol, S., Vuletich, J. L., Bender, A. T., & Osawa, Y. (2001). Agmatine Enhances the NADPH Oxidase Activity of Neuronal NO Synthase and Leads to Oxidative Inactivation of the Enzyme. *Molecular Pharmacology*, *59*(1), 24–29.

- Dudev, T., Lin, Y. lin, Dudev, M., & Lim, C. (2003). First-second shell interactions in metal binding sites in proteins: A PDB survey and DFT/CDM calculations. *Journal of the American Chemical Society*, 125(10), 3168–3180.
- Harris, T. K., Wu, G., Massiah, M. A., & Mildvan, A. S. (2000). Mutational, kinetic, and NMR studies of the roles of conserved glutamate residues and of lysine-39 in the mechanism of the MutT pyrophosphohydrolase. *Biochemistry*, 39(7), 1655–1674.
- Hong, S., Hara, H., Shimazawa, M., Hyakkoku, K., Kim, C. Y., & Seong, G. J. (2012). Retinal protective effects of topically administered agmatine on ischemic ocular injury caused by transient occlusion of the ophthalmic artery. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(3), 212–215.
- Hyung, J. A., Kyoung, H. K., Lee, J., Ha, J. Y., Hyung, H. L., Kim, D., Yoon, H. J., Kwon, A. R., & Se, W. S. (2004). Crystal structure of agmatinase reveals structural conservation and inhibition mechanism of the ureohydrolase superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 50505–50513.
- Iyer, R. K., Kim, H. K., Tsoa, R. W., Grody, W. W., & Cederbaum, S. D. (2002). Cloning and characterization of human agmatinase. *Molecular Genetics and Metabolism*, 75(3), 209–218.
- Kadrmaz, J. L., & Beckerle, M. C. (2004). The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(11), 920–931.
- Kanyo, Z. F., Scolnick, L. R., Ash, D. E., & Christianson, D. W. (1996). Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature*, 383, 554–557.
- Laube, G., & Bernstein, H. (2017). Agmatine : multifunctional arginine metabolite and magic bullet in clinical neuroscience ? *Biochemical Journal*, 474, 2619–2640.
- Lee, W. T., Hong, S., Yoon, S. H., Kim, J. H., Park, K. A., Seong, G. J., & Lee, J. E. (2009). Neuroprotective effects of agmatine on oxygen-glucose deprived primary-cultured astrocytes and nuclear translocation of nuclear factor-kappa B. *Brain Research*, 1281, 64–70.
- Li, G., Eshraghi, J., Regunathan, S., Cooper, R., Barrow, C., & Reis, D. (1994). Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science*, 263(5149), 966–969.
- Maturana, P., Orellana, M., Herrera, S. M., Martinez, I., Figueroa, M., Castro-Fernandez, V., & Uribe, E. (2021). Crystal Structure of Escherichia coli Agmatinase : Catalytic Mechanism and Residues Relevant for Substrate Specificity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 4769.
- Mistry, S. K., Burwell, T. I. M. J., Chambers, R. M., Rudolph-owen, L., Spaltmann, F., Cook, W. J. I. M., Morris, S. M., Sanjay, K., Burwell, T. J., Cham-, R. M., Rudolph-owen, L., Spaltmann, F., Jim, W., Morris, S. M., & Cloning, J. (2002). Cloning of

- human agmatinase . An alternate path for polyamine synthesis induced in liver by hepatitis B virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282, 375–381.
- Mitic, N., Miraula, M., Selleck, C., Hadler, K. S., Uribe, E., Pedroso, M. M., & Schenk, G. (2014). Catalytic mechanisms of metallohydrolases containing two metal ions. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 97(C), 49–81.
- Moretti, M., Matheus, F. C., Oliveira, P. A. de, Neis, V. B., Ben, J., Walz, R., Rodrigues, A. L., & Prediger, R. D. (2014). Role of agmatine in neurodegenerative diseases and epilepsy. *Frontiers in Bioscience*, 6, 341–359.
- Penner, S. B., & Smyth, D. (1996). Natriuresis following central and peripheral administration of agmatine in the rat. *Pharmacology*, 53, 160–169.
- Quiñones, M., Cofre, J., Benítez, J., García, D., Romero, N., González, A., Carvajal, N., García, M., López, V., Schenk, G., & Uribe, E. (2015). Insight on the interaction of an agmatinase-like protein with Mn²⁺ activator ions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 145, 65–69.
- Raasch, W., Schafer, U., Chun, J., & Dominiak, P. (2001). Biological significance of agmatine , an endogenous ligand at imidazoline binding sites. *British Journal of Pharmacology*, 133, 755–780.
- Reyes, M., Navarrete, C., Mardones, E., Martinez, I., Salas, M., López, V., Tarifeño, E., Figueroa, M., García, D., & Uribe, E. (2020). Insights into the Mn 2 + Binding Site in the Agmatinase-Like Protein (ALP): A Critical Enzyme for the Regulation of Agmatine Levels in Mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 4132.
- Salas, M., López, V., Uribe, E., & Carvajal, N. (2004). Studies on the interaction of Escherichia coli agmatinase with manganese ions: Structural and kinetic studies of the H126N and H151N variants. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(6), 1032–1036.
- Sastre, M., Galea, E., Feinstein, D., Reis, D. J., & Regunathan, S. (1998). Metabolism of agmatine in macrophages: Modulation by lipopolysaccharide and inhibitory cytokines. *Biochemical Journal*, 330(3), 1405–1409.
- Sastre, M., Regunathan, S., Galea, E., & Reis, D. J. (2002). Agmatinase Activity in Rat Brain: A Metabolic Pathway for the Degradation of Agmatine. *Journal of Neurochemistry*, 67(4), 1761–1765.
- Satishchandran, C., & Boylet, S. M. (1986). *Purification and Properties of Agmatine Ureohydrolyase , a Putrescine Biosynthetic Enzyme in Escherichia coli*. 165(3), 843–848.
- Satriano, J., Cunard, R., Peterson, O. W., Dousa, T., Gabbai, F. B., & Blantz, R. C. (2008). Effects on kidney filtration rate by agmatine requires activation of ryanodine channels for nitric oxide generation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 92161, 795–801.

- Scolnick, L. R., Kanyo, Z. F., Cavalli, R. C., Ash, D. E., & Christianson, D. W. (1997). Altering the Binuclear Manganese Cluster of Arginase Diminishes Thermostability and Catalytic Function. *Biochemistry*, 36(34), 10558–10565.
- Su, C., Liu, I.-M., Chung, H., & Cheng, J. (2009). Activation of I2-imidazoline receptors by agmatine improved insulin sensitivity through two mechanisms in type-2 diabetic rats. *Neuroscience Letters*, 457, 125–128.
- Uribe, E., Reyes, M. B., Martínez, I., Mella, K., Salas, M., Tarifeño-Saldivia, E., López, V., García-Robles, M., Martínez-Oyanedel, J., Figueroa, M., Carvajal, N., & Schenk, G. (2020). Functional analysis of the Mn²⁺ requirement in the catalysis of ureohydrolases arginase and agmatinase - a historical perspective. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 202, 110812.
- Uribe, E., Salas, M., Enríquez, S., Orellana, M. S., & Carvajal, N. (2007). Cloning and functional expression of a rodent brain cDNA encoding a novel protein with agmatinase activity, but not belonging to the arginase family. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 461(1), 146–150.
- Uzbay, T. I. (2012). The pharmacological importance of agmatine in the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(1), 502–519.
- Wei, T., Quareshy, M., Zhang, Y. Z., Scanlan, D. J., & Chen, Y. (2018). Manganese is essential for PlcP metallophosphoesterase activity involved in lipid remodeling in abundant marine heterotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(15), 1–10.
- Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35, 407–410.

ANEXO 1: Archivo de alineamiento de secuencias en formato .pir para ejecutar Modeller en la realización del modelo estructural de Δ LIM-ALP.

<pre> >P1;1GQ6 structure:1GQ6:..... -----SPRYAQIPTFMRLPH-----DPQ--PRGYD VVVIGAPYDGGTSYRPGARFGPQAIRSESLIHGV----- -----GIDRGPGETFDLINCVDAGDINLTPFDMNIAID TAQSHLSGLL-----KANA AFLMIGGDHSLTVAALRAVAEQHG-PLAVVHLDAHSDTNPAFYGGRYHHG TPFRHGIDEKLIDPAAMVQIGIRGHNPKPDSLDYARGHGVRVTADEFGE LGVGGTADLIREKV-GQRPVYVSDIDVDPDPA----- -FAPGTGTAPAGGLL SREVLALRRCVG--DLKPVGFDMVEVSPLYDHG-- ----- -----GITSILATEIGAELLYQYARAH----- ----- ----- * >P1;1WOI structure:1WOI:..... -----GPAHLPYGGIPTFARAPL-----VQPDG-DWQAD VAALGVPFDIAGFRPGARFAPRALREASLRVPPF----- -----TGLDGKTRLQGVTFADAGDVILPSLEPQLAHD RITEAARQVR-----GR-CR VPVFLGGDHSVSYPLLRAFADV-P-DLHVVLDAHLDFDTDRNDTKWSNS SPFRACEA-LPNLVHITTVGLRGLRFDPEAVAAARARGHTIIPMDDVTA DLAGVLAQLP-----RGQNVYFSDVDGFDPA----- -VIPGTSSPEPDGLTYAQGMKILAAAAA-NNTVVGLDLVELAPNLDPGTG- ----- -----RSELLMARLVMETLCEV-FDHVL----- ----- ----- * >P1;3LHL structure:3LHL:..... -----NYEESN LIVFGVFDGTTSNRPGARFASSMRKEFYGLEY----- -----SPFL-DLLEDYNICDYGDLEISVGSTEQVLK EIYQETYKIV-----RDSK VPFMIGGEHLVTLPAFKAVHEKYN-DIYVIHFDAHTDLREEYNNSKNSHA TVIKRIWD--IVGDNKIFQFIRSGTKE--EFKFATEEKHTYMEI----- -GGIDTFENIVNML-NGKNIYLTIDLVDLSDAS----- -VFPGTGTPEPGGVNYREFQEIFKIKNINIVGCDIVELSPDYDTTG- ----- -----VSTVIACKILRELCLIIISDKIK----- ----- ----- * >P1;3NIO structure:3NIO:..... -----NLHQPLGGNEMPRFGGIATMMRLPH-----VQSPAELDALD AAFVGVPLDIGTSLRSGTRFGPREIRAESVMIRPY----- -----NMATGAAPFDSLNVADIGDVAINTFNLLEAVR IIEQEYDRILG-----HGI LPLTLGGDHTITLPIILRAIKKKG-HG-KVGLVHVDAHADVNDHMFGEKIAHG TFRRAVEEDLLDCDRVVQIGLRAQGYTAEDFNWSRKQGFVQAEECWH KSLEPLMAEVREKV-GGGPVYLSFDIDGIDPA----- -WAPGTGTPEIGGLTTIQAMEIIRGCQ--GLDLIGCDLVEVSPPYDTTG- ----- -----NTSLLGANLLEYMLCVLPGVRR----- ----- ----- * </pre>	<pre> >P1;3PZL structure:3PZL:..... -----ASELRSIFSLKKIAD-----AVNG-YEEAK YVVFVIPDNTSSYRRGSKYAPDSIRGAYVNLESY----- -----EYSYGIDLL-ASGMADLGMEEES-EDVEYVID TVESVVSAVM-----SDGK IPIMLGGEHSITVGAVRALPKD----VDLIVDAHSDFRSSYMGNKYNHA CVTRRALD--LLGEGRITSIGIRSVSREEFEDPDF--RKVSFISFDVKK NGIDKYYEEVDR--KSRVVYISVDMGDIDPA----- -YAPAVGTPEPFGGLADTVRRLLIERL--SYKAVGFDFIVEFSPLYDNG-- ----- -----NTSMLAAKLLQVFIASREKYYK----- ----- ----- * >P1;4DZ4 structure:4DZ4:..... TLYGDGAIIRRPVYGGSSIENTYAGVLSFMRRNY-----TRDLGDVD VVVSGVPLDLATFRSGARLGPSAVRAASVQLAEL----- -----NPYPWGFDFDLDLAVIDYGDGCFDAHPLSICKP AIVEHARTILQ-----SDA RMLTLGGDHYITYPLLIHAHQKYGKPLSLIHFDAHCDTWADDAPDSLNHG TMFYKAVKDGGLIDPKASVQVGIRTWDDYDLGINVLDAAWVH-----E HGARATLERIESIV-GGRPAYLTFDIDCLDPA----- -FAPGTGTVPAGGLSSAQAALAIRVRLG--GVNLI GADVVEVAPAYDQSE- ----- -----ITAIAAAHVACDLLCLWRQRKAGA----- ----- ----- * >P1;ALP sequence:ALP:..... -----MVTPRPYSQPKNSQEVKTKFKVDGKVSMMN-GETAR GDVEGKEKEDPTAVAPGPSLTKSQMFEGVATVH-GSPVQVKQGSNSIEIN IKKPNSPQELTAASEET-ESNGRDDENGEESGARDVELDSAEPQHFTT TVTRCSPTVALVEFSSSPQLRNEVPEEQDQKPKPENEMSGKVELVLSQKVA KPKSPEPEATLTFPFLDKMPET-D-QLHLPNLNSQADSP---SSEKSPAS TPFKFWAWD-----PEEERRRQ-----EKWQQEQERLLQERYQKEQD--- -KLKEWEKAQKEVEEEERRRYEERKIIEDTVVPFTISSSSA----- -DQLSTSSSVTEG--SGTRNKMDLENCQ---DRDKERRQNTPLQENDSD SSLKARESGLPEEHSSLTQSPANSSENSVSKGISQDQPE TEAEASHCGT NPQSAQDPPWQIQISNPPTSSEDVVKPKTLALEKSIINHQIESPGERRSKI SGKKLCSS.. * </pre>
---	--

ANEXO 2 Script utilizado para ejecutar Modeller para generar modelo estructural de Δ LIM-ALP.

```
# Comparative modeling by the automodel class
from modeller import *
# Load standard Modeller classes
from modeller.automodel import *
import sys
# Load the automodel class
log.verbose()
env = environ()
# request verbose output
# create a new MODELLER environment
# directories for input atom files
env.io.atom_files_directory = ['.', './atom_files']
env.io.hetatm = True

a = automodel(env,
alnfile = 'aling.pir_aln', # alignment filename
knowns = ('1GQ6', '1WOI', '3LHL', '3NIO', '3PZL', '4DZ4'),
# codes of the templates
sequence = 'ALP')
# code of the target
a.starting_model= 1
a.ending_model = 100

# index of the first model
# index of the last model
# (determines how many models to calculate)
# do the actual comparative modeling
# Very thorough VTFFM optimization:
a.library_schedule = autosched.slow
a.max_var_iterations = 8000

# Thorough MD optimization:
a.md_level = refine.slow
# Repeat the whole cycle 2 times and do not stop unless obj.func. > 1E6
a.repeat_optimization = 4
a.max_molpdf = 1e6

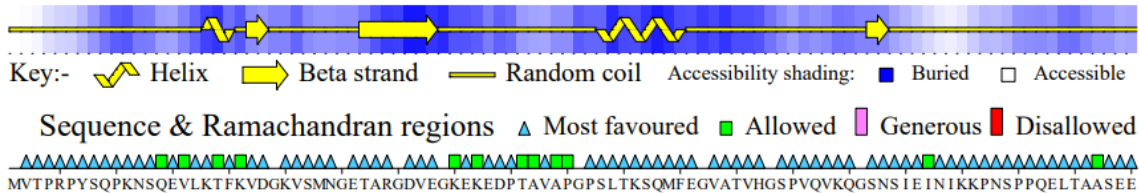
a.make()          # do the actual homology modeling

# Get a list of all successfully built models from a.outputs
ok_models = [x for x in a.outputs if x['failure'] is None]

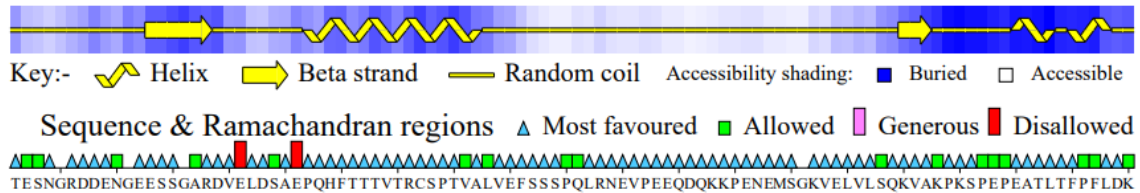
# Rank the models by DOPE score
key = 'DOPE score'
if sys.version_info[:2] == (2,3):
    # Python 2.3's sort doesn't have a 'key' argument
    ok_models.sort(lambda a,b: cmp(a[key], b[key]))
else:
    ok_models.sort(key=lambda a: a[key])
# Get top model
m = ok_models[0]
print("Top model: %s (DOPE score %.3f)" % (m['name'], m[key]))
```

ANEXO 3: Informe de PROCHECK de la estructura secundaria, secuencia y regiones de gráfico de Ramachandran del modelo estructural de Δ LIM-ALP.

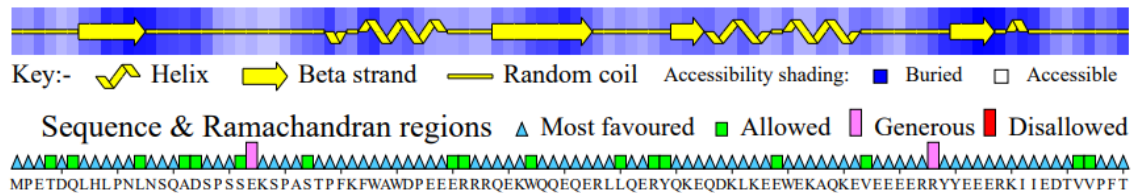
Secondary structure & estimated accessibility



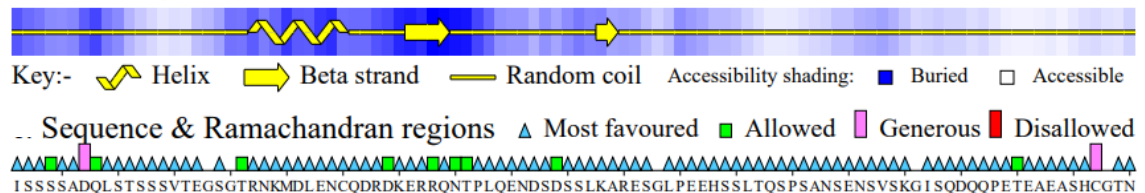
Secondary structure & estimated accessibility



Secondary structure & estimated accessibility



Secondary structure & estimated accessibility



Secondary structure & estimated accessibility

