

Predicción de la estructura tridimensional de las enzimas ACR2 del género *Lupinus*

ACR2 enzymes from genus *Lupinus* 3D-structure prediction

César Díaz Pérez¹, Alma Laura Díaz Pérez², Rafael Alejandro Veloz García¹, Mauricio Nahuam Chávez-Avilés³ y Lenin Sánchez Calderón⁴

¹ Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Guanajuato. ² IQB-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

³ Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo. ⁴ Universidad Autónoma de Zacatecas.

cesar.diaz@ugto.mx*

Resumen

El arsénico (As) es un metal pesado (MP) que se encuentra de forma natural en la corteza terrestre. Debido a la acción de la naturaleza y a la intervención del hombre, el As se ha convertido en un contaminante recalcitrante. La toxicidad del As, además de la capacidad de bioacumularse, lo han convertido un contaminante de interés, por lo que se están buscando nuevas estrategias para su biorremediación. Las plantas se ven afectadas por la toxicidad del As a nivel morfológico, fisiológico y metabólico; sin embargo, estas han desarrollado mecanismos de defensa contra el daño por este MP. Uno de los mecanismos para contrarrestar el efecto tóxico del As dentro de la célula es la reducción de As(V) a As(III) por medio de la enzima arseniato reductasa (ACR2), la cual puede interactuar con fitoquelatinas y ser transportado a la vacuola. Las enzimas ACR2 son homólogas a las enzimas fosfatasas CDC25. Las especies del género *Lupinus* que se caracterizan por crecer en sitios contaminados con MPs son de interés por su posible potencial como herramienta de biorremediación. El objetivo de este trabajo fue buscar proteínas con posible función de ACR2, y modelar su estructura, con el fin de sentar las bases para, posteriormente, llevar a cabo un análisis estructura-función de esta familia. En este trabajo se encontraron tres posibles proteínas ACR2 de *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius* y *Lupinus luteus*, las cuales contenían el dominio de rodanasa y ACR2, además de tener la huella HC(X)₅R. Se obtuvieron modelos tridimensionales de los monómeros y dímeros de cada una de las tres secuencias. Los modelos obtenidos son de buena calidad y pueden ser usados para llevar a cabo un análisis estructura-función de la familia ACR2.

Abstract

Arsenic is a heavy metal (HM) that occurs naturally in the earth's crust. Due to the action of nature and the actions of man, As has become a recalcitrant pollutant. As toxicity and its bioaccumulate effect has made it a pollutant of interest, new strategies for its bioremediation are being sought. Plants are affected by As toxicity at the morphological, physiological and metabolic level; however, plants have developed defense mechanisms against As damage. One of the mechanisms to counteract AS toxic effect inside the cell is As reduction catalyzed by the arsenate reductase enzyme (ACR2), As reduced can interact with phytochelatin and be transported to the vacuole. ACR2 enzymes are homologous to CDC25 phosphatase enzymes. Species of the genus *Lupinus*, which are characterized by growing in sites contaminated with PMs, are of interest for their potential as a bioremediation tool. The aim of this work was to search for putative ACR2 functional proteins with ACR2, and to model their 3D structure, to lay the foundations for, subsequently, carrying out a structure-function analysis of this family. In this work, we found three putative ACR2 proteins from *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius* and *Lupinus luteus*, which contained the rhodanase and ACR2 domain, in addition in Fabaceae plants have the HC(X)₅R motif. 3D models of the monomers and dimers of each of the three sequences were obtained. The models obtained are of good quality and can be used to perform a future ACR2 family structure-function analysis.

Palabras clave: *Lupinus*, Arsenato reductasa, ACR2, modelamiento tridimensional.

Introducción

Arsénico y toxicidad

El arsénico (As) es un metal pesado (MP) no esencial que en el ambiente representa un grave riesgo para todos los organismos (Zhang *et al.*, 2021). Es el vigésimo elemento más abundante y ampliamente distribuido en el planeta. El As ingresa al ecosistema a través de fenómenos naturales, como las erupciones volcánicas, la meteorización y mineralización de la corteza terrestre, y también mediante actividades antropogénicas, como el uso de plaguicidas a base de As, insecticidas, fertilización con residuos sólidos urbanos e irrigación con aguas subterráneas contaminadas por As. Debido a sus efectos tóxicos, el As se considera un contaminante ambiental (Gautam *et al.*, 2020; Nahar *et al.*, 2022).

Toxicidad del Arsénico y mecanismos de resistencia en plantas

En el suelo, el As está disponible para las plantas principalmente en dos estados de oxidación diferentes, el estado trivalente arsenito [As(III)] y el estado pentavalente arseniato [As(V)]. El As(III) entra a las plantas a través de las acuaporinas del tipo NIPs (proteínas intrínsecas similares a Nod26) y PIPs (proteínas intrínsecas de membrana plasmática); mientras que el As(V), al ser similar al fosfato, es absorbido por las raíces de las plantas a través de transportadores de fosfato de la familia Pht (Gautam *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

Dentro de la célula el As provoca daño a distintos niveles. A nivel morfológico, puede afectar negativamente la longitud y la cantidad de biomasa tanto del sistema radicular como del sistema de brotes; a nivel fisiológico, se observan cambios drásticos en la homeostasis hídrica, que impacta la conductancia estomática, la tasa de transpiración, y el contenido relativo de agua en las hojas, además también altera la fotosíntesis, y la tasa fotosintética; a nivel metabólico afecta el metabolismo de los azúcares, de los lípidos de las membranas y fomenta la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que puede llevar a la muerte de la planta (Bali & Sidhu, 2021).

Las plantas son organismos sésiles, los cuales deben de desarrollar mecanismos para poder subsistir en el medio que habitan. Existen varios mecanismos para que las plantas puedan sobrevivir en suelos contaminados con As, como lo es la activación de mecanismos destoxificadores de ROS, expresión de proteínas como chaperonas, fitoquelatinas y metalotioneínas, y compartimentalizar al As en organelos (Gautam *et al.*, 2020). Para la compartimentalización del As[V] es necesaria la reducción del mismo a As[III] por parte de la enzima arsenato reductasa (Dhankher *et al.*, 2006).

Las enzimas arsenato reductasas ACR2

Una de las adaptaciones frente al estrés causado por As(V) en las células de la raíz es su reducción a As(III), catalizada por la enzima arseniato reductasa 2 (ACR2) (Ghori *et al.*, 2019). Una vez reducido el As(V), el As(III), la cual es la forma de As más abundante dentro de la célula, puede ser acompañado por compuestos con tioles, como las fitoquelatinas, y ser transportado a las vacuolas, o puede ser excluido del sistema radicular (Zhang *et al.*, 2021).

La importancia de la enzima ACR2 para la resistencia y acumulación de As en plantas, se ha observado en *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Pteris cretica* y *Pityrogramma calomelanos*, donde se ha probado su actividad como arsenato reductasa (Dhankher *et al.*, 2006; Duan *et al.*, 2007; Le *et al.*, 2023; Nahar *et al.*, 2017; Popov *et al.*, 2021). Más específicamente, en *A. thaliana* el silenciamiento del gen de la AtACR2 provocó hipersensibilidad a altas concentraciones de As(V) (Dhankher *et al.*, 2006).

Las enzimas ACR2 son una familia de enzimas que se encuentra en plantas y en hongos, que no comparte similitud con la familia de enzimas ACR2 de bacterias, por lo que probablemente sean resultado de evento

de evolución convergente (Mukhopadhyay & Rosen, 1998). Se cree que ambas familias evolucionaron a partir de las proteínas fosfatasas de tirosina, que incluyen las fosfatasas del ciclo celular CDC25. Estas fosfatasas y reductasas contienen un motivo catalítico conservado HC(X)₅R, donde la C es indispensable para que la enzima sea funcional (Duan et al., 2007). La relación evolutivo-funcional de las enzimas ACR2/CDC25 se ha comprobado dado que la enzima AtACR2 aún conserva actividad de fosfatasa (Landrieu et al., 2004).

El género *Lupinus* y las enzimas ACR2

El género *Lupinus* pertenece a la familia de las leguminosas (Fabáceas). La mayoría de las especies de este género forman parte de la vegetación secundaria, que coloniza áreas que han sufrido algún tipo de disturbio, ya sea de origen natural o humano (Del Moral & Rozzell, 2005). Estas plantas tienen la capacidad de adaptarse a condiciones adversas y suelen ser pioneras en la recuperación de suelos degradados. Algunas especies del género *Lupinus* son tolerantes y presentan respuestas de defensa contra As y otros MPs, por ejemplo, *Lupinus albus* exuda derivados del glutatión y fitoquelatinas en respuesta cuando crece en presencia de As (Frémont et al., 2024) y *Lupinus campestris* que crece en suelos contaminados con As y es hiperacumuladora de As (Ortiz-Luevano, 2014).

Actualmente se disponen datos genómicos de tres especies de *Lupinus*, *L. albus* (Xu et al., 2020), *Lupinus angustifolius* (Garg et al., 2022), y *Lupinus luteus*. Lo que nos abre las puertas para buscar los posibles determinantes génicos implicados en la resistencia a MPs, analizar sus mecanismos de acción y que puedan ser usados como posibles herramientas biotecnológicas. Por lo anterior, el presente trabajo tiene la finalidad de buscar posibles proteínas ACR2 codificadas en especies del género *Lupinus*, y dilucidar su estructura tridimensional, con la finalidad de poder tener las herramientas necesarias (modelo molecular) para posteriormente hacer un análisis estructura-función de estas proteínas.

Metodología

Filogenia molecular

Para la reconstrucción de la filogenia molecular de las enzimas ACR2 del género *Lupinus*, primeramente, se hizo una búsqueda de secuencias de proteínas similares a la proteína ACR2 de *A. thaliana* (AtACR2; número de acceso: Q8GY31) de fabáceas en la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI. Adicionalmente se buscaron las proteínas de funcionalidad conocida haciendo una búsqueda en la base de datos swissprot. Ambas búsquedas se llevaron a cabo con el programa Blastp (Altschul et al., 1997). Se obtuvo un grupo final de 28 secuencias. El alineamiento de secuencias se hizo en el servidor T-Coffe (Di Tommaso et al., 2011). El alineamiento se refinó a mano con el programa Seaview (Gouy et al., 2021). La filogenia molecular se llevó a cabo con el programa MegaXI (Tamura et al., 2021), usando el algoritmo de máxima verosimilitud modelo de sustitución JTT con una corrección Gamma de 2, con un bootstrap de 500 repeticiones.

Modelado molecular

Para generar los modelos con la molécula de Zn, el primer paso fue buscar los moldes en las bases de datos PDB (wwPDB-consortium, 2019) y AlphaFold (Jumper et al., 2021), con el programa Blastp en los sitios de NCBI y EBI, respectivamente. Se encontraron las enzimas cristalizadas 3FS5 y 3F4A de *Saccharomyces cerevisiae*, la proteína resuelta por resonancia magnética nuclear 1T3K de *Arabidopsis thaliana* y los modelos AF-A0A1J71926 y AF-A0A6A5M599 de *L. albus* y *L. angustifolius* respectivamente. Primeramente, se usaron los moldes monoméricos para generar el modelo monomérico con el cofactor. Posteriormente se generó el modelo dimérico de la proteína usando el modelo monomérico y el molde dimérico. Todos los modelos de las proteínas ACR2 se modelaron con el programa Modeller 10v4 (Webb & Sali, 2021). Los modelos fueron validados en el programa PROCHECK 3.5 (Laskowski et al., 2006). Se seleccionaron los modelos con los mejores valores de validación.



Los modelos moleculares fueron visualizados y las figuras fueron generadas con el programa PyMOL Molecular Graphics System, versión 2.1.0 (Open-Source), Schrödinger, LLC.

Resultados y discusión

Búsqueda de homólogos a la enzima AtACR2 en el género *Lupinus*

El género *Lupinus* tiene especies que se caracterizan por ser resistentes a MPs, incluyendo el As, por lo que es posible que expresen proteínas que les ayuden a contrarrestar los efectos nocivos del As, como las enzimas ACR2. Para probar esta hipótesis se llevó a cabo una búsqueda de enzimas similares a la proteína AtACR2 de *A. thaliana*. En la búsqueda se encontraron cuatro proteínas que tiene similitud de secuencia con la enzima AtACR2. Un análisis comparativo de estas proteínas resultó en la eliminación de una de ellas, dado que era un fragmento de otra de las proteínas encontradas. Las proteínas encontradas fueron: KAE9585436 de *Lupinus albus* de 141 aminoácidos (68.99% de identidad), XP_019444309 de *Lupinus angustifolius* de 135 aminoácidos (70.54% identidad), CAL0326783 de *Lupinus luteus* (68.99% de identidad) de 131 aminoácidos. El hecho de encontrar una proteína de este tipo en cada especie es frecuente como en el caso de *A. thaliana* que presenta únicamente una enzima del tipo ACR2 codificada en su genoma (Dhankher *et al.*, 2006; Nahar *et al.*, 2017).

Para ahondar en la posible función de las proteínas encontradas del género *Lupinus*, se llevó a cabo la reconstrucción de la filogenia molecular de las proteínas similares a la enzima AtACR2 de Fabáceas (Figura 1). Al grupo de trabajo se agregaron cinco proteínas de función conocida encontradas en la base de datos swiss-prot. Dos de estas proteínas son una enzima fosfatasa y una ACR2 de *Saccharomyces cerevisiae*, otra fosfatasa de *Schizosaccharomyces pombe* y las otras dos son ACR2 de arroz (*Oryza sativa*). En la reconstrucción de filogenia se ve claramente que las enzimas de levaduras se agruparon juntas por lo que sirvieron como grupo externo para enraizar el árbol. Además, las proteínas ACR2 de plantas se agrupan junto a las proteínas de las Fabáceas, incluyendo a las tres proteínas del género *Lupinus*, lo que sugiere que este grupo de proteínas pueden ser enzimas de la familia ACR2.

Modelado molecular de los monómeros

Para comenzar la caracterización de la estructura de las proteínas ACR2 de las especies del género *Lupinus*, se propuso hacer un modelado por homología a partir de las secuencias de las proteínas obtenidas anteriormente, usando como moldes enzimas cuya estructura tridimensional ya estuviera resuelta. Dos de las estructuras han sido obtenidas con los cofactores o moléculas estructurales, además, se ha obtenido la estructura de un dímero de la familia, el cual es el estado funcional de las proteínas ACR2 ya caracterizadas (Mukhopadhyay *et al.*, 2000).

En las búsquedas con el programa Blastp se encontraron dos proteínas monoméricas cuya estructura se ha resuelto de manera experimental, que pueden servir como moldes, la enzima AtACR2 (PDB: 1T3K) de *A. thaliana* y la proteína YGR203W (PDB: 3FS5) de *S. cerevisiae*. La proteína es una fosfatasa CDC25, que es homóloga a las proteínas ACR2 de *S. cerevisiae*, pero no tiene actividad ACR2. La estructura de la proteína AtACR2 contiene un átomo de Zn, una posible molécula estructural, por lo que será añadido al momento de generar los modelos de las proteínas de *Lupinus*. Las tres proteínas de *Lupinus* tienen una identidad de arriba del 60% con la estructura de la enzima AtACR2 y menor del 30% con respecto a la proteína YGR203W. Si bien los valores de identidad son adecuados con la proteína AtACR2, los valores de la gráfica de Ramachandran (GR), obtenidos en el programa PROCHECK que verifica la calidad de las combinaciones de los ángulos ϕ y ψ , son malos (5.2% de enlaces en zonas no permitidas; Tabla 1), este es un problema que se ha visto en otras estructuras resueltas con RMN (Nabuurs *et al.*, 2006). Debido a la baja identidad o calidad de los moldes de estructura conocida se decidió usar como moldes también a los modelos moleculares de la base de datos AlphaFold (AF). No se usan directamente los modelos AF, ya que, si bien son modelos con calidad buena, los valores obtenidos en ángulos no permitidos físicamente en el análisis de la GR son de 0.0% (Tabla 1). En AF se encontraron dos modelos, AF-A0A6A5M599 y AF-A0A1J7I926, que alinean con un 100% de identidad las proteínas ACR2

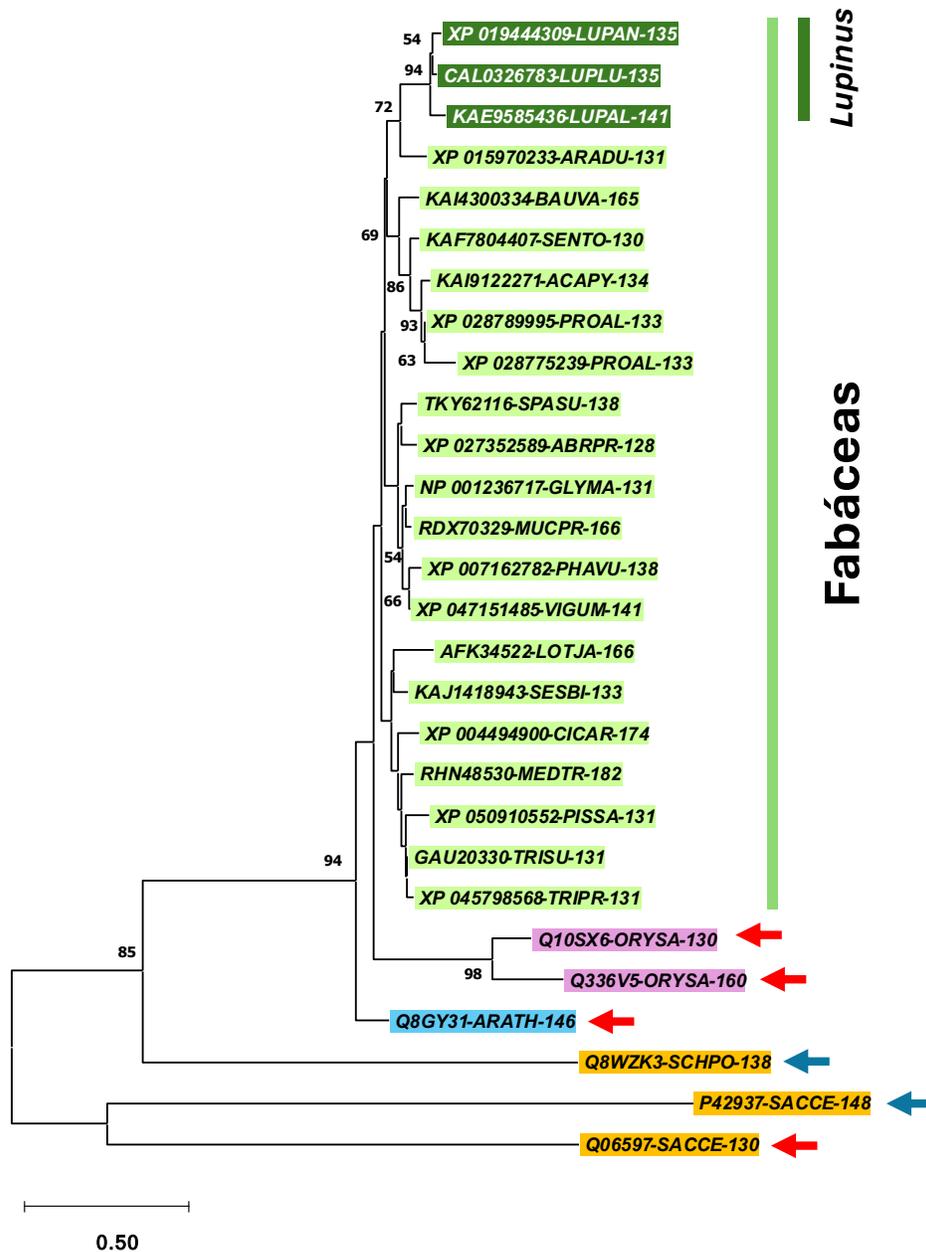


Figura 1. Reconstrucción filogenética de la familia ACR2 de fabáceas. Se obtuvo un grupo de trabajo de 22 secuencias de la familia ACR2 y 6 proteínas funcionales. El árbol se reconstruyó con el método de máxima verosimilitud, con el modelo JTT para medir las distancias evolutivas y 500 réplicas de Bootstrap. Se muestran valores de Bootstrap superiores a 50%. En verde se muestran las secuencias de fabáceas, en rosa las secuencias de arroz, en azul la secuencia de *A. thaliana* y en amarillo las secuencias de levaduras. Las flechas rojas marcan las proteínas con actividad ACR2 y en azul las enzimas con actividad de fosfatasa. *Lupinus albus* (KAE9585436), *Lupinus angustifolius* (XP_019444309), *Lupinus luteus* (CAL0326783), *Lotus japonicus* (FK34522), *Trifolium subterraneum* (GAU20330), *Senna tora* (KAF7804407), *Bauhinia variegata* (KAI4300334), *Acacia pycnantha* (KAI9122271), *Sesbania bispinosa* (KAJ1418943), *Glycine max* (NP_001236717), *Saccharomyces cerevisiae* (Q06597), *Saccharomyces cerevisiae* (P42937), *Oryza sativa* (Q10SX6), *Oryza sativa* (Q336V5), *Arabidopsis thaliana* (Q8GY31), *Schizosaccharomyces pombe* (Q8WZK3), *Mucuna pruriens* (RDX70329), *Medicago truncatula* (RHN48530), *Spatholobus suberectus* (TKY62116), *Cicer arietinum* (XP_004494900), *Phaseolus vulgaris* (XP_007162782), *Arachis duranensis* (XP_015970233), *Abrus precatorius* (XP_027352589), *Prosopis alba* (XP_028775239), *Prosopis alba* (XP_028789995), *Trifolium pratense* (XP_045798568), *Vigna umbellata* (XP_047151485), *Pisum sativum* (XP_050910552). (Elaboración propia).

de *L. albus* y *L. angustifolius* respectivamente. La proteína LluACR2 no ha sido modelada en AF, pero se encontró que el modelo AF-A0A1J7I926 tiene un 94.7% de identidad con esta proteína por lo que se usará como molde en este caso.

Tabla 1.- Datos de la calidad del modelo de las enzimas ACR2 del género *Lupinus*. Se muestran los valores de la gráfica de Ramachandran obtenidos del programa PROCHECK 3.5 del modelo molecular y de las proteínas templados ACR2 (m: 1T3K, 3F55; d: 3F4A), y del modelo de la base de datos AlphaFold (Lan: AF-A0A1J7I926-F1, Lal: AF-A0A6A5M599).

	1T3K	3F55	3F4A	Lan	Lal	Lal m	Lan m	Llu m	Lal d	Lan d	Ll d
A	59.5	91.0	92.8	90.2	85.2	92.6	92.2	90.4	89.7	90.4	87.7
P	27.6	9.0	6.8	9.8	13.1	7.4	7.8	8.7	8.7	8.8	10.5
G	7.8	0.0	0.4	0.0	1.6	0.0	0.0	0.9	1.7	0.9	1.8
N	5.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

A-Adecuados. P-Permitidos. G-Generales. N-No permitidos.
 Lal: *L. albus*; Lan: *L. angustifolius*; Llu: *L. luteus*; m: monómero; d: dímero.

Se generaron 40 modelos por proteína de *Lupinus* y se seleccionó aquel que tuviera los mejores resultados en el análisis de la GR. Los tres modelos monoméricos de las proteínas LalACR2, LanACR2 y LluACR2 tuvieron una buena calidad en el programa PROCHEK (Tabla 1), ya que ninguno de los ángulos de los residuos del modelo cae en no permitidas, y más del 85% de los ángulos caen en las zonas generales, indicando así que se trata de un modelo de alta calidad que puede utilizarse para análisis estructurales.

Una de las formas de medir la calidad de los modelos obtenidos es comparar las cadenas alfa de los moldes y de los modelos, haciendo un alineamiento tridimensional, esperando obtener valores bajos de RMSD. En el caso del modelamiento por homología, valores de RMSD menores a 2 Å se consideran adecuados, ya que mientras más pequeño sea este valor en un alineamiento estructural, más preciso es el modelo (Valanciute et al., 2023). El mejor resultado, como era de esperarse, se dio al comparar los moldes obtenidos de AF y los modelos generados (Tabla 2). Se observó que los modelos tenían un mejor alineamiento estructural con la estructura de la proteína YGR203W de *S. cerevisiae*, que con la enzima AtACR2 de *A. thaliana* (Tabla 2). La posible explicación de este resultado es que debido a la desordenada estructura de la enzima AtACR2, Modeller califica mejor las coordenadas de los moldes de AF y de YGR203W, y consecuentemente los modelos se alinean mejor a estos.

Las estructuras de los modelos de las proteínas ACR2 de *Lupinus* presentan el plegamiento canónico de las fosfatasa CDC25, el cual consiste en cinco laminas-β paralelas centrales, que están rodeadas de cinco hélices-α (Yeo & Lee, 2009) (Figura 2).

Modelado molecular de los dímeros

La forma activa de la enzima ScACR2 caracterizada es un dímero (Mukhopadhyay et al., 2000), por lo que probablemente las enzimas de esta familia sean oligoméricas, consecuentemente fue de interés buscar proteínas que pudieran servir de molde para modelar las formas oligoméricas de las proteínas ACR2 de *Lupinus*. Se encontró una sola proteína con identidad de secuencia que cumplía con estas características, la

proteína fosfatasa YGR203W (PDB: 3F4A) que tiene menos del 30% de identidad, pero que tiene una buena calidad estructural (Tabla 1). Se siguió un protocolo con varios moldes para asegurar la calidad de los modelos a obtener. Los moldes usados fueron la estructura dimérica de la proteína YGR203W, y para asegurar una buena calidad del dímero a modelar, también se utilizaron las estructuras monoméricas usadas en el apartado anterior. Se generaron 40 modelos por proteína, se obtuvo al menos un modelo de buena calidad por proteína ACR2 de *Lupinus*, y se seleccionó el que tuvo mejores resultados en el programa PROCHEK (Tabla 1).

Tabla 2.-Valores de RMSD entre los moldes y las proteínas ACR modeladas. Se muestran los resultados de un alineamiento estructural entre los modelos moleculares obtenidos y las estructuras que fueron usadas de molde. Los valores se representan en Å².

	Lal m	Lan m	Llu m
1T3K	4.046	3.913	3.783
3F55	0.817	0.817	0.797
Molde de AF	0.218	0.257	0.297

m: monómero; Lal: *L. albus*; Lan: *L. angustifolius*; Llu: *L. luteus*.

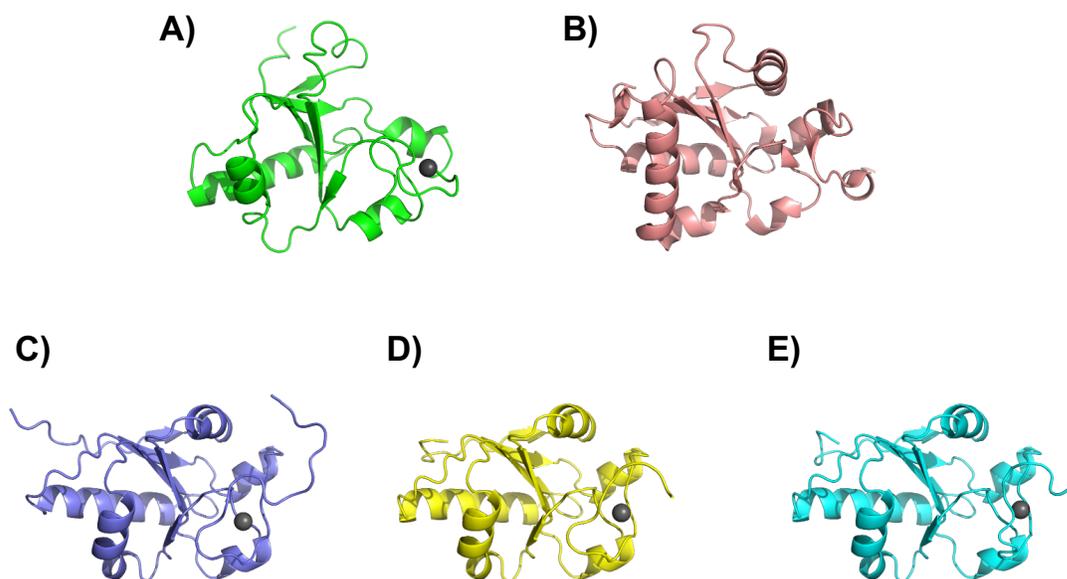


Figura 2. Modelos moleculares de los monómeros de las enzimas ACR2 de género *Lupinus*. Se muestran los moldes y modelos moleculares obtenidos. A) Estructura de RMN AtACR2 de la enzima *A. thaliana*. B) Estructura del cristal de la enzima ScACR2 de *S. cerevisiae*. C) Modelo de la enzima LalACR2 de *Lupinus albus*. D) Modelo de la enzima LanACR2 de *Lupinus angustifolius*. E) Modelo de la enzima LluACR2 de *Lupinus luteus*. En gris se muestra el cofactor Zn. (Elaboración propia).

Los valores del RMSD obtenidos entre el molde y los modelos fueron menores a 1 Å, esto aunado a los resultados del programa PROCHECK nos indican que se construyen modelos moleculares de calidad de las tres proteínas ACR2 de *Lupinus*. Los monómeros de las proteínas se unen de manera antiparalela, y las zonas de interacción se dan entre el dominio amino terminal de la subunidad A y el dominio carboxilo terminal de la subunidad B (Figura 2).

Tabla 3.-Valores de RMSD entre el molde y las proteínas ACR modeladas. Se muestran los resultados de un alineamiento estructural entre los modelos moleculares de los dímeros obtenidos y la estructura que fue usada de molde. Los valores se representan en Å².

	Lal m	Lan m	Llu m
3F4A	0.648	0.695	0.675

d: dímero; Lal: *L. albus*; Lan: *L. angustifolius*; Llu: *L. luteus*.

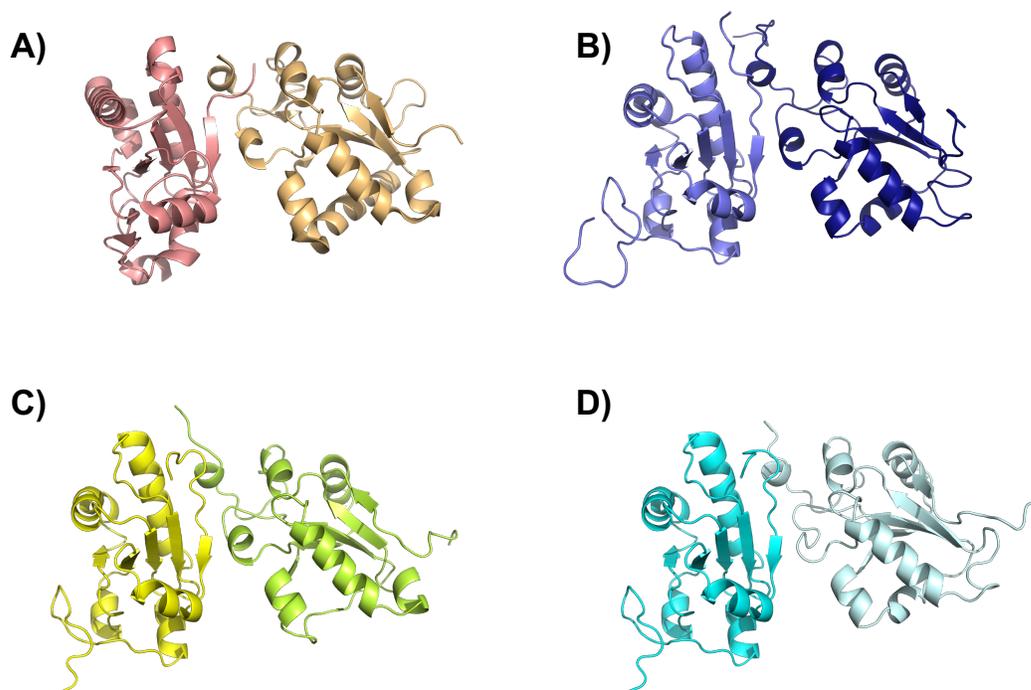


Figura 3. Modelos moleculares de los dímeros de las enzimas ACR2 de género *Lupinus*. Se muestran los molde y modelos moleculares obtenidos. A) Estructura del cristal de la enzima dimerica ScACR2 de *S. cerevisiae*. B) Modelo de la enzima LalACR2 de *L. albus*. C) Modelo de la enzima LanACR2 de *L. angustifolius*. D) Modelo de la enzima LluACR2 de *L. luteus*. Cada subunidad del dímero se muestra de diferente color. (Elaboración propia).

Conclusiones

En este trabajo se encontraron tres secuencias proteicas de *L. albus*, *L. angustifolius* y de *L. luteus* que presentan similitud de secuencia con las enzimas ACR2 de organismos eucarióticos. La distribución filogenética de estas enzimas nos sugiere su posible función como arsenato reductasas de la familia ACR2 eucariótica, la cual es homóloga a la familia de fosfatasa CDC25. La estructura tridimensional del modelo de estas proteínas conserva el plegamiento característico de las fosfatasa CDC25. El dímero de estas tres proteínas, la unidad funcional de la familia, se forma de la interacción de los dominios amino-terminal y carboxilo-terminal de las subunidades, las cuales tienen una posición antiparalela. Los modelos moleculares

obtenidos en este trabajo permitirán poder llevar a cabo un análisis estructura-función de esta familia de enzimas en el género *Lupinus*.

Agradecimientos

Este trabajo fue posible con los fondos provenientes de los proyectos: Convocatoria Institucional de Investigación Científica 2024 de la Universidad de Guanajuato, proyecto 064/2024. Ciencia Básica CB-2010-01 000000000156851 y UAZ-202138539.

Referencias

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Bali, A. S., & Sidhu, G. P. S. (2021). Arsenic acquisition, toxicity and tolerance in plants-From physiology to remediation: A review. *Chemosphere*, 283, 131050. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131050>
- Del Moral, R., & Rozzell, L. (2005). Long-term effects of *Lupinus lepidus* on vegetation dynamics at Mount St. Helens. *Plant Ecology*, 181, 203-215. <https://doi.org/10.1007/s11258-005-6627-4>
- Dhankher, O. P., Rosen, B. P., McKinney, E. C., & Meagher, R. B. (2006). Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (ACR2). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(14), 5413-5418. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509770102>
- Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobítz, M., Montanyola, A., Chang, J.-M., Taly, J.-F., & Notredame, C. (2011). T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_2), W13-W17. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr245>
- Duan, G. L., Zhou, Y., Tong, Y. P., Mukhopadhyay, R., Rosen, B. P., & Zhu, Y. G. (2007). A CDC25 homologue from rice functions as an arsenate reductase. *New Phytologist*, 174(2), 311-321. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02009.x>
- Frémont, A., Sas, E., Sarrazin, M., Brisson, J., Pitre, F. E., & Brereton, N. J. B. (2024). Arsenic stress triggers active exudation of arsenic-phytochelatin complexes from *Lupinus albus* roots. *Journal of Experimental Botany*, erae272. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae272>
- Garg, G., Kamphuis, L. G., Bayer, P. E., Kaur, P., Dudchenko, O., Taylor, C. M., Frick, K. M., Foley, R. C., Gao, L. L., & Aiden, E. L. (2022). A pan - genome and chromosome - length reference genome of narrow - leafed lupin (*Lupinus angustifolius*) reveals genomic diversity and insights into key industry and biological traits. *The Plant Journal*, 111(5), 1252-1266. <https://doi.org/10.1111/tpj.15885>
- Gautam, A., Pandey, A. K., & Dubey, R. S. (2020). Unravelling molecular mechanisms for enhancing arsenic tolerance in plants: A review. *Plant Gene*, 23, 100240. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2020.100240>
- Ghori, N.-H., Ghori, T., Hayat, M., Imadi, S., Gul, A., Altay, V., & Ozturk, M. (2019). Heavy metal stress and responses in plants. *International journal of environmental science and technology*, 16, 1807-1828. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02215-8>
- Gouy, M., Tannier, E., Comte, N., & Parsons, D. P. (2021). Seaview version 5: a multiplatform software for multiple sequence alignment, molecular phylogenetic analyses, and tree reconciliation. *Multiple sequence alignment: methods and protocols*, 241-260. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1036-7_15
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., & Potapenko, A. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Landrieu, I., Hassan, S., Sauty, M., Dewitte, F., Wieruszkeski, J.-M., Inzé, D., De Veylder, L., & Lippens, G. (2004). Characterization of the *Arabidopsis thaliana* Arath; CDC25 dual-specificity tyrosine phosphatase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(3), 734-739. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.182>



- Laskowski, R., MacArthur, M., & Thornton, J. (2006). PROCHECK: validation of protein-structure coordinates. *International Tables for Crystallography, F(25.2)*, 722-725. <https://doi.org/10.1107/97809553602060000882>
- Le, T. T. B., Ho, H. T., Dao, T. T., Nguyen, N. T., Tran, L. T., Ngo, L. T. T., & van Nguyen, T. (2023). Arsenate reductase gene from *Pityrogramma calomelanos* L. enhances tolerance to arsenic in tobacco. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 51(2), 12896-12896. <https://doi.org/10.15835/nbha51212896>
- Mukhopadhyay, R., & Rosen, B. P. (1998). *Saccharomyces cerevisiae* ACR2 gene encodes an arsenate reductase. *FEMS Microbiology Letters*, 168(1), 127-136. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13265.x>
- Mukhopadhyay, R., Shi, J., & Rosen, B. P. (2000). Purification and characterization of Acr2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21149-21157. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910401199>
- Nabuurs, S. B., Spronk, C. A. M., Vuister, G. W., & Vriend, G. (2006). Traditional biomolecular structure determination by NMR spectroscopy allows for major errors. *PLoS Computational Biology*, 2(2), e9. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020009>
- Nahar, K., Rhaman, M. S., Parvin, K., Bardhan, K., Marques, D. N., García-Caparrós, P., & Hasanuzzaman, M. (2022). Arsenic-induced oxidative stress and antioxidant defense in plants. *Stresses*, 2(2), 179-209. <https://doi.org/10.3390/stresses2020013>
- Nahar, N., Rahman, A., Nawani, N. N., Ghosh, S., & Mandal, A. (2017). Phytoremediation of arsenic from the contaminated soil using transgenic tobacco plants expressing ACR2 gene of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant physiology*, 218, 121-126. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.08.001>
- Ortiz-Luevano, R. (2014). *Transformación genética de Lupinus campestris mediada por Rhizobium rhizogenes como un modelo de estudio frente al estrés por arsénico* [Tesis de licenciatura], Universidad Autónoma de Zacatecas.
- Popov, M., Zemanová, V., Sácký, J., Pavlík, M., Leonhardt, T., Matoušek, T., Kaňa, A., Pavlíková, D., & Kotrba, P. (2021). Arsenic accumulation and speciation in two cultivars of *Pteris cretica* L. and characterization of arsenate reductase PcACR2 and arsenite transporter PcACR3 genes in the hyperaccumulating cv. Albo-lineata. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 216, 112196. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112196>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Valanciute, A., Nygaard, L., Zschach, H., Jepsen, M. M., Lindorff-Larsen, K., & Stein, A. (2023). Accurate protein stability predictions from homology models. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.11.048>
- Webb, B., & Sali, A. (2021). Protein Structure Modeling with MODELLER. In Y. W. Chen & C.-P. B. Yiu (Eds.), *Structural Genomics: General Applications* (pp. 239-255). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0892-0_14
- wwPDB-consortium. (2019). Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D520-D528. <https://doi.org/10.1093/nar/gky949>
- Xu, W., Zhang, Q., Yuan, W., Xu, F., Muhammad Aslam, M., Miao, R., Li, Y., Wang, Q., Li, X., & Zhang, X. (2020). The genome evolution and low-phosphorus adaptation in white lupin. *Nature Communications*, 11(1), 1069. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14891-z>
- Yeo, H. K., & Lee, J. Y. (2009). Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* Ygr203w, a homolog of single - domain rhodanese and Cdc25 phosphatase catalytic domain. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 76(2), 520-524. <https://doi.org/10.1002/prot.22420>
- Zhang, J., Hamza, A., Xie, Z., Hussain, S., Brestic, M., Tahir, M. A., Ulhassan, Z., Yu, M., Allakhverdiev, S. I., & Shabala, S. (2021). Arsenic transport and interaction with plant metabolism: Clues for improving agricultural productivity and food safety. *Environmental Pollution*, 290, 117987. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117987>

