



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

Análisis funcional y estructural de mutantes de dominio LIM en agmatinasa de cerebro de rata

PAOLA ANDREA MONTES ROMERO
CONCEPCIÓN-CHILE
2013

Profesor Guía: Elena Amparo Uribe
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Guía: José Antonio Martínez Oyanedel
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

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:

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

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



Dr. Nelson Carvajal
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Marcia Pucci
Profesor Evaluador Externo
Universidad Andrés Bello

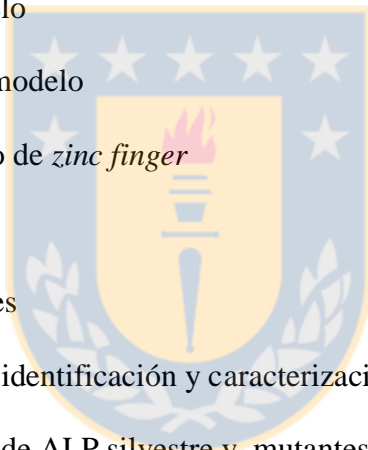
Dra. Marta Bunster Balocci
Director
Programa Magíster en Bioquímica y
Bioinformática

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
1. Resumen	1
2. Summary	3
3. Introducción	5
3.1 Agmatina en cerebro	5
3.2 Degradación de agmatina – agmatinasa	8
3.3 Dominios LIM y <i>zinc fingers</i>	12
4. Hipótesis de trabajo	19
5. Objetivos	20
5.1. Objetivo general	20
5.2. Objetivos específicos	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1. Reactivos	21
6.2. Vectores	21
6.3. Cepas	22
6.4. Medios de cultivo	22
6.5. Oligonucleótidos	22
6.6. Anticuerpos	23
6.7. Soluciones generales	23
6.8. Selección de mutantes	24
6.9. Aislamiento de plásmidos	25
6.10. Electroforesis en geles de agarosa	25
6.11. Expresión y purificación de la ALP y sus mutantes	26



	Pág.
6.12 Cuantificación de proteínas	27
6.13 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	27
6.14 Determinación de actividad agmatinasa	27
6.15 Western Blot	28
6.16 Ensayos de fluorescencia intrínseca de triptófanos y apagamiento con Acrilamiada	28
6.17 Detección de metales	29
6.18 Construcción del modelo dominio LIM de ALP	29
6.19 Evaluación del modelo	30
6.20 Caracterización del modelo	30
6.21 Clasificación del tipo de <i>zinc finger</i>	30
7 Resultados	31
7.1 Construcción de mutantes	31
7.2 Expresión, purificación, identificación y caracterización de ALP y mutantes	32
7.3 Caracterización cinética de ALP silvestre y mutantes	33
7.4 Emisión de fluorescencia y ensayos de apagamiento	34
7.5 Modelo estructural de dominio LIM en ALP – elección de templados	37
7.6 Evaluación del modelo	38
7.7 Caracterización del modelo	41
7.8 Clasificación del tipo de <i>zinc finger</i>	43
8 Discusión	45
9 Conclusiones	48
10 Referencias	49

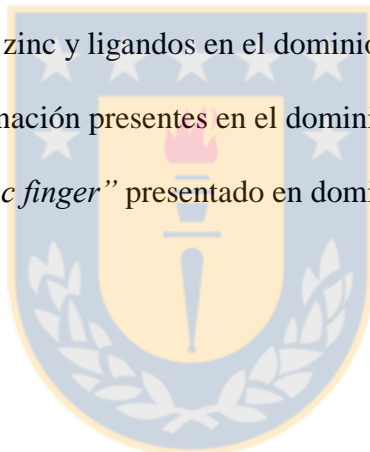


ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Vías metabólicas de la agmatina.	5
Figura 2. Reacción de catálisis de la agmatina	8
Figura 3. Dominio LIM propuesto para agmatinasa like-protein	12
Figura 4. Patrones de interacción zinc-ligando	13
Figura 5. Motivos de secuencia con zinc fingers.	13
Figura 6. Proteínas LIM humanas.	16
Figura 7. Plásmido H ₆ PQE60-29,4	21
Figura 8. Dominio LIM en ALP	24
Figura 9. Secuenciaciones obtenidas para mutantes del dominio LIM ALP	31
Figura 10. Análisis de ALP silvestre y mutantes	32
Figura 11. Espectros de fluorescencia intrínseca de ALP silvestre y las mutantes C453A, H476A y C507A	34
Figura 12. . Ensayos de apagamiento y gráficas de Stern-Volmer con acrilamida en ALP silvestre y mutantes	35
Figura 13. Modelos obtenidos por <i>threading</i> en servidor I-Tasser.	38
Figura 14. Validación y refinamiento de modelos obtenidos a través de ProSA	39
Figura 15. Gráfico de Ramachandran del dominio LIM en ALP.	40
Figura 16. Modelo del dominio LIM de la ALP.	41
Figura 17. Coordinación entre iones Zn ²⁺ y residuos ligando en dominio LIM de ALP	42

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Propiedades de la agmatina como neurotransmisor o neuromodulador.	6
Tabla 2. Plegamientos presentes en zinc fingers	14
Tabla 3. Dominios conformados por zinc fingers	15
Tabla 4. Contenido de zinc en ALP y mutantes	33
Tabla 5. Constantes cinéticas de ALP silvestre y mutantes en el dominio LIM	34
Tabla 6. Porcentajes de identidad de secuencia obtenidos en alineamientos.	36
Tabla 7. Alineamientos de estructura obtenidos con templado I-Tasser	39
Tabla 8. Distancias entre el zinc y ligandos en el dominio LIM ALP y su templado.	42
Tabla 9. Ángulos de coordinación presentes en el dominio LIM ALP	42
Tabla 10. Selección de “ <i>zinc finger</i> ” presentado en dominio LIM ALP.	44



1. RESUMEN

La agmatinasa cataliza la hidrólisis de agmatina en putrescina y urea, la información relacionada con esta enzima en mamíferos es escasa por lo cual aún se desconocen múltiples aspectos de la misma. La agmatina ha sido ampliamente estudiada identificando su participación como poliamina en roles fisiológicos diversos, también posee propiedades de neurotransmisión y es candidata farmacológica para tratar diferentes patologías.

Debido al escaso conocimiento que se tiene sobre agmatinasa en el Laboratorio de Enzimología de la Universidad de Concepción se realizó el clonamiento de una proteína expresada en cerebro de rata que posee actividad *in vitro* como agmatinasa, sin embargo esta proteína al ser comparada con la agmatinasa humana y de *E.coli* presenta un bajo porcentaje de identidad. La proteína obtenida fue denominada “*agmatinase like protein*” (ALP) y en su secuencia se encontró un dominio LIM. En trabajos anteriores se reconoció el papel de este dominio como de regulación auto inhibitoria en la ALP, ya que la delección del mismo en la proteína aumenta su actividad.

La principal característica del dominio LIM es tener un sistema de coordinación tipo dedos de zinc entre dos iones Zn^{2+} y residuos de cisteína e histidina principalmente. Por lo cual, el objetivo del trabajo fue determinar el efecto funcional y estructural del Zn^{2+} en la ALP, para lo cual se realizaron tres mutaciones sitio dirigidas en residuos reconocidos como ligandos que coordinan el zinc, reemplazándolos por alanina. Se evaluó la actividad enzimática de las especies mutantes, su contenido de metales y la fluorescencia emitida; encontrando que en la mutante C453A se produjo un aumento de 14 veces en la k_{cat} y la K_m se mantuvo, no posee zinc y se evidencian cambios significativos en la fluorescencia intrínseca de triptófanos a través de las gráficas de Stern-Volmer. Las dos mutantes restantes (H476A y

C507A) no presentan cambios en la actividad enzimática, su contenido de zinc se reduce al 50% en comparación a la ALP silvestre y se pueden apreciar cambios menores en la fluorescencia emitida. También se realizó un modelo del dominio LIM para describir su estructura obteniendo un modelo que describe la unión entre el zinc los residuos de cisteína e histidina presentes en la ALP.

En este sentido se concluye que la mutante C453A es fundamental para mantener la estabilidad estructural y función inhibitoria del dominio LIM en la ALP. Las otras mutantes no son residuos claves para la inhibición que ejerce este dominio. A partir de estos resultados se propone que los iones Zn^{2+} son claves en la acción autoinhibitoria del dominio LIM sobre ALP y la mutante C453A es fundamental en este efecto.



2. SUMMARY

Agmatinase catalyzes the hydrolysis of agmatine in putrescine and urea, the information related to this enzyme is limited so many aspects are still unknown. Agmatine has been widely studied, identifying their involvement in various physiological roles as polyamine, also possesses neurotransmission and is a candidate drug to treat different pathologies.

Due to the limited knowledge about agmatinase, in Enzymology Laboratory, University of Concepción was performed cloning of a protein expressed in rat brain that has in vitro agmatinase activity, however this protein is very different about human agmatinase and *E.coli* agmatinase and it has a low percentage identity. The protein obtained was named "agmatinase like protein" (ALP) and its sequence was found a LIM domain. In previous work we have proposed this domain as autoinhibitory function over ALP, and its deletion increases ALP activity.

The main feature of LIM domain is to have a coordination system type zinc fingers between Zn^{2+} ions and cysteine and histidine residues mainly. Therefore, the objective of this work was to determine the functional and structural effects of Zn^{2+} in the ALP, for this we did three site directed mutations in residues recognized as ligands that coordinate zinc ions, replacing them with alanine. The enzymatic activity of mutant species, metal content and the emitted fluorescence was characterized; we found that the mutant C453A there was a 14 fold increase in k_{cat} and K_m remained and it has not zinc ions, it also showed significant changes are evident in intrinsic fluorescence of tryptophan. The two remaining mutants (H476A and C507A) showed no changes in enzyme activity, the zinc content of them is reduced to 50% c50% compared to wild type ALP and minor changes in the fluorescence emitted was detect.

We also performed a LIM domain structural model describing the interaction between the zinc and cysteine and histidine residues in ALP.

We concluded that the C453A mutant is critical to maintaining structural stability and LIM domain inhibitory function in the ALP. The other mutants are not key residues for inhibition exerted by this domain. From these results it is proposed that Zn^{2+} ions are key autoinhibitory LIM domain action on ALP and C453A mutant is central to this effect.



3. INTRODUCCIÓN

3.1. AGMATINA EN CEREBRO

Las poliaminas son moléculas orgánicas policatiónicas involucradas en distintas acciones fisiológicas siendo de particular interés las relacionadas con el funcionamiento cerebral (Laube y Bernstein, 2012). Estas poliaminas son producto de la degradación de la L-arginina a partir de dos vías metabólicas donde están involucrada la arginasa y la arginina descarboxilasa (Figura 1).

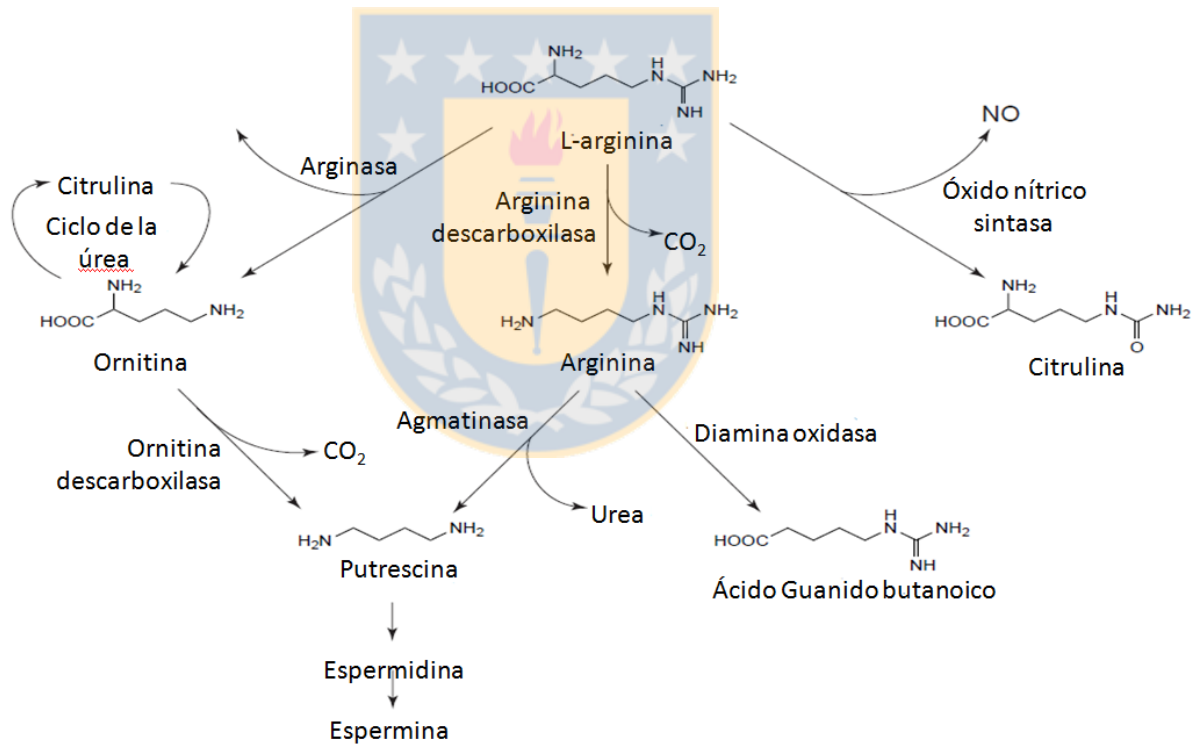


Figura 1. Vías metabólicas de la agmatina (Adaptado de Reis y Regunathan 2000)

La agmatina (N-(4-aminobutil) guanidina) es uno de los intermediarios presentes en la degradación de la L-arginina y fue detectada por primera vez en cerebro de murinos y de bovinos cuando se buscaba un ligando endógeno para receptores de imidazolina (Li *et al.*

1994, Eglen *et al.* 1999). A raíz de este descubrimiento se comenzó a considerar el rol biológico de esta poliamina en el cerebro, llegando a postularse que la misma es un neurotransmisor con propiedades que están resumidas en la tabla 1 (Halaris *et al.* 2007).

Tabla 1. Propiedades de la agmatina como neurotransmisor o neuromodulador

Propiedades que definen a un neurotransmisor	Propiedades de la agmatina
Síntesis en neuronas	La agmatina ha sido detectada en pericaria, dendritas y terminales axónicos mediante técnicas de inmunocitoquímica.
Liberación en la zona presináptica	Es liberada por depolarización dependiente de Ca^{2+} . Se ha encontrado agmatina empaquetada en sinaptosomas con glutamato y vasopresina.
Disponibilidad de drogas para imitar o bloquear su acción específica	Posiblemente antagonistas del receptor de imidazolina tipo I ₁ , bloquean la acción agonista de la agmatina.
Interacción con receptores	Agmatina interacciona con receptores NMDA-R, α_2 -adrenoceptor, imidazolina I ₁ , nicotínicos, serotonina 5-HT ₃ .
Presencia en una población de neuronas específicas	Distribuida en varios tipos neuronales. En el hipotálamo e hipocampo.
Captada por sinaptosomas	Captada por transportadores específicos dentro de las células neuronales.
Inactivación por un mecanismo específico	Inactivación enzimática por agmatinasa.
Otras acciones neuronales	Inhibe la oxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS). También inhibe la liberación de noradrenalina y glutamato

(Adaptado de Halaris A. y Plietz J. 2007).

Se ha descrito que la agmatina potencia las propiedades analgésicas de la morfina a través de un mecanismo que involucra receptores α_2 -adrenérgicos, atenuando los signos del síndrome de abstinencia razón por la cual esta poliamina se considera como candidata para desarrollar fármacos para el tratamiento de la analgesia (Aricioglu *et al.* 2004); previene la dependencia a opioides a través de la reducción de cAMP en el hipocampo (Li *et al.*, 2011);

también se ha propuesto como un agente antidepresivo (Bernstein *et. al.* 2012), anticonvulsivo y antineurotóxico (Halaris, 2007). De manera reciente se ha involucrado la agmatina como poliamina participante en las funciones cognitivas de memoria y aprendizaje (Matheus *et. al.* 2012, Utkan *et. al.* 2012, Knox *et. al.* 2011, Bhutada *et. al.* 2012), de igual manera se ha reportado su posible vinculación con la enfermedad de Alzheimer al observar la disminución de concentración de agmatina en pacientes con esta enfermedad (Matheus *et. al.* 2012, Condello *et. al.* 2012).

Debido a la múltiple participación de agmatina en 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 (Otake *et al.* 1998, Reis y Regunathan 2000). De igual manera se ha podido comprobar su intervención durante la sinapsis química mediante su presencia en dendritas, axones y terminales axónicos (Madai *et. al.* 2012, Sastre *et al.*1997).

En relación a la capacidad inhibitoria de la agmatina ante la óxido nítrico sintasa, se ha reportado que inactiva de forma irreversible la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y disminuye los niveles de la óxido nítrico sintasa inducible (Demady *et al.* 2001).

Otras funciones fisiológicas en las cuales interviene la agmatina hacen referencia a la participación de esta poliamina en: la regulación de la liberación de catecolaminas desde los terminales presinápticos en células cromafines, la liberación de la hormona luteinizante desde el hipotálamo (Aricioglu *et al.* 2004), la modulación de la liberación de insulina en células pancreáticas (Chan 1998, Su *et al.* 2009), la estimulación de excreción renal de sodio (Penner and Smyth 1996), la oxidación de ácidos grasos (Schwart *et al.* 1997), la reducción de la isquemia cerebral (Gilad *et al.* 1996, Olmos *et al.* 1999, Kim *et al.* 2004, Mun *et al.* 2010) y la disminución de la isquemia ocular (Hong *et al.* 2012).

3.2. DEGRADACIÓN DE AGMATINA – AGMATINASA

La agmatinasa es una hidrolasa que tiene como cofactor metálico Mn^{2+} y cataliza la conversión de agmatina en putrescina y urea, figura 2.

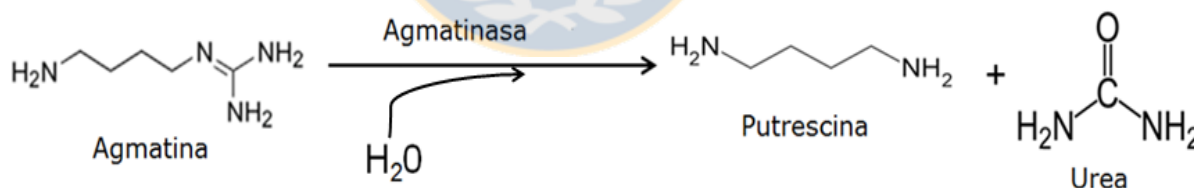


Figura 2. Reacción de catálisis de la agmatinasa.

Actualmente, la agmatinasa mejor caracterizada es la de *Escherichia coli* (Satischandran *et al.* 1986), la cual es inhibida competitivamente por arginina y putrescina, el análisis de su secuencia proteica revela que existe homología con la arginasa humana con un porcentaje de 56% de similitud (Iyer *et al.* 2002).

Para la estructura de la agmatinasa de *E.coli*, se ha obtenido un modelo estructural basado en la estructura tridimensional de la arginasa de *Bacillus caldovelox*, cuyo porcentaje de identidad de secuencia es del 30% (Salas *et.al.* 2002); también se ha determinado la estructura cristalina de la agmatinasa en *Deinococcus radiodurans* revelando conservación estructural y mecanismos de inhibición (Ahn *et.al.* 2004) con las enzimas de la familia de las ureohidrolasas.

Considerando esta información se ha sugerido que la arginasa y la agmatinasa tienen un origen evolutivo común, ya que ambas enzimas requieren de un ión metálico bivalente, Mn^{2+} , para su actividad catalítica (Sekowska *et. al.* 2000) y presentan similitud de sustratos y productos en la reacción que catalizan (Perozich *et.al.* 1998); sin embargo, la diferencia entre estas dos enzimas radica principalmente en la pobre hidrólisis de la agmatina por la arginasa (Reczkowski *et. al.* 1994).

El clonamiento de varias agmatinasas ha revelado la existencia de analogías entre las secuencias de estas enzimas y las secuencias disponibles para varias arginasas. Esto es interesante si consideramos las relaciones estructurales entre sus sustratos y el tipo de reacción que estas enzimas catalizan. Todo esto ha llevado a incluir a la agmatinasa en la llamada “familia de las arginasas” (Perozich *et. al.* 1998).

Aunque las actividades enzimáticas detectadas en cerebro son muy bajas, la agmatinasa presente en cerebro de rata comparte propiedades similares a la enzima de *E.coli*, ambas tienen una K_m para agmatina en el rango de milimolar (5 mM y 1 mM) y son activas a pH alcalino (8.5, 7, 7.5) (Sastre *et. al.* 1996). Sin embargo, la agmatinasa humana recombinante, expresada

en *E.coli*, no tiene actividad catalítica apreciable *in vitro*, de hecho su identificación como agmatinasa se basa en la presencia en su secuencia de residuos críticos para la unión del cofactor metálico, y para la unión del sustrato; otro factor de caracterización de la agmatinasa humana recombinante ha sido la capacidad del gen para permitir el crecimiento de levaduras (*Sacharomyces cerevisiae*) incapaces de sintetizar putrescina en un medio sin poliaminas, dado que estas levaduras han sido transformadas con arginina descarboxilasa para la producción de agmatina, por lo que la transfección con agmatinasa les permite generar poliaminas y hacer replicación celular (Mistry *et. al.* 2002).

En el laboratorio de Enzimología de la Universidad de Concepción, a partir de una librería de cDNA de cerebro de rata, se identificó un gen cuya expresión en *E.coli* genera una proteína con actividad agmatinasa (Uribe *et.al.* 2007). Esta proteína recombinante denominada “*agmatinase like protein*” (ALP) muestra un 13% de identidad y un 19% de similitud con la agmatinasa humana, pero no posee las secuencias que incluyen los residuos definidos como críticos para la actividad catalítica de una agmatinasa, especialmente los ligandos para el cofactor metálico.

La ALP no reconoce a la arginina como sustrato, pero si cataliza la hidrólisis de agmatina con una K_m de 3 mM, es inhibida por el producto putrescina ($k_i= 5$ mM) y presenta una constante catalítica relativamente baja ($k_{cat}= 0.8$ s⁻¹). Por lo demás, requiere de un ion metálico bivalente para su acción catalítica, como lo muestra su pérdida de actividad por diálisis contra agentes quelantes como el EDTA, y la posterior reactivación de las especies inactivas por adición de metales especialmente Mn²⁺ (Uribe *et. al.* 2007). En resumen, la ALP

muestra las mismas propiedades enzimáticas descritas previamente para la agmatinasa mejor caracterizada, la de *E.coli* (Carvajal *et. al.* 1999 y 2004, Salas *et. al.* 2002 y 2004).

Con el fin de averiguar si la ALP se expresaba en cerebro de rata, se usaron técnicas de RT-PCR e inmunohistoquímica cuyos resultados permitieron concluir que ALP es expresada y detectada en cerebro de rata especialmente en células gliales, astrocitos y neuronas del hipotálamo e hipocampo (Mella *et. al.* 2010).

Los análisis de secuencia de ALP (Uribe *et.al.* 2007) permitieron descubrir que esta proteína a diferencia de las demás agmatinasas posee un motivo de secuencia correspondiente a un dominio LIM en el extremo C-terminal (Figura 3). Con el fin de analizar la función de este dominio se generaron especies de ALP sin dominio LIM; los resultados obtenidos indicaron que la ALP trunca presenta un incremento de 10 veces en la k_{cat} y una disminución de 3 veces en su K_m para agmatina, ambas especies (ALP silvestre y trunca) 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 autoinhibición 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 aun no está definida (Castro *et. al.* 2011).

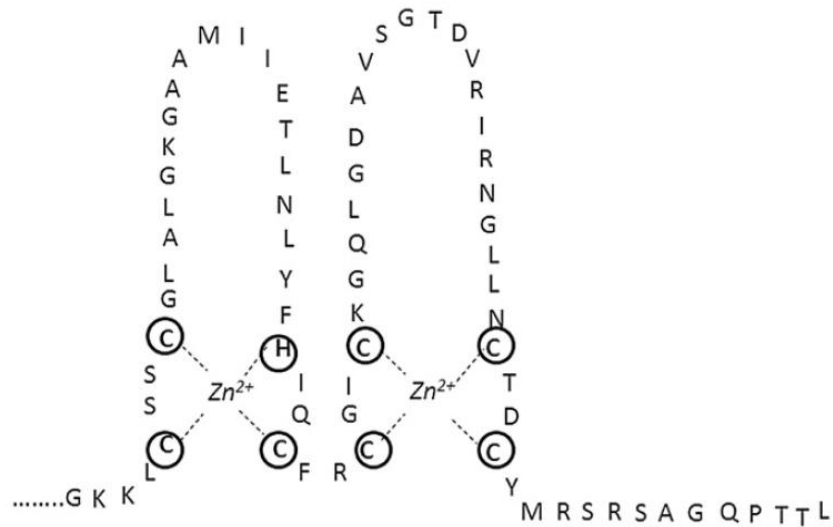


Figura 3. Dominio LIM propuesto para agmatinasa like-protein (Castro *et. al.* 2011)

3.3 DOMINIOS LIM Y “ZINC FINGERS”.

El dominio LIM es un tipo de estructura proteica de conformación secundaria cuya característica principal es la presencia de dos iones de zinc que se encuentran en coordinación con residuos de cisteína, histidina, glutamato y aspartato . (Wolfgang, 2005). La coordinación de este metal es posible por la formación de un núcleo estable, el cual consta de 8 residuos altamente conservados y que se encuentran a intervalos definidos, esta característica determina que el dominio LIM posee un motivo estructural denominado *zinc fingers* (Kardmas *et. al.* 2004).

Los *zinc fingers* presentan características estructurales particulares relacionadas con la coordinación que presenta este metal. Se ha reportado que estos motivos presentan cinco números de coordinación (ZnN₃, ZnNS, ZnN₂S₂, ZnNS₃, ZnS₄), siendo el más común el

ZnS₄, de igual manera existen patrones de coordinación los cuales se encuentran descritos en la figura 4 (Wolfgang, 2005) y forman plegamientos específicos (Tabla 2). El principal rol de los *zinc fingers* es la interacción no solo de proteínas sino también de DNA, RNA, lípidos y proteínas; lo cual confiere la posibilidad que estos zinc fingers formen dominios o formen parte de proteínas, tal como sucede con la ALP.

La combinación de *zinc fingers* da origen a dominios cuyas características son mencionadas en la tabla 3 y en la figura 5.

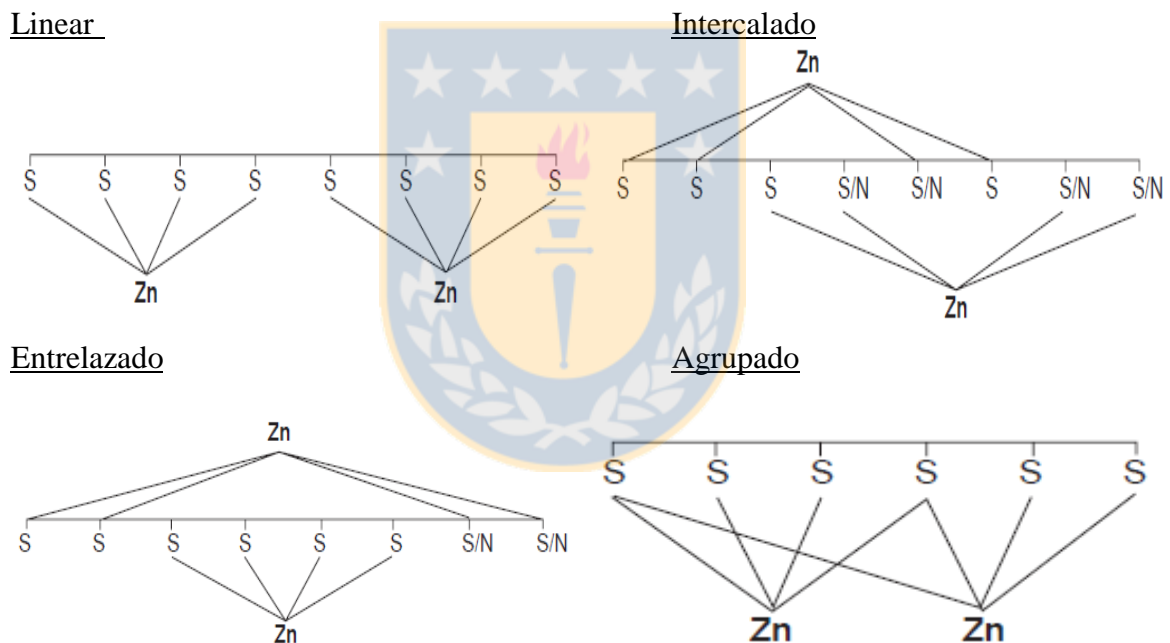
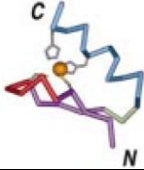
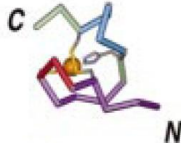
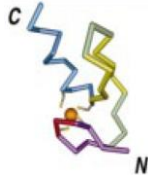
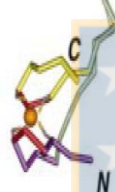


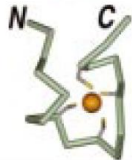
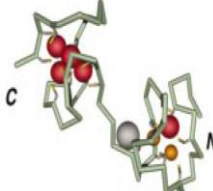


Figura 4. Patrones de interacción zinc-ligando (Wolfgang, 2005)

	Zn1	Loop1	Zn2	Loop2	Zn3	Loop3	Zn4
LIM	C-X ₂ -C-X ₃ -Φ-X ₁₁₋₁₈ -Φ-H-X ₂ -C	—	Φ-X	—	C-X ₂ -C-X ₃ -Φ-X ₄ -Φ-X ₉₋₁₄ -Φ ₂ -C-X ₂ -Z		
RING	C-X ₂ -C	—	X ₉₋₃₉	—	C-X ₁₋₃ -H-X ₁₋₂ -D	—	C-X ₂ -C
PHD	C-X ₂ -C	—	X ₇₋₂₁	—	C-X ₂₋₄ -C-D-X ₂₋₃ -H-X ₂ -C	—	Φ-X ₆₋₄₀ -W-X
MYND	C/H-X ₂₋₄ -C	—	X ₇₋₁₇	—	C-X ₀₋₂ -C-X ₄ -Y	—	C-X ₃ -C/H-X ₄ -W-X ₁₋₄ -H-X ₃₋₄ -C

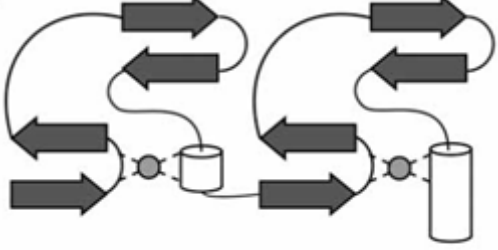
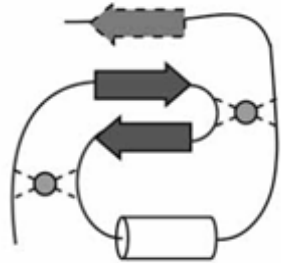
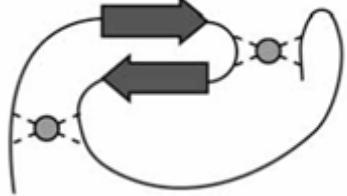
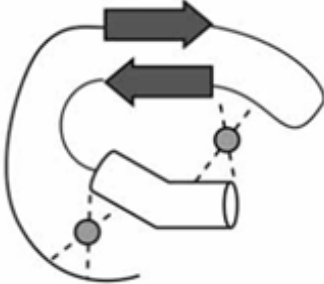
Figura 5. Motivos de secuencia de dominios con Zinc fingers, X es cualquier aminoácido y φ representa un residuo hidrofóbico/aromático. (Matthews *et. al.* 2009).

Tabla 2. Plegamientos presentes en zinc fingers

Plegamiento	Estructura representativa	Características de ligación
C2H2 like		Dos ligandos de unión y dos más del C-terminal con hélice
Gag knucle		Dos ligandos de unión en el bucle y dos más desde una hélice corta o loop
Treble clef		Dos ligandos de unión en el bucle y dos más desde el N-terminal con hélice
Zinc ribbon		Dos ligandos de unión
Zn 2/Cys 6		Dos ligandos desde el N-terminal con una hélice y dos más en un loop
TAZ2 domain like		Dos ligandos cada uno desde dos hélices
Zinc binding loops		Cuatro ligandos de unión
Metalotioneína		Dominios ricos en cisteína que presentan unión a metales

Adaptado de Khrisna *et. al.* 2003

Tabla 3. Dominios conformados por zinc fingers.

Dominio	Sitio de ligación	
LIM	Entre dos hojas beta anti y una hélice	
RING	Entre hélice e inicio del C-terminal; loop entre hojas β y loop hacia N-terminal	
PHD	Inicio C-terminal y loop posterior a segunda hoja β entre 2 loops	
MYND	La misma hélice coordina los dos zinc en los extremos con loops	

Adaptado de Matthews *et. al.* 2009

En relación al dominio LIM, su nombre obedece a una sigla formada a partir de las tres primeras proteínas en las que se encontró este dominio (LIN 11 *cell lineage protein*, ISI-1 *rat insulin gene-enhancer binding protein*, MEC-3 proteína requerida para la especialización de las neuronas mecanoreceptoras de *C.elegans*) (Kadmas *et. al.* 2004). En el genoma humano se han identificado 135 secuencias que codifican para dominios LIM involucrando 58 genes

(Quanhui y cols 2007). Debido a su amplia presencia en eucariontes, los dominios LIM han sido clasificados de acuerdo a su función, generando familias de proteínas que contienen dominios LIM (Figura 6)

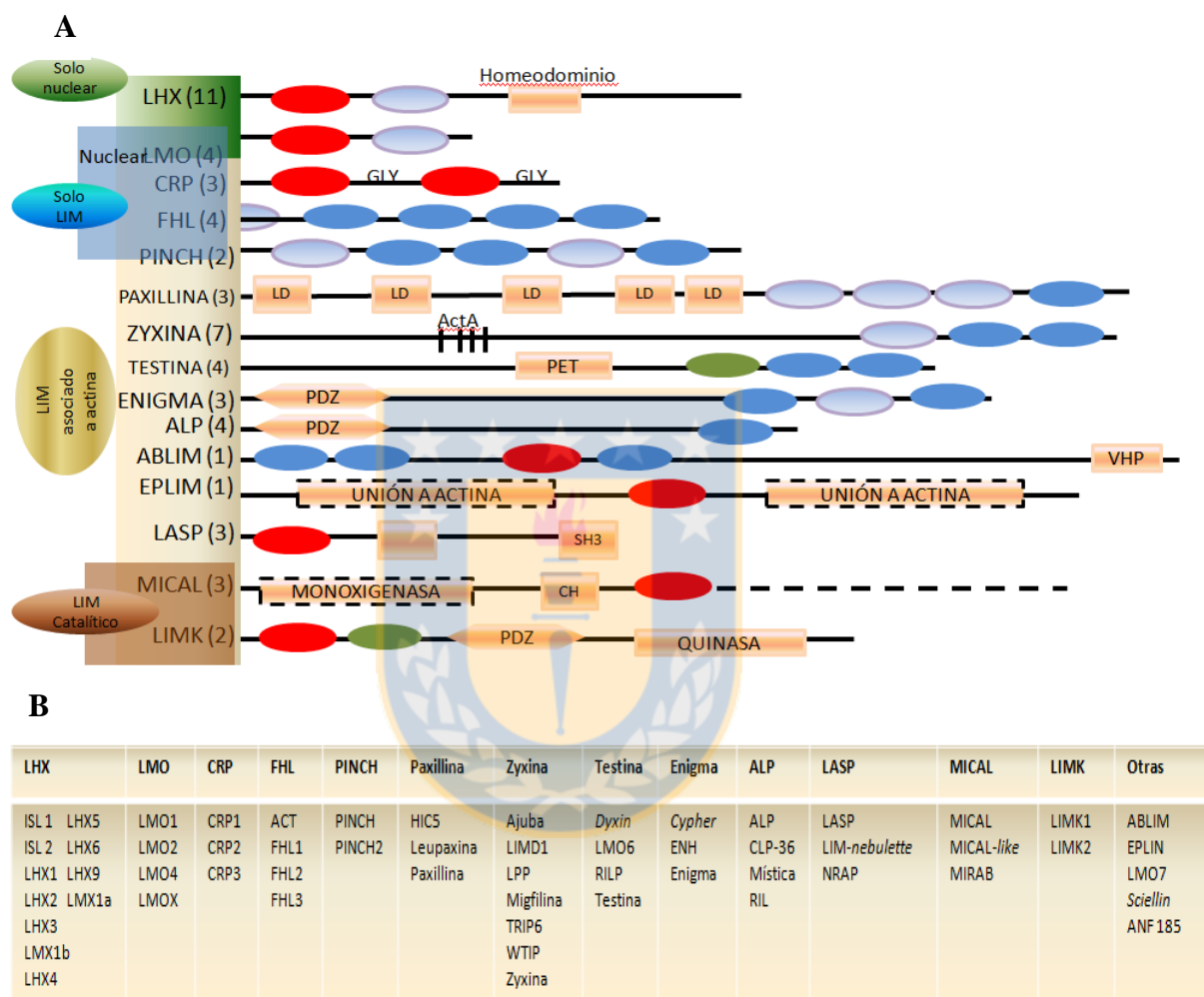


Figura 6. Proteínas LIM humanas. A. Los óvalos de colores representan la similitud de secuencia entre los dominios LIM: rojo, mayor similitud para dominios LIM ubicados en el N-terminal, púrpura para LIM ubicados en el C-terminal, azul para baja similitud y verde nula similitud. Las cajas representan dominios presentes en las proteínas que ejercen funciones específicas, las cajas con líneas punteadas representan dominios con límites aun no definidos. El hexágono representa la presencia del dominio PDZ en proteínas específicas. B. Lista de miembros identificados por cada familia LIM, donde ALP corresponde en este caso a α -actina asociada con proteínas LIM (Adaptado de Kardmas *et. al.* 2004)

Se ha identificado que el dominio LIM presenta una alta probabilidad de interacción proteína-proteína explicada a partir de características estructurales específicas de este dominio como la presencia de hojas β que son fundamentales en la interacción entre el dominio y otras proteínas (Matthews *et. al.* 2009). Gracias a esta característica estructural, el dominio LIM puede tener una diversidad de funciones, dentro de las cuales se han reportado: la dinámica y organización de filamentos de actina (Maul, R. S. & Chang, D. D. 1999, Kromey *et. al.* 2010, Järvinen 2012), la migración neuronal y celular (Suzuki *et. al.* 2002, Uemura *et. al.* 2011), la señalización y adhesión dependiente celular (Tu Y *et.al.* 2003, Diefenbacher *et. al.* 2010, Kromery *et. al.* 2010, Chiswell *et. al.* 2010, Maturana *et. al.* 2011), la diferenciación celular (Shirasaki R. *et al.* 2002, Wilkinson *et al.* 2010, El Omari *et al.* 2011) y el desarrollo de la cresta neural (Ochoa *et. al.* 2012, Vechev *et.al.* 2009).

En las proteínas LIM con actividad catalítica, se ha identificado una LIM-quinasa, que se expresa en el sistema nervioso de mamíferos y cuya fosforilación induce a la reorganización de la actina, lo cual sugiere que esta enzima participa en diversas actividades celulares que involucran la motilidad y crecimiento celular (Nagata *et al.* 1999, Tastet *et. al.* 2012). En esta enzima, el dominio LIM se encuentra ubicado en el N-terminal y la remoción del mismo generó un aumento de la actividad en la LIM-quinasa, lo cual sugiere que este dominio ejercería una regulación negativa o autoinhibición, de igual manera, se ha reportado que mutaciones sitiodirigidas en residuos específicos de algunas LIM quinasas afectan la actividad de la enzima generando un aumento de la catálisis similar a lo observado en la ALP (Castro *et. al.* 2011, Edwards *et. al.* 1999, Whale *et. al.* 2012).

Teniendo en cuenta los antecedentes presentados y la presencia del dominio LIM en la ALP, el problema a resolver consiste en determinar la importancia de los iones Zn^{2+} en la integridad estructural y la acción inhibitoria de este dominio LIM en la ALP.



4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Considerando los antecedentes expuestos, planteamos como hipótesis que los iones Zn^{2+} son fundamentales en la estabilidad estructural y el efecto autoinhibitorio del dominio LIM en la ALP.



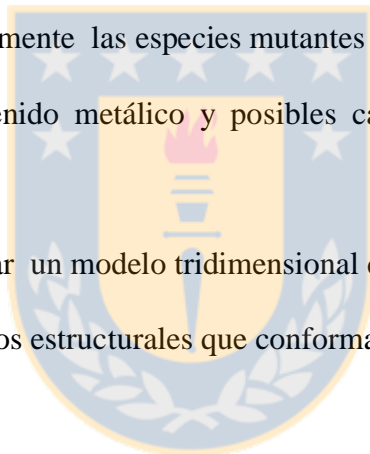
5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar los efectos funcionales y estructurales causados por el reemplazo mutagénico de residuos que estabilizan los iones Zn^{2+} en el dominio LIM de la ALP.

5.2. Objetivos específicos

- Generar las mutantes C453A, H476A y C507A que estabilizan los iones Zn^{2+} en la ALP.
- Caracterizar cinéticamente las especies mutantes del dominio LIM de ALP.
- Determinar el contenido metálico y posibles cambios estructurales de las especies mutantes de ALP.
- Diseñar y caracterizar un modelo tridimensional del dominio LIM presente en la ALP.
- Identificar los motivos estructurales que conforman el dominio LIM de la ALP.



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Reactivos

Todos los reactivos químicos usados en este trabajo de investigación son de grado analítico y grado biología molecular de las casas comerciales Sigma y Merck.

6.2. Vectores

El plásmido H₆PQE60-29,4 fue utilizado por tener inserto el gen que expresa la ALP. Las principales características de este vector son: la presencia de 6 histidinas (6xhis) en el extremo N-terminal de los genes subclonados, la resistencia a ampicilina y cloranfenicol, la presencia de un sitio de término de la transcripción del fago λ to y el promotor fuerte del colifago T7, ubicado río arriba de dos operones lac, permitiendo la represión del gen subclonado por el represor lac, el cual es ducible por IPTG(Isopropyl- β -D-thio-galactosido) y su compatibilidad de ser expresado en la cepa *E. coli* JM109.

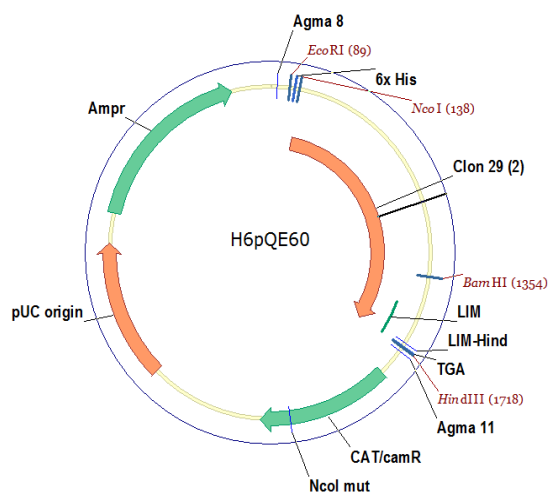


Figura 7. Plásmido H₆PQE60-29,4 (Editado Vector NTI 10.0)

6.3. Cepas

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 del gen mutado de ALP.

6.4. Medios de cultivo

El medio Luria (LB) fue preparado usando 10 g/L de Bacto-triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl. Posterior a la mezcla de estos reactivos se procedió a ajustar la solución a pH 7.0 con NaOH 5N 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.

Las placas LB- agar, fueron preparadas usando medio LB y agregando 15 g/L de agar. Esta solución fue autoclavada, llevada a temperatura de 50°C y se adicionó ampicilina a concentración final de 100 µg/ml final, la cual fue esterilizada por filtración.

6.5. Oligonucleótidos

Con el fin de realizar las mutaciones sitiodirigidas de ligandos de zinc en la ALP subclonado en el vector H₆PQE60-29,4, se diseñaron y utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Mutación C453A: 5'GGG AAG AAG CTG GCC TCC TCC TGT GGG 3'y' 3'CCC TTC
TTC GAC CGG AGG AGG ACA CCC 5'

Mutación H476A: 5' CTG AAT CTC TAC TTT GCC ATA CAG TGT TTC AGG 3' y 3'
GAC TTA GAG ATG AAA CGG TAT GTC ACA AAG TCC 5'

Mutación C507A: 5' GGT CTT CTA AAC GCT ACC GAC TGC TAC 3' y 3' CCA GAA
GAT TTG CGA TGG CTG ACG ATG 5'

6.6 Anticuerpos

Para reconocimiento primario de la ALP se usó un anticuerpo policlonal de conejo anti ALP de cerebro de rata, producido en nuestro laboratorio a partir de la proteína recombinante purificada.

Como segundo anticuerpo se utilizó IgG goat anti rabbit conjugado a peroxidasa de rábano.

6.7 Soluciones generales

TAE 10X: en un litro de agua destilada se mezclaron 48.4 g de Tris, 11.4 mL de ácido acético glacial y 20 mL de EDTA 0.5 M a pH 8.0.

TBS-tween: a un litro de agua destilada se adicionaron 1.21 g de Tris, 8.775 g de NaCl y 500 µL de Tween 20, la solución resultante fue ajustada a pH 7.4.

Buffer TG-SDS10X: a un litro de agua destilada se agregaron 30.2 g de Tris, 144.0g de glicina y 10.0 g de dodecilsulfato de sodio (SDS), la solución fue ajustada a pH 8.4.

Buffer de transferencia: a un litro de agua destilada se adicionaron 3.02 g de Tris, 14 g de glicina, 200 mL de metanol y 0.37 g de SDS.

Mezcla ácida: esta mezcla fue preparada con ácido ortofosfórico al 23% y ácido sulfúrico al 9%

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

6.8 Selección de mutantes

El objetivo general del trabajo consiste en determinar los efectos funcionales y estructurales causados por el reemplazo mutagénico de los residuos que unen el ion Zn^{2+} en el dominio LIM presente en la ALP, para lo cual se tomará como modelo, el propuesto por Castro et.al. (2011) (Figura 8).

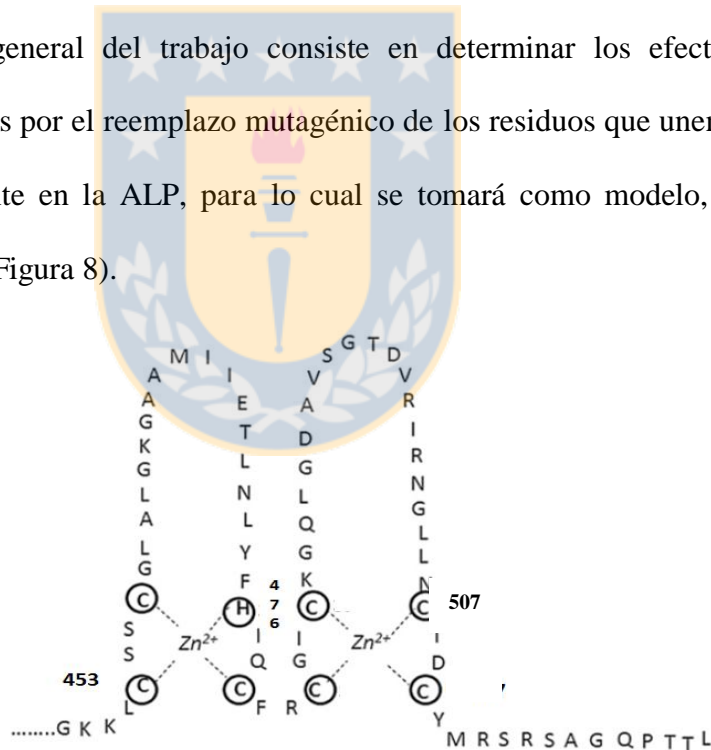


Figura 8. Dominio LIM en ALP (Castro et. al. 2011)

A partir de este modelo se realizaron reemplazos mutagénicos de cisteína o histidina por alanina en cada uno de los zinc fingers que conforman el dominio LIM de ALP, las posiciones en las cuales se efectuaron las mutaciones fueron en las posiciones 453, 476 y 507.

La mutagénesis fue realizada con el kit de mutaciones sitio dirigidas Quick Change® y PCR, usando la DNA polimerasa Pfu y los oligonucleótidos antes indicados que contienen el codón mutado; el producto amplificado fue sometido a digestión con la enzima Dpn I a 37°C por un periodo de 2 horas. El plásmido digerido fue transformado en la cepa *E.coli* JM 109, incubado en placas LB-agar a 37°C durante toda la noche y las colonias obtenidas fueron inoculadas en medio LB con ampicilina durante toda la noche. El plásmido obtenido de estas colonias fue purificado y secuenciado automáticamente con el fin de verificar la presencia de la mutación esperada y la ausencia de mutaciones no esperadas.

6.9. Aislamiento de plásmidos

Los plásmidos resultantes del proceso de electroporación fueron purificados utilizando el kit comercial E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I, Omega Co, siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.10 Electroforesis en geles de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon a una concentración de 1% en buffer TAE 1X y bromuro de etidio a una concentración de 0.7 µg/ml. A las muestras analizadas se les agregó Loading Buffer 1X (Promega) y los geles se corrieron a un voltaje constante de 90V por 70 minutos. Como patrones para estimar el tamaño de los fragmentos de DNA, se usó un marcador de DNA 1000 pb (Fermentas). La confirmación de DNA en los geles fue realizada mediante visualización por transiluminador UV.

6.11. Expresión y purificación de la ALP y sus mutantes

La expresión de las enzimas mutantes se realizó mediante la transformación de la cepa JM 109 de *E. coli* con el plásmido H₆PQE60-29,4 mutado con previa verificación de la presencia de la mutación por secuenciación automática. Las cepas transformadas se dejaron crecer como inóculo en medio estéril de LB-ampicilina durante toda la noche, y luego en medio Terrific Broth-ampicilina con agitación constante, a 37 °C, hasta obtener una D.O. de 0.6 a 600nm. La inducción de la expresión para las enzimas fue realizada con IPTG 0.5 mM, durante toda la noche a 30°C. A continuación, los cultivos fueron centrifugados a 5.000 rpm por 10 minutos en rotor Sorvall tipo GSA, se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue lavado con Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos en rotor Sorvall SS 34. El sedimento obtenido fue homogenizado en una solución que contenía 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; esta mezcla fue sometida a sonicación en ciclos de 10 segundos de sonicación cada 50 segundos de reposo, por 5 minutos totales de sonicación, a 80 % de amplitud; el resultado de esta sonicación fue centrifugado a 14.000 rpm por 20 minutos en rotor Sorvall SS 34 con el fin de obtener el extracto proteico.

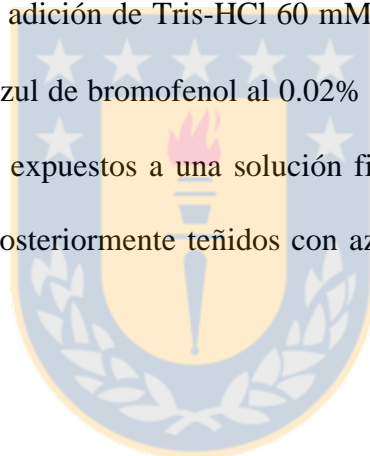
El extracto obtenido fue purificado por cromatografía de intercambio aniónica usando una columna de DEAE-celulosa equilibrada con Tris-HCl 10 mM pH 7.5, lavada con KCl 150 mM hasta obtener una D.O. ~0.01 a 280 nm, la elución de la enzima fue realizada con 250 mM de KCl. La agmatinasa endógena de *E. coli* eluyó a una concentración de 500 mM de KCl, según procedimiento previamente estandarizado en el laboratorio. La detección de ALP en las fracciones obtenidas fue realizada mediante ensayo de actividad por el método colorímetro de Archibald para detección de úrea (Archibald 1945) y western blot.

6.12. Cuantificación de proteínas

Las concentraciones de proteínas fueron determinadas mediante el método de Bradford, empleando albúmina de suero de bovino como estándar y por cuantificación a 280 nm en nanodrop Quawell UV-Vis Spectrophotometer Q5000.

6.13 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida SDS al 8% en presencia de Buffer TG-SDS 1X a un voltaje constante de 100 V. Las muestras cargadas en los geles fueron tratadas previamente con la adición de Tris-HCl 60 mM pH 6.8, SDS al 1%, glicerol al 10%, β -mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0.02% y calentadas a 100°C por 10 minutos. Los geles obtenidos fueron expuestos a una solución fijadora en proporción de metanol 45: ácido acético 1: agua 54, posteriormente teñidos con azul de Coomassie coloidal y lavados con agua destilada.



6.14. Determinación de actividad agmatinasa

La actividad agmatinasa fue detectada teniendo como fundamento la medición de concentración de urea producida por la hidrólisis de agmatina, usando el método colorimétrico de Archibald (Archibald, 1945). El ensayo de actividad fue iniciado agregando la enzima a soluciones de glicina-NaOH 50 mM pH 9.5, agmatina en concentraciones de 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1mM, MnCl₂ 2 mM y extracto de proteína purificada; la mezcla fue incubada a 37°C por 20 minutos con posterior adición de 1 mL de mezcla ácida para finalizar la reacción. Luego se agregaron 100 uL de α -isonitroso propiofenona al 3% en etanol y se calentó por una hora a

100°C. Al finalizar la incubación, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad para luego ser medida su absorbancia a 540 nm.

6.15. Western Blot

Los ensayos de Western Blot fueron realizados iniciando la separación de proteínas mediante geles de poliacrilamida-SDS al 8%, las cuales fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 2 horas en 250 mA a 4°C. El bloqueo de dicha membrana fue realizado con TBS 1X-Tween 20 en solución de leche descremada al 0,5% durante una hora y luego se incubó con el primer anticuerpo en dilución 1:2000 durante 2 horas con agitación constante a temperatura ambiente. Se hicieron 5 lavados cada uno de 10 minutos con TBS-Tween 20 y luego se incubó por una hora con el segundo anticuerpo, IgG goat anti rabbit conjugado a peroxidasa de rabano con dilución 1:5000 en TBS-Tween 20 más leche al 0,5% por una hora. Luego de esta incubación se lavó la membrana 5 veces por 10 minutos con TBS-Tween y se procedió a revelar la membrana con anticuerpo acoplados con el sistema quimioluminiscente Pierce ELC Western Blotting Substrate, siguiendo instrucciones del fabricante.

6.16 Ensayos de fluorescencia intrínseca de triptófanos y apagamiento con acrilamida

Las mediciones de fluorescencia intrínseca para ALP y sus mutantes se realizaron a 25°C en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301, con una longitud de onda de excitación de 295 nm en un rango de emisión de 250 a 400 nm. Las muestras de proteína se evaluaron en un rango de concentración de acrilamida de 0 a 100mM, las emisiones registradas fueron corregidas a partir de la sustracción del espectro de la solución amortiguadora Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 en ausencia de la proteína, también fueron normalizadas tomando como

referencia la concentración de proteína de la ALP silvestre. Posterior a ese tratamiento de los datos se elaboraron los gráficos de Stern-Volmer con el fin de determinar el efecto apagador de la acrilamida en la ALP y sus mutantes.

6.17 Detección de metales

La detección y cuantificación de metales presentes en las muestras purificadas de ALP fue realizada por la técnica de fluorescencia de rayos X en reflexión total, en el Laboratorio de Física Aplicada de la Facultad de Ciencias Físicas de la Universidad de Concepción.

6.18. Construcción del modelo dominio LIM de ALP

La obtención de un modelo para la estructura del dominio LIM de la ALP fue realizada mediante una búsqueda de motivos utilizando el servidor PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) y se efectuó la búsqueda de templados o moldes a partir de los resultados entregados por este servidor. De forma paralela, se hizo una predicción de plegamiento o “*threading*” utilizando el servidor I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) con la secuencia de aminoácidos que conforman el dominio LIM.

El modelamiento del dominio LIM fue realizado con el programa Modeller versión 9.10 (<http://salilab.org/modeller/>) utilizando como templados o moldes las proteínas obtenidas en la búsqueda a través de PROSITE además se usó como molde el mejor modelo obtenido por I-TASSER. Las proteínas utilizadas como templados fueron seleccionadas a través de alineamientos estructurales realizados con el servidor PDB efold (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>).

6.19. Evaluación del modelo

Los modelos obtenidos fueron evaluados utilizando el servidor ProSA (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) y la aplicación PROCHECK instalada en el servidor Expasy: (http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=tools_structure_assessment1&userid=USERID&token=TOKEN). A partir de la evaluación de los modelos obtenidos se escogió el modelo mejor evaluado con el cual se realizó su caracterización.

6.20. Caracterización del modelo

Con el fin de determinar datos que permitieran describir detalles del modelo se realizaron cálculos de las distancias entre el Zn^{2+} y los residuos ligandos junto con la determinación de la geometría de coordinación usando el programa de visualización de moléculas Swiss-pdbviewer versión 4.0.1.

6.21. Clasificación del tipo de *zinc finger*

Con el fin de determinar el tipo de “*zinc finger*” que conforma el dominio LIM en la ALP se realizaron alineamientos estructurales entre el modelo obtenido y las estructuras empleadas en la clasificación estructural reportada en literatura para los “*zinc finger*” (Krishna *et.al.* 2003) usando el servidor PDBefold (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>). Se analizó el porcentaje de identidad de estructura secundaria y el RMSD entre las estructuras alineadas.

7 RESULTADOS

7.1. Construcción de mutantes

La obtención de las mutantes de ALP C453A, H476A y C507A fue realizada mediante mutagénesis sitio dirigida usando el kit de mutagénesis sitio dirigida Quick Change® con los partidores descritos en la sección de materiales y métodos. La presencia de las mutantes fue verificada mediante secuenciación automática de los productos amplificados para cada subclonamiento realizado (figura 9).

A	GTA CGT CCC AGA AGT GGC AAA GCC CAA AAT CCC CAG AAC CCG GAA GCA ACT TGA ACA TTC AAT TTC TGA CAA AAA TGC CTG AAA CCG ACC AAC TAC ATT GCC AAA TCT CAA TTC TCA AGC GGA TTC CCC AAG CAG TGA GAA GTC CCC CGC GAG CAC GCC TTT TAA GTT CTG GGC GTG GGA CCC GGA AGA GGA GCG TAG GCG ACA GGA GAA GTG GCA GCA GGA GCA AGA GCG CTG CTC CAG GAG AGG TAT CAG AAG GAG CAG GAT AAG CTG AAG GAG GAA TGG GAA AAG GCC CAG AAG GAG GTA GAA GAA GAG GAA CGC AGA TAC TAT GAG GAG GAG CGT AAG ATA ATT GAG GAC ACC GTG GTT CCA TTC ACT ATT TCC TCG AGT TCT GCC GAC CAG CTG TCT ACA TCC TCA TCT GTA ACT GAA GGC AGC GGG ACA AGG AAT AAG ATG GAC TTG GAA AAC TGC CAA GAC AGA GAC AAA GAG AGA AGA CAG AAC ACT CCC CTC CAG GAG AAT GAC AGT GAC TCA TCA CTC AAA GCT AGA GAA AGT GGC CTG CCC GAG GAG CAC AGC AGC CTA ACT CAA AGT CCC TCA GCT AAC TCT GAA AAC TCC GTG TCA AAA GGA ATT AGT CAG GAC CAG CAG CCA GAG ACA GAG GCT GAG GCC TCA CAC TGT GGT ACA AAC CCA CAG TCA GCT CAG GAT CCA CCT TGG AAT CAA CAG ATC TCA AAC CCA CCG ACA TCC AAG TCG GAA GAC GTG AAG CCC AAA ACC CTA GCC CTG GAG AAA AGC ATT AAT CAT CAG ATT GAG TCT CCG GGG GAA AGG CCG AAG TCT ATA AGC GGG AAG AAG CTG GCC TCC TCC TGT GGG CTT GCT TTG GGG AAA GGT GCC GCA ATG ATC ATC GAG ACT CTG AAT CTC TAC TTT CAC ATA CAG TGT TTC AGG TGC GGC ATT TGT AAA GGA CAG CTA GGA GAT GCA GTG AGT GGG ACA GAT GTC AGG APT CGC AAC GGT CTT CTA AAC TGT ACC GAC TGC TAC ATG CGA TCC AGA AGT GCT GGC CAG CCT ACA ACA CTG GAA AGC TAA TAG TTT TTC TTT TCC CCC GAA TTT
B	TGGGGGGAGCCTATTTCATTAAAGAGGAGAATTAACCATG CAT CAC CAT CAC CAT CACGCC ATG GTG ACA CCC AGG CCT TAC TCC CAG CCC AAA AAC TCT CAG GAG GTT CTG AAG ACT TTT AAG GTC GAT GGG AAA GTC AGC ATG AAT GGA GAA ACG GCC CGT GGA GAT GTG GAA GGA AAG GAA AAA GAA GAC CCC ACA GCG GTG GCC CCT GGC CCT TCC TTA ACC AAG TCC CAG ATG TTT GAA GGC GTG GCC ACG GTG CAT GGC TCT CCC GTG CAA GTG AAA CAA GGC AGC AAC AGC ATC GAG ATC AAC ATC AAG AAG CCA AAT TCT CCT CCC CAG GAA CTG ACA GCA GCC TCT GAG GAA ACT GAG TCA AAC GGC CGA GAT GAT GAG AAC GGT GAA GAG AGC TCA GGG GCA CGG GAT GTG GAG CTG GAT TCG GCA CAG CCA CAG CAT TTT ACA ACA ACC GTG ACT CGG TGC AGC CCA ACC GTG GCC CTG GTG GAG TTT TCT TCC AGC CCG CAG CTC AGG AAT GAA GTA CCA GAA GAA CAA CAG CAG AAG AAG CCA GAA AAC GAG ATG AGC GGG AAG GTG GAG TTA GTA TCC CAG AAG GTG GCA AAG CCA AAA TCC CCA GAA CCG GAA GCA ACC TTG ACA TTT CCA TTT CTT GAC AAA ATG CCT GAA ACC GAC CAA CTA CAT TTG CCA AAT CTC AAT TCT CAA GCG GAT TCC CCA AGC AGT GAG AAG TCC CCC GCG AGC AGC CCT TTT AAG TTC TGG GCG TGG GAC CCG GAA GAG GAG CGT AGC GAC AGG AGA AGT GGC AGC AGG AGC AAG AGC GCC TGC TCC AGG AGA GGT ATC AGA AGG AGC AGA TAA GCT GAA GGA GGA ATG GGA AAA GGC CCA GAA GGA GGT AGA AGA AGA GGA ACG CAG ATA CTA TGA GGA GGA GCG TAA GAT AAT TGA GGA CAC CGT GGT TCC ATT CAC TAT TTC CTC GAG TTC TGC CGA CCA GCT GTC TAC ATC CTC ATC TGT AAC TGA AGG CAG CCG GAC AAG GAA TAA GAT GGA CTT GCA AAA CCT GCC CAA GAC AAG GAG AAA GAG AGA GAG AAG AAG AAG CAG AAC ACC TCC CCC TCC AGG GAG AAT GAA CAG TTG ACT CAT CAC CTC CAA AGG CTT AGG AGA AAG TGC TGC CCC GAG AGC ACA GCA GTC TAA CTC AAG TCC CCT CAG CTA AAC TTC TGT AAA ACT GCT CGC CGG GTG GTC TTC CAA AG
C	CAATCATTAAAGAGGAGAATTAACCATGCATCACCATCACCATCAGGCC ATG GTG ACA CCC AGG CCT TAC TCC CAG CCC AAA AAC TCT CAA GAG GTT CTG AAG ACT TTT AAG GTC GAT GGT AAA GTC AGC ATG AAT GGA GAA ACG GCC CGT GGA GAT GTG GAA GGA AAG GAA AAA GAA GAC CCC ACA GCG GTG GCC CCT GGC CCT TCC TTA ACC AAG TCC CAG ATG TTT GAA GGC GTG GCC ACG GTG CAT GGC TCT CCC GTG CAA GTG AAA CAA GGC AGC AAC AGC ATC GAG ATC AAC ATC AAG AAG CCA AAT TCT CCT CCC CAG GAA CTG ACA GCA GCC TCT GAG GAA ACT GAG TCA AAC GGC CGA GAT GAT GAG AAC GGT GAA GAG AGC TCA GGG GCA CGG GAT GTG GAG CTG GAT TCG GCA GAG CCA CAG CAT TTT ACA ACA ACC GTG ACT CGG TGC AGC CCA ACC GTG GCC CTG GTG GAG TTT TCT TCC AGC CCG CAG CTG AGG AAT GAA GTA CCA GAA GAA CAA GAC CAG AAG AAG CCA GAA AAC GAG ATG AGC GGG AAG GTG GAG TTA GTA CTG TCC CAG AAG GTG GCA AAG CCA AAA TCC CCA GAA CCG GAA GCA ACC TTG ACA TTT CCA TTT CTT GAC AAA ATG CCT GAA ACC GAC CAA CTA CAT TTG CCA AAT CTC AAT TCT CAA CCG GAT TCC CCA AGC AGT GAG AAG TCC CCC ACG AGC AGC CCT TTT AAG TTC TGG GCG TGG GAC CCG GAA GAG GAG CGT AGG CGA CAG GAG AAG TGG CAG CAG GAG CAA GAG CGC CTG CTC CAG GAG AGG TAT CAG AAG GAG CAG GAT AAG CTG AAG GAG GAA TGG GAA AAG GCC CAG AAG GAG GTA GAA GAA GAG GCC AGA TAC TAT GAG GAG GAG CGT AAG ATA ATT GAG GAC ACC GTG GTT CCA TTC ACT ATT TCC TCG AGT TCT GCC GAC CAG CTG TCT ACA TCC TCA TCT GTA ACT GAA GGC AGC GGG GAC AGG AAT AGA TGG GAC TTT GCA AAC TGC CAG ACG AGA CAA GAG AGA GAC GAC ACC TCC CCC TCC AGG AGA ATG ACA GTG ACT CAT CAC CTC AAG CTA GAG AAG TGC CTG CCC GAG GAG CAA GCC AGC CTA CCT CAA AGT TCC CCT CAA GCT TAA GT

Figura 9. Secuenciaciones obtenidas para mutantes del dominio LIM ALP. A. Mutación C453A. B Mutación H476A. C Mutante C507A.

7.2. Expresión, purificación, identificación y caracterización de ALP y mutantes

El gen de ALP y sus mutantes fueron expresados y purificados en una cromatografía de intercambio iónico como se describe en materiales y métodos. La ALP y sus mutantes eluyeron con 250mM de KCl. Todas las mutantes de ALP presentaron actividad agmatinasa, por lo tanto ninguna de las mutaciones fue deletérea de su actividad.

Con el fin de analizar la pureza de la enzima silvestre y las enzimas mutadas se realizaron geles de poliacrilamida al 8% y la identificación de estas enzimas fue realizada a partir de western blot, tal como se confirma en la figura 10.



Figura 10. Análisis de ALP silvestre y mutantes. A. Determinación de pureza en geles de acrilamida al 8%, el tamaño de las bandas azules corresponde aproximadamente a 66 kDa. B. Identificación por western blot

A partir de los resultados obtenidos en los geles de poliacrilamida se escogieron las fracciones con mayor pureza para llevar la cuantificación de zinc presente en las muestras mediante espectroscopía de fluorescencia de rayos X en reflexión total, detectando diferentes concentraciones que fueron usadas para calcular la relación molar de átomos de zinc en la ALP silvestre como en las mutantes (Tabla 4).

En la ALP silvestre la concentración molar de zinc es de dos átomos por molécula de ALP, lo cual confirma los resultados obtenidos previamente en otros trabajos del laboratorio de enzimología de la Universidad de Concepción. En la mutante C453A no se detectó contenido de zinc, lo cual sugiere que este residuo es clave para la coordinación del zinc en el primer *zinc finger* del dominio y que también estaría ejerciendo algún tipo de estabilidad para el segundo *zinc finger* del dominio LIM. Para las mutantes H476A y C507A se detectaron menos de dos átomos de zinc por molécula de ALP, lo cual indica que la coordinación entre zinc y los ligandos se pierde al mutar solo un residuo ligando, pero en estas mutaciones se alteraría solo el *zinc finger* donde realizan la respectiva coordinación.

Tabla 4. Contenido de zinc en ALP y mutantes

Especie	Relación de zinc por molécula de ALP
ALP-LIM silvestre	1,8
C453A	0,06
H476A	0,44
C507A	0,86

7.3. Caracterización cinética de ALP silvestre y mutantes

Las constantes cinéticas de las mutantes de ALP fueron determinadas a partir de curvas de saturación (Figura 13) cuantificando la concentración de úrea producto de la hidrólisis de agmtina. Los resultados obtenidos (Tabla 5) indican que la mutante C453A genera un aumento de 14 veces en la constante catalítica con respecto a la ALP silvestre, este incremento en la catálisis también se ve evidenciado en la eficiencia catalítica de esta mutante. La mutante H476A no mostró cambios significativos en sus constantes cinéticas en comparación a los obtenidos para la ALP silvestre. La mutante C507A presenta un aumento del doble en la k_{cat}

con respecto a la ALP y que también se muestra un aumento de 7 veces en la eficiencia catalítica de esta mutante.

Tabla 5. Constantes cinéticas de ALP silvestre y mutantes en el dominio LIM

Especie	Km (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /Km (M ⁻¹ s ⁻¹)
ALP silvestre (Castro <i>et.al.</i> 2011)	3,0	0,9	300
C453A	2,7	14,5	5370,3
H476A	0,97	1,5	1546,3
C507A	1	2,2	2200

7.4 Emisión de fluorescencia y ensayos de apagamiento.

La presencia de cambios conformacionales en las mutantes de la ALP fue evaluada tomando como fundamento los cambios en la fluorescencia intrínseca de triptófanos, por lo cual se realizaron espectros y ensayos de apagamiento con acrilamida a diferentes concentraciones. Es necesario resaltar que la ALP posee cinco residuos de triptófano que no están presentes en el dominio LIM, por lo tanto cualquier cambio observado en la fluorescencia emitida por las mutantes mostraría su influencia sobre el estado conformacional del resto de la proteína.

En este sentido, se observaron cambios significativos en los espectros de emisión de las mutantes en relación a la ALP silvestre, con un aumento importante en la intensidad de fluorescencia más no en un cambio en la longitud de onda de máxima emisión (Figura 14, tabla 6) siendo el cambio más representativo el registrado para la mutante C453A que presenta una emisión de fluorescencia mayor que la ALP silvestre y demás mutantes.

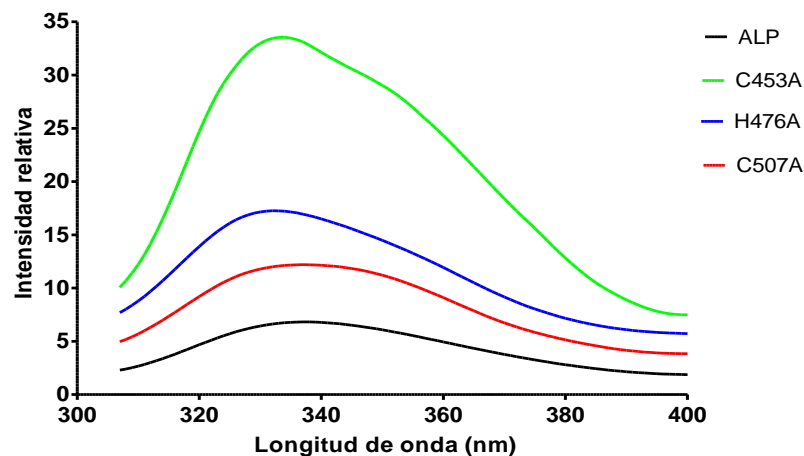


Figura 11. Espectros de fluorescencia intrínseca de ALP silvestre y las mutantes C453A, H476A y C507A, normalizadas a la concentración de proteínas de la ALP (200 $\mu\text{g/ml}$). Las mediciones se realizaron a 25°C en un espectrofluorimetro ShimadzuRF-5301 y la longitud de onda de excitación fue de 295 nm

Los ensayos de apagamiento con acrilamida realizados indican que las mutantes generaron cambios conformacionales en la ALP, provocando que los residuos de triptófano presenten diferentes exposiciones al solvente cuya variación depende de la mutante presente en el dominio LIM; dicha afirmación está sustentada en los gráficos de Stern-Volmer obtenidos, en los cuales se observa un comportamiento lineal para la ALP silvestre y una relación hiperbólica para las mutantes (Figura 12) y que confirman la relevancia de la mutante C453A en el aumento de la actividad de la ALP por reordenamiento estructural en esta enzima que altera la exposición de triptófanos al solvente.

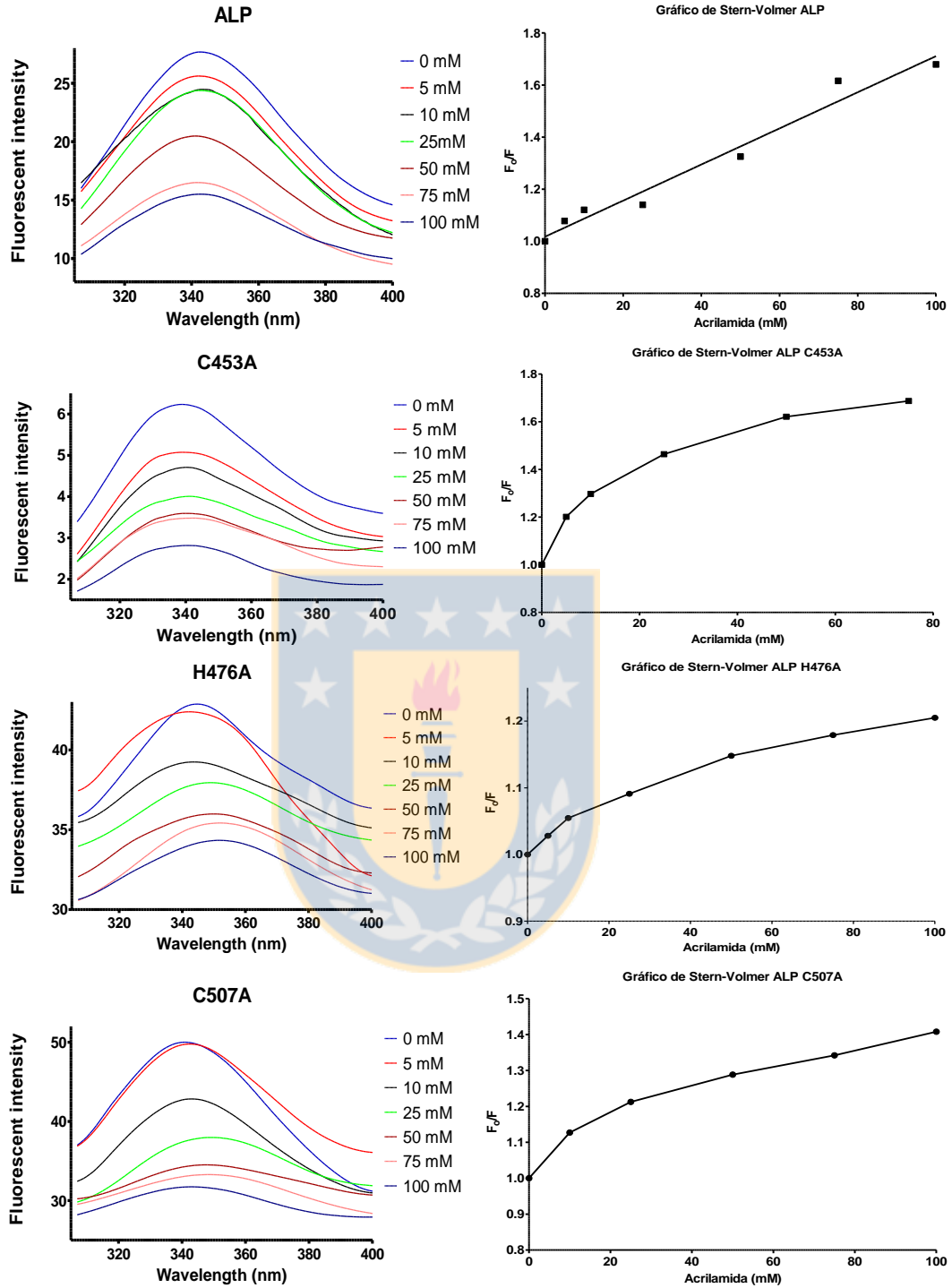


Figura 12. Ensayos de apagamiento y gráficas de Stern-Volmer con acrilamida en ALP silvestre y mutantes.

7.6 Modelo estructural de dominio LIM presente en ALP - elección de templados.

La búsqueda de información estructural del dominio LIM de ALP utilizando el servidor PROSITE indica que la secuencia corresponde a un dominio LIM, este servidor también ofrece información de otras proteínas con estructuras resueltas y que presentan similitud con la secuencia de dominio LIM ALP, tomando como referencia dicha información se realizaron alineamientos de secuencia, cuyos resultados están resumidos en la tabla 7. Los porcentajes de identidad de secuencia obtenidos no tienen un mínimo aceptable para ser seleccionados como templados, por lo cual se realizó una predicción de estructura *threading* usando el servidor I-TASSER, los resultados obtenidos arrojaron 5 modelos (Figura 13), de los cuales se escogió el modelo número 1 como templado.

A partir del templado conseguido en el servidor I-TASSER se realizaron alineamientos de estructura (Tabla 8) para buscar nuevas estructuras que sirvieran de templado para obtener el modelo del dominio LIM en la ALP, de este proceso se obtuvo como mejor templado la estructura con código PDB 2XQN, escogiendo el segundo dominio LIM de esta proteína como molde y que fue rotulado como 2XQN LIM 2.

Tabla 6. Porcentajes de identidad de secuencia obtenidos en alineamientos.

Secuencia (PDB)	% ID	Secuencia (PDB)	% ID	Secuencia (PDB)	% ID
1WIG	17,33	2COR	24,32	1B8T	28
1NYP	18,57	1X68	25	1CTL	28
1G47	18,84	1X4K	25,33	1CXX	28
1V6G	21,62	1X61	25,68	1IBI	28
1X62	22,50	1IML	26,32	1QLI	28
1J20	22,97	1A7I	26,67	1WYH	28,38
2CO8	23,29	1X6A	26,67	1RUT	28,95
1X63	24	1X3H	27	1M3V	30
1X64	24,32	1X4L	27,40		

Tabla 7. Alineamientos de estructura obtenidos con templado I-Tasser

PDB	RMSD (Å)
2XQN LIM 1	1,62
2 XQN LIM 2	1,13
3F6Q LIM 1	1,99
3F6Q LIM 2	2,01
3F6Q LIM 3	2,04
2RGT LIM 1	2
2RGT LIM 2	1,65

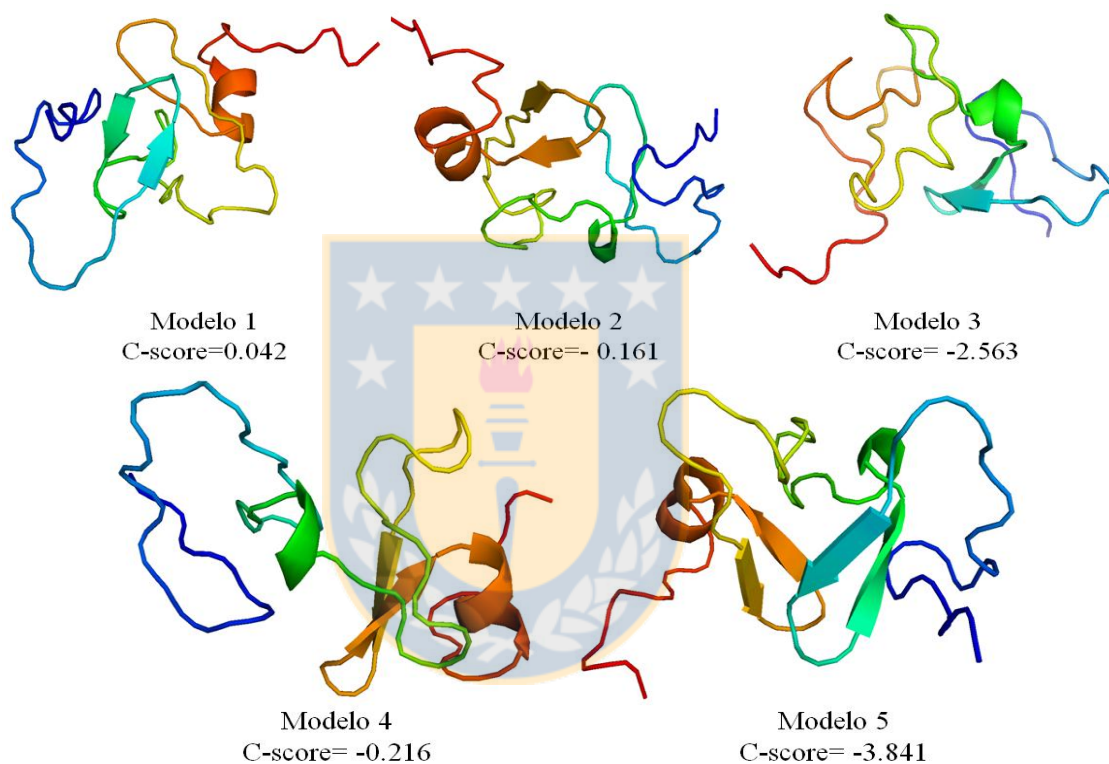


Figura 13. Modelos obtenidos por threading en servidor I-Tasser.

7.7 Evaluación del modelo.

Los cinco modelos obtenidos en Modeller fueron evaluados utilizando el servidor ProSA para determinar su validación y refinamiento con proteínas depositadas en el Protein Data Bank (Figura 14), se eligió el modelo número 1 como por tener el mejor Z-Score que indica una minimización energética favorable.

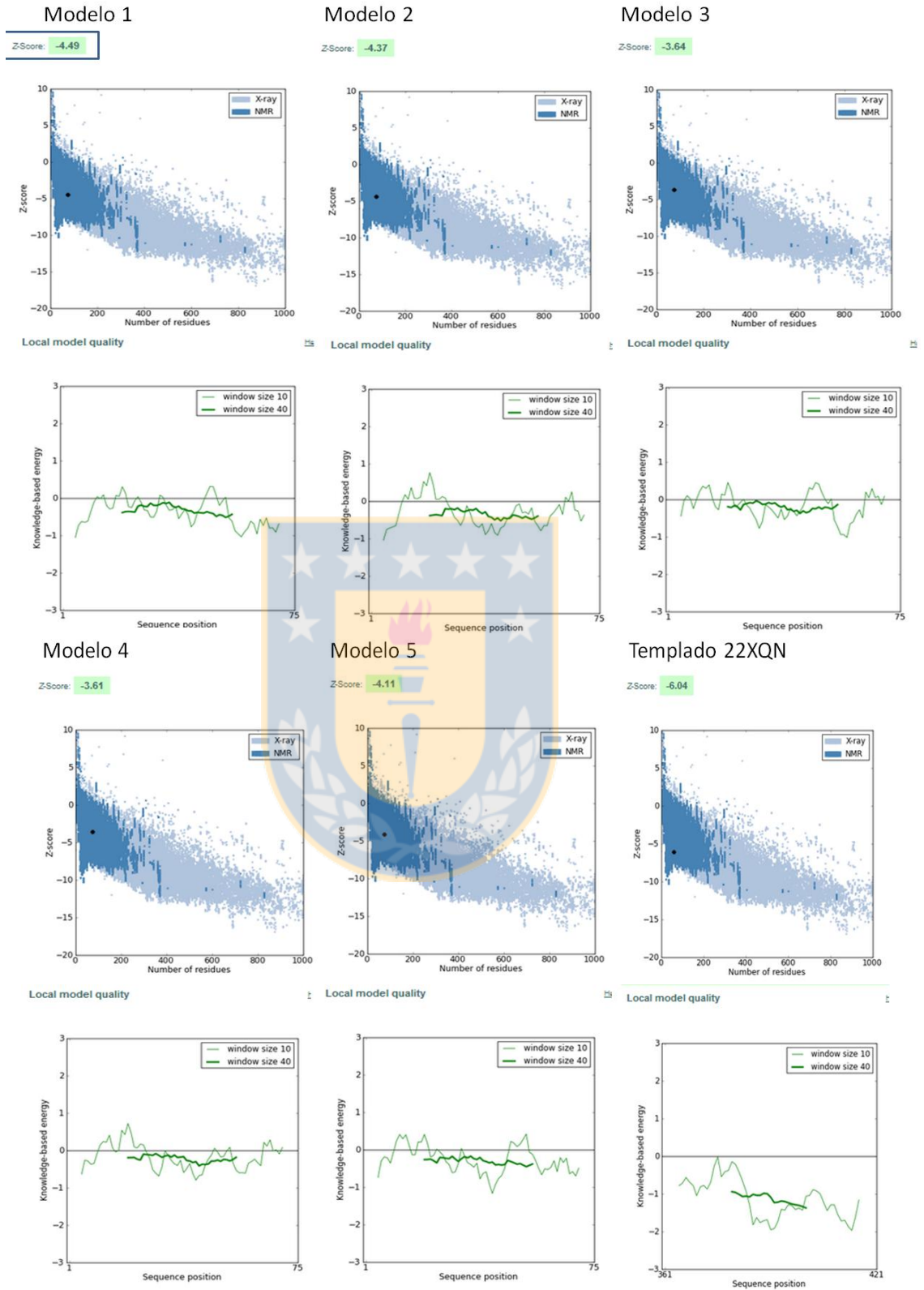


Figura 14. Validación y refinamiento de modelos obtenidos a través de ProSA.

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 (Figura 15), en el cual se puede apreciar que la mayoría de residuos del dominio LIM en la ALP poseen ángulos de enlace peptídico permitidos.

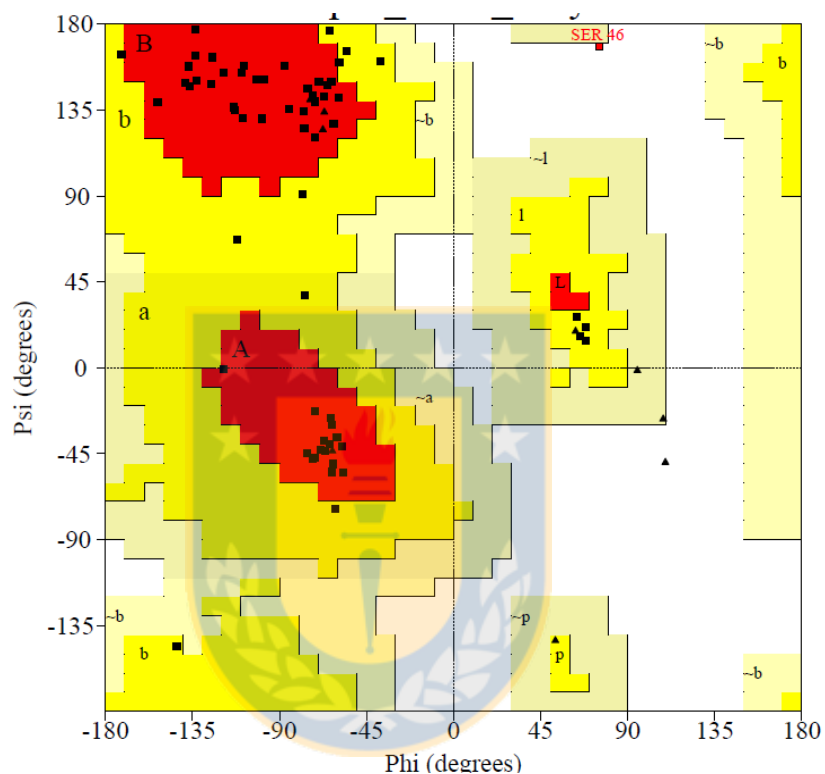


Figura 15. Gráfico de Ramachandran del dominio LIM en ALP.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en cuanto a la evaluación del modelo en la figura 16 se muestra el modelo obtenido para el dominio LIM en la ALP y las interacciones de Zn^{2+} con los respectivos ligandos.

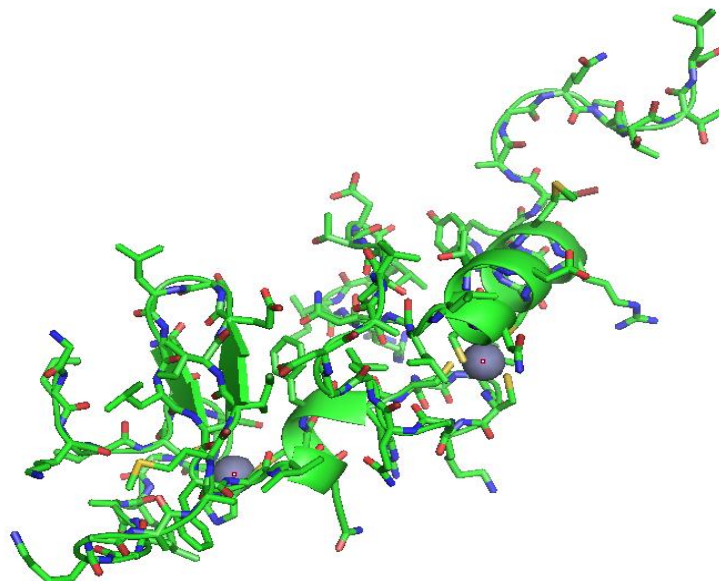


Figura 16. Modelo del dominio LIM de la ALP.

7.7 Caracterización del modelo

El modelo del dominio LIM fue caracterizado en los siguientes aspectos: número y tipo de coordinación, distancias entre el Zn²⁺ y ligandos, y ángulos de coordinación. En relación al tipo de coordinación presente en los zinc fingers del dominio LIM está fue identificada como linear y los números de coordinación hallados fueron: ZnNS3 para el primer zinc finger y ZnS4 para el segundo zinc finger, estos números han sido descritos y reportados para diferentes moléculas biológicas (Wolfgang, 2011). La descripción gráfica de la coordinación entre los iones Zn²⁺ y ligandos es realizada en la figura 17.

Las distancias entre el Zn²⁺ y los ligandos del dominio LIM de la ALP (Tabla 8) presentan una mayor distancia de interacción entre el zinc y los ligandos que la medida para el templado.

Tabla 8. Distancias entre el zinc y ligandos en el dominio LIM ALP y su templado.

	Distancia con Zn ²⁺ (Å)							
	Zinc finger 1				Zinc finger2			
	Cys 453	Cys 456	His 476	Cys 479	Cys 482	Cys 485	Cys 507	Cys 510
Modelo ALP LIM	2,39	2,02	1,63	1,98	2,28	1,76	1,98	2,48
Templado 2 XQN LIM 2	Cys 361	Cys 364	His 383	Cys 388	Cys 391	Cys 394	Cys 412	Cys 416
	2,3	2,2	2,1	2,3	2,3	2,3	2,3	2,4

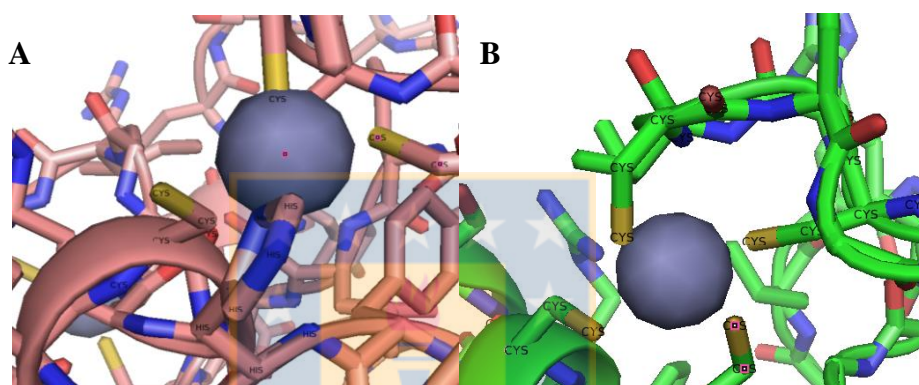


Figura 17. Coordinación entre iones Zn²⁺ y residuos en dominio LIM de ALP. A. *zinc finger* 1. B. *zinc finger* 2.

La coordinación presente en los dedos de zinc presentes en el dominio LIM es de geometría tetrahédrica de acuerdo a la medición de los ángulos de enlace obtenidos para este modelo (Tabla 10).

Tabla 9. Ángulos de coordinación presentes en el dominio LIM ALP

Zinc finger 1		Zinc finger 2	
Residuos	Ángulo	Residuos	Ángulo
Cys 453-Zn-Cys 456	86,17°	Cys 482-Zn-Cys 485	134,80°
Cys 453-Zn- His 476	93,79°	Cys 485-Zn-Cys 510	102,18°
Cys 456-Zn-Cys 479	127,73°	Cys 510-Zn-Cys 507	101,92°
Cys 456-Zn- His 476	88,94°	Cys 507-Zn- Cys 482	79,69°
Cys 456-Zn- Cys 479	68,94°	Cys 482-Zn-Cys 510	114,39°
His 476-Zn- Cys 479	147,84°	Cys 485-Zn-Cys 507	118,73°

7.8 Clasificación del tipo de *zinc finger*

Con el fin de determinar el tipo de “zinc finger” que tiene el dominio LIM ALP se realizaron alineamientos de estructura con las proteínas representativas que fueron empleadas en la clasificación estructural de *zinc fingers* (Krishna *et.al.* 2003). Los resultados obtenidos indican que el dominio LIM ALP posee “zinc fingers” con un plegamiento de tipo C2H2, esta selección está basada en los resultados obtenidos en los alineamientos (tabla 10) donde el RMSD y el porcentaje de identidad de estructura secundaria fueron favorables para el *zinc finger* tipo C2H2. A partir de estos análisis, se afirma que el dominio LIM de ALP posee zinc finger que presentan un plegamiento estructural C2H2 like conformado por una unidad $\beta\beta\alpha$, cuyos sitios de unión a zinc se ubican en la hélice C-terminal y en los *knuckles* del dominio



Tabla 10. Selección de “zinc finger” presentado en dominio LIM ALP.

Plegamiento	PDB usados	Promedio RMSD	Promedio % see	Descripción plegamiento
C2H2 like	1FU9, 1FV5, 1JD5, 1KLR, 1SP1, 1ZFD, 1ZNF, 1AAAY, 1BBO, 1C9Q, 1YUI, 2ADR, 2DRP, 2GLI, 1K2F, 1RMD, 1UBD, 1EJ6, 1TF6, 1G73	2,50 (0,5)	59,5	Dos ligandos en hélice C terminal y otros dos en knuckle
Gag knuckle	1FN9	2,63	50	Dos ligandos en knuckle y otros dos en hélice corta o loop.
Treble clef	4GAT, 1GNF, 1F62, 1E4U, 1DCQ, 1CHC, 1Vfy, 1KB6, 1LV3, 1KBE, 1K3W, 1G47, 1Z60, 1G25, 1FAQ, 1EE8, 1B8T, 1DGS, 1PTQ, 1G2R, 1EN7, 1EF4, 1RMD, 1I3J, 1XPA, 1LM7, 1I3Q, 1FBV, 1DVP, 1A73, 1MHD, 1L2B, 1HC7, 1XBI, 1IML, 1ZBD, 1LDJ, 1FFY, 1JL2, 1QLO, 15LE	2,84 (0,93)	43,95	Dos ligandos en knuckle y otros dos en hélice N terminal.
Zinc ribbon	1PFT, 1DXG, 1TFI, 1G8K, 1EG9, 1DFE, 1QYP, 1ZIN, 1RFS, 1J8F, 1ICI, 1FQT, 1EZV, 1B55, 1GH9, 1EYK, 1QF8, 1D0Q, 1DX8, 1MA3, 1ADU, 1GAX, 1F4L, 1B71, 1 ⁸ H, 1LLO, 1KJZ, 1JJ2, 1I50, 2OCC, 1ILE, 1I5O	3,06 (0,38)	40,68	Dos ligandos cada uno con dos Knuckles
Zn2/Cys6	1CO4, 2HAP, 1ALC, 1ZME, 1DGG	2,14	30	Dos ligandos en una hélice N-terminal con dos ligandos con loop
TAZ Domain like	1F81, 1JR3, 1WJB	3,31	15,6	Dos ligandos cada uno con dos hélices terminales
Zinc binding loops	1CW0, 1CYQ, 1A5T, 1ENU, 1IQ8, 1I3Q, 1HSO, 1GPC, 1E3J, 1LDJ, 1IA9	3,08	21,63	Cuatro ligandos con loops

8 DISCUSIÓN

Los efectos metabólicos, farmacológicos y neurológicos de la agmatina han sido ampliamente descritos, llegando a considerar este metabolito como un neurotransmisor (Halaris A. y Plietz J. 2007); a pesar de su relevancia, la información relacionada con su catabolismo y las enzimas involucradas en este proceso es escasa. Por lo cual, es de gran interés el estudio de los mecanismos que intervienen en la degradación de la agmatina cuya acción es ejercida por la enzima agmatinasa. Sin embargo, uno de los grandes inconvenientes para dilucidar el catabolismo de este metabolito hace referencia a la difícil obtención de preparaciones enzimáticas activas; solo hasta el año 2007 (Uribe *et. al.* 2007) se pudo obtener una proteína mediante el análisis de una librería de expresión de genes de cerebro de rata que presenta actividad agmatinasa teniendo una divergencia en los residuos claves para la catálisis de la familia ureohidrolasas, a la cual pertenece la agmatinasa. Dentro de la caracterización de esta proteína denominada “*agmatinase like protein*”, ALP; se realizaron alineamientos de secuencia con la agmatinasa de *E.coli* y agmatinasa humana cuyo resultado fue el hallazgo de un motivo de secuencia correspondiente a un dominio LIM (Uribe *et. al.* 2007), el cual posee un rol autoinhibitorio en la ALP ya que al ser removido de la enzima, aumenta significativamente la catálisis (Castro *et. al.* 2011).

La característica principal del dominio LIM es tener dos dedos de zinc que coordinan ligandos de cisteína e histidina para el caso particular de la ALP, la pregunta a responder en este trabajo consiste en determinar la importancia de los iones Zn^{2+} en la integridad estructural y la acción inhibitoria de este dominio LIM en la ALP.

Tomando como punto de partida la mutagénesis sitio dirigida de residuos de cisteína e histidina presentes en el dominio LIM, se realizaron mutaciones cuyos resultados de cuantificación de metales, emisión de fluorescencia y actividad enzimática determinaron que hay residuos claves que actúan como ligandos de Zn^{2+} en el dominio LIM de la ALP que afectan su actividad enzimática, el contenido de Zn^{2+} y su conformación estructural.

En este sentido se observa que el efecto más significativo es el causado por la mutación C453A. En efecto, ésta especie prácticamente no contiene Zn^{2+} y al igual que la mutante trunca que carece del dominio LIM, muestra un incremento de un orden de magnitud en la constante catalítica para la hidrólisis de agmatina. En la gráfica de Stern Volmer también se observa un significativo cambio conformacional expresado en una relación hiperbólica que se interpreta como una mayor exposición de los triptófanos presentes en la ALP.

Las otras mutantes (H476A y C507A), no mostraron cambios significativos en sus constantes cinéticas, a pesar de presentar un menor contenido de Zn^{2+} (prácticamente un 50 % del correspondiente a la proteína silvestre). Sin embargo los gráficos de Stern-Volmer muestran una relación hiperbólica que manifestaría un grado menor de exposición al solvente. Con lo cual, todas las mutaciones estarían generando cambios conformacionales que implican una mayor exposición de triptófanos al solvente, este efecto también ha sido observado para la ALP trunca de dominio LIM (Castro *et. al.* 2011).

Los resultados obtenidos apoyan la participación de los residuos C453A, H476A y C507A en la estabilidad del dominio LIM de la ALP y la relevancia de este dominio en la actividad enzimática, siendo la mutante C453A la de mayor importancia; esta mutación

estaría revertiendo el efecto autoinhibitorio del dominio LIM en la enzima que también fue observado en la ALP trunca (Castro *et. al.* 2011).

Se realizó un modelo tridimensional del dominio LIM presente en la ALP el cual se considera como una buena aproximación a la estructura del dominio LIM, debido a los resultados favorables en la evaluación energética y en el gráfico de Ramachandran de este modelo. La caracterización del mismo describe con detalle la interacción del Zn^{2+} y los ligandos presentes en el dominio, de igual manera la identificación del tipo de zinc finger que conforman el dominio LIM de la ALP se encuentra dentro de las reportadas (Krishna *et.al.* 2003).

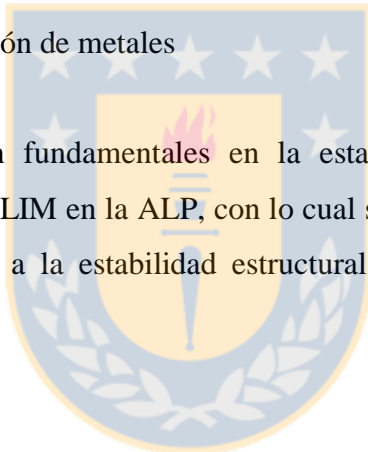
A partir de estos resultados, se sugiere que el residuo C453A del dominio LIM es esencial para la estabilidad del dedo de zinc que estaría ejerciendo un efecto inhibitorio en la ALP. De igual manera se sugiere que el zinc estaría ejerciendo un efecto de regulación de tipo inhibitoria en la ALP ya que no participa directamente en catálisis pero su presencia autoregula la ALP a partir de una función estructural presente en un único estado de oxidación, con lo cual el zinc tendría dos roles en la ALP, los cuales serían de carácter estructural y regulatorio.

9 CONCLUSIONES

El residuo de cisteína C453A es clave para la estabilización de los iones Zn^{2+} y la conservación de la función inhibitoria que produce este dominio en la ALP. Su reemplazo por alanina genera la pérdida de estos metales en la proteína y merma el efecto inhibitorio de la misma, esta afirmación está comprobada mediante las constantes cinéticas determinadas para esta especie.

Los residuos H476A y C507A no son residuos claves para la preservación de la función inhibitoria de este dominio, pero son fundamentales para la estabilización de los iones Zn^{2+} en la ALP. El cambio por alanina en estos residuos genera una pérdida parcial de los iones generando cambios estructurales observados en los ensayos de apagamiento de fluorescencia y en la detección de metales

Los iones Zn^{2+} son fundamentales en la estabilidad estructural y en el efecto autoinhibitorio del dominio LIM en la ALP, con lo cual se propone que este metal posee dos roles en la ALP asociados a la estabilidad estructural de la proteína y a la regulación inhibitoria en la misma.



10 REFERENCIAS

Ahn H., Kim K., Lee J., Ha J., Kim D., Yoon H., Kwon A., Suh S. (2004) Crystal structure of agmatinase reveals structural conservation and inhibition mechanism of the ureohydrolase superfamily. *J. Biol. Chem* 279: 50505-50513.

Archibald R.M. (1945) Colorimetric determination of urea. *J. Biol. Chem.* 157: 507-518.

Aricioglu F., Means A., Regunathan S. (2004) Effect of agmatine on the development of morphine dependence in rats: potential role of cAMP system. *Eur J Pharmacol* 504:191–197.

Bernstein H.G., Stich C., Jäger K., Dobrowolny H., Wick M., Steiner J., Veh R., Bogerts B., Laube G. (2012) Agmatinase, an inactivator of the putative endogenous antidepressant agmatine, is strongly upregulated in hippocampal interneurons of subjects with mood disorders. *Neuropharmacology* 62: 237-246.

Bhati M., Lee C., Gadd M.S., Jeffries C.M., Kwan A., Whitten A.E., Trewhella J., Mackay J.P., Matthews J.M. (2012) Solution structure of the LIM-Homeodomain transcription factor complex Lhx3/Ldb 1 and the effects of a Pituitary mutation on Key Lhx 3 interactions. *7*: 1-9

Bhutada P., Mundhada Y., Humane V., Rahigude A., Deshmukh P., Latad S., Jain K. (2012) Agmatine an endogenous ligand of imidazoline receptor protects against memory impairment and biochemical alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 37: 96-105.

Carvajal N., López V., Salas M., Uribe E., Herrera P., Cerpa J. (1999) Manganese is essential for catalytic activity of *Escherichia coli* agmatinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258:808-11.

Carvajal N., Orellana M.S., Salas M., Enriquez P., Alarcon R., Uribe E., Lopez, V. (2004) Kinetic studies and site-directed mutagenesis of *Escherichia coli* agmatinase. A role for

Glu274 in binding and correct positioning of the substrate guanidinium group. *Arch Biochem Biophys.* 430:185-190.

Castro V., (2010) Análisis funcional de una agmatinasa de cerebro de rata. Tesis para obtener el grado de Bioquímico, Universidad de Concepción, Chile. 74 pp.

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: 107-110.

Chan S.L. (1998) Clonidine-displacing substance and its putative role in control of insulin secretion: a minireview. *Gen Pharmacol* 31:525–529.

Brian P., Chiswell B.P., Stiegler A.L., Razinia Z., Nalibotski E., Boggon T.J., Calderwood D.A. (2010) Structural basis of competition between PINCH1 and PINCH2 for binding to the ankyrin repeat domain of integrin-linked kinase. *J. Struct.Biol.* 170: 157-163.

Condello S., Caccamo D., Curro M., Ferlazzo N., Satriano J., Magazu S., Ientile R. (2012) Protective effects of agmatine in rotenone-induced damage of human SH-SY5Y neuronblastoma cells: Fourier-transform infrared spectroscopy analysis in a model of Parkinson's disease. *Aminoacids* 42: 775-781.

Demady D.R, Jianmongkol S, Vuletich J.L (2001). Agmatine enhances the NADPH oxidase activity of neuronal NO synthase and leads to oxidative inactivation of the enzyme. *Mol Pharmacol*; 59: 24-9.

Diefenbacher M.E., Litfin M., Herrlinch P., Kassel O. (2010) The nuclear isoform of the LIM domain protein Trip6 integrates activating and repressing signals at the promoter-bound glucocorticoid receptor. *Molecular and Celullar Endocrinology* 320: 58-66.

Eglen R.M., Hudson A.L., Kendall D.A., Nutt D.J, Morgan N.G., Wilson V.G., Dillon M.P. (1999) Seeing through a glass darkly: casting light on imidazoline 'I' sites. *Trends Pharmacol. Sci.* 19: 381–390.

Edwards D.C., Sanders L.C., Bokoch G.M., Gill G.N. (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc 42 GTPase signaling to actin cytoskeletal dynamics. *Nature Cell Biology*

El Omari K., Hoosdally S., Tuladhar K., Karia D., Vyas P., Patient R., Porcher C., Mancini E.J. (2011). Structure of the leukemia oncogene LMO2: implications for the assembly of a hematopoietic transcription factor complex. *Blood* 117:2146-2156.

Galea E, Regunathan S, Eliopoulos V, Feinstein DL, Reis DJ. (1996) Inhibition of mammalian nitric oxide synthase by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem J.* 316:247–249.

Gilad G.M., Gilad V.H., Rabey J.M. (1996) Arginine and ornithine decarboxylation in rodent brain: coincidental changes during development and after ischemia. *Neurosci Lett.* 216:33-36.

Halaris A., Plietz J. (2007) Agmatine: metabolic pathway and spectrum of activity in brain. *CNS drugs.* 21 (11): 885-900.

Hong S., Hara, M. Shimazawa, K. Hyakkoku, K. Kim, C.Y. Seong, G.J. (2012) Retinal protective effects of topically administer agmatine on ischemic ocular injury caused by transient occlusion of the ophthalmic artery. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45: 212-215

Iyer R.K., Kim H.K., Tsoa R.W., Grody W.W., Cederbaum S.D. (2002) Cloning and characterization of human agmatinase. *Mol Genet Metab.* 75:209-218.

Järvinen P.M., Laiho M. (2012) LIM-domain proteins in transforming growth factor β -induced epithelial -to- mesenchymal transition and myofibroblast differentiation. *Celular Signaling* 24: 819-825.

Kardmas J, Beckerle M (2004) The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5:920-931.

Kim J.H., Yenari M.A., Giffard R.G., Cho S.W., Park K.A., Lee J.E. (2004) Agmatine reduces infarct area in a mouse model of transient focal cerebral ischemia and protects cultured neurons from ischemia-like injury. *Exp Neurol*. 189:122-130.

Knox L.T., Jing Y., Fleete M.S., Collie N.D., Zhang H., Liu P. (2011) Scopolamine impairs behavioral function and arginine metabolism in the rat dentate gyrus. *Neuropharmacology* 61: 1452-1462.

Krishna S.S., Majumdar I., Grishin N. (2003) Structural classification of zinc fingers. *Nucleic Acids Research* 31: 532-550

Kromery J., Camarata T., Kulisz A., Simon H.G. (2010) Nucleocytoplasmic functions of the PDZ-LIM protein family new insights into organ development. *BioEssays* 32: 100-108.

Labbe G., Bernstein H.G. (2012) Agmatine in the brain emerging “human” perspective. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 36: 872.

Li G, Regunathan S., Barrow C.J., Eshraghi J., Cooper R., Reis D.J. (1994) Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science* 263, 966–969.

Li F., Wu N., Su R., Chen Y., Lu X., Liu Y., Li J. (2011) Imidazoline receptor antisera selected/Nischarin regulates the effect of agmatine on the development of morphine dependence. *Addiction Biology* 17: 392-408.

Maret W. (2005) Zinc coordination environments in proteins determine zinc functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19: 7–12

Maret W. (2012) New perspectives of zinc coordination environments in proteins. *Journal of Inorganic Biochemistry* 111: 110-116.

Matthews J.M., Bhati M., Lehtomaki E., Mansfield R.E., Cubeddu L., Mackay J.P. (2009) It takes two to tango: The structure and function of LIM, RING, PHD and MYND domains. *Current Pharmaceutical Design* 15: 3681-3696.

Maturana A., Nakagawa N.; Yoshimoto N.; Tatematsu K., Hoshijima M., Tanizawa K., Kuroda S. (2011) LIM domains regulate C activity: A novel molecular function. *Cellular Signalling* 23: 928-934.

Matheus F., Aguiar A., Castro A., Villarihno J., Ferreira J., Figueiredo C. Walz R., Santos A., Tasca C., Prediger R. (2012) Neuroprotective effects of agmatine in mice infused with a single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl 1,2,3,6 tetrahydropyridine (MPTP). *Behavioural Brain Resarch* 235: 263-272.

Maul R. S., Chang D. D. (1999) EPLIN, epithelial protein lost in neoplasm. *Oncogene* 18, 7838–7841.

Mella C., Martínez F., García M., Nualart F., Castro V., Bustos P., Carvajal N., Uribe E. (2010) Expression and localization of agmatinase-like protein in rat brain. *Histochem Cell Biol* 134:137-144.

Mistry S.K., Burwell T.J., Chambers R.M., Rudolph-Owen L., Spaltmann F., Cook W.J., Morris S.M. Jr. (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:G375–G381.

Morris SM Jr (2003) Vertebrate agmatinases: what role do they play in agmatine catabolism? *Ann N Y Acad Sci* 1009:30–33.

Mun C.H., Lee W.T., Park K.A., Lee J.E. (2010) Regulation of endothelial nitric oxide synthase by agmatine after transient global cerebral ischemia in rat brain. *Anat Cell Biol* 43:230-240.

Nagata K., Ohashi K., Yang N., Mizuno K. (1999). The N-terminal LIM domain negatively regulates the kinase activity of LIM-kinase 1. *Biochem. J.* 343, 99–105.

Ochoa S., Salvador S., LaBonne C. (2012) The LIM adaptor protein LM04 is an essential regulator of neural crest development. *Development Biology* 361: 313-325

Olmos G., DeGregorio-Rocasolano N., Paz Regalado M., Gasull T., Assumpcio Boronat M., Trullas R., Villarroel A., Lerma J., Garcia-Sevilla J.A. (1999) Protection by imidazol(ine) drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor. *Br J Pharmacol.* 127:1317-1326.

Otake K., Ruggiero D.A., Regunathan S., Wang H., Milner T.A., Reis D.J. (1998) Regional localization of agmatine in the rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res* 787:1–14.

Penner S.B., Smyth D.D. (1996). Natriuresis following central and peripheral administration of agmatine in the rat. *Pharmacology* 53:160–169.

Perozich J., Hempel J., Morris S. M. (1998) Roles of conserved residues in the arginase family. *Biochem. Biophys. Acta* 1332: 23-37

Piletz J.E., Chikkala D.N., Ernsberger P. (1995) Comparison of the properties of agmatine and endogenous clonidine- displacing substance at imidazoline and alpha-2 adrenergic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 72: 581–587.

Reczkowski R.S., Ash D.E. (1994) Rat liver arginase: kinetic mechanism, alternate substrates, and inhibitors. *Arch Biochem Biophys.* 312: 31-7.

Reis D., Regunathan S. (2000) Is agmatine a novel neurotransmitter in the brain?. *Trends Pharmacol. Sci.* 21 187–193.

Roy A., Kucukural A., Zhang Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* 4: 5: 725-738.

Salas M., Rodriguez R., Uribe E., López V., Fuentes M., López N., Carvajal N. (2002) Insights into the reaction mechanism of *Escherichia coli* agmatinase by site directed mutagenesis and molecular modelling. A critical role for aspartate 153. *Eur. J. Biochem.* 269: 5522-5526.

Salas M., Lopez 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. *J Inorg Biochem.* 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 cytokine. *Biochem.J.* 330: 1405–1409.

Sastre M., Regunathan S., Reis D.J. (1997) Uptake of agmatine into rat brain synaptosomes: possible role of cation channels. *J Neurochem.* 69: 2421-2426.

Sastre M., Regunathan S., Galea E., Reis D.J (1996) Agmatinase activity in rat brain: A metabolic pathway for the degradation of agmatine. *J. Neurochem.*, 67: 1761-1765.

Satishchandran, C., Boyle, S. (1986) Purification and properties of agmatine ureohydrolyase, a putrescine biosynthetic enzyme in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 165:843-848.

Schwartz D., Peterson, O.W., Mendonca, M., Satriano, J., Lortie, M., Blantz, R.C. (1997) Agmatine affects glomerular filtration via a nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Am J Physiol.* 272:597-601.

Sekowska A., Danchin A., Risler J.L. (2000) Phylogeny of related functions: the case of polyamine biosynthetic enzymes. *Microbiology* 146: 1815-1828.

Shirasaki R., Pfaff S. L. (2002). Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 251–281.

Su C.H., Liu I.M., Chung H.H., Cheng J.T. (2009) Activation of I2-imidazoline receptors by agmatine improved insulin sensitivity through two mechanisms in type-2 diabetic rats. *Neurosci Lett* 457:125–128.

Suzuki, T. (2002). MICAL, a novel CasL interacting molecule, associates with vimentin. *J. Biol. Chem.* 277, 14933–14941.

Tabor C.W., Tabor H. (1984) Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 749–790.

Tastet J., Vourec'h P., Laumonnier F., Vallé B., Michelle C., Duittoz A., Bénédicti H., Andres C.R., (2012) LIMK2d, a truncated isoform of LIM kinase 2 regulates neurite growth in absence of the LIM kinase domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 420: 247-252.

Tjörnhammar R., Edholm O. (2010) Molecular dynamics simulations of Zn²⁺ coordination in protein binding sites. *The Journal of Chemical Physics* 132: 205101-1-205101-9

Tu Y., Wu S., Shi X., Chen K., Wu C. (2003) Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell* 113, 37–47.

Uemura A., Nguyen T., Steele A.N., Yamada S. (2011) The LIM domain of zyxin is sufficient for force-induced accumulation of zyxin during cell migration. *Biophysical Journal* 101: 1069-1075.

Uribe E., Salas M, Enriquez S., Orellana MS, 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. *Arch. Biochem. Biophys.* 461:146-150.

Utkan T., Gocmez S.S., Regunathan S., Aricioglu R. (2012) Agmatine, a metabolite of L-arginine, reverses scopolamine-induced learning and memory impairment in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 102: 578-584.

Verhey van Wijk, N., Witte F., Feike A.C., Schambony A., Brichmeier W., Mundlos S., Stricker S. (2009) The LIM domain protein witp interactions with the receptor tyrosine kinase Rcr 2 and inhibits canonical wnt signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390: 211-216.

Wiederstein M., Sippl M. (2007) ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research* 35: W407-410.

Wilkinson-White L., Dastmalchi S., Kwan A.H., Ryan D.P., Mackay J.P, Matthews J.M. (2010) ^1H , ^{15}N and ^{13}C assignments of an intramolecular Lmo2-LIM2/Ldb1-LID complex. *Biomolecular NMR assign.* 4: 203-206.

Zheng Q., Zhao Y. (2007) The diverse biofunctions of LIM domain proteins: determined by subcellular localization and protein–protein interaction. *Biol. Cell* 99: 489–502.

