



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y oceanográficas
Facultad de Ciencias Biológicas

Purificación y caracterización estructural de Δ LIM-ALP

Seminario de Título presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Para optar al título de Biólogo

Diego Ignacio Bustamante Campusano

Concepción, 2025

Este seminario de título a sido desarrollado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad de Concepción

Profesor Guía

Dra. Elena Amparo Uribe Pérez _____

Comité evaluador

Dra. Violeta Morin _____

Dra. Marcell Gatica _____

Profesor Coordinador de Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández Santander _____

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible la realización de este seminario de título. Partiendo por mi madre que fue la principal inspiración para permitirme la oportunidad de realizar mis sueños al estudiar una carrera científica, agradezco profundamente a mi profesora, tutora y directora del proyecto la Dra. Elena Amparo Uribe Pérez quien me dio la bienvenida a su laboratorio de enzimología y creyó en mi para trabajar en los objetivos que como laboratorio pudimos lograr a lo largo de mi formación académica siendo un pilar fundamental en mi desarrollo en el área molecular la cual se ha vuelto un sueño cumplido gracias a la oportunidad que me concedió.

Además, hacer una especial mención a María Belén Reyes Cuevas quien como bioquímica y asistente a cargo del laboratorio estuvo presente en todo el proceso de esta investigación trabajando codo a codo y compartiendo conocimientos con los cuales se logró cumplir los objetivos de este trabajo, agradezco sobre todo su paciencia y amistad. Quiero destacar a todo el equipo de trabajo detrás de este seminario el cual esta conformado por los profesores a cargo de los laboratorios los cuales en todo momento estuvieron dispuestos ayudar en todo sentido entregando su conocimientos y consejos a lo largo del proceso experimental, de igual manera a mis compañeros de laboratorio los cuales entregaron tanto su apoyo como amistad, fundamental para muchas veces soportar las largas jornadas de trabajo que implico este proyecto algo que recordare con mucho cariño por siempre.

Retomar la carrera fue una decisión difícil, muchas veces me vi sobrepasado, pero a lo largo de estos años los engranajes del destino solo abrieron a mi encuentro todas las posibilidades que me permitieron avanzar, estoy profundamente agradecido de las personas que han aparecido en mi camino, nunca pensé que viviría cosas tan lindas estos últimos años y quedo corto en palabras para decir lo que siento realmente, simplemente me siento profundamente agradecido por todo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURA	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCION	10
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVO ESPECÍFICO.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Reactivos utilizados	17
Soluciones generales	17
Cepa bacteriana	17
Medios de cultivo	17
Vector	18
Crecimiento, expresión y obtención de ΔLIM-ALP	18
Purificación por cromatografía de intercambio aniónico	20
Purificación por cromatografía de afinidad	20
Determinación de actividad agmatinasa	20
Cuantificación de proteína	20
SDS-PAGE	21
Western-Blot	21
Análisis de dicroísmo circular:	22
RESULTADOS.....	23
Purificación de ΔLIM-ALP	23
Cultivo y expresión de ΔLIM-ALP	23
Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-celulosa)	24
Cromatografía de afinidad Ni²⁺-NTA-Agarosa	25
Contenido de estructuras secundarias de ΔLIM-ALP mediante análisis de dicroísmo circular	29
DISCUSION.....	32
CONCLUSION	34

BIBLIOGRAFÍA35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Método por el cual se purificó la enzima Δ LIM-ALP.....	19
Tabla 2. Tabla de purificación Δ LIM-ALP	23

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Ruta metabólica de la arginina.....	10
Figura 2. Esquemas de las variantes de ALP y del dominio LIM.....	13
Figura 3. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de ALP, la agmatinasa humana y de <i>E. coli</i>	14
Figura 4. modelo molecular obtenido para la isoforma I de ALP a través de la plataforma Alpha-Fold.....	15
Figura 5. Vector H ₆ pQE60	18
Figura 6. Cromatografía en una columna de intercambio aniónico DEAE-celulosa.	24
Figura 7. Análisis en gel SDS-PAGE 10% de cromatografía de intercambio aniónico	25
Figura 8. Cromatograma de la columna de afinidad Ni ²⁺ -NTA-agarosa.....	26
Figura 9. Gel SDS- PAGE al 10% de cromatografía de afinidad	27
Figura 10. Segunda cromatografía de afinidad Ni ²⁺ -NTA-agarosa	28
Figura 11. Análisis de pureza de la fracción 23	29
Figura 12. Espectro de DC de Δ LIM-ALP.....	30
Figura 13. Espectro de DC de Δ LIM-ALP a distintas temperaturas.....	30
Figura 14. Análisis de DC a partir de la plataforma BeStSel.....	31

RESUMEN

La *Agmatinase Like Protein* (ALP) es una enzima clonada a partir de una librería de ADNc de cerebro de rata y cataliza la hidrólisis de agmatina en putrescina y urea. La agmatina (1-amino-4-guanidinobutano) es una amina que deriva de la descarboxilación de arginina mediante la arginina descarboxilasa (ADC), cumple funciones críticas en mamíferos como neuromodulador, anticonvulsivante y agente neuroprotector. Hasta la fecha, ALP es la única enzima de mamíferos caracterizada cinéticamente con actividad agmatinasa confirmada. A pesar de su función catalítica, ALP muestra una identidad de secuencia mínima con agmatinasas conocidas, y los residuos involucrados en la catálisis o en la coordinación del cofactor Mn^{2+} (ion metálico divalente crítico para la actividad de ALP y otras ureohidrolasas) permanecen sin identificar. Las herramientas actuales de predicción de plegamiento proteico, como la plataforma AlphaFold 3, no logran modelar la estructura de ALP. En el Laboratorio de Enzimología de la Universidad de Concepción, se han clonado varias isoformas de ALP. La variante de ALP más activa y estable contiene 457 aminoácidos y carece de 66 aminoácidos en su extremo carboxilo, esta secuencia se denomina dominio LIM y ejerce un efecto auto-inhibitorio sobre su actividad agmatinasa (Δ LIM-ALP). En este seminario de título, se estableció un protocolo de purificación para Δ LIM-ALP logrando purificar la enzima a homogeneidad y se realizó un análisis de dicroísmo circular (DC) para determinar el contenido de estructura secundaria. El análisis de DC arrojó que Δ LIM-ALP contiene 2,8% de estructuras helicoidales, 34,4% de hojas β -plegadas, 14,6% de vueltas y 48,1% de zonas al azar o no definidas. Este trabajo proporciona las primeras aproximaciones respecto de la estructura de ALP.

ABSTRACT

Agmatinase Like Protein (ALP) is an enzyme cloned from a rat brain cDNA library and catalyzes the hydrolysis of agmatine to putrescine and urea. Agmatine (1-amino-4-guanidinobutane) is an amine derived from the decarboxylation of arginine by arginine decarboxylase (ADC), fulfilling critical functions in mammals as a neuromodulator, anticonvulsant, and neuroprotective agent. To date, ALP is the only kinetically characterized mammalian enzyme with confirmed agmatinase activity. Despite its catalytic function, ALP shows minimal sequence identity with known agmatinases, and the residues involved in catalysis or in the coordination of the Mn^{2+} cofactor (a divalent metal ion critical for the activity of ALP and other ureohydrolases) remain unidentified. Current protein folding prediction tools, such as the AlphaFold 3 platform, fail to model the structure of ALP. Several ALP isoforms have been cloned at the Enzymology Laboratory of the University of Concepción. The most active and stable ALP variant contains 457 amino acids and lacks 66 amino acids at its carboxyl terminus. This sequence is called the LIM domain and exerts an autoinhibitory effect on its agmatinase activity (Δ LIM-ALP). In this degree seminar, a purification protocol for Δ LIM-ALP was established, achieving homogeneity in the enzyme, and circular dichroism (CD) analysis was performed to determine its secondary structure content. CD analysis showed that Δ LIM-ALP contains 2.8% helical structures, 34.4% β -pleated sheets, 14.6% turns, and 48.1% random or undefined regions. This work provides the first approximations regarding the structure of ALP.

INTRODUCCIÓN

La agmatina (1-amino-4-guanidinobutano) es una amina proveniente de la descarboxilación de la arginina, reacción catalizada por la enzima arginina descarboxilasa (ADC) (Fig. 1), (Reyes *et al.*, 2020). 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).

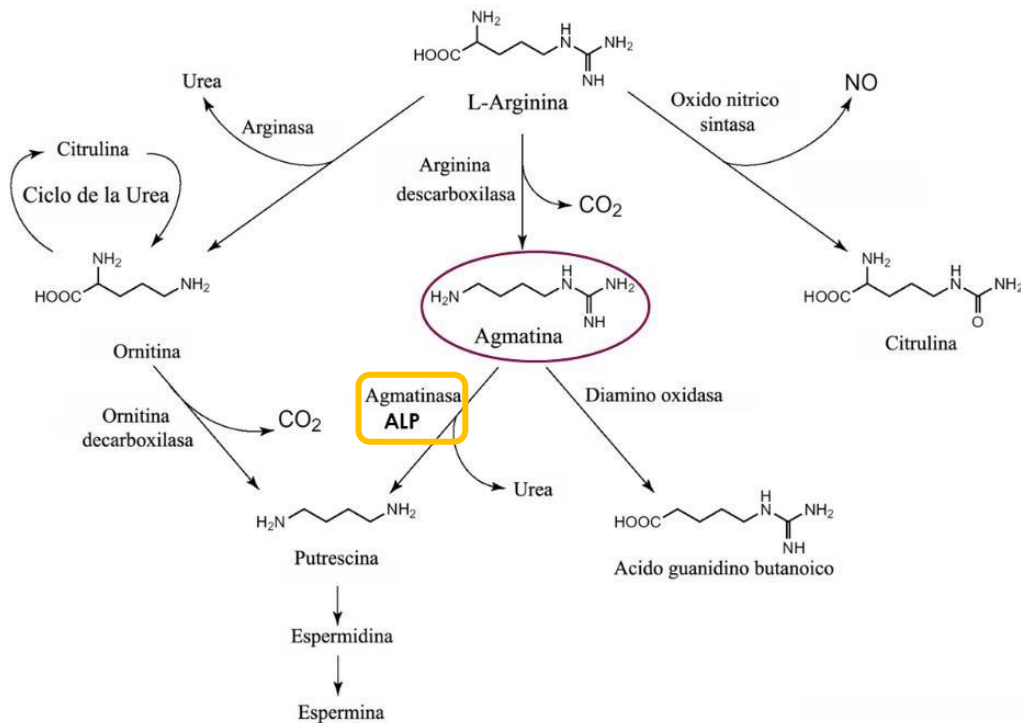


Figura 1. Ruta metabólica de la arginina donde se destaca la participación de la agmatina para producir putrescina más urea y ácido guanidino butanoico.

La agmatina fue descubierta por primera vez en esperma de arenques a inicios del siglo XX por parte del químico alemán Albrecth Kossel (Kossel *et al.*, 1910). A partir del descubrimiento se ha logrado entender la participación de la agmatina en el metabolismo de plantas, bacterias e incluso en vertebrados como los mamíferos. Inicialmente, la agmatina era una ruta alternativa de la síntesis de poliaminas que solo era posible encontrar en plantas y bacterias, pero en estudios posteriores se detectó agmatina en cerebro de bovinos. En mamíferos la agmatina fue descrita

inicialmente como una sustancia desplazadora de clonidina, la cual eventualmente pudo ser purificada e identificada a través de espectroscopía de masa como agmatina atribuyéndole un rol neurotransmisor (Li *et al.*, 1994). La presencia de la agmatina en el sistema nervioso central fue mapeada en el cerebro de ratas donde se encontró en una cantidad similar a otros neurotransmisores, principalmente en el citoplasma de las neuronas. (Otake *et al.*, 1998). Es por ello que surgieron investigaciones centradas en entender el rol fundamental que cumple la agmatina para mamíferos, entre ellas podemos destacar su capacidad inhibitoria de la óxido nítrico sintasa (NOS), lo que se discute como un posible rol regulador en la producción de óxido nítrico (Galea *et al.*, 1996), actividad promoviendo la secreción de insulina en ensayos in vitro (Chan *et al.*, 1998). La presencia de agmatina en tejidos neuronales le otorga un rol neurotransmisor/neuromodulador por su capacidad de unir a los receptores adrenérgicos α_2 y receptores de Imidazolina (Reis & Regunathan *et al.*, 1998). Además, mejora la capacidad analgésica de opioides y al mismo tiempo reduce la dependencia y recaída sobre estos a nivel fisiológico (Wu *et al.*, 2008). La agmatina también posee una acción anticonvulsiva al tener un mecanismo con efectos similares a los antagonistas del receptor de glutamato de NMDA o “N-Metil-D-Aspartato” (Wu *et al.*, 2008), de igual manera esta capacidad antagonista de NMDA e inhibitoria de la NOS mencionada anteriormente se relacionó directamente con un papel de anti-plasticidad para el sistema nervioso central, por lo tanto, revierte los mecanismos relacionados al dolor crónico y lesiones neuronales otorgándole actividad neuro protectora y analgésica (Fairbanks *et al.*, 2000).

También se ha descrito un posible efecto antidepresivo de la agmatina, asociado a su acción antagonista en receptores NMDA y regulación en la sobrecarga de Ca^{2+} además de inducir un mayor número de monoaminas (Li *et al.*, 2003). Además, se ha logrado obtener múltiples resultados gracias a todos los antecedentes sobre los mecanismos a los cual está asociada la agmatina, ejemplo de esto es que se comercializa como un suplemento nutracéutico siendo frecuentemente utilizado en la actividad física de alto rendimiento por ser precursora de la síntesis de poliaminas y a su vez un vasodilatador (Gao *et al.*, 1995) que ayuda en el crecimiento de los

tejidos musculares. En la actualidad, diversos estudios han atribuido a la agmatina un efecto terapéutico en modelos murinos de enfermedades neurológicas (Barua *et al.*, 2019), así como una capacidad neuroprotectora frente a enfermedades neurodegenerativas y epilepsia (Moretti *et al.*, 2014).

Metabolismo de agmatina en mamíferos

Aún existen muchos mecanismos desconocidos sobre la actividad catalítica de la enzima que degrada la agmatina, especialmente en mamíferos. No fue hasta el año 1994 en donde Li, Regunathan y cols. descubren la presencia de la agmatina en el cerebro de bovinos, lo que impulsó la búsqueda de las enzimas involucradas en el metabolismo de agmatina en mamíferos. Se identificó la presencia de ADC en las mitocondrias del cerebro de rata (Li *et al.*, 1995), así como la actividad agmatinasa en cerebro de bovinos. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que la agmatinasa humana carece de actividad hidrolítica sobre agmatina, aunque sí la presenta sobre otras moléculas guanidínicas (Sastre *et al.*, 1996; Sinn *et al.*, 2022). En el año 2007, el Laboratorio de Enzimología de la Universidad de Concepción (Uribe *et al.*, 2007), reportó la expresión de una proteína clonada desde una librería de genes de cerebro de rata que presentaba actividad agmatinasa, pero que su secuencia era muy divergente de las agmatinasas de procariontes y de la agmatinasa humana, por lo que se le denominó Agmatinase Like Protein (ALP). Interesantemente la agmatinasa humana posee una similitud del 56% a la agmatinasa de la *Escherichia coli* (Iyer *et al.*, 2002) y pese a ello no posee actividad agmatinasa demostrable, lo cual resulta particularmente interesante al compararse con ALP. La Figura 2 muestra un alineamiento de secuencias entre ALP, la agmatinasa humana y la agmatinasa de *E. coli*, en el que se observa que solo algunos residuos están conservados en ALP. En general, no se evidencia una similitud significativa entre ALP y las agmatinasas, y además ALP no conserva los residuos encargados de coordinar el cofactor activador Mn^{2+} , los cuales están estrictamente conservados en las enzimas de la familia de las ureohidrolasas. La actividad agmatinasa de ALP requiere del cofactor Mn^{2+} . Al igual que otras ureohidrolasas esta enzima requiere la presencia de 2 iones de Mn^{2+} para activar la

molécula de agua que participa en la hidrólisis del sustrato guanidínico. Si bien, ALP por su secuencia no es parte de la familia de las ureohidrolasas, esta enzima funciona como tal. Otro aspecto interesante que tiene en común ALP, es la termo estabilidad generando un aumento significativo en la actividad agmatinasa de ALP al incubar previamente a 60°C con Mn²⁺, fenómeno conocido como hiperactivación.

Se detectó la presencia de ALP en tejido de ratas, específicamente en astrocitos y neuronas del hipotálamo e hipocampo (Mella *et al.*, 2010). En el laboratorio de Enzimología de la Universidad de Concepción, se han clonado varias isoformas de ALP (Fig. 3A), un aspecto interesante es una secuencia denominada dominio-LIM que se encuentra en el extremo C-terminal (Castro *et al.*, 2011), formando una estructura de dos dedos de zinc que se plantea es capaz de auto inhibir la actividad enzimática de ALP (Cofre *et al.*, 2014; Feuerstein *et al.*, 1994). Una mutante trunca en este dominio, denominada ΔLIM-ALP, presenta la actividad agmatinasa aumentada y una mayor termo estabilidad (Cofre *et al.*, 2014). Con esta variante se propone realizar los experimentos en este proyecto.

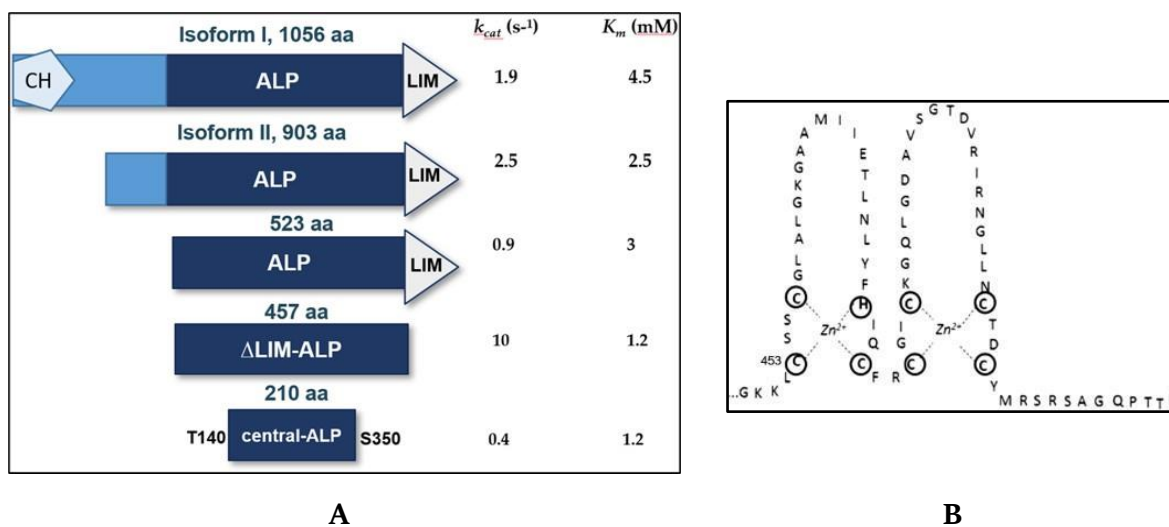


Figura 2. (A) Esquema de las variantes de ALP y sus constantes cinéticas, k_{cat} y K_m . Se indica el número de aminoácidos de cada variante. (B). Esquema del dominio LIM.

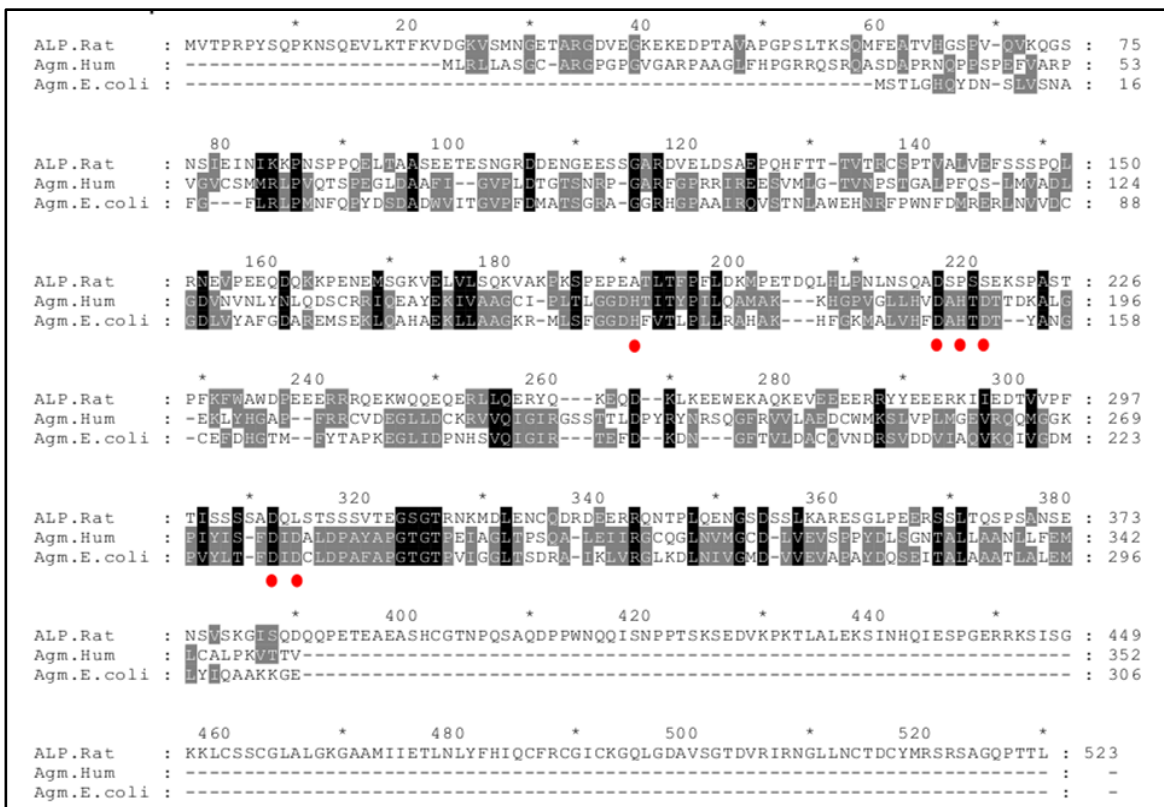


Figura 3. Alineamiento de secuencias aminoacídicas, donde se observa ALP y las agmatinasas humana y de *E. coli*. En círculos rojos se señalan los aminoácidos altamente conservados en la familia de las ureohidrolasas involucrados en la coordinación del cofactor Mn^{2+} .

Plataformas bioinformáticas que predicen el plegamiento proteico, tales como AlphaFold 3, no son capaces de predecir la estructura de ALP o de alguna de sus variantes (Fig. 4). Por lo tanto, en este seminario de título se estandarizó un protocolo de purificación de la isoforma Δ LIM-ALP y se realizaron análisis de dicroísmo circular. El dicroísmo circular es usado para identificar y cuantificar estructuras secundarias en moléculas polipeptídicas, para el caso de la enzima esto nos permitió estimar la cantidad de conformaciones Alpha-hélice, beta-plegada y loops o giros (beta).

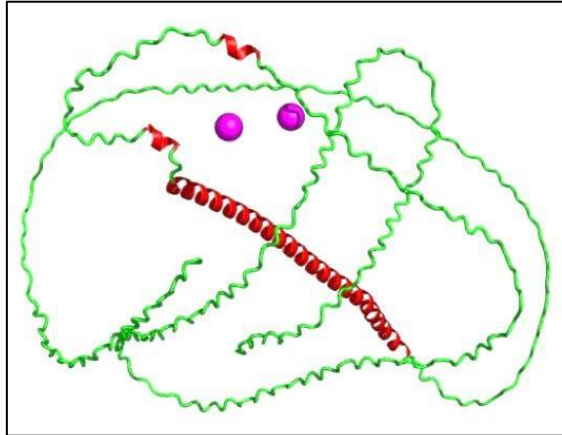


Figura 4. A modo de ejemplo se muestra el modelo molecular obtenido para la isoforma I de ALP a través de la plataforma Alpha-Fold, los resultados con las otras isoformas son similares.

HIPÓTESIS

Δ LIM-ALP posee un contenido de estructuras secundarias similar a las agmatinasas de procariontes conocidas.

OBJETIVO GENERAL

Realizar una caracterización del contenido de estructuras secundarias de Δ LIM-ALP.

OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Estandarizar un método para purificar Δ LIM-ALP.
2. Determinar el tipo y contenido de estructuras secundarias de Δ LIM-ALP mediante dicroísmo circular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos utilizados

Los reactivos químicos generales, amortiguadores, sales y sustratos utilizados son de grado analítico y biología molecular de las casas comerciales Sigma y Merck.

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, 8.775g de NaCl y 500 L de Tween 20, la solución resultante fue ajustada a pH 7.4.

Buffer TG-SDS10X, a un litro de agua destilada 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.

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 orto fosfórico al 23% y ácido sulfúrico al 9%.

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

Cepa bacteriana

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.

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 auto clavado.

Las placas LB- agar, fueron preparadas usando medio LB y agregando 15 g/L de agar.

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

Vector

El plásmido H6pQE60, de 3,1 kb (Fig. 6), fue el vector de expresión utilizado en *E. coli* BL21(DE3) para expresar el gen de Δ LIM-ALP y generar las mutantes simples. Sus principales características son la resistencia al antibiótico ampicilina, además de un sitio de unión al ribosoma (RBS), contiene el promotor del bacteriófago T5 ubicado rio arriba del operón *lac*, permitiendo la regulación y expresión del subclonado por IPTG (Fig. 5).

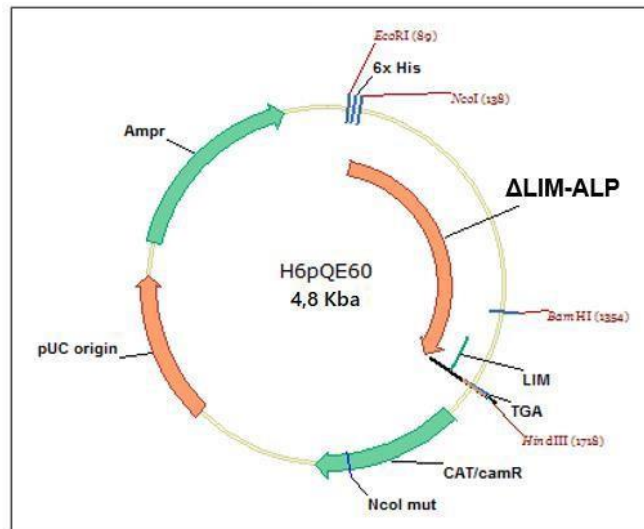


Figura 5. Vector H₆pQE60, utilizado para la expresión de Δ LIM-ALP y sus variantes mutadas.

Crecimiento, expresión y obtención de Δ LIM-ALP:

La Δ LIM-ALP se expresó en *E. coli* JM109 utilizando el vector H6pQE60 disponible como glicerol stock en el laboratorio de enzimología, posterior a ello, pasaron por un proceso de lisis bacteriana. A continuación, se muestra una tabla a modo de resumir el proceso optimizado para la enzima que es el objetivo de este estudio:

Tabla 1. Método por el cual se purificó la enzima Δ LIM-ALP.

Crecimiento de bacterias y expresión de ALP en JM109		
Proceso	Volumen	Tiempo
Pre inóculo de 20ml	20 mL medio LB 3 μ L de bacteria 20 μ L Ampicilina 100x	16 horas a 37°C
Cultivo x matraz 500ml hasta una absorbancia de 0,5 a OD 600 nm.	500 ml medio LB + 0.2 mM de Mn^{2+} 5ml de preinoculo 500 μ L Ampicilina 1000x	3 – 4 horas a 37°C
Agregar IPTG	100 μ L IPTG 1 M por cada matraz de 500 ml	16 horas entre 18 - 20°C
Centrifugado de bacterias a 5000 rpm	Volumen total obtenido (2000 ml) + lavado con Tris 10mM pH 7.5 + 0.2 mM $MnCl_2$	25 min, 3 veces mínimo resuspendiendo y agregando el resto del volumen del cultivo en tubos de 250 ml (hasta obtener sobrenadante transparente)
Lisis bacteriana		
Proceso	Volumen	Tiempo
Sonicación de pellet centrifugado.	15 ml de buffer de lisis (tris 100 mM pH 7.5 + 100 mM KCl) 15 μ L PMSF 100mM 75 μ L DTT 1 M 60 μ L $MnCl_2$ 0.5 M	9 minutos a 85% amplitud - 15 s pulso - 30 s descanso Se sostiene sobre hielo aproximadamente a 4°C
Centrifugado para obtener el sobrenadante del extracto total de proteínas, 12000 rpm.	9 ml de lisado bacteriano por tubo de centrifugado (2 de 50 ml redondos). Se obtienen 18 ml total	15 minutos 2 veces a 4°C
Incubación a 60° C de Extracto total.	2 a 3 ml por tubo de ensayo Obteniendo 14 ml en total	10 minutos
Centrifugado de extracto total final a 12000 rpm.	7 ml por tubo de centrifugado con un total de 14 ml aproximadamente.	25 minutos, luego se cambia tubo y se repite 15 min para eliminar impurezas dos veces más.

Purificación por cromatografía de intercambio aniónico

Para purificar la proteína se utilizó una cromatografía de intercambio aniónico con una columna de dietilaminoetil (DEAE)-celulosa equilibrada con buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 + 0.2 mM de MnCl_2 y una batería de 3 buffers de elusión con concentraciones crecientes de KCl (150, 250 y 500 mM respectivamente) usando la gravedad para eluir a través de la columna las proteínas totales.

Purificación por cromatografía de afinidad

Este procedimiento se llevó a cabo utilizando una columna de Ni^{2+} -NTA-agarosa, empleando el método por gravedad con un flujo lento, estimado en aproximadamente 3 a 4 segundos por goteo. La muestra cargada en la columna fue el pool obtenido a partir de la cromatografía de intercambio aniónico, que eluyó con 250 mM de KCl. El volumen total fue cargado con el flujo más lento posible, repitiendo este proceso al menos tres veces. Posteriormente, la columna se dejó en reposo durante toda la noche a 4 °C.

Determinación de actividad agmatinasa:

Se determinó la actividad enzimática a través de una reacción colorimétrica que detecta la producción de urea al interaccionar con el reactivo colorimétrico α -isonitrosopropiofenona (Archibald et al., 1945) a 37°C producto de la hidrólisis de agmatina. La reacción se inició con un mix de actividad de 100 μL que en su disolución contiene una concentración de 2 mM MnCl_2 , 20 mM agmatina pH 7.5 y 50 mM glicina pH 9.0 y 100 μL de muestra con enzima, y se incubó a 37°C por 15 minutos. Para detener la actividad se usó 1 mL de mezcla ácida (ácido orto fosfórico 23% y ácido sulfúrico 9%). Luego, se agregó 100 μL de α -isonitrosopropiofenona al 3% en etanol y se calentó a 100°C por 1 hora. Se enfrió en oscuridad al ser una reacción fotosensible y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

Cuantificación de proteína:

La concentración de proteínas fue cuantificada mediante el método de Bradford, utilizando una curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Para la curva, se prepararon soluciones con 100 μL de BSA en

concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 80 y 100 $\mu\text{g/mL}$, a las que se añadieron 700 μL de agua destilada y 200 μL del reactivo de Bradford. Una vez obtenida la curva de calibración, se realizó la reacción con solución de Bradford para cada muestra obtenida a lo largo del proceso de purificación. Posteriormente, se midió la absorbancia a 595 nm y, con base en la curva de calibración, se calcularon las concentraciones de proteína, expresadas en mg/mL .

SDS-PAGE:

Para analizar la pureza de $\Delta\text{LIM-ALP}$ se realizó un gel de poliacrilamida al 10%, para separar las proteínas según su tamaño. Las muestras obtenidas de las distintas etapas de purificación fueron preparadas con buffer de carga 6x y SDS al 10 % para desnaturalizar las proteínas antes de su aplicación. La corrida electroforética se llevó a cabo en una cámara con buffer de corrida, durante 140 minutos a un voltaje constante de 120 V. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se sometió a una solución fijadora durante 1 hora para estabilizar las proteínas. Luego, se lavó con agua destilada antes de realizar la tinción con azul de Coomassie coloidal, que se aplicó durante 20 minutos. Una vez realizada la tinción se lavó el exceso con agua destilada hasta obtener el gel con las bandas visibles, donde a través del tamaño y la cantidad de bandas se confirmó el nivel de pureza.

Western-Blot:

Para identificar $\Delta\text{LIM-ALP}$ se realizó un ensayo de inmunodetección a partir de un gel de poliacrilamida al 10 %, seguido de la transferencia a una membrana de nitrocelulosa utilizando buffer de transferencia. La transferencia se llevó a cabo durante 120 minutos. Posteriormente, la membrana fue bloqueada mediante lavados con solución de leche semidescremada en TBS-Tween para evitar uniones inespecíficas. A continuación, se incubó con el anticuerpo primario anti-ALP durante 16 horas a 4 °C en constante agitación. Al día siguiente, se realizaron lavados para eliminar el exceso de anticuerpo y se añadió el anticuerpo secundario anti-goat/rabbit. Luego de un nuevo lavado con TBS-Tween, se aplicó el buffer de detección para visualizar las proteínas mediante el equipo foto documentador Chemiscope 3000 disponible en el laboratorio.

Análisis de dicroísmo circular:

Una vez obtenida una muestra lo suficientemente pura (mayor a 0.2 mg/ml), se procedió a realizar el dicroísmo circular en un espectro polarímetro Jasco 1500 plus disponible en el Laboratorio de Biofísica Molecular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Concepción gracias a la colaboración del Dr. Maximiliano Francisco Figueroa Yévenes. El análisis de los resultados se realizó a través de la plataforma web BeStSel (<https://bestsel.elte.hu/index.php>).

RESULTADOS

Purificación de Δ LIM-ALP.

Después de varios ensayos donde se ajustaron distintos aspectos involucrados en la purificación de Δ LIM-ALP, incluyendo variar el medio de cultivo, la temperatura, el tiempo de sonicación, incubación de la muestra a 60°C, equilibrar columna de la cromatografía de afinidad, se optimizó un protocolo de purificación que se detalla en la sección materiales y métodos. Los resultados obtenidos se resumen a continuación en la Tabla 2, donde se aprecia que la actividad específica va aumentando a través de las distintas etapas.

Tabla 2. Tabla de purificación Δ LIM-ALP.

<i>Muestra</i>	<i>Volumen (ml)</i>	<i>Absorbancia 540 nm/0,1 ml/15 min</i>	<i>Concentración (mg/ml)</i>	<i>Proteína total (mg)</i>	<i>Actividad total</i>	<i>Actividad específica (Absorbancia 540 nm/15 min/ mg proteína)</i>
<i>Extracto total</i>	7	0,2 (diluido por 10 y con 100 μ l)	70.1	490.7	140	0.28
<i>Extracto total calentado a 60°C con MnCl₂ después de la centrifugación</i>	7	0,6 (diluido por 10 y con 100 μ l)	20.5	143.5	420	2.9
<i>Pool DEAE (250 mM KCl)</i>	52	0.5	2.3	119,1	260	2.18
<i>Pool Níquel</i>	24	0.8	0.5	10,8	192	17.7
<i>Fracción 23</i>	3	2.2	0.3	0,9	66	73.3

Cultivo y expresión de Δ LIM-ALP

Se utilizó como medio de cultivo LB suplementado con 0,5 mM de MnCl₂ para aumentar la estabilidad de la enzima (Sinn et al., 2022). La inducción de la expresión de la enzima con IPTG 1 M, se realizó a 20°C, lo que resultó en una mejor expresión que a 30°C (datos no mostrados). También se aumentó en el tiempo de sonicación de las bacterias recolectadas y se incluyó la incubación a 60° C y posterior

centrifugación lo que permitió separar un gran porcentaje de proteínas totales sin perder la actividad agmatinasa. Para analizar las distintas etapas se realizó un gel SDS-PAGE 10% el cual se puede observar en la Fig. 7.

Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-celulosa)

La siguiente etapa fue una cromatografía de intercambio aniónico (deitilaminoetil-celulosa, DEAE-celulosa) equilibrada con Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. Esta cromatografía permite separar la agmatinasa de *E.coli* de la enzima Δ LIM-ALP (a pesar del punto isoiónico muy próximo de ambas enzimas 5,1 y 4,9 respectivamente). En el laboratorio de Enzimología se ha verificado que la Δ LIM-ALP eluye con 250 mM de KCl, mientras que la agmatinasa de *E. coli* eluye con 500 mM de KCl, como se aprecia en la Fig. 6. En dicha figura se observa que se separa el peak de actividad a 250 mM de KCl de dos grandes peak de proteínas totales.

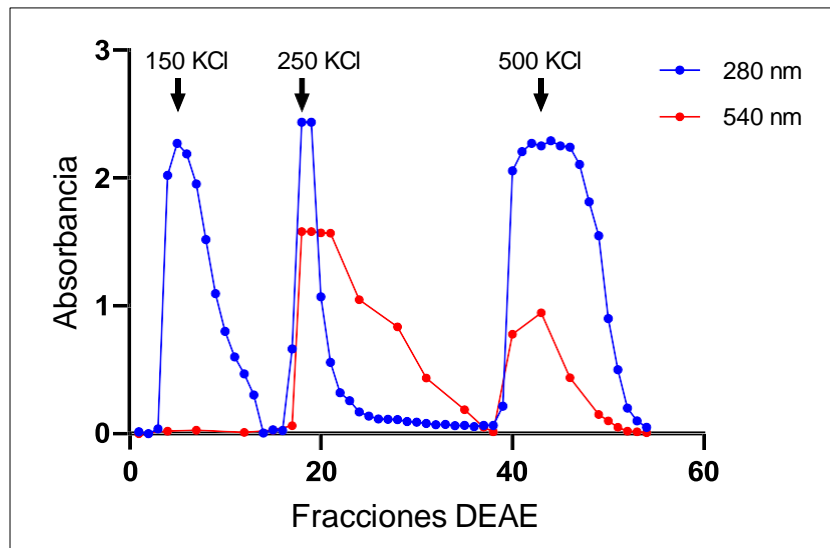


Figura 6. Cromatografía del extracto proteico en una columna de intercambio aniónico DEAE-celulosa equilibrada con Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. Las flechas indican el gradiente discontinuo de KCl. Los círculos azules indican la absorbancia a 280 nm de las fracciones que fueron medidas (proteínas totales). Los círculos rojos indican la absorbancia a 540 nm (actividad agmatinasa).

En la **Fig. 7** se muestra un análisis electroforético del extracto total de proteínas (carril 3 y 4), luego de la incubación a 60°C y el pool de fracciones de la DEAE-celulosa con actividad agmatinasa de la elución a 250 mM de KCl (carril 5).

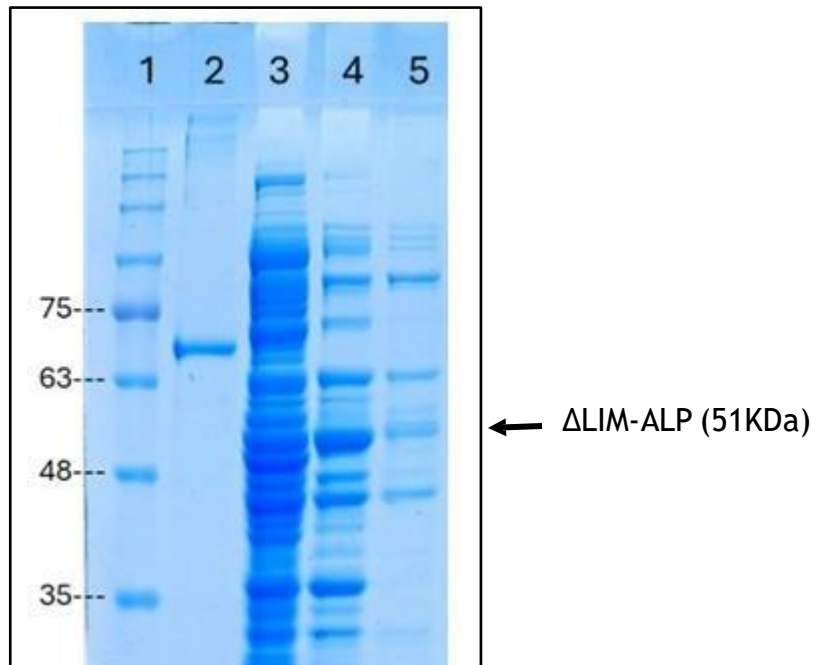


Figura 7. Análisis en gel SDS-PAGE 10%. En el extremo izquierdo se indican con números el tamaño en kDa del marcador de peso molecular. **1.** Marcador de peso molecular pre-teñido. **2.** BSA de 66 kDa (también como marcador de peso molecular). **3.** Extracto total de proteínas (diluido 1:10) **4.** Extracto total del sobrenadante luego de la incubación a 60°C (diluido 1:10). **5.** Muestra obtenida en cromatografía de intercambio aniónico (pool DEAE).

Cromatografía de afinidad Ni²⁺-NTA-Agarosa

La siguiente etapa en la purificación, fue una cromatografía de afinidad utilizando Ni²⁺-NTA-agarosa considerando que la ΔLIM-ALP tiene un epítoto 6xHis en el extremo amino-terminal. Como antecedente se conoce que la enzima se une débilmente a la resina, por lo que la columna se equilibró con buffer tris 10mM + 500 mM NaCl + 0.2 mM MnCl₂ e imidazol 2mM (una concentración baja). Se cargó el eluido con 250 mM de KCl al menos 3 veces en la columna, se lavó extensivamente con la misma concentración de imidazol y luego se aplicó un gradiente discontinuo de imidazol de 5 y 10 mM, tal como se indica en la Fig. 8. Para cada fracción, se midió la absorbancia a 280 nm (proteínas totales) y la actividad agmatinasa (absorbancia a 540 nm). además, se analizaron las fracciones mediante electroforesis denaturante (SDS-PAGE 10%). Como se aprecia en la Fig. 9, se

obtuvieron varias fracciones que presentan solo algunas bandas siendo la banda predominante la correspondiente al tamaño de Δ LIM-ALP.

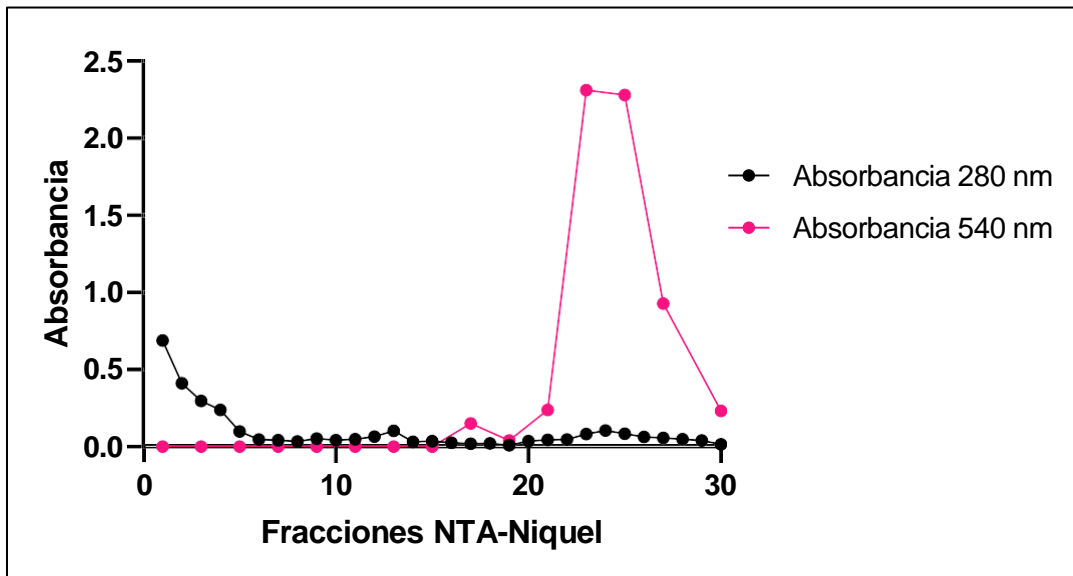


Figura 8. Cromatograma de la columna de afinidad Ni^{2+} -NTA-agarosa de Δ LIM-ALP. En negro se puede observar las mediciones a 280 nm (proteína total). En rojo se puede observar las mediciones de actividad agmatinasa a 540 nm.

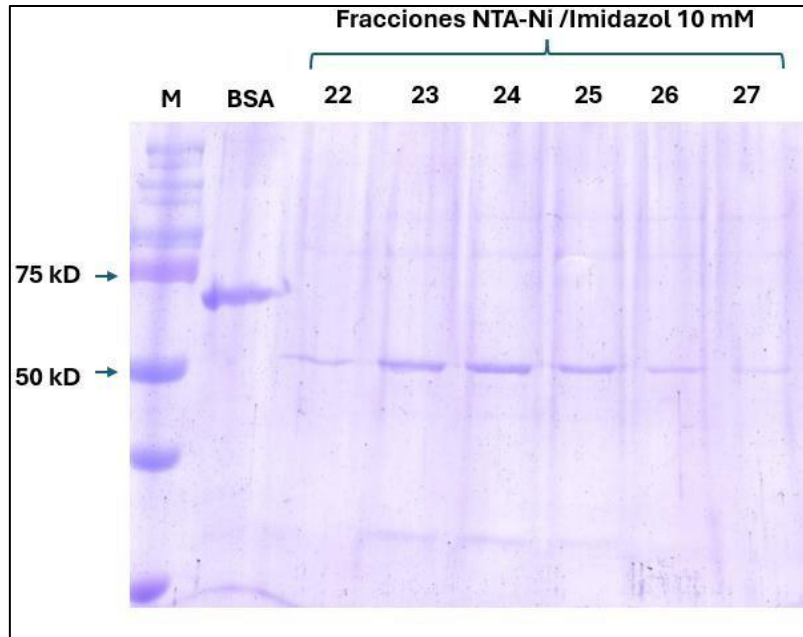


Figura 9. Gel SDS- PAGE al 10%. M. Marcador de peso molecular. BSA, albúmina de suero de bovino marcador de 66 kDa. 22-27 fracciones eluidas con 10 mM de Imidazol de Δ LIM-ALP.

Se realizó una segunda cromatografía de afinidad Ni^{2+} -NTA-agarosa, de las muestras eluidas con 10 mM de imidazol (Fig. 8). Las muestras fueron dializadas, re-cromatografiadas (Fig. 9), y analizadas en un SDS-PAGE 10%. A partir de esta cromatografía se obtuvo una muestra la cual fue analizada en dicróismo circular, la fracción 23, en la Fig. 10 se puede observar que el pico de actividad a 540 nm alcanza un valor de 2.17 unidades de absorbancia.

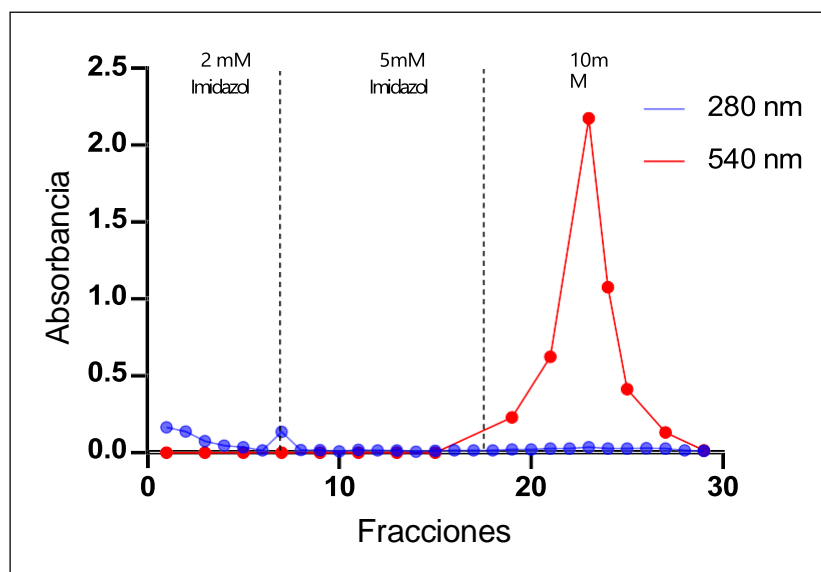


Figura 10. Segunda cromatografía de afinidad Ni²⁺-NTA-agarosa. En azul se puede observar las mediciones a 280 nm (proteína total). En rojo se puede observar las mediciones de absorbancia de la actividad agmatinasa a 540 nm.

La fracción 23 obtenida con un volumen aproximado de 3 ml dio la mayor pureza obtenida hasta el momento (Fig. 11), con una concentración de proteínas de 0.321 mg/ml lo que permitió realizar un análisis de dicroísmo circular (DC) para determinar el contenido de estructuras secundarias de ΔLIM-ALP.

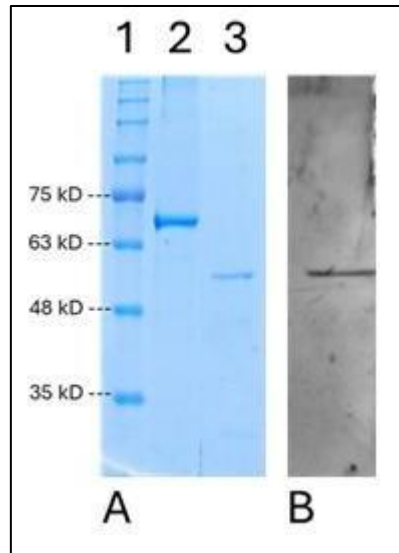


Figura 11. Análisis de pureza de la fracción 23 de Δ LIM-ALP. A. Gel SDS-PAGE 10%. 1. Marcador de peso molecular. 2. proteína de albúmina de suero bovino 66 kDa. 3. Fracción 23. B. Western blot con anticuerpo primario anti-ALP de la fracción 23.

Contenido de estructuras secundarias de Δ LIM-ALP mediante análisis de dicroísmo circular.

La muestra se sometió a una diálisis contra Tris-HCl 10 mM a pH 7.5 y 0.2 mM de $MnCl_2$ y se realizó el análisis de DC, podemos ver el resultado en la Fig. 12. El DC es una técnica espectroscópica que estudia la interacción de la luz polarizada circularmente con moléculas quirales como las proteínas y permite determinar el contenido de estructura secundaria de las proteínas. Luego se repitió el análisis a distintas temperaturas y a pH 9,0 que es el pH al que se mide la actividad enzimática, como se observa en la Fig. 13. A continuación, se analizó el espectro obtenido utilizando la plataforma web BeStSel, lo que permite obtener el contenido de estructura secundaria (Fig. 14). Como resultados se obtuvo que la enzima Δ LIM-ALP presenta una estructura mayormente desplegada, con un contenido del 48% de estructura desordenada y 14% de giros. Posee solo un 34% de estructura β -plegada y un 3% de α -hélice.

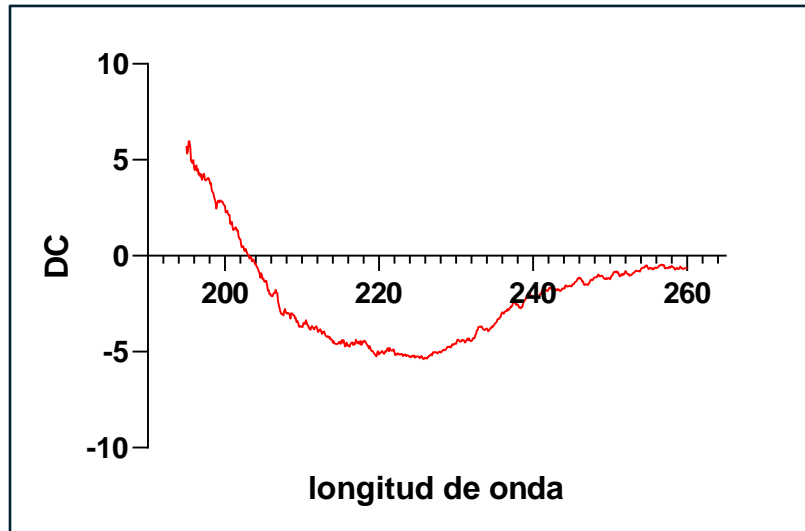


Figura 12. Espectro de DC de Δ LIM-ALP. Los espectros de DC en UV lejano se registraron a 20 °C. La concentración de proteína fue de 0.321 mg/ml.

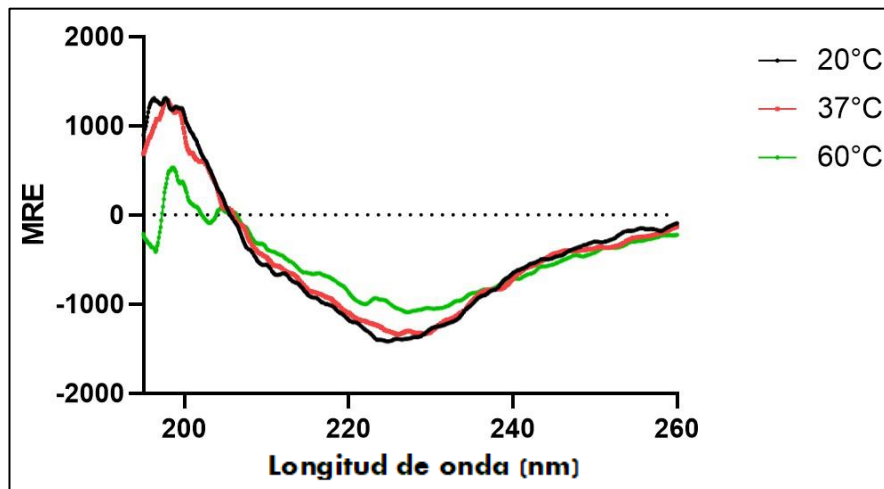


Figura 13. Espectro de DC de Δ LIM-ALP a distintas temperaturas. La concentración de proteína fue de 0.321 mg/ml.

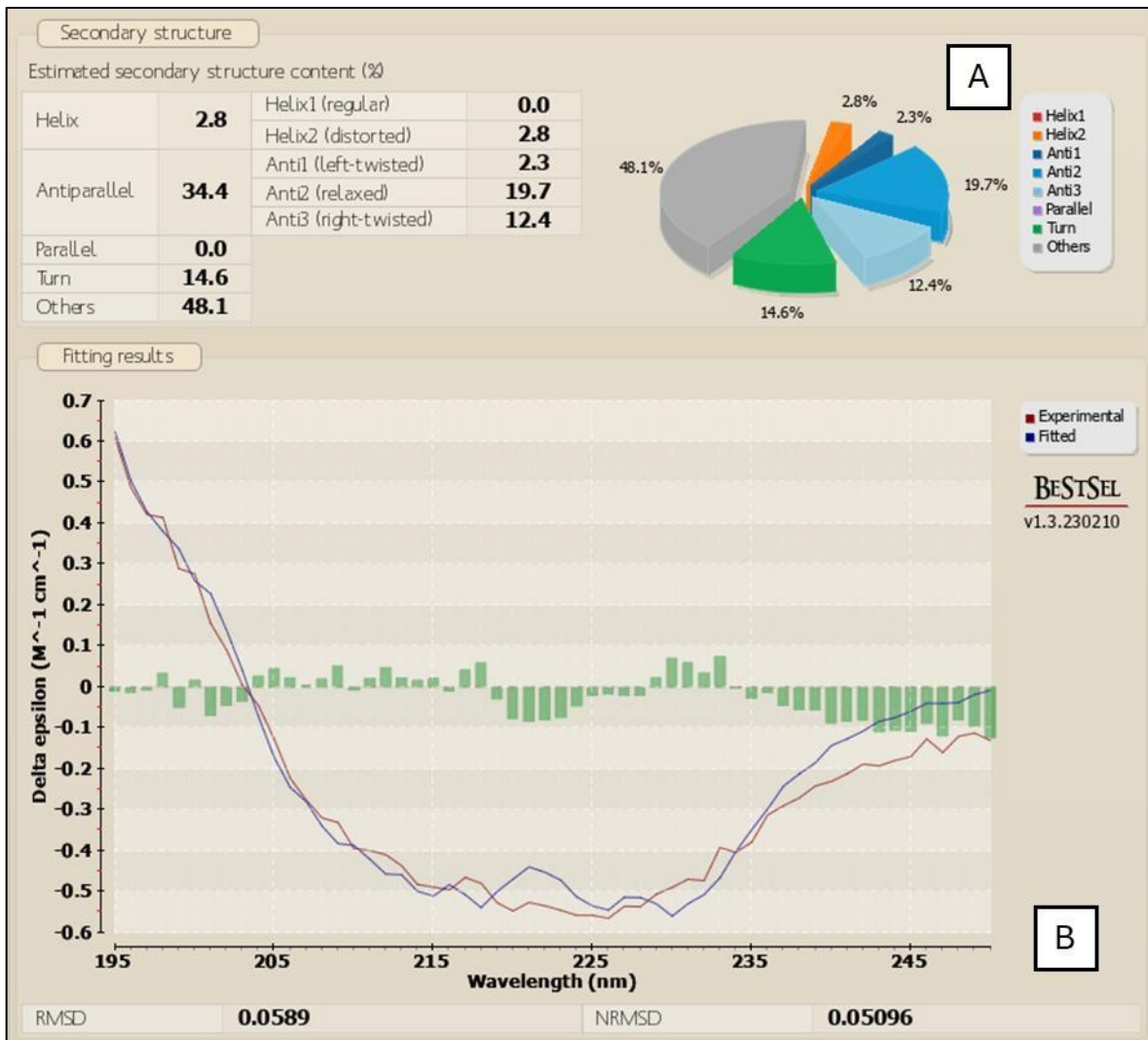


Figura 14. Análisis de DC entregado por la plataforma BeStSel. A. Se puede observar a partir del gráfico el porcentaje de estructuras secundarias identificadas a partir de los datos obtenidos. B. Se puede observar el gráfico en el cual se ajustan los datos obtenidos experimentales al análisis entregado por BeStSel.

DISCUSIÓN

Hasta ahora no existe evidencia estructural de LIMCH1 o de sus variantes como Δ LIM-ALP, uno de los desafíos más difíciles ha sido obtener suficiente cantidad de proteína con una pureza cercana al 100% para realizar análisis estructurales como de DC o SAXS o ensayos de cristalización.

En este seminario de título, se probaron distintas estrategias de purificación de Δ LIM-ALP donde se modificó el medio de cultivo, la temperatura de expresión de la proteína, el tiempo de sonicación, realizar incubación de la muestra a 60°C, variaciones en la cromatografía de afinidad, hasta optimizar un protocolo de purificación que se detalla en la sección materiales y métodos y en los resultados.

Un paso clave fue lograr una sobreexpresión óptima de la enzima, lo que finalmente se logró utilizando medio LB-Mn²⁺ con una temperatura de 20-25°C y con 0,5 mM de IPTG. Hasta ahora en el laboratorio se utilizaba medio Terrific (mucho más enriquecido en nutrientes) y 30°C luego de adicionar el inductor y no se lograba una sobreexpresión de la proteína. Con las nuevas condiciones, se logró observar una banda mayoritaria del tamaño esperado (~50 kDa) luego de la incubación a 60 °C, la cual sirvió como punto de partida para las etapas posteriores de purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad.

Con la pureza y el rendimiento obtenido (0,3 mg/ml) fue posible realizar el análisis de DC y los resultados utilizando la plataforma web BeStSel determinaron que Δ LIM-ALP es una enzima con un bajo nivel de plegamiento lo que se traduce en un bajo porcentaje de estructuras secundarias (2,8% de estructuras helicoidales, 34,4% de hojas β -plegadas, 14,6% de vueltas y 48,1% de zonas al azar o no definidas) (Micsonai *et al.*,2021). Esto podría explicar la dificultad que tienen los servidores de modelamiento estructural para obtener un modelo de predicción con un puntaje alto de precisión. Respecto del modelo de Δ LIM-ALP de Reyes *et al.* 2020, en el desarrollo de este modelo se “cortaron” varios loops o giros de gran magnitud y se ajustó el “core” de la estructura a la estructura de las agmatinasas (sándwich $\alpha/\beta/\alpha$) que contiene principalmente 40% de hoja y 33,3% alfa hélice.

Con la data de estructura secundaria generada para Δ LIM-ALP, se descarta la hipótesis de una estructura similar a las agmatinasas conocidas, sin embargo, mantiene actividad agmatinasa y por lo tanto pertenece a las ureohidrolasas.

Un detalle importante que se desprende a partir de los análisis por dicroísmo circular es que existen cambios en la conformación estructural cuando la enzima alcanza los 60°C donde se ha demostrado que permanece hiperactivada para realizar una mayor actividad agmatinasa. Sin embargo, este resultado debe ser replicado en análisis posteriores y con técnicas más avanzadas para el análisis estructural ya que al realizar el análisis por la plataforma web BeStSel, se obtiene un porcentaje similar en estructuras secundarias pese a que las señales como se puede observar en la fig. 13, pierden intensidad en el dicroísmo circular a mayor temperatura.

CONCLUSIÓN

- En este seminario de título se logró estandarizar un protocolo eficiente para la purificación de la variante Δ LIM-ALP, el que servirá de base para futuras purificaciones que permitan obtener una mayor cantidad de enzima purificada necesarias para ensayos de SAXS y obtención de cristales de la enzima.
- Se caracterizó el contenido de estructuras secundarias de Δ LIM-ALP mediante dicroísmo circular. Los resultados obtenidos muestran que Δ LIMALP presenta un predominio de regiones desordenadas, lo que la distingue de otras agmatinasas conocidas y destaca su singularidad como una agmatinasa con una secuencia distintiva, presente exclusivamente en mamíferos
- Estos resultados constituyen una primera aproximación experimental a la estructura de ALP y aportan antecedentes relevantes para futuros estudios orientados a comprender en mayor profundidad su estructura, función y mecanismos catalíticos. Esto permitirá avanzar en el conocimiento de su rol fisiológico y su posible potencial terapéutico.

Bibliografía

- Agostinelli, E., Marques, M.P.M., Calheiros, R. et al., (2010), Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology. *Amino Acids*, Volumen 38, 393–403
- Barua, S., Kim, J. Y., Kim, J. Y., Kim, J. H., & Lee, J. E. (2019). Therapeutic Effect of Agmatine on Neurological Disease: Focus on Ion Channels and Receptors. *Neurochem Res*, 44(4), 735-750.
- 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.
- Chan, S. L. (1998). Clonidine-displacing substance and its putative role in control of insulin secretion: a minireview. *Gen Pharmacol*, 31(4), 525-529.
- 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, 92-95.
- Fairbanks, C. A., Schreiber, K. L., Brewer, K. L., Yu, C. G., Stone, L. S., Kitto, K. F., Nguyen, H. O., Grocholski, B. M., Shoeman, D. W., Kehl, L. J., Regunathan, S., Reis, D. J., Yeziarski, R. P., & Wilcox, G. L. (2000). Agmatine reverses pain induced by inflammation, neuropathy, and spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(19), 10584-10589.
- Feuerstein, R., Wang, X., Song, D., Cooke, N. E., & Liebhaber, S. A. (1994). The LIM/double zinc-finger motif functions as a protein dimerization domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22), 10655-10659.
- Galea, E., Regunathan, S., Eliopoulos, V., Feinstein, D. L., & Reis, D. J. (1996). Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem J*, 316 (Pt 1) (Pt 1), 247-249.
- Gao, Y., Gumusel, B., Koves, G., Prasad, A., Hao, Q., Hyman, A., & Lipton, H. (1995). Agmatine: a novel endogenous vasodilator substance. *Life Sci*, 57(8), P183-86.

- 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.
- Kossel, A. (1910). Über das Agmatin. 66(3), 257-261
- Laube, G., & Bernstein, H. G. (2017). Agmatine: multifunctional arginine metabolite and magic bullet in clinical neuroscience? *Biochem J*, 474(15), 2619-2640.
- 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(5149), 966-969.
- LI, G., REGUNATHAN, S., & REIS, D. J. (1995). Agmatine Is Synthesized by a Mitochondrial Arginine Decarboxylase in Rat Brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 763(1), 325-329.
- Li, Y. F., Gong, Z. H., Cao, J. B., Wang, H. L., Luo, Z. P., & Li, J. (2003). Antidepressant-like effect of agmatine and its possible mechanism. *Eur J Pharmacol*, 469(1-3), 81-88.
- Mella, C., Martínez, F., de los Angeles García, M., Nualart, F., Castro, V., Bustos, P., Carvajal, N., & Uribe, E. (2010). Expression and localization of an agmatinase-like protein in the rat brain. *Histochemistry and Cell Biology*, 134(2), 137-144.
- Micsonai, A., Bulyáki, É., Kardos, J. (2021). BeStSel: From Secondary Structure Analysis to Protein Fold Prediction by Circular Dichroism Spectroscopy. In: Chen, Y.W., Yiu, C.P.B. (eds) *Structural Genomics. Methods in Molecular Biology*, vol 2199. Humana, New York, NY.
- Moretti, M., Matheus, F. C., de Oliveira, P. A., Neis, V. B., Ben, J., Walz, R., Rodrigues, A. L., & Prediger, R. D. (2014). Role of agmatine in neurodegenerative diseases and epilepsy. *Front Biosci (Elite Ed)*, 6(2), 341-359.
- Mrozowich, T., McLennan, S., Overduin, M., Patel, T.R. Structural Studies of Macromolecules in Solution using Small Angle X-Ray Scattering. *J. Vis. Exp.* (141), e58538
- 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), 1-14.

- Reis, D. J., & Regunathan, S. (1998). Agmatine: an endogenous ligand at imidazoline receptors may be a novel neurotransmitter in brain. *J Auton Nerv Syst*, 72(2-3), 80-85.
- Reyes, M.-B., Martínez-Oyanedel, J., Navarrete, C., Mardones, E., Martínez, I., Salas, M., López, V., García-Robles, M., Tarifeño-Saldivia, E., Figueroa, M., García, D., & Uribe, E. (2020). Insights into the Mn²⁺ 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(11), 4132.
- Sastre, M., Regunathan, S., Galea, E., & Reis, D. J. (1996). Agmatinase Activity in Rat Brain: A Metabolic Pathway for the Degradation of Agmatine. *Journal of Neurochemistry*, 67(4), 1761-1765.
- Sinn, M., Stanoppi, M., Hauth, F., Fleming, J. R., Funck, D., Mayans, O., & Hartig, J. S. (2022). Guanidino acid hydrolysis by the human enzyme annotated as agmatinase. *Scientific Reports*, 12(1), 22088.
- Tabor, C. W., & Tabor, H. (1984). POLYAMINES. *Annual Review of Biochemistry*, 53(1), 749-790.
- 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.
- Wu, N., Su, R. B., & Li, J. (2008). Agmatine and imidazoline receptors: their role in opioid analgesia, tolerance and dependence. *Cell Mol Neurobiol*, 28(5), 629-641.