



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

Análisis funcional del dominio CH de LIMCH1

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

ARLETTE DENISE GONZÁLEZ SAN MARTIN

CONCEPCIÓN-CHILE

2018

Profesor Guía: Amparo Uribe Pérez

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular,

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

RESUMEN

Las agmatinasas catalizan la hidrólisis de agmatina en putrescina y urea, y requieren del ion Mn^{2+} para su actividad catalítica. Su sustrato agmatina, se genera por la descarboxilación de la arginina en una reacción mediada por la enzima arginina descarboxilasa (ADC). La agmatina es considerada un neurotransmisor/neuromodulador, y entre sus funciones se encuentran la modulación de la liberación de insulina y la regulación de la concentración de poliaminas intracelulares, a nivel farmacológico se ha encontrado que tiene efectos anticonvulsionantes, antidepresivos y anti ansiolíticos. Su producto putrescina, es un precursor de la síntesis de las poliaminas espermina y espermidina, indispensables para el ciclo celular, mantención del citoesqueleto y remodelación de la cromatina.

En nuestro laboratorio se clonó, expresó y caracterizó una proteína de cerebro de rata, con actividad agmatinasa denominada LIMCH1. Esta proteína comparte la localización cerebral descrita para la agmatina y para la enzima ADC, por lo cual podría estar regulando las concentraciones de agmatina a nivel cerebral. Sin embargo, a pesar de presentar una significativa actividad agmatinasa, su secuencia es altamente divergente de las agmatinasas descritas.

LIMCH1 posee un dominio LIM en su extremo C-terminal, el cual posee un rol regulatorio de su actividad enzimática, inhibiéndola, y posee un dominio de homología a calponina, CH, en su extremo N-terminal.

Los dominios CH han sido descritos como dominios de interacción con proteínas del citoesqueleto y han sido clasificados en 3 grupos, donde los dominios CH1 y CH2, se

encuentran en tándem y forman un dominio de interacción a actina (ABD). Los dominios CH3 se encuentran en una sola repetición en proteínas de unión a citoesqueleto, *scaffold* y proteínas asociadas a transducción de señales. Análisis de secuencia indican que el dominio CH de LIMCH1 pertenece al tercer grupo.

Es así que, considerando los antecedentes con respecto a los dominios CH tipo 3, y la importancia de las poliaminas en la estructura del citoesqueleto, planteamos como hipótesis que el dominio CH de LIMCH1 interacciona con las proteínas del citoesqueleto actina y tubulina.

En esta tesis se analizó la interacción del dominio CH de LIMCH1 con G-actina y tubulina, utilizando un protocolo *in vitro* de coinmunoprecipitación (CoIP). Para estos experimentos, se generó la proteína de fusión SBP-CH (*streptavidin binding protein-CH*) y se utilizó un anticuerpo anti-SBP para realizar la CoIP *in vitro*. A continuación los inmunoprecipitados obtenidos, se revelaron con anticuerpos anti-SBP, anti- β actina y anti- α tubulina. Obteniendo resultados positivos con el anticuerpo anti- β actina. Por lo que se propone que ambas proteína, SBP-CH y β -actina, estarían formando parte de un complejo proteico.

En conexión con estos resultados, se generó un modelo estructural del dominio CH de LIMCH1 el cual está formado por 2 α -hélices centrales rodeadas de α -hélices secundarias dando un total de 7 α -hélices. Sin embargo, no todos los residuos que lo conforman se encuentran en el nivel energético correcto, por lo que es necesario un análisis a profundidad del modelo y su refinamiento.