



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

**ANÁLISIS DE LOS RESIDUOS RELEVANTES EN LA
COORDINACIÓN CON EL COFACTOR MANGANESO
EN LA *agmatinase like protein (ALP)***

POR ALLISON MARIOTH FUENTES LEYTON

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de
Concepción para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor Patrocinante y Guía: Dra. Elena Amparo Uribe Perez
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de Concepción

Mayo, 2024
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

©2024, Allison Marioth Fuentes Leyton

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto FONDECYT Regular N°1230549 Etapa 2023, por el financiamiento de esta tesis.

Al Dr. Yamil Neira por facilitar el Equipo de espectrometría de fluorescencia de Rayos X de reflexión total bajo el proyecto FONDEQUIP EQM 160100.

Al Laboratorio de Enzimología de la Universidad de Concepción.

TABLA DE CONTENIDOS

1	ÍNDICE DE TABLAS	VI
2	ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	VII
3	RESUMEN	VIII
4	ABSTRACT	X
5	INTRODUCCIÓN	1
5.1	Agmatina	1
5.2	Funciones de agmatina en mamíferos.	2
5.3	Agmatinasa	5
5.4	Agmatinase like protein (ALP)	7
5.5	ALP y el cofactor Mn^{2+}	10
6	HIPÓTESIS.	13
7	OBJETIVOS.	13
8	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	13
9	MATERIALES Y MÉTODOS	14
9.1	Vector	14
9.2	Cepa bacteriana	15
9.3	Medio de cultivo	15
9.4	Oligonucleótidos	15
9.5	Reactivos químicos generales	16
9.6	Soluciones generales	17
9.7	Obtención de las mutantes simples.	17
9.8	Secuenciación de plásmido	18
9.9	Cuantificación de ADN	18
9.10	Ensayo de digestión enzimática.	18
9.11	Expresión de variantes Δ LIM-ALP mutadas.	19
9.12	Purificación parcial de las variantes Δ LIM-ALP mutadas.	19
9.13	Determinación de actividad agmatinasa.	20
9.14	Determinación de los parámetros cinéticos.	20
9.15	Ensayo de hiperactivación	20
9.16	Ensayo con distintos metales.	21
9.17	Cuantificación de proteína	21

9.18	Electroforesis en condiciones desnaturalante	21
9.19	Determinación de manganeso por fluorescencia de rayos X	22
9.20	Gráficas	22
10	RESULTADOS	23
10.1	Obtención de enzimas mutantes	23
10.2	Purificación parcial de Δ LIM-ALP y de las variantes mutadas	25
10.3	Determinación de la actividad específica de las variantes mutadas.	26
10.4	Obtención de los parámetros cinéticos para las variantes mutadas.	27
10.5	Análisis de la interacción enzima-metal en las variantes de Δ LIM-ALP.	29
10.6	Determinación del contenido de manganeso en las variantes mutadas.	32
10.7	Efecto de distintos metales sobre la actividad de las variantes de Δ LIM-ALP.	34
11	DISCUSIÓN	36
12	CONCLUSIONES	41
13	BIBLIOGRAFÍA.	42

1 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Agmatina y desórdenes del sistema nervioso central.	4
Tabla II: Parámetros cinéticos de ALP silvestre y trunca en el domino LIM.	10
Tabla III: Secuencia de oligonucleótidos para mutantes simples de ALP.	16
Tabla IV: Secuencia del partidor utilizado en la detección de las mutaciones simples.	16
Tabla V: Concentración de proteínas y actividad específica.	27
Tabla VI: Parámetros cinéticos de las variantes mutadas.	28
Tabla VII: Concentración de Mn^{2+} de las variantes de Δ LIM-ALP.	33

2 ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1: Metabolismo de agmatina.	1
Figura 2: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la agmatinasa	6
Figura 3: Alineamiento de secuencia aminoacídica de <i>Agmatinase like</i> <i>protein</i> (ALP.Rat), Agmatinasa humana (Agma.hum), Agmatinasa de <i>E.coli</i> (Agm. <i>E.coli</i>).	8
Figura 4: Esquema comparativo de ALP y las isoformas clonadas.	9
Figura 5: Modelo del sitio de unión de Mn^{2+} para ALP.	12
Figura 6: Vector H ₆ pQE60	14
Figura 7: Identificación de las mutaciones en asparagina 213, glutamina 215 y aspartato 217 por alanina.	23
Figura 8: Análisis de restricción de las mutantes simples de Δ LIM-ALP en el vector H ₆ pQE60.	24
Figura 9: Cromatograma representativo de la mutante Q215A, a partir de la columna de intercambio aniónico DEAE-celulosa calibrada con Tris-HCl 10 mM, pH 7,5.	25
Figura 10: Identificación de las variantes Δ LIM-ALP, N213A, Q215A y D217A por SDS-PAGE e inmunodetección.	26
Figura 11: Curva de saturación para las enzimas mutantes y silvestre.	28
Figura 12: Efecto de Mn^{2+} , diálisis e hiperactivación sobre la actividad de las enzimas mutantes y silvestre.	30
Figura 13: Hiperactivación en el tiempo de Δ LIM-ALP y las variantes mutadas.	31
Figura 14: Contenido de Mn^{2+} determinado a través de fluorescencia de rayos X de reflexión total en las variantes de Δ LIM-ALP.	33
Figura 15: Efecto de distintos metales en la actividad de las variantes de Δ LIM-ALP.	35
Figura 16: Sitio de unión a Mn^{2+}	37

3 RESUMEN

La *agmatinase like protein* (ALP) es una enzima que se clonó a partir de una librería de genes de cerebro de rata y presenta actividad agmatinasa, hidrolizando la agmatina a putrescina y urea. Esta enzima requiere Mn^{2+} como cofactor y posee un bajo porcentaje de identidad con las agmatinasas conocidas, no conservando los residuos de coordinación al metal activador. En trabajos previos del laboratorio por la falta de información estructural se realizó un modelo estructural de ALP, en el cual se propusieron 5 posibles residuos que interaccionarían con el cofactor Mn^{2+} . Se generó una mutante triple (N213A/Q215A/D217A) y una mutante doble (E288A/K290A) de estos residuos y ambas mutantes no presentaron actividad enzimática. Esta tesis tiene como objetivo evaluar la participación de cada uno de los residuos de la mutante triple en la actividad y coordinación metálica de ALP. Para ello, se generaron mutantes simples reemplazando cada residuo por alanina a través de mutagénesis sitio dirigida, se purificó parcialmente cada enzima por cromatografía de intercambio aniónico y se analizaron sus parámetros cinéticos. Como resultado, se obtuvo que las tres mutantes simples presentaron valores de K_m y $V_{máx}$ menores que la enzima silvestre. Para analizar la interacción enzima- Mn^{2+} , se realizaron experimentos de activación enzimática, diálisis, hiperactivación, determinación del contenido metálico y especificidad de la activación con el metal y en todos los resultados las tres mutantes simples no mostraron diferencias con la enzima silvestre. Concluimos que las tres mutaciones simples afectaron el sitio activo de la enzima ya que alteraron sus parámetros cinéticos y postulamos que estos

residuos se encuentran próximos al sitio activo. Dado que las mutaciones no alteraron la interacción enzima-Mn²⁺ concluimos que estos residuos no participan directamente como ligandos coordinantes del metal activador Mn²⁺.

4 ABSTRACT

The agmatinase-like protein (ALP) is an enzyme cloned from a rat brain gene library that exhibits agmatinase activity, hydrolyzing agmatine to putrescine and urea. This enzyme requires Mn^{2+} as a cofactor and has a low percentage of identity with known agmatinases, not conserving the coordination residues to the activating metal. In previous laboratory work, due to the lack of structural information, a structural model of ALP was constructed, proposing 5 possible residues that would interact with the Mn^{2+} cofactor. A triple mutant (N213A/Q215A/D217A) and a double mutant (E288A/K290A) of these residues were generated, both of which showed no enzymatic activity. This thesis aims to evaluate the participation of each residue in the triple mutant in the activity and metal coordination of ALP. For this purpose, single mutants were generated by replacing each residue with alanine through site-directed mutagenesis, each enzyme was partially purified by anion exchange chromatography, and their kinetic parameters were analyzed. As a result, all three single mutants showed lower K_m and V_{max} values compared to the wild-type enzyme. To analyze the enzyme- Mn^{2+} interaction, experiments including enzymatic activation, dialysis, hyperactivation, determination of metal content, and specificity of activation with the metal were conducted, and in all cases, the three single mutants showed no differences compared to the wild-type enzyme. We concluded that the three single mutations affected the enzyme's active site as they altered its kinetic parameters, and we postulate that these residues are located near the active site. Since the mutations did not alter the

enzyme-Mn²⁺ interaction, we conclude that these residues do not directly participate as coordinating ligands for the activating metal Mn²⁺

5 INTRODUCCIÓN

5.1 Agmatina

La agmatina es una amina primaria que se genera como producto de la descarboxilación de la arginina a través de una reacción enzimática catalizada por la arginina descarboxilasa, a su vez la agmatina es hidrolizada por la agmatinasa o ALP generando putrescina y urea. (Figura 1).

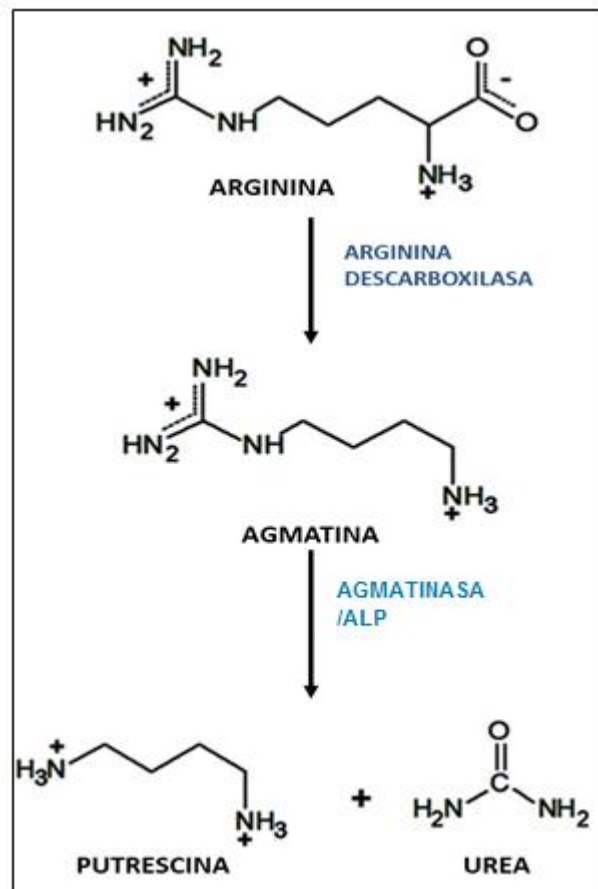


Figura 1: Metabolismo de agmatina. Reacción catalizada por la arginina descarboxilasa y agmatinasa (Orellana et al., 2022)

La agmatina se encuentra en diferentes tejidos, especialmente en el intestino al ser un producto de la microbiota (Raasch et al., 1995), también es sintetizada en el cerebro por la arginina descarboxilasa siendo almacenada en vesículas sinápticas (Reis & Regunathan, 1998).

5.2 Funciones de agmatina en mamíferos.

Entre las funciones biológicas que se asocia la agmatina, está ser un precursor de la síntesis de poliaminas, moléculas esenciales para el crecimiento y el desarrollo celular (Tabor & Tabor, 1984), además inhibe la óxido nítrico sintasa (iNOS) (Gilad et al., 1995). En mamíferos a nivel cerebral se encontró a la agmatina como agonista endógeno en los receptores de imidazolina y de $\alpha 2$ -adrenérgico (Atlas & Burstein, 1984a, 1984b; Li et al., 1994). Se comenzaron a realizar estudios en el sistema nervioso central donde una de las funciones más relevantes es su efecto neuroprotector (Gilad et al., 1995) y su potencial mecanismo incluye la antioxidación, la antiapoptosis, la antiinflamación, la protección de la barrera sanguínea cerebral y la prevención del edema cerebral (Xu et al., 2018), además, es considerada un neurotransmisor/neuromodulador (Reis & Regunathan, 1998; Reis et al., 1998).

Se ha demostrado que la agmatina tiene un efecto neuroprotector en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, lo que se debería al bloqueo del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) ya que la acumulación del péptido beta amiloide en las regiones cerebrales dañadas disminuye (Song et al., 2014). También en la enfermedad de Parkinson, la

agmatina previno el deterioro motor y la pérdida de neuronas dopaminérgicas del cuerpo estriado en animales (Bilge et al., 2020). Además, la agmatina puede actuar como agente antiestrés en condiciones crónicas, su administración exógena proporciona protección contra los cambios inducidos por el estrés al reducir la liberación de glucocorticoides, estimular los procesos antiinflamatorios y liberar factores neuroprotectores (Hassanshahi et al., 2023). Se ha proyectado utilizar agmatina como un posible tratamiento para enfrentar la ansiedad y depresión inducida por diabetes mellitus tipo II, ya que la administración prolongada de agmatina redujo tanto la ansiedad como la depresión e igualmente redujo la concentración de glucosa plasmática, mejorando la resistencia a la insulina (Kale et al., 2020). Igualmente, la agmatina se ve involucrada en otras enfermedades neurológicas como la epilepsia, esquizofrenia, adicciones, etc (Tabla 1).

En ratas con enfermedad de Huntington inducida por ácido 3-nitropropiónico, se ha constatado una disminución de los niveles de agmatina en la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el hipocampo, lo que se correlaciona con deterioro cognitivo y metabólico, resultando en pérdida de peso y anorexia. Sin embargo, la administración crónica de agmatina ha demostrado reducir significativamente los síntomas de la enfermedad y normalizar los niveles de GABA/glutamato, BDNF, IL-6 y TNF- α en áreas cerebrales específicas (Katariya et al., 2024).

Tabla I: Agmatina y desórdenes del sistema nervioso central. (Laube & Bernstein, 2017; Xu et al., 2018)

Enfermedad	Efecto neuroprotector
Accidente cerebrovascular isquémico	Reduce la producción de óxido nítrico (NO) a través de la inhibición de óxido nítrico sintasa en células endoteliales, aumentando así el flujo sanguíneo en áreas isquémicas.
Lesión cerebral traumática	Reduce el glutamato y el NO atenúan la lesión cerebral traumática
Enfermedad de Parkinson	Actúa como antagonista del receptor NMDA. A través de modelos inducidos por rotenona y 1-metil-4-fenil-4-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), la agmatina puede disminuir el estrés oxidativo y proporcionar protección parcial, respectivamente.
Enfermedad de Alzheimer	Activa muchos antioxidantes, incluido glutatión. Además, de disminuir los radicales libres e inhibir la acumulación de péptido beta-amiloide.
Epilepsia	La actividad anticonvulsiva de la agmatina está mediada por los receptores NMDA, los adrenoreceptores $\alpha 2$ y la señalización de NO.
Trastornos mentales (depresión, ansiedad, adicción, esquizofrenia, etc)	Ejerce una acción antidepresiva inhibiendo los receptores NMDA o interactuando con los receptores 5-HT1A/1B y 5-HT2. Además, la agmatina podría suprimir la expresión de los receptores NOS, NMDA o imidazolina y aliviar la adicción a las drogas.

Además, agmatina tiene un efecto antidiabético atribuido a sus mecanismos antiinflamatorio y antioxidante por la activación de los receptores de imidazolina en las glándulas suprarrenales en ratas (Chang et al., 2010; Hwang et al., 2005). También se ha observado en un estudio reciente que la agmatina representa un tratamiento prometedor para tratar la xerostomía de origen diabético debido a su efecto antiglicante y antioxidante (Fikry et al., 2024).

5.3 Agmatinasa

La agmatinasa participa en la hidrólisis de la agmatina generando como productos putrescina y urea y requiere del cofactor manganeso, Mn^{2+} , para su actividad. Hace unos años se consideraba que la agmatinasa era exclusiva de microorganismos y plantas (Satishchandran & Boyle, 1986), pero se ha demostrado la presencia tanto de agmatina como de actividad agmatinasa en los mamíferos, en el cerebro de rata específicamente en el cerebelo (Gilad et al., 1996)

Las agmatinasas pertenecen a la familia de las ureohidrolasa, ya que poseen los residuos conservados de esta familia (Figura 2), incluidos los residuos de coordinación a metales (Ahn et al., 2004). Se caracterizan por poseer un centro metálico binuclear de Mn^{2+} ubicado en el sitio activo estabilizado mediante 6 residuos que son: His121, Asp143, His145, Asp147, Asp229 y Asp231; los que están estrictamente conservados en la familia (Ahn et al., 2004).

La agmatinasa mejor caracterizada cinéticamente es la agmatinasa de *E. coli* con una K_m para su sustrato agmatina de 1,1 mM (Carvajal et al., 2004), la K_i para sus inhibidores competitivos arginina, guanidina y putrescina son 9 mM, 15 mM y 2.8 mM, respectivamente (Carvajal et al., 2004), y su constante catalítica (k_{cat}) es de 140 s^{-1} (Carvajal et al., 1999).

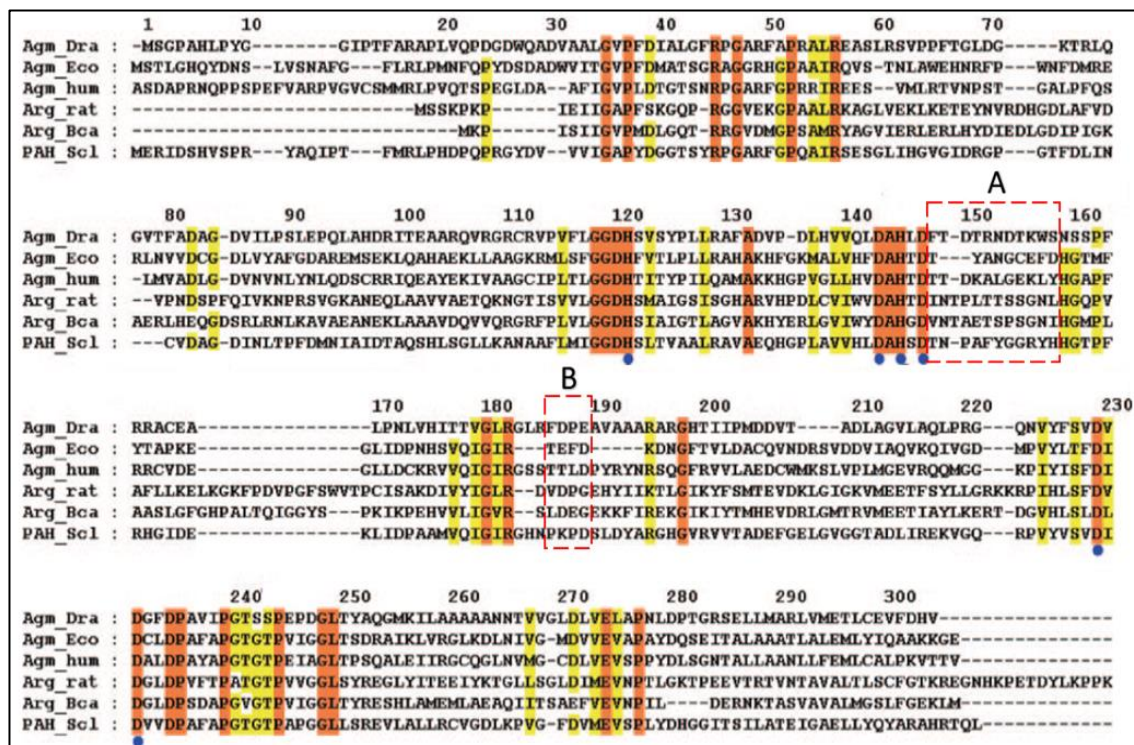


Figura 2: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la agmatinasa de Agm_Dra: *D. radiodurans* (SWISS-PROT: Q9RZ04), Agm_Eco: agmatinasa de *E. coli* (SWISS-PROT entry P60651), Agm_hum: agmatinasa de *H. sapiens* (SWISS-PROT: Q9BSE5), Arg_rat: arginasa de *R. rattus* (SWISS-PROT: P07824), Arg_Bca: arginasa de *B. caldovelox* (SWISS-PROT: P53608) y PAH_Scl: proclavaminato amidinohidrolasa de *S. clavuligerus* (SWISS-PROT: P37819). Los aminoácidos idénticos están destacados en naranja y los más conservados en amarillo. Los círculos azules bajo la secuencia indican los aminoácidos que coordinan los iones Mn²⁺. En línea punteada color rojo se destacan los lazos designados como A y B (Ahn et al., 2004).

Recientemente se ha reportado que la metformina, un fármaco ampliamente utilizado como hipoglicemiante es un inhibidor competitivo de la agmatinasa de *E.coli* con una constante de inhibición, K_i de 1 mM, afectando al catabolismo de la agmatina intestinal. Sin embargo, no afecta a otros homólogos de la familia de las ureohidrolasas ni a otras enzimas que utilicen

agmatina como sustrato. Con respecto a los análogos de metformina que son hipoglicemiantes más potentes: fenformina, buformina y galegina, resultaron mejores inhibidores de agmatinasa con una K_i de 0.6, 0.1, y 0.007 mM, respectivamente (Tassoulas & Wackett, 2024)

5.4 *Agmatinase like protein (ALP)*

ALP es una proteína compuesta de 523 aminoácidos, que posee una masa molar de 60 kDa, que se obtuvo a partir de una librería de ADNc de cerebro de rata, esta secuencia expresada en *E. coli* presentó actividad agmatinasa (Uribe et al., 2007). Aunque ALP no contiene los clásicos residuos catalíticos ni aquellos que interaccionan con el cofactor Mn^{2+} característicos de la familia de las ureohidrolasa, ALP es la única enzima de mamíferos con actividad agmatinasa caracterizada cinéticamente, con una K_m para agmatina de 3 ± 0.2 mM y una k_{cat} de $0.9 \pm 0.2 \text{ seg}^{-1}$. Una característica particular de la proteína ALP es la presencia de una secuencia denominada dominio LIM en el extremo carboxilo. Estos dominios, en general, participan en interacciones proteína-proteína (Fig 3). Actúan como un dominio autoinhibitorio de ALP, el cual se estabiliza por dos iones zinc, Zn^{2+} , formando estructuras similares a dedos de Zn^{2+} . Este dominio puede plegarse de forma independiente (Castro et al., 2011).

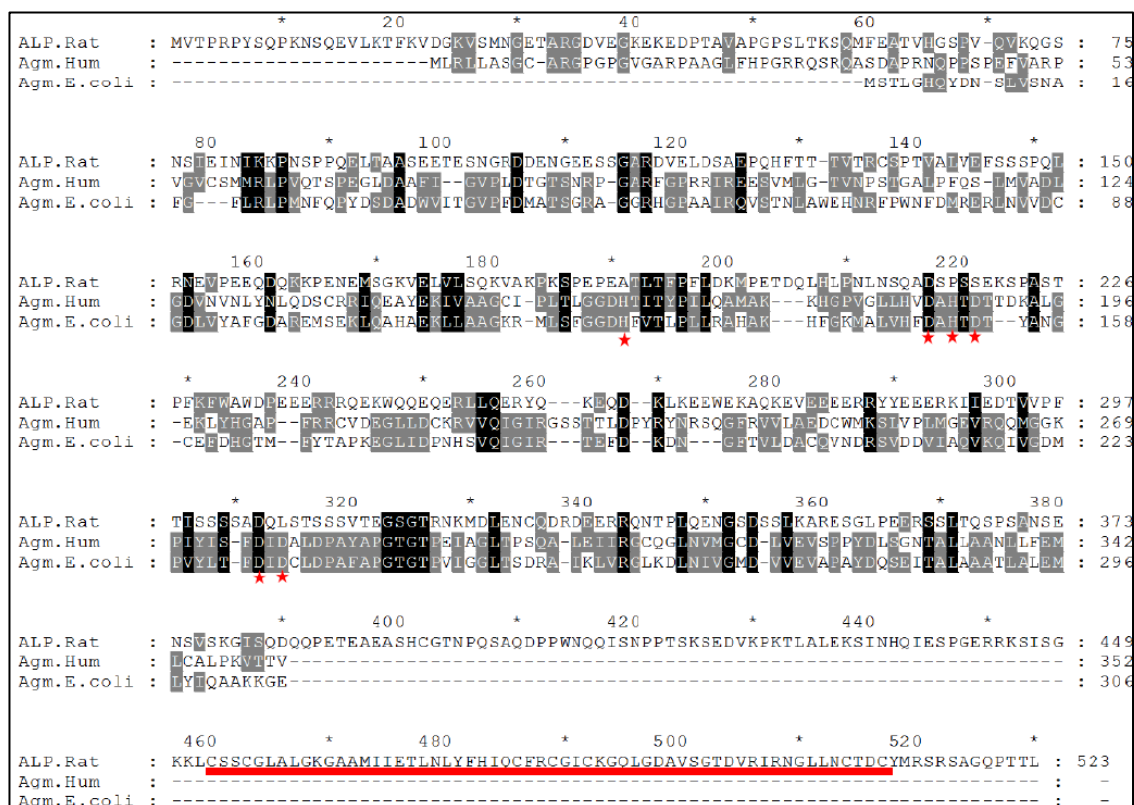


Figura 3: Alineamiento de secuencia aminoacídica de Agmatinase like protein (ALP.Rat), Agmatinasa humana (Agma.hum), Agmatinasa de *E.coli* (Agm.E.coli). Los residuos conservados críticos para la actividad catalítica y el ligando Mn^{2+} en las ureohidrolasas, se designan con una estrella roja. Los residuos que conforman el dominio LIM están subrayados.

Al realizar un análisis de la secuencia nucleotídica de ALP en las bases de datos Protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>), se identifican transcritos denominados LIMCH1 cuyo extremo 3' es idéntico a ALP. De estos, en el laboratorio se clonaron dos isoformas: la isoforma I de 3177pb y la isoforma II de 2709pb. Ambas fueron catalíticamente activas con agmatina (Fig 4), y sus parámetros cinéticos no mostraron diferencia significativas con respecto a ALP, por lo que el sitio activo se conserva en estas proteínas y las

regiones adicionales que se encuentran en LIMCH1 no participarían en la catálisis (García et al., 2016). Aún más, se logró expresar una secuencia de 210 aminoácidos denominado ALP-central que conserva la actividad agmatinasa (Fig 4).

Al realizar especies truncadas de la ALP sin el dominio LIM (Δ LIM-ALP) se consiguieron variantes con una k_{cat} aumentada 10 veces, una K_m para agmatina disminuida en 3 veces y una mayor afinidad por el producto putrescina (Tabla 2).

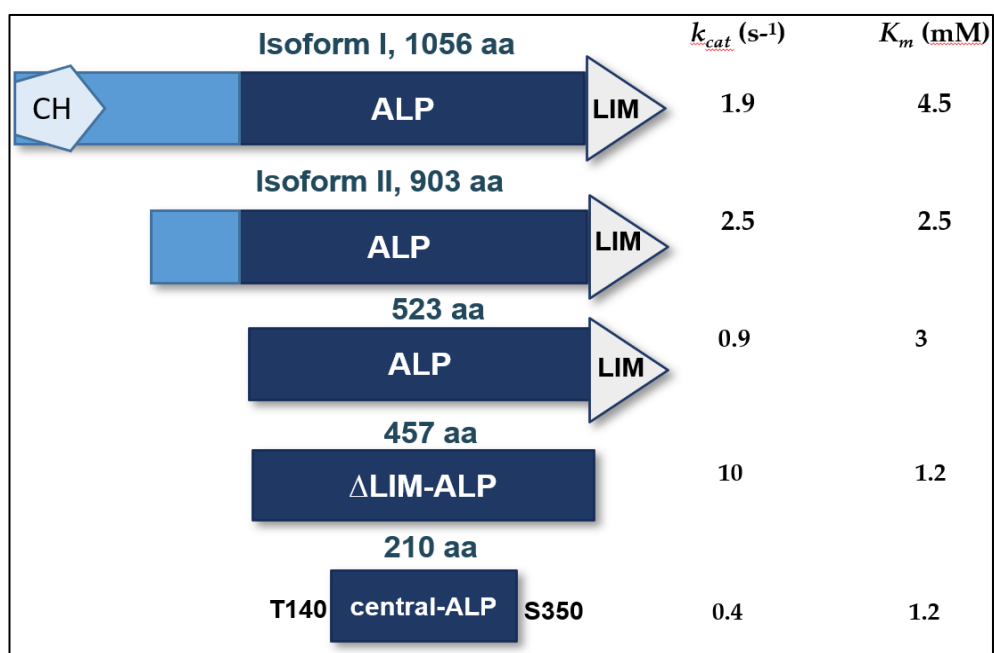


Figura 4: Esquema comparativo de ALP y las isoformas clonadas. Las regiones en azul claro y oscuro, también en el triángulo son idénticas. Se indica el valor de k_{cat} y K_m para agmatina.

Tabla II: Parámetros cinéticos de ALP silvestre y trunca en el dominio LIM (Castro et al., 2011).

Variante	K_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	K_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)	K_i (mM) (Putrescina)
Silvestre	0.9 ± 0.2	3.0 ± 0.2	300	5.0 ± 0.4
Trunca	10 ± 1	1.2 ± 0.5	9091	1.3 ± 0.2

5.5 ALP y el cofactor Mn^{2+}

Se ha demostrado que ALP contiene un Mn^{2+} por subunidad (Cofre et al., 2014), y al adicionar Mn^{2+} se hace más activa, por otro lado la incubación con EDTA provoca la inactivación total de la enzima (Uribe et al., 2007). Como primera aproximación para identificar los residuos que coordinan los iones metálicos, se realizaron mutaciones simples a los cinco residuos de histidinas presentes en ALP, donde solo la variante H206A mostró una reducción en la afinidad por Mn^{2+} de casi diez veces, por lo que se concluyó que His206 puede estar involucrada en la unión de los iones metálicos, además de indicar que al contrario de las ureohidrolasas silvestres los residuos de histidinas no son críticos en la actividad catalítica (Quiñones et al., 2015)

Considerando la identidad de secuencia de ALP con las secuencias de las estructuras de agmatinasas depositados en el Protein Data Bank, se seleccionaron las secuencias de *Deinococcus radiodurans* (1WOI), *Clostridium difficile* (3LHL), *Burkholderia thailandensis* (4DZ4), *Thermoplasma volcanium* (3PZL), *Pseudomonas aeruginosa* (3NIO) y *Streptomyces clavuligerus* (1GQ6) para realizar un modelamiento estructural y obtener una posible ubicación del sitio de unión a Mn^{2+} en ALP. Considerando este modelo,

se propone que los residuos que interaccionan con los iones metálicos son: E190, N213, Q215, D217, E288 y K290, reafirmando que las interacciones no incluyen residuos de aspartato ni histidina como en las enzimas de la familia de las ureohidrolasa (Fig 5). Por tanto, se realizó una mutante triple y una mutante doble, N213A/Q215A/D217A y E288A/K290A, respectivamente, para un análisis funcional de la unión del Mn^{2+} . Se encontró que ambas mutantes no presentaron actividad agmatinasa, apoyando que estos residuos son necesarios para la actividad ALP defendiendo el modelo propuesto (Reyes et al., 2020).

Tomando en consideración que en las mutantes triples y dobles realizadas no se obtuvo actividad catalítica, indicativo de la posible relevancia en la interacción con el Mn^{2+} . En este proyecto se propone esclarecer cuáles residuos de la mutante triple contribuyen a la coordinación con el ion Mn^{2+} . Por lo tanto, en esta tesis se propone responder la siguiente pregunta: ¿cuál es el rol de cada uno de los residuos de la mutante triple en la unión al ion Mn^{2+} y la actividad catalítica de ALP?

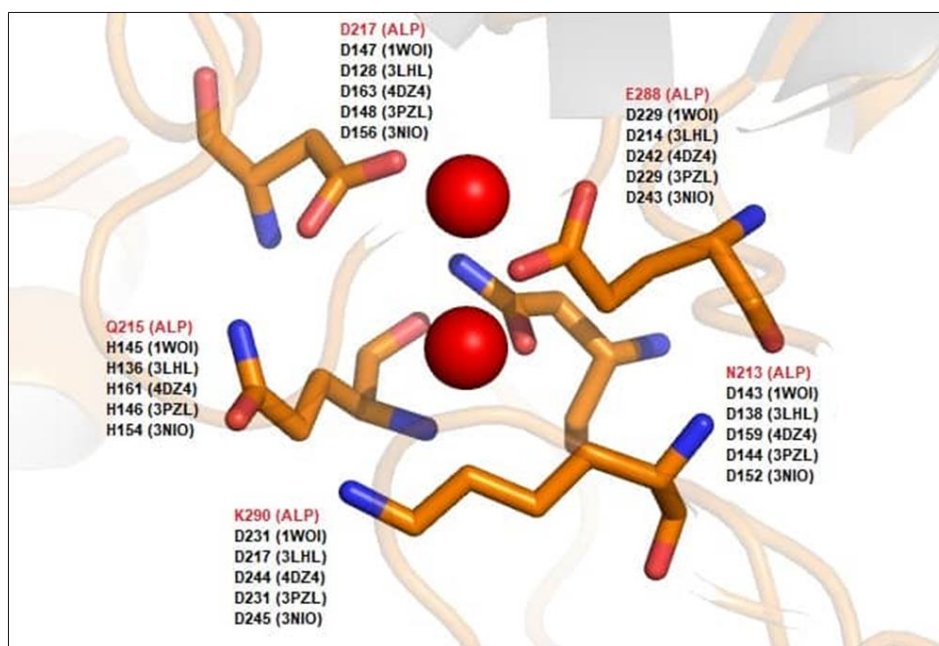


Figura 5: Modelo del sitio de unión de Mn²⁺ para ALP, a partir de *Deinococcus radiodurans* (1WOI), *Clostridium difficile* (3LHL), *Burkholderia thailandensis* (4DZ4), *Thermoplasma volcanium* (3PZL), *Pseudomonas aeruginosa* (3NIO) y *Streptomyces clavuligerus* (1GQ6)

6 HIPÓTESIS.

Los residuos N213, Q215 y D217 participan en la coordinación con el cofactor Mn^{2+} , y el reemplazo de cada uno por alanina disminuiría su actividad catalítica.

7 OBJETIVOS.

Evaluar la participación de los residuos N213, Q215 y D217 en la coordinación con el cofactor manganeso y la actividad de ALP.

8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- a) Generar las mutantes simples de los residuos N213, Q215 y D217 por alanina en Δ LIM-ALP.
- b) Caracterizar los parámetros cinéticos y la interacción con el cofactor Mn^{2+} en las mutantes simples generadas.

9 MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Vector

El plásmido H₆pQE60 de 3.1 kb (Fig 6), es el vector de expresión en procariontes que se utilizó para expresar en *E.coli* BL21(DE3) el gen de Δ LIM-ALP y para la realización de 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 6)

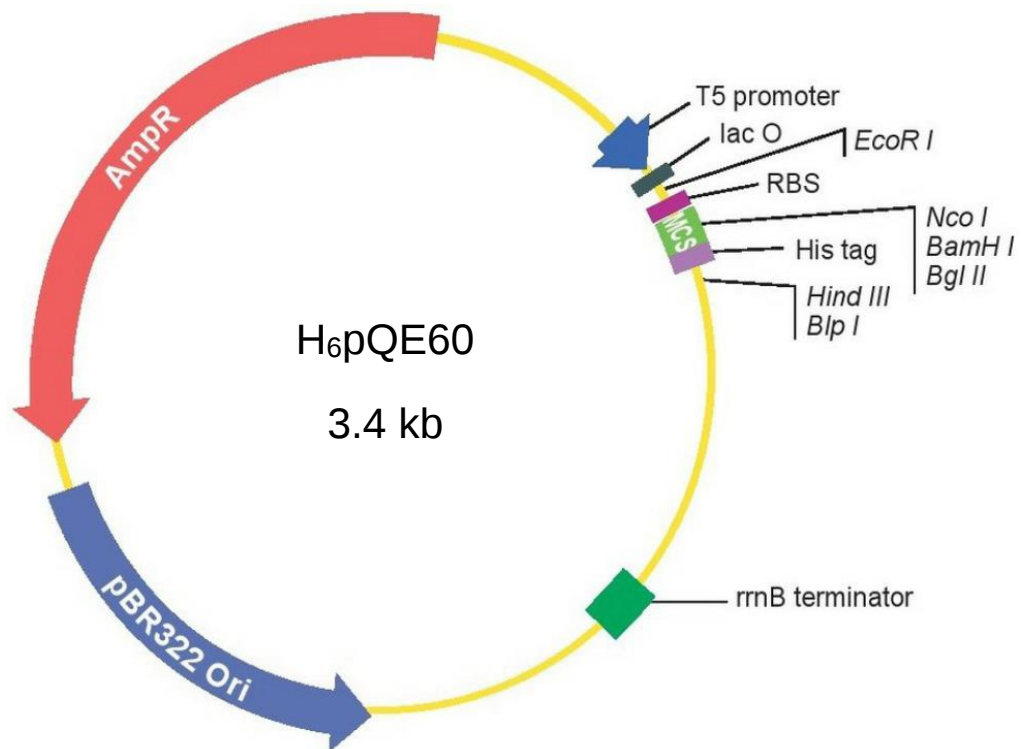


Figura 6: Vector H₆pQE60, utilizado para la expresión de Δ LIM-ALP y sus variantes mutadas.

9.2 Cepa bacteriana

La cepa *E.coli* BL21(DE3), cuyo genotipo es *fhuA2 [lon] ompT, gal(λDE3) [dcm] ΔhsdSλ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5*, fue utilizada para expresión del gen ΔLIM-ALP silvestre y las mutantes simples N213A, Q215A y D217A.

9.3 Medio de cultivo

Agar Luria Bertani: se preparó con 10 g/L de bactotripton, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl y 15 g/L de agar con posterior autoclavado.

Caldo Luria Bertani (LB): para un litro de medio se utilizó 10 g de bactotripton, 5g de extracto de levadura, 10 g de NaCl con posterior autoclavado.

Caldo Terrific Broth (TB): se preparó con 12 g/L bactotripton y 24 g/L de extracto de levadura el cual fue autoclavado, para posteriormente agregar 100 mL/L de una solución amortiguadora de fosfato monopotásico 0.17 M y fosfato dipotásico 0.72 M autoclavada.

A los medios se le adiciono ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL.

9.4 Oligonucleótidos

Del trabajo previo *in silico*, se mandaron a sintetizar los oligonucleótidos con la mutación de los residuos N213, Q215 y D217 por alanina (Tabla 3). Se sintetizaron los oligonucleótidos a través de Fermelo Biotec.

Tabla III: Secuencia de oligonucleótidos para mutantes simples de ALP.

Nombre	Secuencia
F-ALP-Tr N213A	5'- GACCAACTACATTTGCCAAATCTC GCC TCTCAAGCGGATTCCCCAAGC -3'
R-ALP-Tr N213A	5'- GCTTGGGGAATCCGCTTGAGAG GGC GAGATTTGGCAAATGTAGTTGGTC -3'
F-ALP-Tr Q215A	5'- CATTTGCCAAATCTCAATTCT GCG GCGGATTCCCCAAGCAGTGAG -3'
R-ALP-Tr Q215A	5'- CTCCTGCTTGGGGAATCCGCG CGC AGAATTGAGATTTGGCAAATG -3'
F-ALP-Tr D217A	5'- CCAAATCTCAATTCTCAAGCG GCG TCCCCAAGCAGTGAGAAGTCC -3'
R-ALP-Tr D217A	5'- GGACTTCTCACTGCTTGGGGA CGC CGCTTGAGAATTGAGATTTGG -3'

Para la verificación de la mutación se realizó la secuenciación de los plásmidos mutados utilizando el partidor de ALP-central, indicado en la Tabla 4.

Tabla IV: Secuencia del partidor utilizado en la detección de las mutaciones simples.

Nombre	Secuencia
F-ALP-central	5'-GCCCATGGGATGACCGTGGCCCTGGTGGAG -3

9.5 Reactivos químicos generales

Los reactivos químicos generales, soluciones tampones, sales y sustratos empleados para enzimas son de grado analítico y biología molecular del proveedor Merck.

9.6 Soluciones generales

TAE 10X: se adicionó 48.4 g de Tris, 11.4 mL de ácido acético glacial y 20 mL de EDTA 0.5 M ajustando a pH 8.0 y se completó a volumen de 1 L con agua destilada.

TBS-tween: NaCl 150 mM, Tris 10 mM y Tween 20 al 0,05% para un volumen de 1L que se completó con agua destilada.

Tampón de transferencia: Tris 25 mM, Glicina 192 mM, metanol 20% para un litro de solución.

Tampón de corrida 5X: para un litro de solución se le adicionó 15g de Tris, 72g de glicina y 5g de SDS, se completó el volumen con agua destilada.

Solución mezcla ácida: fue preparada con ácido ortofosfórico 23% y ácido sulfúrico 9% para un volumen de 1 L con agua destilada.

9.7 Obtención de las mutantes simples.

Las mutaciones simples se realizaron utilizando el kit Quick changell Site-Directed Mutagenesis kit y KOD Hot Start DNA Polymerase, utilizando como templado el vector H6-pQE60 que contiene la secuencia codificante para esta enzima silvestre y la KOD polimerasa para elongar el ADN con una alta fidelidad. De la reacción de PCR se realizó la digestión del ADN parental metilado con la enzima de restricción Dpn1 a 37°C por 1 hora.

Con el plásmido mutado se transformaron bacterias *E. coli* BL21(DE3) quimiocompetentes tratada con CaCl₂ que serán sometidas a un breve shock térmico 42°C por 2 minutos, luego se deja en la cubeta con hielo por 5 minutos.

Luego, las bacterias se cultivan a 37°C en medio LB líquido por 1 hora, se centrifugará a 5000 rpm por 5 minutos y el precipitado se sembrará en placa con agar medio LB y ampicilina (Amp) y se cultivará a 37°C por 14 horas. Una vez conseguidas las colonias se incubarán con agitación en medio LB/Amp líquido a 37°C por 14 horas.

A partir del cultivo bacteriano se purificará el plásmido con el protocolo del kit de soluciones PureDirex Plasmid mini PREP Kit, para enviar a secuenciación automática y verificar la presencia de la mutación y la ausencia de mutaciones no deseadas.

9.8 Secuenciación de plásmido

Los plásmidos de interés fueron enviados al servicio de secuenciación automática de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Luego, con el programa ChromasPro 2.1.10.1 además con el servidor web Clustal Omega fueron analizados los resultados de secuenciación (Reyes Cuevas, 2023).

9.9 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se realizó por espectrofotometría utilizando el equipo UV-Vis Spectrophotometer modelo Q5000 marca Quawell.

9.10 Ensayo de digestión enzimática.

Se usó un gel de agarosa a una concentración de 1% de agarosa disuelta en una solución TAE 1X, se adicionó el compuesto fluorescente SafeView Plus de Fermelo Biotec en una dilución 1:20000 (indicado por el fabricante). Las muestras fueron digeridas con las enzimas de restricción HindIII y NcoI de

Thermo Scientific que flanquean el inserto en el vector. El marcador de peso molecular que se usó fue GeneRuler 1kb DNA Ladder de Thermo Scientific. La electroforesis se realizó a un voltaje de 80V por 40 minutos, además, la detección del ADN en el gel fue a través de un transiluminador UV acoplado a un fotodocumentador.

9.11 Expresión de variantes Δ LIM-ALP mutadas.

Se indujo la expresión de la enzima mutada transformada en *E. coli* BL21(DE3) en el medio Terrific con ampicilina. Se cultivó a 37°C en un agitador orbital hasta una densidad óptica de 0.5 a 600 nm, y le adicionó el isopropil- α -tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5mM final para inducir la expresión de la enzima a 30°C.

9.12 Purificación parcial de las variantes Δ LIM-ALP mutadas.

Posteriormente el cultivo bacteriano se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos, se lavó con tampón Tris 10mM a pH 7.5 hasta obtener el pellet bacteriano que fue resuspendido en buffer de lisis que contiene Tris-HCl 100 mM pH 7.5; MnCl₂ 2 mM; putrescina 2 mM; PMSF 0.1 mM; DTT 5 mM y KCl 100 mM, lisando las bacterias por sonicación en ciclos de 15 segundos de sonicación cada 30 segundos de reposo, por 9 minutos totales de sonicación, a 85% de amplitud en el equipo Sonics modelo VCX130, luego de una segunda centrifugación a 12000 rpm por 15 minutos se obtuvo el extracto proteico que fue sometido a una cromatografía de intercambio aniónico donde utilizamos una columna de DEAE-celulosa previamente lavada y equilibrada con Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y KCl 150mM. Para la elución se utilizó una

concentración de KCl de 250 mM. Verificando su completa elución cuando la absorbancia a 280nm llegó a 0.0.

9.13 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 las siguientes soluciones 2 mM MnCl_2 , 20 mM agmatina pH 7.5 y 50 mM glicina pH 9.0 y 100 μL de enzima, 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 agregaron 100 μL de α -isonitrosopropiofenona al 3% en etanol y se calentó a 100°C por 1 hora. Se enfrió en oscuridad por ser una reacción fotosensible y se midió la absorbancia a 540 nm (Reyes et al., 2020).

9.14 Determinación de los parámetros cinéticos.

Para realizar la curva de saturación se utilizaron concentraciones de agmatina 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 y 15 mM con soluciones de 2 mM MnCl_2 , 50 mM glicina pH 9.0 y 100 μL de enzima para iniciar la reacción, se incubó a 37°C por 15 minutos, se detuvo la reacción con 1 mL de mezcla ácida y se añadió α -isonitrosopropiofenona al 3% en etanol y se calentó a 100°C por 1 hora. Enfriamos en oscuridad y medimos a 540 nm (Reyes et al., 2020).

9.15 Ensayo de hiperactivación

Muestras de enzima dializada por 2 horas contra Tris-HCl 5 mM pH 7.5 y no dializadas se incubaron a 60°C por 5 minutos, en presencia y ausencia

de Mn^{2+} También, se realizó la incubación a 60°C a distintos a tiempos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 minutos) en presencia de Mn^{2+} con muestras de enzima no dializada. Luego, se dejaron en hielo por 10 minutos para determinar la actividad agmatinasa por el método descrito anteriormente (Quiñones et al., 2015).

9.16 Ensayo con distintos metales.

A través del método antes escrito para la determinación de la actividad agmatinasa como cofactor se utilizaron distintos metales con concentración de 5 mM siendo $MnCl_2$, $CoCl_2$, $NiCl_2$, $MgCl_2$ y $CaCl_2$.

9.17 Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se determinó a través del método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

9.18 Electroforesis en condiciones desnaturalante

Para la separación de proteínas se realizaron geles de poliacrilamida-SDS al 12%, de los cuales uno fue teñido con azul de Coomasie y otro fue utilizado para la inmunodetección a través de Western blot. En esta técnica, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y luego se bloquearon con leche descremada al 5% p/v en TBS-Tween 1X. Posteriormente, la membrana se lavó cada 3 minutos durante 5 veces con TBS-Tween 1X. Luego, se incubó con el anticuerpo primario, que es un anticuerpo policlonal anti ALP, diluido a 1:2000 en TBS-Tween 1X, a 4°C con agitación constante durante 16 horas. Posteriormente, se realizaron lavados

seriados de 10 minutos por 4 veces y se incubó con el anticuerpo secundario de cabra IgG anti-conejo con dilución 1:10000 en TBS-Tween 1X con leche 0.5% p/v por una hora, siguiente a esto se lavó 5 veces con TBS-Tween 1X. Finalmente, se añadió el sustrato quimioluminiscente Westar Antare de Cyanagen en proporción de 1:1, siguiendo las recomendaciones del fabricante para su detección en el fotodocumentador ChemiScope 3000 modelo 3100 (Reyes et al., 2020).

9.19 Determinación de manganeso por fluorescencia de rayos X

Las muestras utilizadas fueron del pool recolectado de la columna de DEAE-celulosa con Tris HCl 10 mM a pH 7.5 y su diálisis por 2 horas contra Tris 5 mM a pH 7.5, se adicionó un estándar de Galio 0.5 mg/L en 150 µL de cada muestra, luego se tomaron 10 µL de las muestras que fueron depositados en el disco siliconizado y secadas utilizando una lampara de calor IR por 5 minutos para ser analizadas en el espectrómetro de fluorescencia de rayos X de reflexión total (TXRF) S4 TStar BRUKER.

9.20 Gráficas

Se realizaron análisis estadísticos y la representación de los resultados de manera grafica fueron mediante el software GraphPad Prism 8.

10 RESULTADOS

10.1 Obtención de enzimas mutantes

Se verificó la obtención de las mutantes simples N213A, Q215A y D217A en el vector H₆pQE60- Δ LIM-ALP, mediante secuenciación automática y se analizó utilizando los programas ChromasPro1.5 y el servidor Clustal Omega (Fig 7).

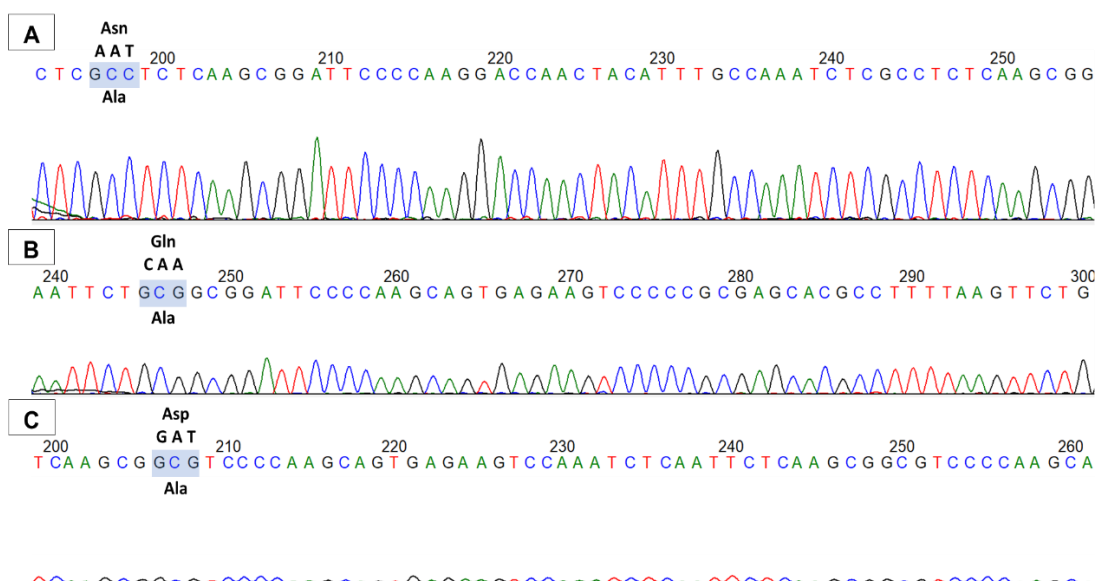


Figura 7: Identificación de las mutaciones en asparagina 213, glutamina 215 y aspartato 217 por alanina. Electroferograma de las mutaciones de los residuos A) asparragina 213 por alanina, B) glutamina 215 por alanina, y C) aspartato 217 por alanina.

Se realizó la liberación del inserto en los plásmidos mediante una digestión con las enzimas de restricción HindIII y NcoI mostrando 2 bandas de los tamaños que corresponde a H₆pQE60 de 3,4 kb y Δ LIM-ALP con las mutaciones respectivas de 1,4 kb (Fig 8).

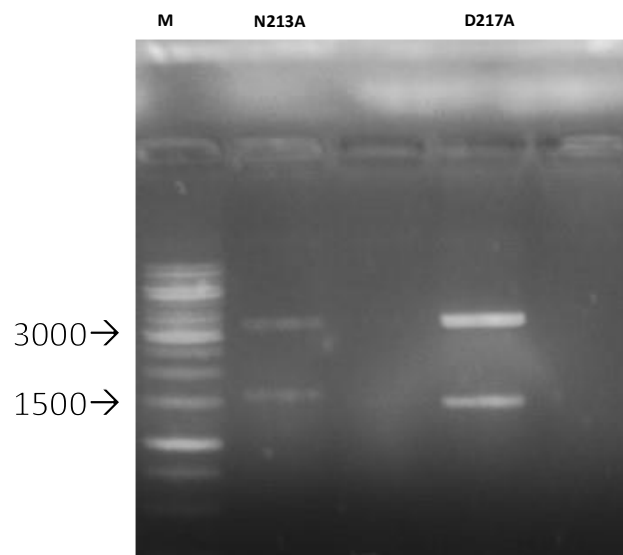


Figura 8: Análisis de restricción de las mutantes simples de Δ LIM-ALP en el vector H₆pQE60. A modo de ejemplo se muestra el vector digerido con las enzimas de restricción HindIII y NcoI de las mutantes N213A y D217A

10.2 Purificación parcial de Δ LIM-ALP y de las variantes mutadas

Luego de haber expresado las enzimas mutadas en *E.coli* BL21 (DE3), las mutantes simples N213A, Q215 y D217A, se purificaron parcialmente utilizando una cromatografía de intercambio aniónico de DEAE-celulosa, equilibrada con Tris 10 mM a pH 7,5. Se eluyó la enzima con 250 mM al mostrar el primer máximo de la actividad enzimática, del cual se realizó un pool con las fracciones de mayor actividad para los análisis posteriores (Fig 9).

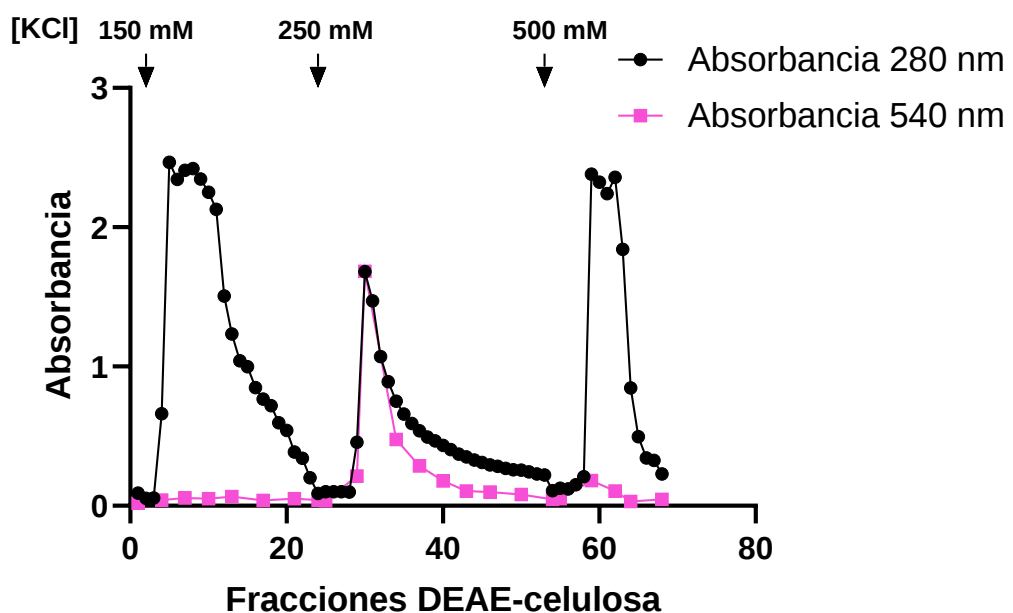


Figura 9: Cromatograma representativo de la muntante Q215A, a partir de la columna de intercambio aniónico DEAE-celulosa calibrada con Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. La absorbancia a la longitud de onda de 280 nm representa las proteínas totales (círculos negros) y la longitud de onda de 540 nm representa la actividad agmatinasa (cuadrados rosas). Las flechas indican la fracción donde comenzó la aplicación de las distintas concentraciones de KCl.

El pool de fracciones con actividad agmatinasa eluída de la columna DEAE-celulosa, se analizó en un SDS-PAGE al 12% y las variantes fueron identificadas mediante Western blot con un anticuerpo anti-ALP (Fig 10).

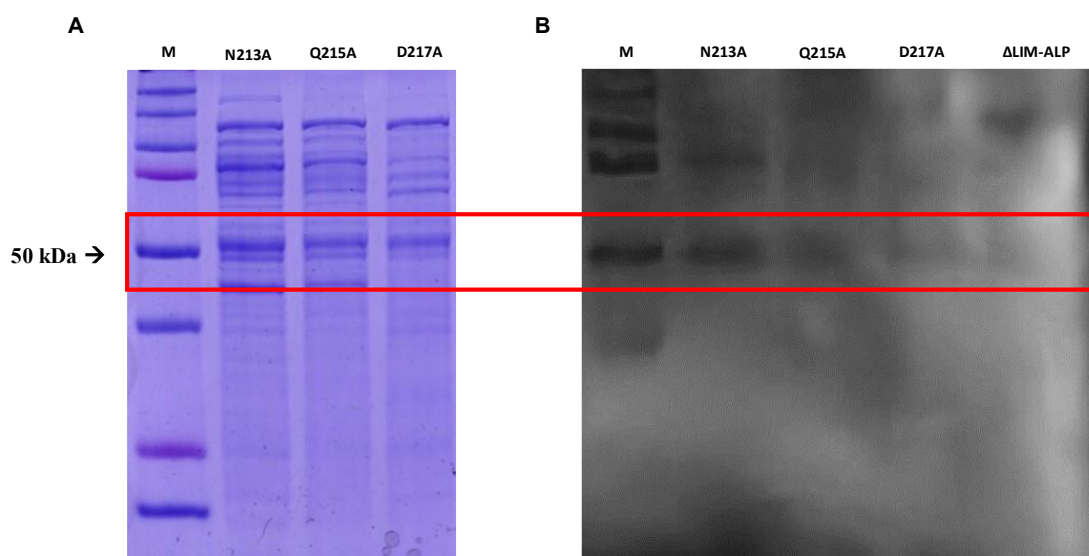


Figura 10: Identificación de las variantes Δ LIM-ALP, N213A, Q215A y D217A por SDS-PAGE e inmunodetección. Gel de poliacrilamida al 12% A) Las proteínas están teñidas con azul de Coomasie. B) Western Blot incubada con anticuerpo anti-ALP en la dilución 1:2000. M indica el marcador de peso. No se normalizó la concentración de proteínas en cada carril.

10.3 Determinación de la actividad específica de las variantes mutadas.

Para determinar la concentración de proteína de cada variante, se realizó el método de Bradford utilizando BSA para la curva de calibración.

Como se indica la tabla 5, se normalizó la actividad enzimática con 75 μg de proteínas totales. La variante N213A presentó la menor actividad específica que corresponde a un 42% del control.

Tabla V: Concentración de proteínas y actividad específica.

	m (μg) /100uL	Abs_{540nm}	Actividad específica (Abs_{540nm}/15min/75μg prot)
N213A	78,00	0,302	0,290
Q215A	98,00	0,638	0,488
D217A	84,00	0,702	0,627
$\Delta\text{LIM-ALP}$	75,00	1,290	1,293

10.4 Obtención de los parámetros cinéticos para las variantes mutadas.

Las variantes N213A, Q215 y D217A presentaron curvas de saturación hiperbólicas para su sustrato agmatina (GraphPad Prism 8) (Fig. 11). Las variantes mutadas presentaron valores de K_m menores con respecto a la enzima control $\Delta\text{LIM-ALP}$, como se aprecia en la Tabla 6. La K_m de la enzima silvestre es del orden de 1 mM, y en las tres variantes la K_m fue alrededor de 0,3 mM, evidenciando una disminución de 3 veces. Por otro lado, respecto de las $V_{\text{máx}}$ normalizadas por la concentración de proteínas totales, las 3 variantes presentaron una menor $V_{\text{máx}}$ que la enzima silvestre. La variante D217A presenta un 36% de la $V_{\text{máx}}$ de la enzima silvestre, la Q215A presenta un 28% y la N213A presenta solo un 12% indicando una catálisis menos eficiente a pesar de la disminución de la K_m .

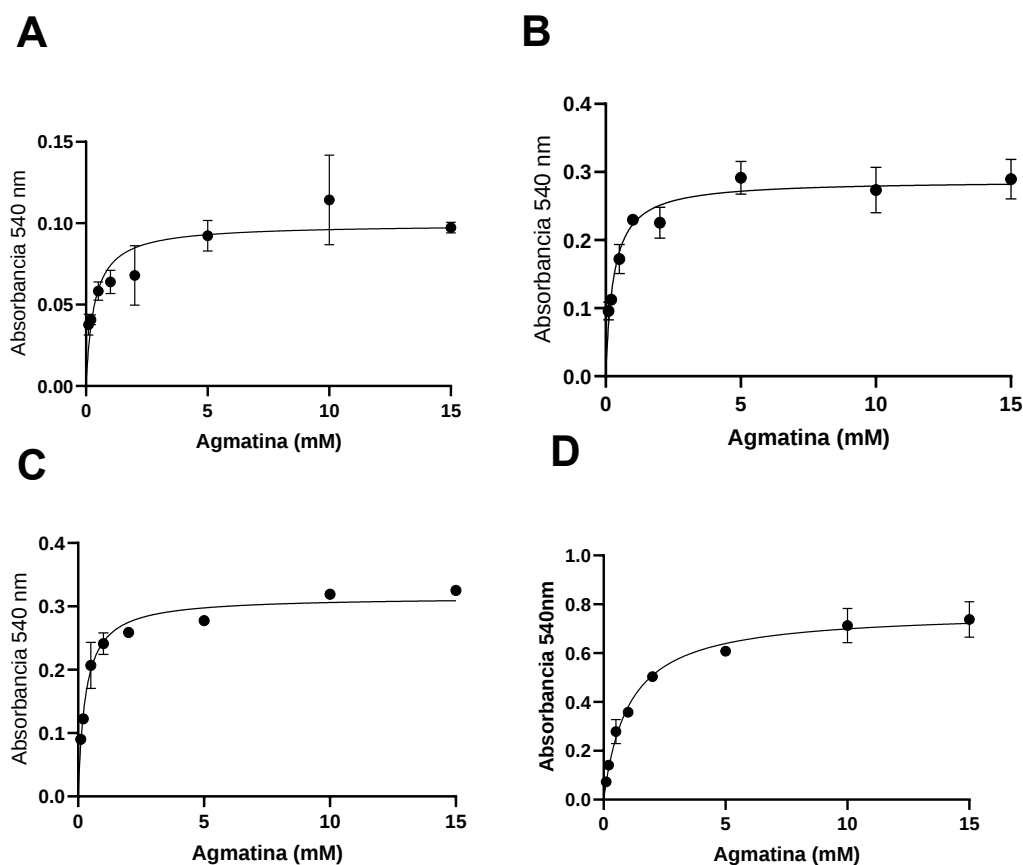


Figura 11: Curva de saturación para las enzimas mutantes y silvestre. Las concentraciones finales de agmatina fueron 0.1 mM, 0.2 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM y 15 mM para A) N213A, B) Q215A, C) D217A y D) Δ LIM-ALP. Se utilizó el programa GraphPad Prism 8, y se utilizaron ajustes no lineales.

Tabla VI: Parámetros cinéticos de las variantes mutadas.

	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (Abs _{540nm} /15min/75ug prot)
N213A	0,34 $\pm$ 0,09	0,19 $\pm$ 0,01
Q215A	0,29 $\pm$ 0,04	0,44 $\pm$ 0,01
D217A	0,29 $\pm$ 0,03	0,56 $\pm$ 0,01
ΔLIM-ALP	1,04 $\pm$ 0,10	1,55 $\pm$ 0,04

10.5 Análisis de la interacción enzima-metal en las variantes de Δ LIM-ALP.

Con el pool de fracciones eluídas de la cromatografía, lo primero que se realizó fue medir la actividad agmatinasa con y sin el metal activador Mn^{2+} como se resume en la Fig. 12, barras claras. La actividad de todas las variantes incremento entre un 30-50% con Mn^{2+} y no se encontraron diferencias importantes con la enzima silvestre. En el siguiente experimento se dializaron las muestras durante 2 horas contra Tris-HCl 5 mM, pH 7,5, y se midió actividad con y sin Mn^{2+} , en todos los casos la enzima pierde actividad con la diálisis y no es recuperada al adicionar Mn^{2+} en el ensayo de actividad, comportamiento equivalente a la enzima silvestre. A continuación, se realizó un proceso denominado hiperactivación, descrito para las ureohidrolasas especialmente para las arginasas y que también se replica en ALP a pesar de la baja identidad de secuencia con la familia ureohidrolasas (Uribe et al., 2020). El proceso consiste en someter a la enzima a un calentamiento a 60°C en presencia y ausencia de Mn^{2+} por 5 minutos, se enfría la muestra y se mide la actividad agmatinasa. En presencia de Mn^{2+} se generó un aumento significativo de la actividad ureohidrolasa, esto se ha asociado a un cambio conformacional que optimiza la interacción enzima- Mn^{2+} . Interesantemente, la enzima silvestre aumento pobremente (alrededor de un 15%) al comparar con la enzima sin calentar medida en presencia de Mn^{2+} . Sin embargo, las tres variantes mutadas aumentaron al doble su actividad enzimática. También se hiperactivaron las muestras dializadas y se recuperaron buena parte de la actividad enzimática, comportamiento equivalente en la enzima silvestre.

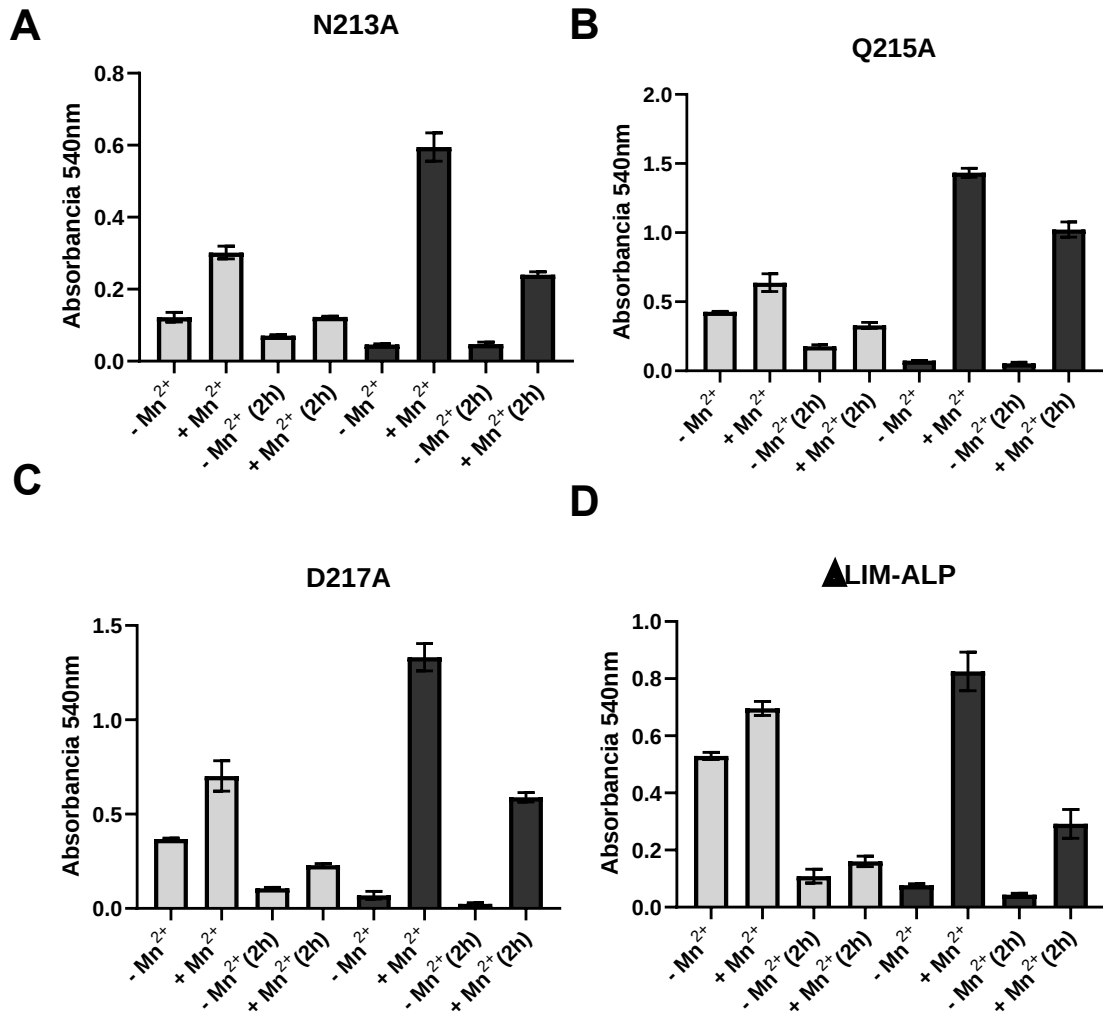


Figura 12: Efecto de Mn²⁺, diálisis e hiperactivación sobre la actividad de las enzimas mutantes y silvestre. Las barras claras corresponden a las enzimas no hiperactivadas, medidas con y sin Mn²⁺ antes y después de dializar. Las barras oscuras indican la actividad de las enzimas hiperactivas con y sin Mn²⁺ antes y después de la diálisis por 2 horas contra Tris-HCl 5 mM pH 7,5. En las variantes A) N213A, B) Q215A, C) D217A y D) ΔLIM-ALP.

También, se analizó el proceso de hiperactivación a través del tiempo y se encontró un aumento de la actividad enzimática a mayor tiempo de incubación con Mn^{2+} a $60^{\circ}C$, el comportamiento fue similar entre las variantes mutadas y la enzima silvestre. Aunque, ΔLIM -ALP con respecto a las variantes tuvo una menor activación (Fig. 13).

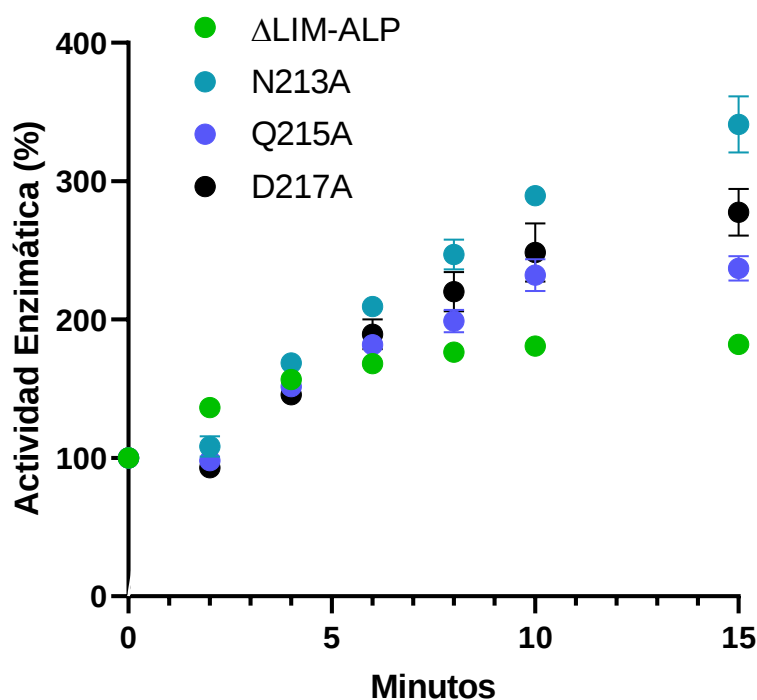


Figura 13: Hiperactivación en el tiempo de ΔLIM -ALP y las variantes mutadas. Las muestras calentadas a $60^{\circ}C$ en presencia de Mn^{2+} a distintos tiempos, ΔLIM -ALP (verde), N213A (celeste), Q215A (azul) y D217A (negro), donde la actividad enzimática es representada en porcentaje. El punto que indica el 100% es la actividad de la enzima sin calentar a $60^{\circ}C$.

10.6 Determinación del contenido de manganeso en las variantes mutadas.

Se cuantificó el contenido de metales en las muestras eluídas de la columna DEAE-celulosa mediante espectrometría de fluorescencia de rayos X. Se cuantificó antes y después de una diálisis de 2 horas contra Tris-HCl 5 mM, pH 7,5 en dos de las variantes mutadas y la enzima silvestre (Fig 14). La variante Q215A, mostró una mayor variación disminuyendo a la mitad la concentración de Mn^{2+} . La variante D217A y la enzima silvestre no variaron sustantivamente su contenido de Mn^{2+} antes y después de la diálisis (Tabla 7).

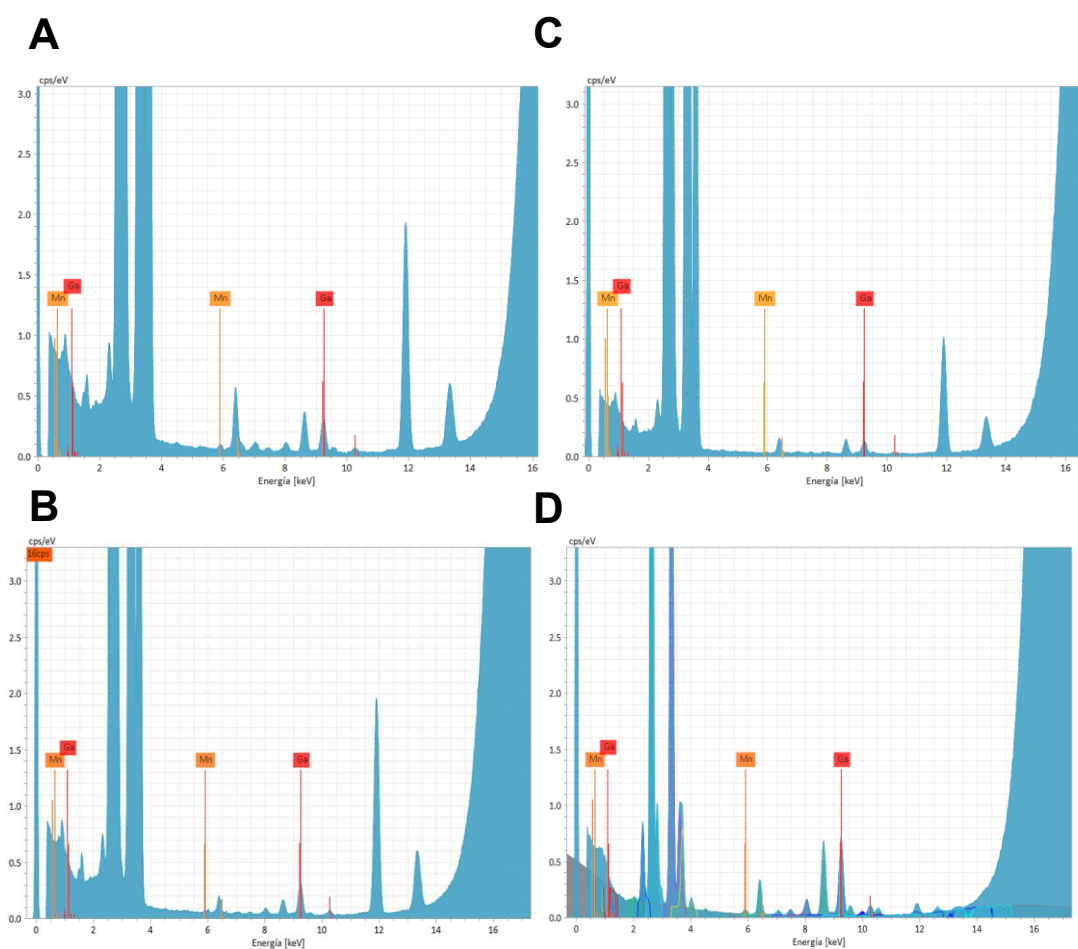


Figura 14: Contenido de Mn^{2+} determinado a través de fluorescencia de rayos X de reflexión total en las variantes de $\Delta\text{LIM-ALP}$. A) Q215A y B) D217A, muestras no dializadas y C) Q215A y D) D217A muestras dializadas por 2 horas contra Tris-HCl 5 mM pH 7,5 corresponde.

Tabla VII: Concentración de Mn^{2+} de las variantes de $\Delta\text{LIM-ALP}$.

	Mn^{2+} (mg/L)	Mn^{2+} (mg/L) dializada 2 h
Q215A	$0,18 \pm 0,10$	$0,09 \pm 0,02$
D217A	$0,10 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,00$
$\Delta\text{LIM-ALP}$	$0,09 \pm 0,05$	$0,12 \pm 0,01$

10.7 Efecto de distintos metales sobre la actividad de las variantes de Δ LIM-ALP.

Se determinó la actividad agmatinasa de las distintas variantes eluidas de la columna DEAE con distintos metales, se utilizaron: Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} y Ca^{2+} . El comportamiento en las variantes mutadas y la enzima silvestre fue muy similar, la mayor actividad por supuesto resultó con Mn^{2+} , mientras el Co^{2+} y el Ni^{2+} inhibieron su actividad (especialmente Ni^{2+}), Mg^{2+} y Ca^{2+} no afectaron prácticamente la actividad, obteniendo actividades equivalentes a las del control (Fig.15) con distintos metales en las variantes de Δ LIM-ALP.

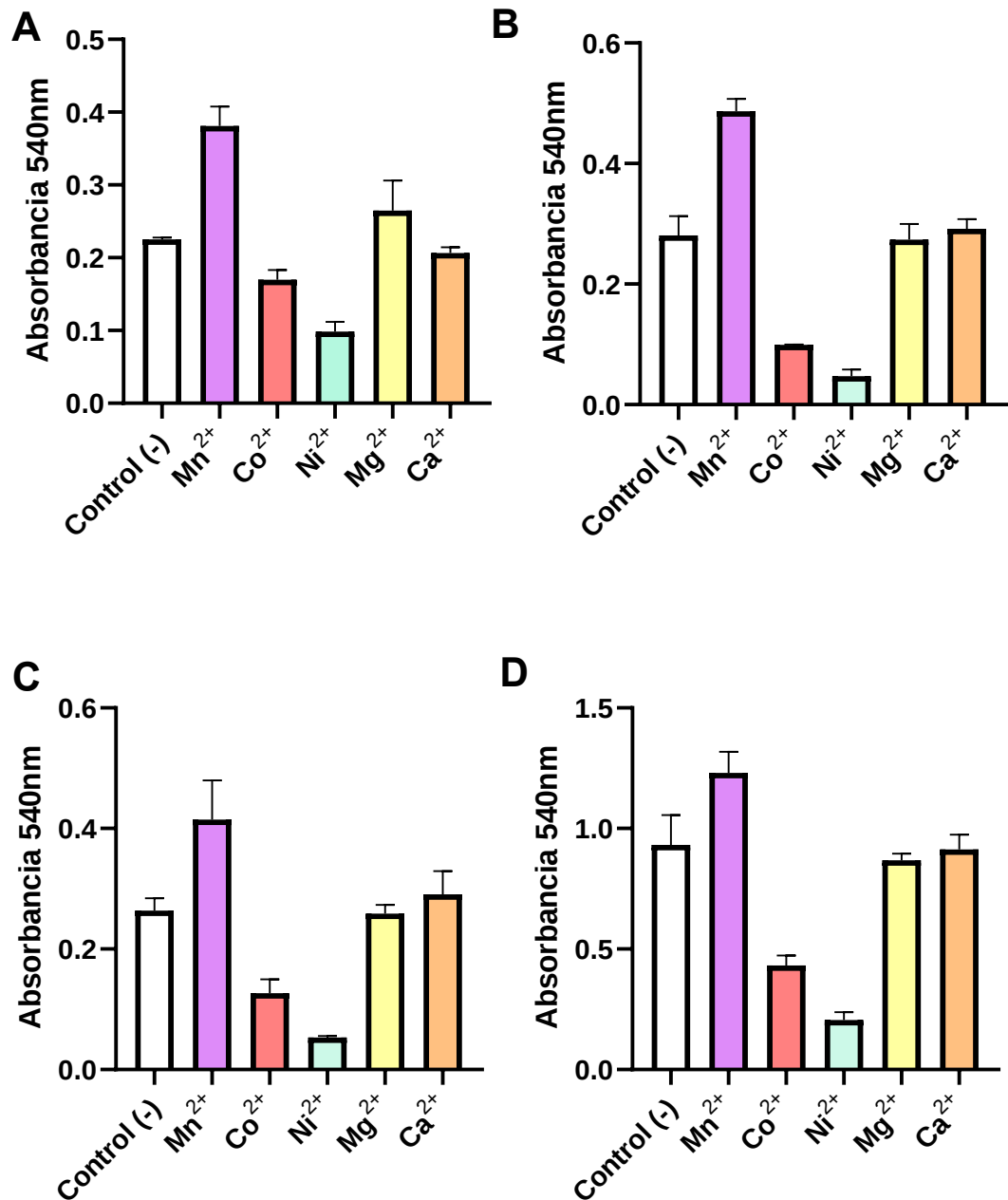


Figura 15: Efecto de distintos metales en la actividad de las variantes de Δ LIM-ALP. El control negativo indica la actividad agmatinasa sin metal adicionado, los metales utilizados a una concentración de 5 mM son Mn²⁺(morado), Co²⁺ (rojo), Ni²⁺ (celeste), Mg²⁺ (amarillo) y Ca²⁺ (naranja) en las variantes A) N213A, B) Q215A, C) D217A y D) Δ LIM-ALP.

11 DISCUSIÓN

Para la familia ureo-hidrolasa, es conocido el requerimiento de iones metálicos especialmente Mn^{2+} para su actividad catalítica. También se conocen con exactitud los residuos que coordinan el cofactor Mn^{2+} , 4 aspartatos y 2 histidinas que son altamente conservados en la familia, y que de hecho son parte de la marca de familia de estas proteínas (Ahn et al., 2004). Los residuos coordinan dos iones Mn^{2+} , el Mn^{2+} A que se uniría a la enzima con una baja afinidad y que es removible por un tratamiento de diálisis y el Mn^{2+} B que está fuertemente unido (Fig 16A). Para las agmatinasas de procariontes cuya estructura y secuencia es conocida, los residuos que coordinan Mn^{2+} son los mismos (Uribe et al., 2020). También sucede con la agmatinasa humana, enzima sobre la que recientemente se ha cuestionado su actividad hidrolítica sobre agmatina, sugiriendo que podría actuar sobre otros sustratos guanidínicos (Sinn et al., 2022). Un caso particular es la agmatinasa de ratón que posee solo 4 de los 6 residuos altamente conservados, pero en esta enzima no se ha podido demostrar fehacientemente su actividad agmatinasa (Romero et al., 2017).

La función de los iones Mn^{2+} en la catálisis de las ureohidrolasas, consiste en coordinar la molécula de agua favoreciendo la generación del ion hidroxilo que realiza el ataque nucleofílico al carbono guanidino de la agmatina, generando la hidrólisis de agmatina y produciendo urea y putrescina, por lo tanto es esencial para la actividad de la enzima (Fig 16B) (Maturana et al., 2021)

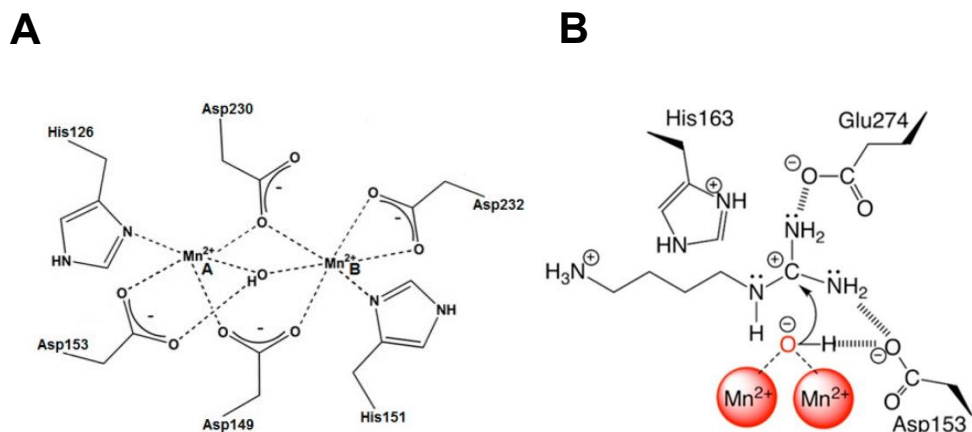


Figura 16: Sitio de unión a Mn²⁺ **A)** Ligandos de coordinación para Mn²⁺ en la agmatinasa de *E. coli* (Uribe et al., 2020). **B)** Función de los iones Mn²⁺ en la catálisis de las agmatinasas (Maturana et al., 2021)

El metabolismo de la agmatina en mamíferos es objeto de controversia. No se ha demostrado de manera fehaciente la existencia ni la expresión activa de la arginina descarboxilasa, la enzima que genera agmatina a partir de arginina (Laube & Bernstein, 2017). Por otro lado la denominada agmatinasa humana aparentemente no es capaz de hidrolizar agmatina (Sinn et al., 2022). Y entre estos hallazgos, el grupo de investigación del laboratorio de Enzimología de la Universidad de Concepción, ha publicado varios artículos reportando la actividad agmatinasa de ALP y de Δ LIM-ALP, una enzima cuya secuencia no pertenece a la familia ureohidrolasa, pero que al igual que estas enzimas requiere del cofactor Mn²⁺ para su actividad agmatinasa, es inhibida por EDTA, incluso sufre el proceso de hiperactivación que hasta ahora solo se había descrito para algunas ureohidrolasas (Uribe et al., 2020), donde la actividad de la enzima aumenta significativamente producto del calentamiento a 60°C de la enzima en presencia de Mn²⁺. Debido a la falta de información

estructural sobre ALP, en el laboratorio se generó un modelo estructural donde se propusieron 5 potenciales ligandos que coordinarían el cofactor Mn^{2+} , se realizó una mutante doble y una mutante triple de estos ligandos y se obtuvieron variantes sin actividad agmatinasa. En esta tesis se analizaron las mutantes independientes de la mutante triple. En las tres mutantes, los residuos aminoacídicos se reemplazaron por alanina y la generación de cada mutación se realizó por PCR y se corroboró su presencia y la ausencia de mutaciones no deseadas mediante secuenciación automática. Se logró la expresión y la purificación parcial de cada mutante mediante una cromatografía de DEAE-celulosa, y a partir de estas muestras se realizaron los análisis cinéticos y de interacción enzima metal activador.

Análisis de los parámetros cinéticos:

De los análisis cinéticos, obtuvimos un resultado inesperado, la disminución en la K_m en todas las variantes mutadas, reduciéndose en un 30% respecto a la K_m de la enzima silvestre. Si la mutación hubiese generado un aumento de la K_m , podría ser un indicador de que alguno de los residuos participa en la interacción con el sustrato. Sin embargo, una disminución en la K_m nos indica que producto de la mutación la interacción enzima sustrato se optimizó. Hasta este punto, no podemos afirmar que el residuo mutado participe directamente en la interacción directa con el sustrato, o si el efecto está mediado por un cambio conformacional, solo podemos decir que las mutaciones tuvieron una consecuencia en el sitio activo de la enzima. Acompañando la disminución en la K_m , al analizar las $V_{m\acute{a}x}$ obtenidas

(normalizadas por la concentración de proteína), se encontró una disminución significativa en las variantes mutadas (disminuyeron a un 30%-12% del control), lo que indica que las 3 mutaciones alteraron negativamente el proceso catalítico. Por lo tanto, las variantes mutadas a pesar de su disminución en la K_m no son más eficientes que la enzima silvestre, debido a que también disminuye su $V_{m\acute{a}x}$. Dado que no hay información estructural disponible sobre Δ LIM-ALP y el modelo generado se realizó con una baja identidad de secuencia aminoacídica entre Δ LIM-ALP y las estructuras utilizadas como plantados, podemos concluir que, a pesar de ello, las mutaciones tuvieron consecuencias que afectaron el sitio activo de la enzima, lo cual es relevante.

Análisis de la interacción enzima metal activador:

Para abordar este aspecto se realizaron diversos experimentos, en resumen, las tres variantes y la enzima silvestre presentaron actividad sin Mn^{2+} y su actividad aumentó al adicionar Mn^{2+} en el ensayo. Sabemos que el Mn^{2+} es esencial para la actividad de ALP, por lo tanto, la enzima eluida de la columna tendría Mn^{2+} , lo que también se corroboró mediante determinaciones del contenido de Mn^{2+} en las muestras. El aumento de actividad al adicionar Mn^{2+} indicaría la posible unión de un segundo metal activador. Todas las variantes disminuyeron su actividad en los experimentos de diálisis y recuperaron solo parte de su actividad al medir con Mn^{2+} , en las muestras dializadas prácticamente no se altera el contenido de Mn^{2+} , sin embargo, pierden actividad. Todas las variantes se hiperactivaron en presencia de Mn^{2+}

y la diálisis solo afecta parcialmente la actividad de las muestras hiperactivadas.

Finalmente, al utilizar distintos metales, solo Mn^{2+} efectivamente activó a todas las variantes y a la enzima silvestre, mostrando más especificidad por el metal activador que otras ureohidrolasas como arginasa que también es activada por Co^{2+} y Ni^{2+} (Daumann et al., 2013; Saragadam et al., 2019). Considerando que no hubo diferencias entre las variantes y la enzima silvestre en todos los resultados donde analizamos la interacción de Mn^{2+} , y que las variantes tienen el mismo contenido de Mn^{2+} que la enzima silvestre, descartamos que estos residuos coordinen el metal activador Mn^{2+} .

12 CONCLUSIONES

- Los residuos N213, Q215 y D217 se encuentran en la vecindad del sitio activo de Δ LIM-ALP, puesto que una mutación simple bastó para alterar sus propiedades cinéticas de K_m y $V_{m\acute{a}x}$.
- Los residuos mencionados no participan directamente como ligandos coordinantes del metal activador Mn^{2+} , puesto que en cada mutante simple no se alteró el contenido de metal ni las propiedades funcionales del complejo enzima-metal activador.

13 BIBLIOGRAFÍA.

- Ahn, H. J., Kim, K. H., Lee, J., Ha, J.-Y., Lee, H. H., Kim, D., Yoon, H.-J., Kwon, A.-R., & Suh, S. W. (2004). Crystal structure of agmatinase reveals structural conservation and inhibition mechanism of the ureohydrolase superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 50505-50513.
- Archibald, R. M., Ortiz, P., Stroh, E., & Beonnbe, J. (1945). Colorimetric determination of urea. *Journal of Biological Chemistry*, 157, 507-518.
- Atlas, D., & Burstein, Y. (1984a). Isolation and partial purification of a clonidine - displacing endogenous brain substance. *European journal of biochemistry*, 144(2), 287-293.
- Atlas, D., & Burstein, Y. (1984b). Isolation of an endogenous clonidine-displacing substance from rat brain. *FEBS letters*, 170(2), 387-390.
- Bilge, S. S., Günaydin, C., Önger, M. E., Bozkurt, A., & Avcı, B. (2020). Neuroprotective action of agmatine in rotenone-induced model of Parkinson's disease: Role of BDNF/cREB and ERK pathway. *Behavioural Brain Research*, 392, 112692.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Carvajal, N., López, V., Salas, M., Uribe, E., Herrera, P., & Cerpa, J. (1999). Manganese is essential for catalytic activity of *Escherichia coli* agmatinase. *Biochemical and biophysical research communications*, 258(3), 808-811.
- Carvajal, N., Orellana, M. a. S., Salas, M., Enríquez, P., Alarcón, R., Uribe, E., & López, 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. *Archives of biochemistry and biophysics*, 430(2), 185-190.
- 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.
- Chang, C.-H., Wu, H.-T., Cheng, K.-C., Lin, H.-J., & Cheng, J.-T. (2010). Increase of β -endorphin secretion by agmatine is induced by activation of imidazoline I2A receptors in adrenal gland of rats. *Neuroscience letters*, 468(3), 297-299.
- 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.
- Daumann, L. J., McCarthy, B. Y., Hadler, K. S., Murray, T. P., Gahan, L. R., Larrabee, J. A., Ollis, D. L., & Schenk, G. (2013). Promiscuity comes at a price: catalytic versatility vs efficiency in different metal ion derivatives of the potential bioremediator GpdQ. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1834(1), 425-432.
- Fikry, H., Saleh, L. A., Mohammed, O. A., Doghish, A., Elsakka, E., Alghamdi, M., Alfaifi, J., Alamri, M. M. S., Adam, M. I., & Atti, M. A. (2024). Agmatine

- Mitigates Histological and Biochemical Alterations in the Salivary Glands of a Rat Model with Type 2 Diabetes Mellitus. *Available at SSRN 4728361*.
- García, D., Ordenes, P., Benítez, J., González, A., García-Robles, M. A., López, V., Carvajal, N., & Uribe, E. (2016). Cloning of two LIMCH1 isoforms: characterization of their distribution in rat brain and their agmatinase activity. *Histochemistry and cell biology*, 145, 305-313.
- Gilad, G. M., Salame, K., Rabey, J. M., & Gilad, V. H. (1995). Agmatine treatment is neuroprotective in rodent brain injury models. *Life sciences*, 58(2), PL41-PL46.
- Gilad, G. M., Wollam, Y., Iaina, A., Rabey, J., Chernihovsky, T., & Gilad, V. (1996). Metabolism of agmatine into urea but not into nitric oxide in rat brain. *NeuroReport*, 7(11), 1730-1732.
- Hassanshahi, A., Soti, M., Ranjbar, H., Razavinasab, M., Pirmoradi, Z., Kohlmeier, K. A., Janahmadi, M., & Shabani, M. (2023). Perspectives on agmatine neurotransmission in acute and chronic stress-related conditions. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*.
- Hwang, S.-L., Liu, I.-M., Tzeng, T.-F., & Cheng, J.-T. (2005). Activation of imidazoline receptors in adrenal gland to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*, 48, 767-775.
- Kale, M., Nimje, N., Aglawe, M. M., Umekar, M., Taksande, B., & Kotagale, N. (2020). Agmatine modulates anxiety and depression-like behaviour in diabetic insulin-resistant rats. *Brain research*, 1747, 147045.
- Katariya, R., Mishra, K., Sammeta, S., Umekar, M., Kotagale, N., & Taksande, B. (2024). Agmatine mitigates behavioral abnormalities and neurochemical dysregulation associated with 3-Nitropropionic acid-induced Huntington's disease in rats. *NeuroToxicology*.
- Laube, G., & Bernstein, H.-G. (2017). Agmatine: multifunctional arginine metabolite and magic bullet in clinical neuroscience? *Biochemical Journal*, 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.
- Maturana, P., Orellana, M. S., Herrera, S. M., Martínez, I., Figueroa, M., Martínez-Oyanedel, J., Castro-Fernandez, V., & Uribe, E. (2021). Crystal Structure of Escherichia coli Agmatinase: Catalytic Mechanism and Residues Relevant for Substrate Specificity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4769.
- Orellana, M.-S., Jaña, G. A., Figueroa, M., Martínez-Oyanedel, J., Medina, F. E., Tarifeño-Saldivia, E., Gatica, M., García-Robles, M. Á., Carvajal, N., & Uribe, E. (2022). New Insights into the Determinants of Specificity in Human Type I Arginase: Generation of a Mutant That Is Only Active with Agmatine as Substrate. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6438.
- Quiñones, M., Cofre, J., Benítez, J., García, D., Romero, N., González, A., Carvajal, N., García, M., López, V., & Schenk, G. (2015). Insight on the interaction of an agmatinase-like protein with Mn²⁺ activator ions. *Journal of inorganic biochemistry*, 145, 65-69.

- Raasch, W., Regunathan, S., Li, G., & Reis, D. (1995). Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues. *Life sciences*, 56(26), 2319-2330.
- Reis, D., & Regunathan, S. (1998). Agmatine: an endogenous ligand at imidazoline receptors may be a novel neurotransmitter in brain. *Journal of the autonomic nervous system*, 72(2-3), 80-85.
- Reis, D. J., Yang, X.-C., & Milner, T. A. (1998). Agmatine containing axon terminals in rat hippocampus form synapses on pyramidal cells. *Neuroscience letters*, 250(3), 185-188.
- Reyes Cuevas, M. B. (2023). Análisis de la región catalítica de agmatinase like protein (ALP).
- Reyes, M.-B., Martínez-Oyanedel, J., Navarrete, C., Mardones, E., Martínez, I., Salas, M., López, V., García-Robles, M., Tarifeño-Saldivia, E., & Figueroa, M. (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.
- Romero, N., Benítez, J., Garcia, D., González, A., Bennun, L., García-Robles, M. A., López, V., Wilson, L. A., Schenk, G., & Carvajal, N. (2017). Mammalian agmatinases constitute unusual members in the family of Mn²⁺-dependent ureahydrolases. *Journal of inorganic biochemistry*, 166, 122-125.
- Saragadam, T., Kumar, S., & Punekar, N. S. (2019). Characterization of 4-guanidinobutyrase from *Aspergillus niger*. *Microbiology*, 165(4), 396-410.
- Satishchandran, C., & Boyle, S. M. (1986). Purification and properties of agmatine ureohydrolyase, a putrescine biosynthetic enzyme in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 165(3), 843-848.
- 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.
- Song, J., Hur, B. E., Bokara, K. K., Yang, W., Cho, H. J., Park, K. A., Lee, W. T., Lee, K. M., & Lee, J. E. (2014). Agmatine improves cognitive dysfunction and prevents cell death in a streptozotocin-induced Alzheimer rat model. *Yonsei medical journal*, 55(3), 689-699.
- Tabor, C. W., & Tabor, H. (1984). Polyamines. *Annual review of biochemistry*, 53(1), 749-790.
- Tassoulas, L. J., & Wackett, L. P. (2024). Insights into the action of the pharmaceutical metformin: Targeted inhibition of the gut microbial enzyme agmatinase. *Isience*, 27(2).
- Uribe, E., Reyes, M.-B., Martínez, I., Mella, K., Salas, M., Tarifeño-Saldivia, E., López, V., García-Robles, M., Martínez-Oyanedel, J., & Figueroa, M. (2020). Functional analysis of the Mn²⁺ requirement in the catalysis of ureohydrolases arginase and agmatinase-a historical perspective. *Journal of inorganic biochemistry*, 202, 110812.
- 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.
- Xu, W., Gao, L., Li, T., Shao, A., & Zhang, J. (2018). Neuroprotective role of agmatine in neurological diseases. *Current neuropharmacology*, 16(9), 1296-1305.

