



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas-Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas Mención  
Biología Celular y Molecular

# Caracterización funcional de LIMCH1

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, área Biología  
Celular y Molecular

David Alfonso García Labraña  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2015

Profesor Guía: Dra. Elena Uribe Pérez  
Profesor Guía: Dr. Nelson Carvajal Baeza  
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## RESUMEN

La agmatinasa, es una enzima que cataliza la hidrólisis de agmatina, generando putrescina y urea, que pertenece a la superfamilia de las ureohidrolasas y forma parte de una vía de generación de poliaminas.

En los últimos años se ha relacionado a la agmatina con importantes funciones, siendo considerada un neurotransmisor, ya que potencia la analgesia generada por morfina y atenúa su tolerancia y dependencia, tiene efectos ansiolíticos y anticonvulsionantes. En cerebro, la agmatina se encuentra principalmente en hipotálamo y áreas periventriculares.

En nuestro laboratorio, se clonó y expresó una secuencia de cDNA de cerebro de rata que codifica para una proteína con actividad agmatinasa, pero que no posee una identidad o similitud importante con ninguna agmatinasa conocida y tampoco contiene los residuos críticos para realizar el proceso catalítico. Esta proteína, denominada *agmatinase like protein* (ALP), es la primera proteína recombinante de mamífero que ha demostrado poseer una significativa actividad agmatinasa *in vitro*. Un análisis inmunohistoquímico para ALP en cerebro de rata, demuestra su presencia en hipotálamo e hipocampo. Además, ALP presenta en su extremo C-terminal un dominio-LIM, compuesto por 67 residuos, el cual cumple un rol auto-inhibitorio de su actividad agmatinasa.

Al analizar las bases de datos, encontramos que el gen que codifica para ALP en *Rattus norvegicus*, corresponde a la región 3' del gen *Limch1*, el cual genera varios transcritos diferentes, ellos codifican dos isoformas, de 1059 y 903 residuos cada una. Los productos de este gen, que han descritos como miembros de una familia de proteínas multidominio, las cuales además de presentar el dominio LIM, presente en ALP, poseen una sola repetición del dominio *Calponin Homology*

(CH) (isoforma I) en el extremo N-terminal, el cual ha sido descrito como dominio de unión a componentes del citoesqueleto. Considerando estos antecedentes, en esta tesis abordamos las siguientes interrogantes: ¿Se genera una proteína fisiológicamente funcional del gen *Limch1* que presente los dominios CH y LIM (isoforma I)? Y de ser así, ¿qué roles cumplirían estos dominios en la función de la proteína LIMCH1?

En esta tesis se determinó la presencia del mRNA que codifica para ambas isoformas de *Limch1* en cerebro de rata, y a nivel de proteína, se identificó mediante Western blot una banda, tanto en lisado de hipotálamo como en lisado de células de glioma de rata (C6), de un tamaño de 120 kDa, equivalente al tamaño esperado para la isoforma I. Mediante ensayos de inmunohistoquímica, LIMCH1 se detectó en el hipotálamo, tanto en neuronas como en tanicitos, y en hipocampo se encontró en astrocitos. Esta es la misma localización ya descrita para agmatina, y concuerda con resultados ya obtenidos en el laboratorio para ALP.

Ambas isoformas de LIMCH1 fueron capaces de hidrolizar agmatina *in vitro*, además de ser capaces de sustentar la síntesis de poliaminas *in vivo*, en un sistema de complementación en levaduras. Además, ninguna de ellas hidrolizó arginina, y al igual que en ALP, la remoción del dominio LIM generó un aumento en su eficacia catalítica, aunque en menor grado que en ALP.

En conclusión, ambas isoformas de LIMCH1 presentaron actividad agmatinasa, la misma distribución en cerebro que ALP, y el dominio LIM presente en su secuencia también desempeñó un rol auto-regulatorio de la actividad agmatinasa. Proponemos por lo tanto que LIMCH1 es una proteína clave para la regulación de los niveles de agmatina en cerebro.