



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



Análisis del rol de los residuos E190, Q339 y N340 en la interacción con Mn^{2+} en la *Agmatinase Like Protein* (ALP)

Seminario de Título presentado a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Para optar al título de Biólogo

Fernando Benjamín Retamal Messer

25 de junio, 2025



Este Seminario de Título ha sido desarrollado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.



Prof. Guía

Dra. Elena Amparo Uribe Pérez

Prof. Evaluadores

Dra. Marcell Alejandra Gatica Miranda

Dr. Alejandro Andrés Vallejos Almirall

Prof. Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Javier Hernández Santander

25 de junio, 2025

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis está dedicada a la memoria de mi abuelo Franklin Gabriel Messer Mercado (1946 - 2024), tu legado y tradiciones viven en nuestro quehacer del día a día, desde siempre, gracias por las risas y los consejos.

Mis agradecimientos a mis padres y mi pareja, por ser una parte importante del proceso, por estar cuando más los necesité y por no dejar que me rindiera cuando las cosas se pusieron difíciles, este logro también es de ustedes.

Al proyecto FONDECYT N°1230549 de la Dra. Amparo Uribe Pérez, por facilitar los recursos para el desarrollo de esta tesis.

A los miembros del laboratorio de Enzimología que me ayudaron durante el desarrollo de los experimentos y de esta tesis, mención honrosa para Juan Pablo, Diego, Belén y Antonia.

A mis profesores de ciencias Daniela Cisterna Jara, Claudia Arratia Rivera (ed. básica y media) y Diego Fernández Valdivieso (talentos UdeC), por cultivar y alentar mi llama científica, este logro también va dedicado a ustedes.

Al laboratorio de bioquímica y biología molecular de la Universidad de Chile, por aportar en gran medida a mi formación científica y profesional, gracias por las risas.

A mis compañeros de carrera por acogerme desde el primer día, los gratos momentos compartidos y por mostrarme una perspectiva diferente de la vida, los llevaré en mi corazón por siempre.

A Raiza Sánchez, gracias por ser más que una compañera de carrera, una persona generosa y sensata, gracias por ser mi amiga y compañera de ruta, ojalá la ciencia vuelva a juntarnos en algún punto.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	4
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	14
Agmatina y sus funciones en mamíferos	14
Agmatinasa	15
Agmatinase Like Protein (ALP)	18
Dominio LIM	20
Isoformas de ALP	21
Sitio de unión al cofactor Mn²⁺	23
OBJETIVOS	27
Objetivo general:	27
Objetivos específicos:	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Materiales	28
Reactivos químicos generales	28
Soluciones generales	28
Vector	29
Oligonucleótidos	30
Cepas bacterianas	31
Medios de cultivo	31

Métodos	32
Mutagénesis sitio dirigida de mutantes simples	32
Ensayo de digestión enzimática	33
Ensayo de restricción	33
Electroforesis de ADN en geles de agarosa	33
Transformación de bacterias quimiocompetentes	33
Secuenciación de plásmidos	34
Expresión recombinante de las mutantes simples	35
Purificación parcial de las mutantes simples	35
Cuantificación de actividad agmatinasa	36
Cuantificación de proteína	37
Determinación de parámetros cinéticos de las mutantes simples	37
Ensayo de hiperactivación	37
Ensayo de interacción con distintos metales	38
Efecto presencia/ausencia de Mn²⁺, diálisis e hiperactivación	38
Electroforesis de proteína en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	39
Inmunodetección (Western Blot)	39
Anticuerpos	40
Análisis de datos	40
RESULTADOS	41
Generación y obtención de ALP- mutantes	41
Determinación de parámetros cinéticos	48
Efecto de Mn²⁺, diálisis e hiperactivación a 60°C en las variantes mutadas	51
Ensayos de activación en el tiempo de las variantes mutadas	53

Actividad de las variantes mutadas con diferentes metales divalentes	53
DISCUSIÓN	55
Parámetros cinéticos de la variantes	56
Efecto del cofactor Mn²⁺	57
BIBLIOGRAFIA	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta metabólica de la agmatina	14
Figura 2. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de enzimas de la superfamilia metaloureohidrolasa.....	16
Figura 3. Modelo esquemático del sitio de unión a Mn^{2+} de arginasa de hígado de rata y la agmatinasa de <i>E. coli</i>	17
Figura 4. Modelo esquemático de la hidrólisis de agmatina catalizada por la agmatinasa de <i>E. coli</i>	18
Figura 5. Primera localización de ALP.....	19
Figura 6. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de enzimas de la superfamilia metaloureohidrolasa y ALP.	20
Figura 7. Modelo esquemático del dominio LIM de ALP	21
Figura 8. Esquema comparativo entre ALP e isoformas.	23
Figura 9. Modelo esquemático del sitio de unión a Mn^{2+} propuesto para ALP.	24
Figura 10. Modelo esquemático de los residuos E190, Q339 y N340.	26
Figura 11. Modelo esquemático del vector utilizado para transformación de bacterias quimiocompetentes.....	30
Figura 12. Gel de agarosa al 3% del vector H6pQE-60- Δ LIM-ALP (variantes mutadas), digerido con las enzimas de restricción Nco1 y EcoR1.....	41
Figura 13. Placa de LB agar con colonias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con el vector H6pQE-60 mutado para N340A.....	42
Figura 14. Alineamiento de secuencias de las mutantes con Δ LIM-ALP silvestre.	43
Figura 15. Perfil cromatográfico de las mutantes simples y Δ LIM-ALP	46
Figura 16. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10%.	47
Figura 17. Identificación de mutantes simples por Western blot.....	48
Figura 18. Curvas de saturación para las enzimas mutantes simples y Δ LIM-ALP.	49
Figura 19. Tubos de reacción correspondientes a la curva de saturación de la mutante Q339A	50

Figura 20. Efecto presencia/ausencia de Mn^{2+} , diálisis e hiperactivación a $60^{\circ}C$ en las variantes mutadas y $\Delta LIM-ALP$	52
Figura 21. Efecto de hiperactivación en el tiempo de las mutantes simples y $\Delta LIM-ALP$	53
Figura 22. Interacción de las variantes mutadas y $\Delta LIM-ALP$ frente a diferentes metales.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros cinéticos para algunas enzimas de la superfamilia metaloureohidrolasa.....	22
Tabla 2. Diseño de partidores para la generación de mutantes simples de Δ LIM-ALP.	31
Tabla 3. Secuencias de partidores utilizados para secuenciar las mutaciones simples de Δ LIM-ALP.....	35
Tabla 4. Parámetros cinéticos de las mutantes simples y Δ LIM-ALP.	50

RESUMEN

La agmatina es una amina primaria presente en diversos organismos, es metabolizada por las enzimas agmatinasa y/o *agmatinase like protein* (ALP) generando urea y putrescina. En mamíferos, la agmatina, regula diversos procesos fisiológicos, además de tener un potencial uso para el tratamiento de enfermedades a la salud mental. La enzima ALP fue descubierta en tejido cerebral de ratas, esta enzima conserva las características propias de la familia de las metaloureohidrolasas, especialmente la dependencia del cofactor metálico Mn^{2+} para su actividad catalítica. ALP presenta una región proteica en el extremo carboxilo denominada dominio-LIM, que tiene un efecto auto inhibitorio de la actividad agmatinasa de ALP, la variante trunca en este dominio (Δ LIM-ALP) es mucho más activa y estable, y con esta isoforma se realizaron los estudios de esta tesis. En cuanto a su secuencia aminoacídica, ALP resultó ser diferente de las demás agmatinasas y no presenta los residuos que coordinan con el cofactor Mn^{2+} altamente conservados en las metalo-ureohidrolasas. Dada la ausencia de información estructural, se construyó un modelo molecular de ALP utilizando como referencia agmatinasas procariotas cuya estructura ha sido resuelta. Pese a la baja identidad de la secuencia, este modelo permitió proponer residuos putativos involucrados en la coordinación de los iones Mn^{2+} en ALP. En estudios anteriores utilizando la isoforma Δ LIM-ALP, se generó una mutante doble (E288A/K290A) y una mutante triple (N213A/Q215A/D217A), donde se reemplazaron los residuos por alanina. Se encontró que estas variantes no presentaron actividad agmatinasa, lo que indica que dichos residuos son necesarios para la actividad catalítica de ALP. A continuación, se generaron 4 mutantes simples de estos residuos reemplazándolos por alanina (N213A, Q215A, D217A, K290A y E288A) y se encontró que cada mutación puntual altera las propiedades cinéticas de Δ LIM-ALP disminuyendo su K_m y su $V_{m\acute{a}x}$ en todas las variantes, pero no se altera la interacción enzima- Mn^{2+} . En vista de lo anterior, en este proyecto se evaluó la importancia en la actividad catalítica y la coordinación metálica de 3 residuos que se encuentran en la proximidad de los residuos analizados según el modelo

estructural, estos son E190, Q339, N340. Se realizaron mutantes simples de cada residuo, reemplazándolos por alanina, luego se expresaron y purificaron parcialmente por cromatografía de intercambio aniónico, se realizaron experimentos cinéticos para determinar los parámetros cinéticos y la interacción enzima metal. Al revisar las secuencias de las mutantes, se encontró una inserción no deseada antes de la mutación N340A. Las tres variantes resultaron activas y sus parámetros cinéticos (K_m y $V_{m\acute{a}x}$) sufrieron variaciones respecto al control Δ LIM-ALP, K_m aumentó y $V_{m\acute{a}x}$ disminuyó a la mitad en la variante que además tiene la inserción. Para analizar la interacción enzima- Mn^{2+} , se realizaron experimentos de activación enzimática, diálisis, hiperactivación 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 dado que las mutaciones no alteraron la interacción enzima- Mn^{2+} concluimos que estos residuos no participan como ligandos coordinantes del metal activador Mn^{2+} .

ABSTRACT

Agmatine is a primary amine present in various organisms; it is metabolized by the enzymes agmatinase and/or agmatinase-like protein (ALP), generating urea and putrescine. In mammals, agmatine regulates various physiological processes and has potential uses in the treatment of mental health conditions. The ALP enzyme was discovered in rat brain tissue. It retains the characteristics of the metalloureohydrolase family, especially its dependence on the metal cofactor Mn^{2+} for its catalytic activity. ALP has a protein region at the carboxyl end called the LIM domain, which autoinhibits the agmatinase activity of ALP. The truncated variant in this domain (Δ LIM-ALP) is much more active and stable, and this isoform was used for the studies in this thesis. Regarding its amino acid sequence, ALP was found to be distinct from other agmatinases and lacks the highly conserved Mn^{2+} cofactor-coordinating residues found in metalloureohydrolases. Given the lack of structural information, a molecular model of ALP was constructed using structurally solved prokaryotic agmatinases as a reference. Despite the low sequence identity, this model allowed us to propose putative residues involved in the coordination of Mn^{2+} ions in ALP. In previous studies using the Δ LIM-ALP isoform, a double mutant (E288A/K290A) and a triple mutant (N213A/Q215A/D217A) were generated, in which the residues were replaced by alanine. These variants were found to be inactive, indicating that these residues are required for the catalytic activity of ALP. Next, 4 single mutants of these residues were generated by replacing them with alanine (N213A, Q215A, D217A, K290A and E288A) and it was found that each point mutation alters the kinetic properties of Δ LIM-ALP by decreasing its K_m and V_{max} in all variants, but the enzyme- Mn^{2+} interaction is not altered. In view of the above, in this project the importance in the catalytic activity and the metal coordination of 3 residues that are in the proximity of the residues analyzed according to the structural model was evaluated, these are E190, Q339, N340. Single mutants of each residue were made, replacing them with alanine, then they were expressed and partially purified by anion exchange chromatography, kinetic experiments were performed to determine the kinetic parameters and the enzyme

metal interaction. When reviewing the mutant sequences, an unwanted insertion was found before the N340A mutation. The three variants were active and their kinetic parameters (K_m and V_{max}) varied with respect to the Δ LIM-ALP control, K_m increased and V_{max} decreased by half in the variant that also had the insertion. To analyze the enzyme-Mn²⁺ interaction, enzyme activation, dialysis, hyperactivation, and metal activation specificity experiments were performed. In all the results, the three single mutants showed no differences with the wild-type enzyme. We conclude that the three single mutations affected the active site of the enzyme since they altered its kinetic parameters. Since the mutations did not alter the enzyme-Mn²⁺ interaction, we conclude that these residues do not participate as coordinating ligands for the activating metal Mn²⁺.

INTRODUCCIÓN

Agmatina y sus funciones en mamíferos

La agmatina (1-amino-4-guanidinobutano) es una amina primaria que se sintetiza a partir de la descarboxilación de la arginina por la enzima arginina descarboxilasa (ADC), y posteriormente, se hidroliza en urea y putrescina por las enzimas agmatinasa o ALP, por lo tanto, es un intermediario en la biosíntesis de poliaminas (espermina y la espermidina), principalmente en bacterias y plantas (Fig. 1).

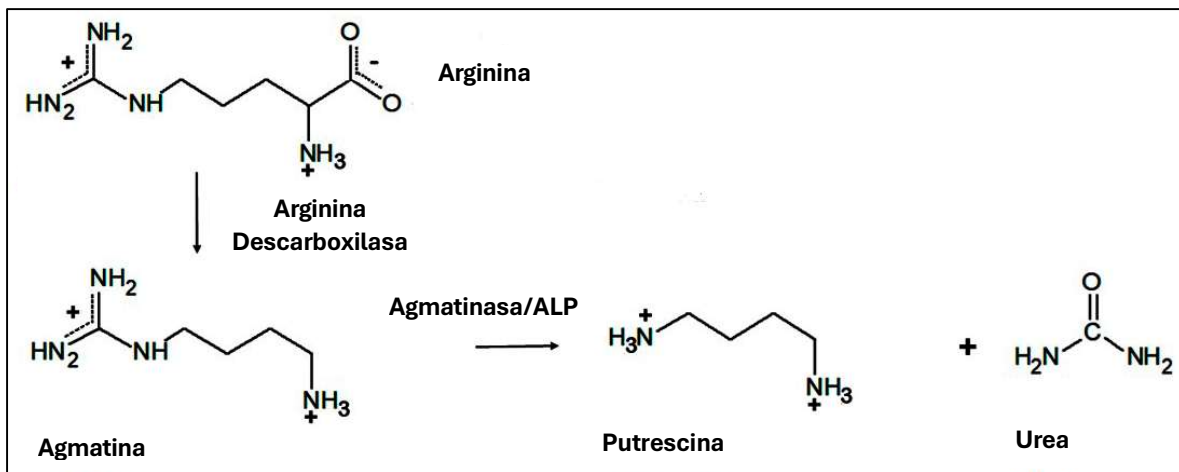


Figura 1. Ruta metabólica de la agmatina. Orellana *et al.*, 2022

En mamíferos, la agmatina se encuentra distribuida en diferentes tejidos, tales como el páncreas, riñones, estómago e intestino (Raasch *et al.*, 2001), donde desempeña diferentes funciones, como regular la excreción de sodio (en los riñones), modular la liberación de insulina (en el páncreas) o de catecolaminas (en las glándulas suprarrenales) (Uribe *et al.*, 2007). También, se sintetiza a nivel cerebral, distribuyéndose en algunas regiones del cerebro como el hipotálamo, encéfalo y regiones subcorticales (Reis & Regunathan, 2000). En dichas zonas cerebrales, se almacena en vesículas sinápticas (ingresan por captación y se liberan por despolarización) y desempeña propiedades neuroprotectoras contra la

apoptosis en células ganglionares de la retina (Hong *et al.*, 2012) y astrocitos privados de oxígeno y glucosa (Lee *et al.*, 2009). Dentro de otras funciones biológicas, cabe destacar, su capacidad inhibitoria frente a la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) (Gilad *et al.*, 1995), su papel como agonista endógeno en los receptores α 2-adrenérgico y de imidazolina (Atlas & Burstein, 1984; Li *et al.*, 1994)

Estudios recientes han señalado que la agmatina puede tener propiedades anticonvulsivas, anti neurotóxicas y antidepresivas en mamíferos (Quiñones *et al.*, 2015, Zamanian *et al.*, 2024), además, su administración en animales muestra efectos beneficiosos para trastornos de la salud mental como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, tolerancia a la morfina, abstinencia alcohólica (y otras drogas), entre otras (Reyes *et al.*, 2020), por lo que, el control de los niveles de agmatina a nivel fisiológico despierta el interés del desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de las enfermedades antes mencionadas.

Agmatinasa

La agmatinasa es una enzima que hidroliza la agmatina, generando urea y putrescina. Esta enzima pertenece a la familia de las de las metalo-ureohidrolasas (subgrupo de ureohidrolasas que requieren un cofactor metálico para su actividad catalítica en vez de una coenzima orgánica). Agmatinasa comparte similaridad en secuencia aminoacídica y estructura terciaria con varias enzimas de la familia como la arginasa, además de las marcas de familia propias del grupo, que corresponden a residuos críticos para la coordinación de iones metálicos (Mn^{2+}) en su sitio de unión y otros para el posicionamiento e hidrólisis del sustrato (Fig. 2). (Hyung *et al.*, 2004; Perozich *et al.*, 1998).

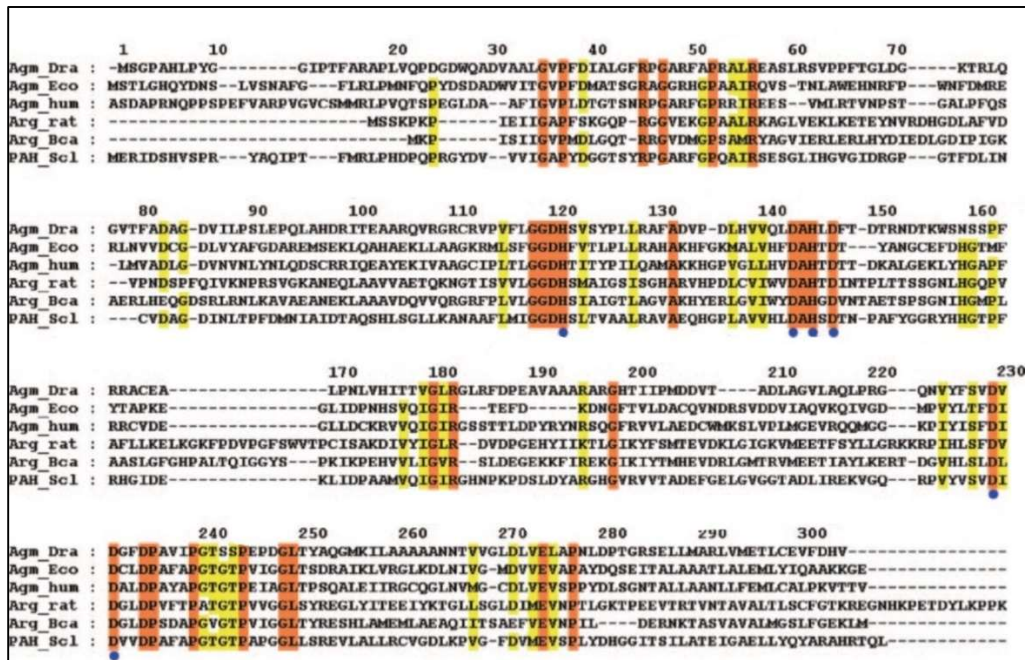


Figura 2. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de enzimas de la superfamilia metaloureohidrolasa. Agm_Dra: Agmatinasa de *Deinococcus radiodurans* (SWISS-PROT: Q9RZ04), Agm_Eco: Agmatinasa de *Escherichia coli* (SWISS-PROT: P60651), Agm_Hum: Agmatinasa de mitocondrias humanas (Homo sapiens sapiens) (SWISS-PROT: Q9BSE5), Arg_Rat: Arginasa de *Rattus rattus* (SWISS-PROT: P07824), Arg_Bca: Arginasa de *Bacillus caldovelox* (SWISS-PROT: P53608), PAH_Scl: Proclavamiento amidohidrolasa de *Streptomyces clavuligerus* (SWISS-PROT: P37819). Leyenda: En naranja se destacan los residuos estrictamente conservados, en amarillo se muestran los residuos semiconservados y en azul se muestran aquellos residuos que coordinan los iones de Mn²⁺. Ahn *et al.*, 2004.

En relación con el sitio de unión a metales en agmatinasa, estudios de estructuras cristalinas de agmatinasas de procariontes como *Deinococcus radiodurans*, *Clostridium difficile*, *Burkholderia thailandensis* y *Escherichia coli* (la mejor caracterizada) han revelado que la enzima alberga 2 iones de manganeso en su sitio de unión, en donde uno de ellos forma una unión fuerte y el otro una unión débil (Uribe *et al.*, 2019) (Fig. 3). Esta región se conforma de histidinas y aspartatos y juega un rol fundamental en su función catalítica (Scolnick *et al.*, 1997). Los iones

de Mn^{2+} , por un lado, disminuyen el pK_a de los grupos funcionales aledaños (de $pK_a \sim 8$ a $pK_a \sim 6$), permitiendo las interacciones polares de los aminoácidos con agmatina. Por otro lado, los iones de Mn^{2+} también disminuyen el pK_a del agua, resultando en la formación de un hidroxilo unido al metal, el cual, participa en el ataque nucleofílico de la hidrólisis del grupo guanidino, generando de esta manera, urea y putrescina, los que abandonan el sitio activo eventualmente (Fig. 4).

En relación con sus parámetros cinéticos, la agmatinasa de *E. coli*, presenta una K_{cat} de $140 \pm 8 \text{ seg}^{-1}$, una K_m de $1.5 \pm 0.2 \text{ Mm}$ y tiene un peso de 80 kDa (el dímero) (Sathishchandran & Boylet, 1986).

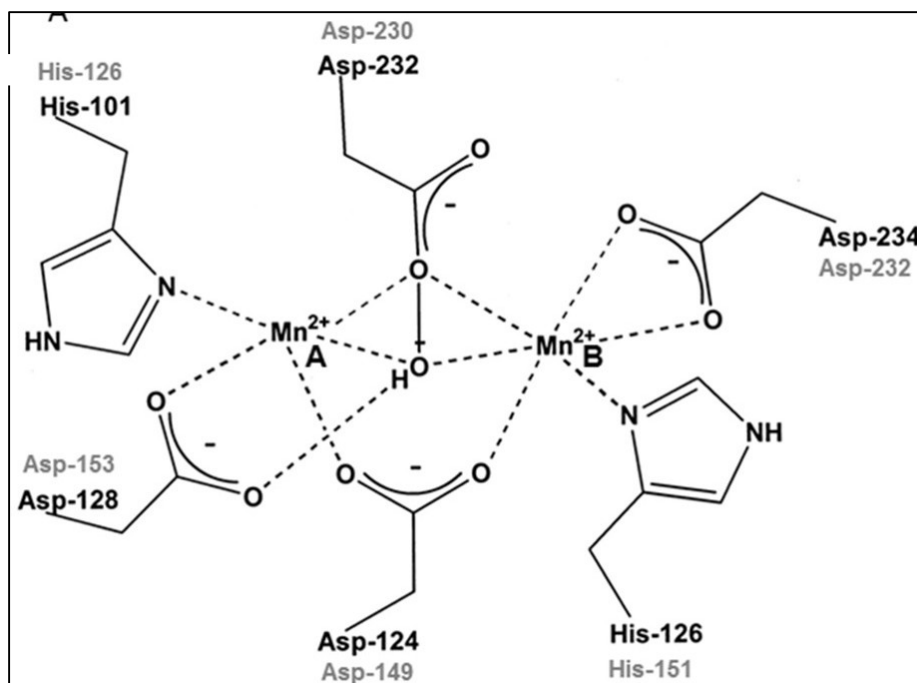


Figura 3. Modelo esquemático del sitio de unión a Mn^{2+} de arginasa de hígado de rata (en negro) y la agmatinasa de *E. coli* (en gris). En ambos modelos se pueden ver los 2 iones metálicos, uno de unión débil (A) y otro de unión fuerte (B) coordinados por residuos de aspartato e histidina. Uribe *et al.*, 2019.

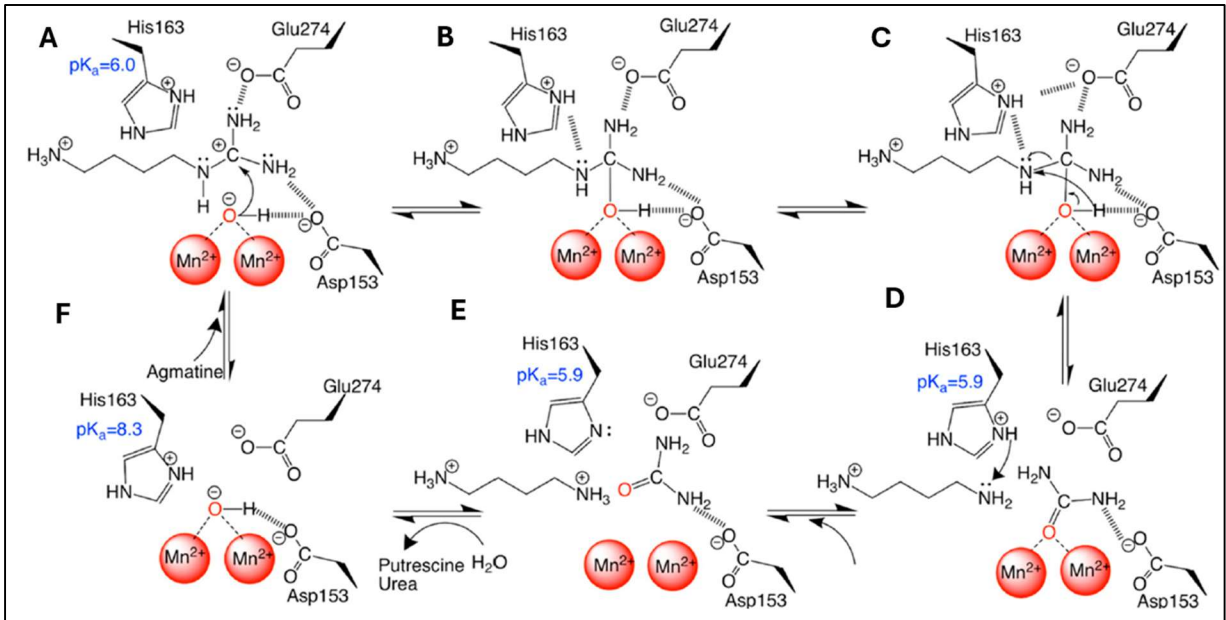


Figura 4. Modelo esquemático de la hidrólisis de agmatina catalizada por la agmatinasa de *E. coli*. En el paso 3C se observa el momento del ataque nucleofílico, mientras que en 3D se muestran los productos generados: urea y putrescina. Maturana *et al.*, 2021.

Agmatinase Like Protein (ALP)

En el laboratorio de enzimología de la Universidad de Concepción, a partir de una librería de genes de cerebro de rata, se clonó y expresó una proteína con actividad agmatinasa. Su secuencia aminoacídica difiere mucho de las demás enzimas metaloureohidrolasas (en especial de agmatinasa), sin embargo, es la primera enzima de mamífero con actividad agmatinasa detectada *in vitro* (Uribe *et al.*, 2007) y se denominó “proteína similar a agmatinasa” o por sus siglas en inglés ALP (agmatinase like protein).

ALP se localizó en cerebro de rata, específicamente en la región hipotalámica, el hipocampo y áreas periventriculares del cerebro en neuronas como en astrocitos, endimocitos y tanicitos, y se reportó como la primera enzima de mamífero con actividad agmatinasa *in vitro* (Mella *et al.*, 2010) (Fig. 5).

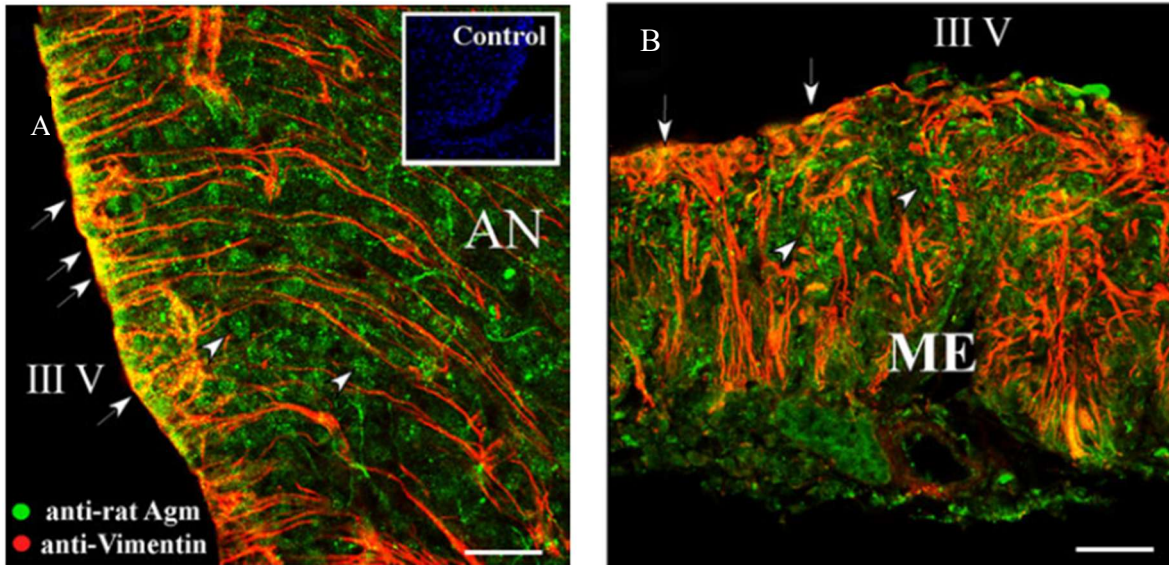


Figura 5. Primera localización de ALP. Detección por inmunohistoquímica en la región hipotalámica de cerebro de rata. Las células endimarias modificadas (tanicitos) fueron positivas al marcaje con anticuerpo proteína similar a la anti-agmatinasa (verde). Mella *et al.*, 2010.

Esta proteína se compone de 523 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 58 kDa. Sus parámetros cinéticos son una k_{cat} de $0.9 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ y una K_m de $3.0 \pm 0.2 \text{ mM}$, es catalíticamente activa solo con agmatina, pero no con arginina. Al dializarla contra EDTA 10 mM en Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, pierde sus iones Mn^{2+} , por lo que disminuye su actividad catalítica, sin embargo, recupera su actividad agmatinasa al calentarla 10 minutos a 60°C en presencia de Mn^{2+} 5mM (comportamiento característico de enzimas arginasas). Cabe destacar que, la hidrólisis del sustrato alcanzó su máximo a un pH entre 9 – 9,5, lo cual también es una característica de arginasas y agmatinasas. Al comparar la secuencia aminoacídica de ALP con otras metaloureohidrolasas, presenta solo un 12% de identidad y un 19% de similitud con la agmatinasa humana, además, no presenta los residuos altamente conservados que coordinan los iones Mn^{2+} , lo que es crucial para la actividad agmatinasa de ALP (Figura 6) (Uribe *et al.*, 2007).

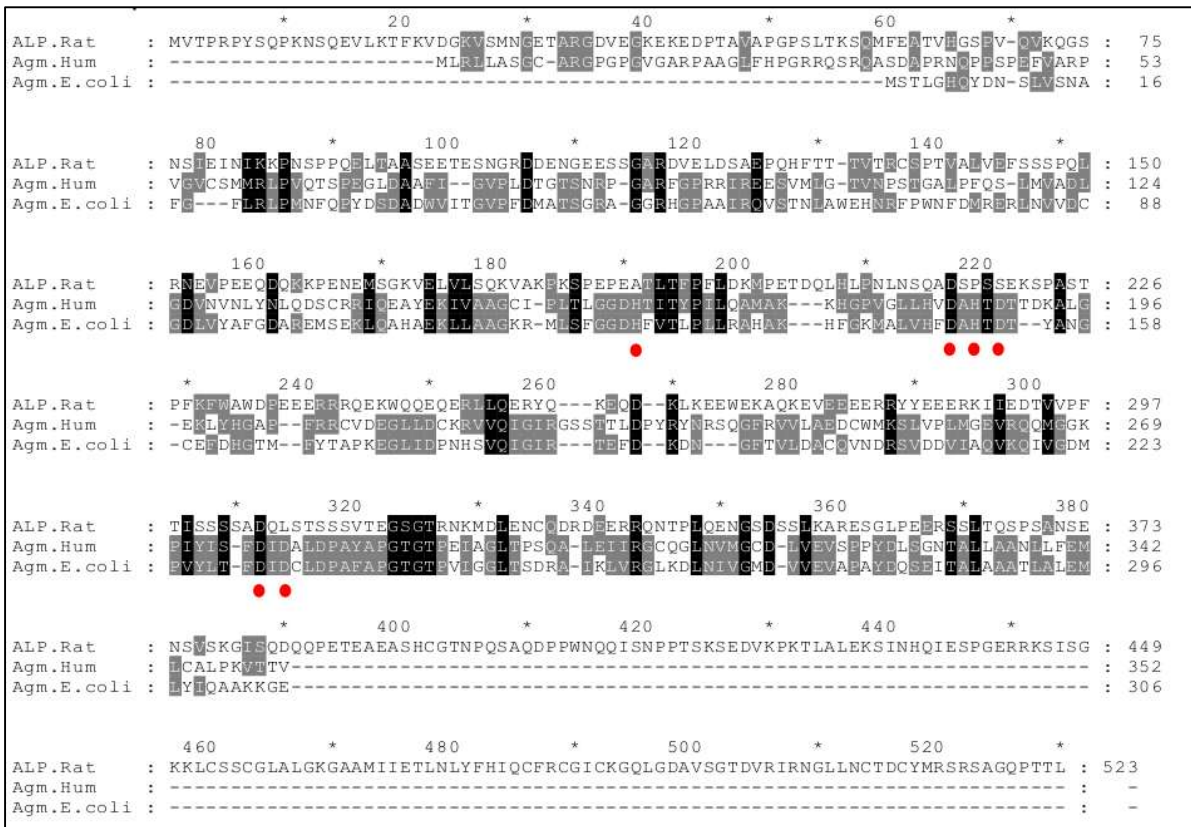


Figura 6. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de enzimas de la superfamilia metaloureohidrolasa y ALP. Podemos ver las secuencias de Agm.Hum: Agmatinasa humana, Agm. *E. coli*: Agmatinasa de *E. coli* y ALP.Rat: Agmatinasa Like Protein (ALP) de Rata. Los puntos rojos indican los residuos clásicos que conforman el sitio de unión a Mn²⁺, los que varían en la secuencia de ALP.Rat. Fuentes *et al.*, 2024.

Dominio LIM

Un hallazgo interesante en ALP es un segmento terminal en el extremo carboxilo denominado dominio-LIM, compuesto por 67 residuos ordenados en la siguiente secuencia: C-X₂-C-X₁₉-H-X₂-C-X₂-C-X₂-C-X₂₁-C-X₂-C, donde X es cualquier aminoácido. Este dominio se estabiliza con dos iones de Zn²⁺ formando 2 dedos de zinc repetidos en tándem (Fig.7), se pliega de forma independiente y se le atribuyen funciones como interacciones proteína-proteína y auto inhibición de la función catalítica de ALP, (Cofre *et al.*, 2013). Cabe destacar que en general los

dominios LIM están involucrados en procesos biológicos como la expresión genética, diferenciación y crecimiento celular, comunicación celular e interacciones con el citoesqueleto (Castro *et al.*, 2011).

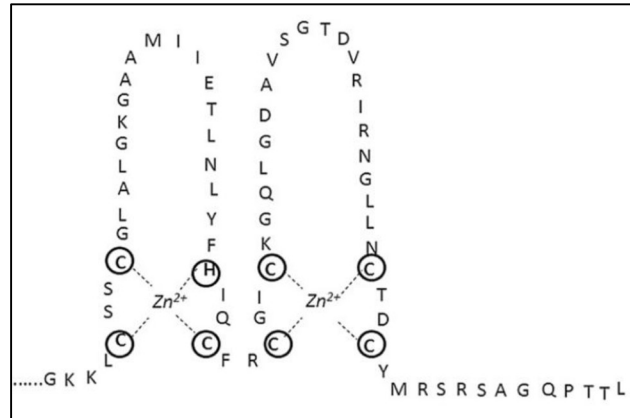


Figura 7. Modelo esquemático del dominio LIM de ALP. Se pueden apreciar los residuos que coordinan los iones de Zn^{2+} dentro de los dedos de zinc. Castro *et al.*, 2011.

Isoformas de ALP

Al analizar las secuencias de ALP en la base de datos de proteínas (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) se identificaron una serie de transcritos a los que se les ha asignado el nombre de LIMCH1 y que poseen el extremo 3' idéntico a ALP, por lo cual, en el laboratorio de enzimología de la Universidad de Concepción se clonaron dos de estos transcritos desde hipotálamo de cerebro de rata, los cuales se denominaron: Isoforma I de LIMCH1 de 3177 pb e Isoforma II de LIMCH1 de 2709 pb. Al caracterizar ambas isoformas, los parámetros no demostraron diferencias significativas respecto a ALP (Fig. 8), por lo que se concluyó que estas regiones adicionales de LIMCH1 no participan en la catálisis del sustrato agmatina (García *et al.*, 2016).

Para estudiar la función del dominio LIM de ALP, se generó una isoforma denominada Δ LIM-ALP, que corresponde a una variante truncada en este dominio mediante la técnica de PCR. Esta isoforma mostró ser catalíticamente más activa y específica para agmatina. En cuanto a sus parámetros cinéticos, su k_{cat} aumentó 10 veces y su K_m es 3 veces menor para agmatina (Tabla 1), lo que refleja un aumento en la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de la enzima truncada. Otras características relevantes de esta isoforma son que disminuyó su K_i para el producto putrescina, y se reportó un cambio conformacional en la enzima trunca, detectable mediante cambios en la fluorescencia intrínseca de triptófanos (Castro *et al.*, 2011). Finalmente, se logró expresar la región central de ALP (isoforma ALP central) la cual se compone de 210 aminoácidos y conserva la actividad agmatinasa de la enzima (Fig.8).

Tabla 1. Parámetros cinéticos para algunas enzimas de la superfamilia metaloureohidrolasa. Se informan los valores de K_{cat} y K_m para el sustrato agmatina.

Variante	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)
Agmatinasa <i>E. coli</i>	140 ± 8	1.5 ± 0.2
ALP silvestre	0.8 ± 0.2	2.5 ± 0.2
Δ LIM-ALP	10 ± 1	1.2 ± 0.5

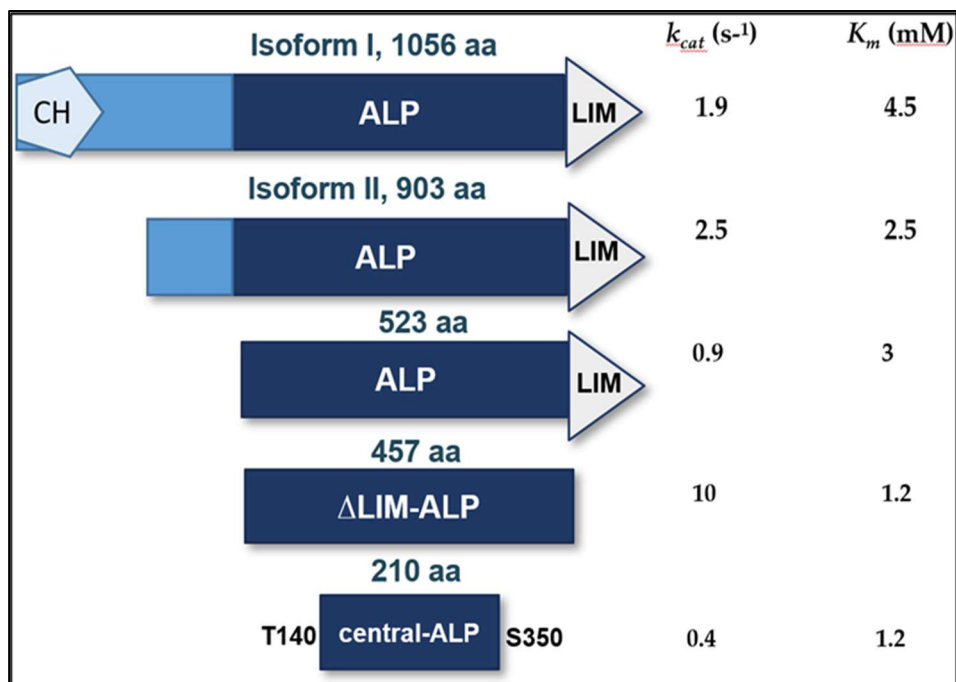


Figura 8. Esquema comparativo entre ALP e isoformas. Las regiones coloreadas en azul y celeste son idénticas en ambas isoformas, al igual que las regiones triangulares en blanco. Se informan los parámetros cinéticos (k_{cat} (s⁻¹) y K_m (mM)) de cada isoforma para el sustrato agmatina. Cofre *et al.*, 2013.

Sitio de unión al cofactor Mn²⁺

Al igual que las demás metaloureohidrolasas, ALP requiere de un metal bivalente para llevar a cabo la hidrólisis de su sustrato agmatina. Se sabe que ALP coordina 2 iones de Mn²⁺ en su sitio activo, sin embargo, se desconoce que residuos puntuales coordinan estos iones metálicos en ALP. En vista de esto, en 2015 se generaron mutantes simples de 5 residuos de histidina (H) presentes en ALP, de los cuales, solo la mutante H206A mostró una alteración en el comportamiento de ALP, disminuyendo su afinidad por Mn²⁺ hasta 10 veces, por lo que, se postuló como un posible residuo crítico para la coordinación de los iones (Quiñones *et al.*, 2015).

Posterior a este primer acercamiento al estudio del sitio de unión a Mn²⁺, en el laboratorio de Biofísica Molecular de la Universidad de Concepción, se generó un modelo estructural utilizando el programa Modeller, a partir de secuencias

aminoácidas de las agmatinasas de diferentes procariontes como *D. radiodurans* (1WOI), *C. difficile* (3LHL), *B. thailandensis* (4DZ4), *Thermoplasma volcanium* (3PZL), *Pseudomonas aeruginosa* (3NIO) y *Streptomyces clavuligerus* (1GQ6), disponibles en la base de datos Protein Data Bank. En base a este modelo, se propusieron 6 nuevos potenciales ligandos que coordinarían los iones Mn^{2+} , los cuales son: E190, N213, Q215, D217, E288 y K290 (Fig. 9).

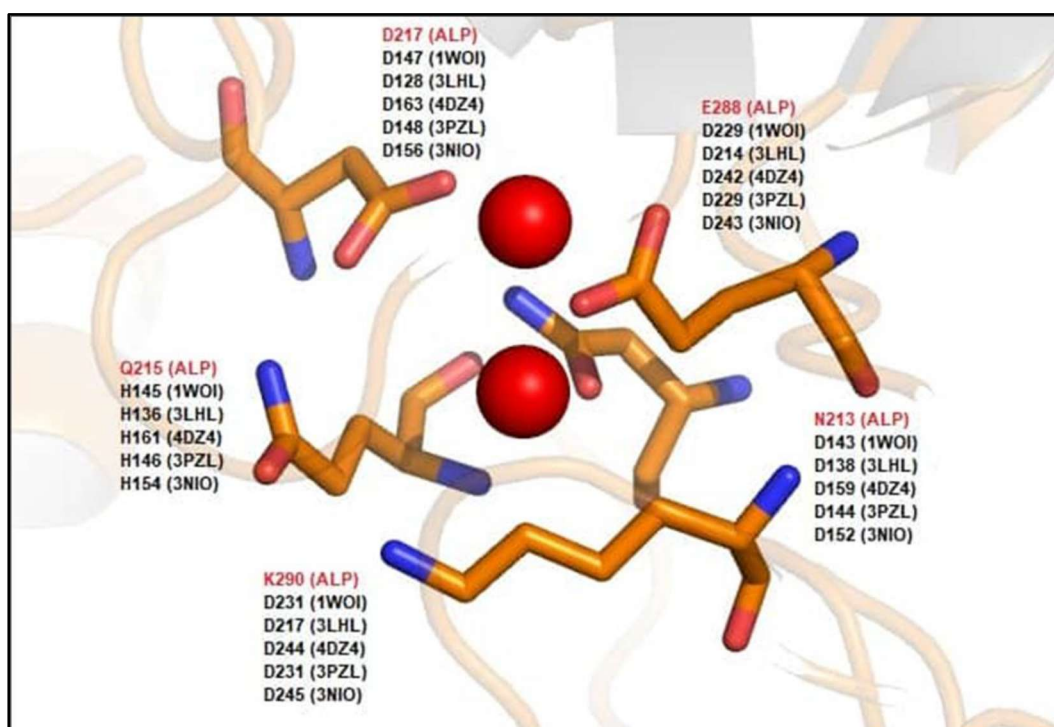


Figura 9. Modelo esquemático del sitio de unión a Mn^{2+} propuesto para ALP, a partir de secuencias aminoácidas de las agmatinasas de diferentes procariontes como *Deinococcus radiodurans* (1WOI), *Clostridium difficile* (3LHL), *Burkholderia. Thailandensis* (4DZ4), *Thermoplasma volcanium* (3PZL), *Pseudomonas aeruginosa* (3NIO) y *Streptomyces clavuligerus* (1GQ6). Fuentes *et al.*, 2024.

A partir de este modelo y utilizando la isoforma Δ LIM-ALP, se generó una mutante doble (E288A/K290A) y una mutante triple (N213A/Q215A/D217A) de los residuos propuestos como ligandos, donde se reemplazaron por alanina. Los ensayos arrojaron que estas variantes no presentaron actividad agmatinasa, lo que indica que dichos residuos serían necesarios para la actividad catalítica de ALP y a su vez reafirman el modelo propuesto (Reyes *et al.*, 2020). Posteriormente, se generaron 5 mutantes simples de los residuos postulados reemplazándolos por alanina (N213A, Q215A, D217A, E288, K290A), y se alteraron los parámetros cinéticos en todas las variantes, disminuyendo su K_m y su $V_{m\acute{a}x}$, sin embargo, no se alteró la afinidad de la enzima por Mn^{2+} .

En vista de estos antecedentes, en este seminario de título se busca contribuir a esclarecer los residuos que conforman el sitio de unión a Mn^{2+} en ALP y si estos son críticos para la coordinación del metal activador y/o la actividad catalítica de la enzima. Se analizará la participación del residuo E190, que es uno de los residuos propuestos para la coordinación de los iones Mn^{2+} y los residuos N340 y Q339 que son aledaños al sitio propuesto como se muestra en la Fig.10.

Por lo tanto, esta tesis busca resolver la siguiente interrogante: ¿Son los residuos E190, Q339 y N340 relevantes para la coordinación del cofactor Mn^{2+} y para la actividad catalítica de Δ LIM-ALP?

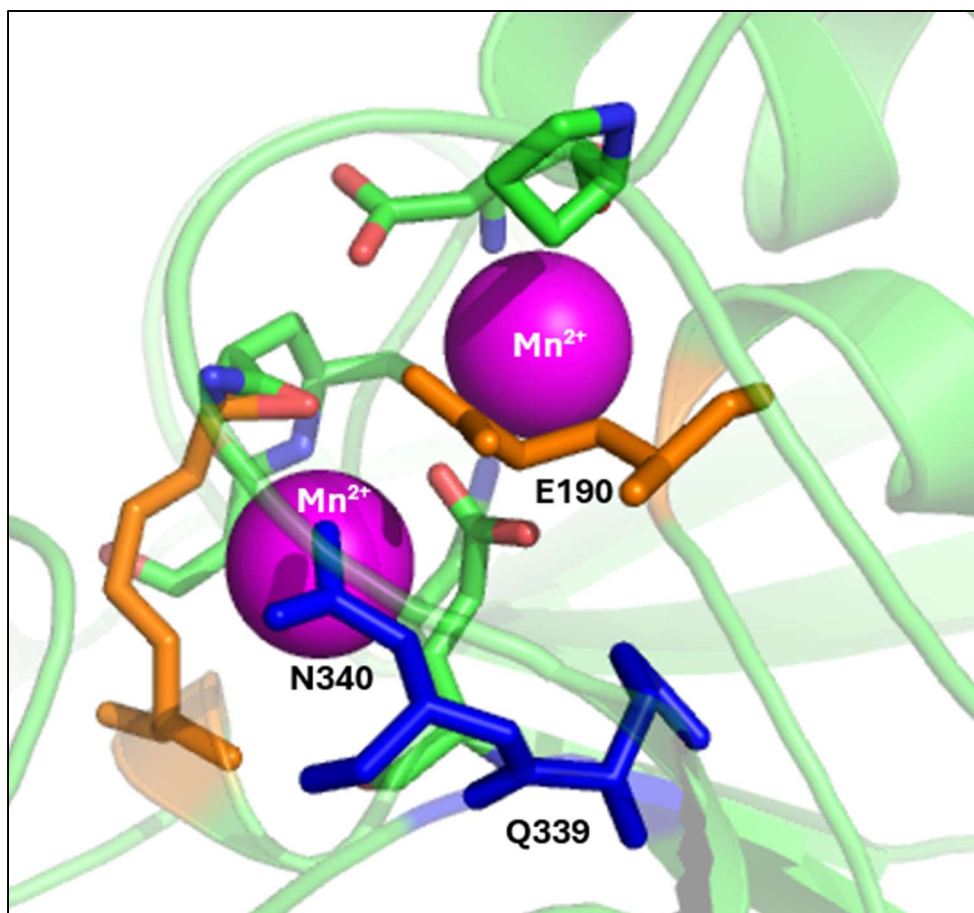


Figura 10. Se muestra el residuo E190, propuesto en el modelo generado por LBFM como uno de los posibles coordinadores del ion metálico, junto con los residuos Q339 y N340, también considerados potenciales participantes en la coordinación del ligando.

HIPÓTESIS

Los residuos E190, Q339 y N340, se encuentran en el sitio activo de Δ LIM-ALP y son relevantes para la interacción con el cofactor Mn^{2+} y la actividad catalítica de la enzima.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar el rol de los tres aminoácidos postulados en la interacción del cofactor Mn^{2+} y en la actividad enzimática de Δ LIM-ALP.

Objetivos específicos:

- Generar, expresar y purificar las mutantes E190A, Q339A y N340A.
- Caracterizar los parámetros cinéticos y la interacción con el cofactor Mn^{2+} en las mutantes simples generadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Reactivos químicos generales

Los reactivos químicos generales, amortiguadores, sales y sustratos utilizados son de grado analítico y biología molecular de las marcas comerciales Winkler, Thermo scientific, Bioneer y Sigma.

Soluciones generales

α -isonitrosopropiofenona (3%p/v): Contiene α -isonitrosopropiofenona al 3%p/v en 100 mL de alcohol etílico 100%.

Buffer de corrida 5X: Contiene Tris 124 mM, Glicina 959 mM y SDS 17 mM, se completó el volumen de 1 L con agua destilada.

Buffers de elusión: Se prepararon 3 buffers para elusión con concentraciones fijas de Tris-HCl 10mM para ajustar a pH 7.5 y concentraciones crecientes de KCl (150mM, 250mM y 500mM).

Buffer de lisis: Contiene KCl 50 mM y Tris HCl 100 mM pH 7.5 y se completó el volumen para 100 mL con agua destilada.

Buffer TAE 10X: Contiene Tris 0.4 M, ácido acético glacial al 1%p/v y EDTA 0.5 M para ajustar a pH 8.0. Se completó el volumen a 1 L con agua destilada.

Buffer TBS 10X: Contiene NaCl 1.5 M y Tris 1 M, se completó el volumen de 1 L con agua destilada.

Buffer TBS-Tween 1X: Contiene buffer TBS 1 X y Tween 20 al 0.5%, se completó el volumen a 500 mL con agua destilada.

Buffer de transferencia: Contiene Tris 25 mM, Glicina 192 mM y metanol 20% y se completó el volumen a 1 L con agua destilada.

Sales TB 50 X: Contiene potasio fosfato monobásico 170 mM y potasio fosfato dibásico 720 mM, se completó el volumen a 1 L con agua destilada y posteriormente se autoclavó.

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

Solución fijadora para geles: Contiene metanol 45%, ácido acético 1% y H₂O_d 54%.

Solución de tinción Azul de coomassie: Contiene sulfato de amonio 17%, metanol 34%, ácido acético 0.5 % y coomassie G-250 0.1%.

Vector

Se utilizó el vector H6pQE-60 (4.8 kb) para la expresión génica en procarionte. Este vector contiene un sitio de unión al ribosoma (RBS) para facilitar la traducción del gen clonado, y un gen de resistencia a ampicilina, que permite la selección de bacterias transformadas. También posee el promotor T5-lac, ubicado río arriba del operón lac, lo que permite inducir la expresión génica mediante IPTG. La secuencia insertada de Δ LIM-ALP tiene una longitud de 1371 pb. Además, el vector incluye una etiqueta 6xHis en el extremo N-terminal, lo que permite la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad con resina agarosa-NTA-Ni²⁺ (Fig. 11).

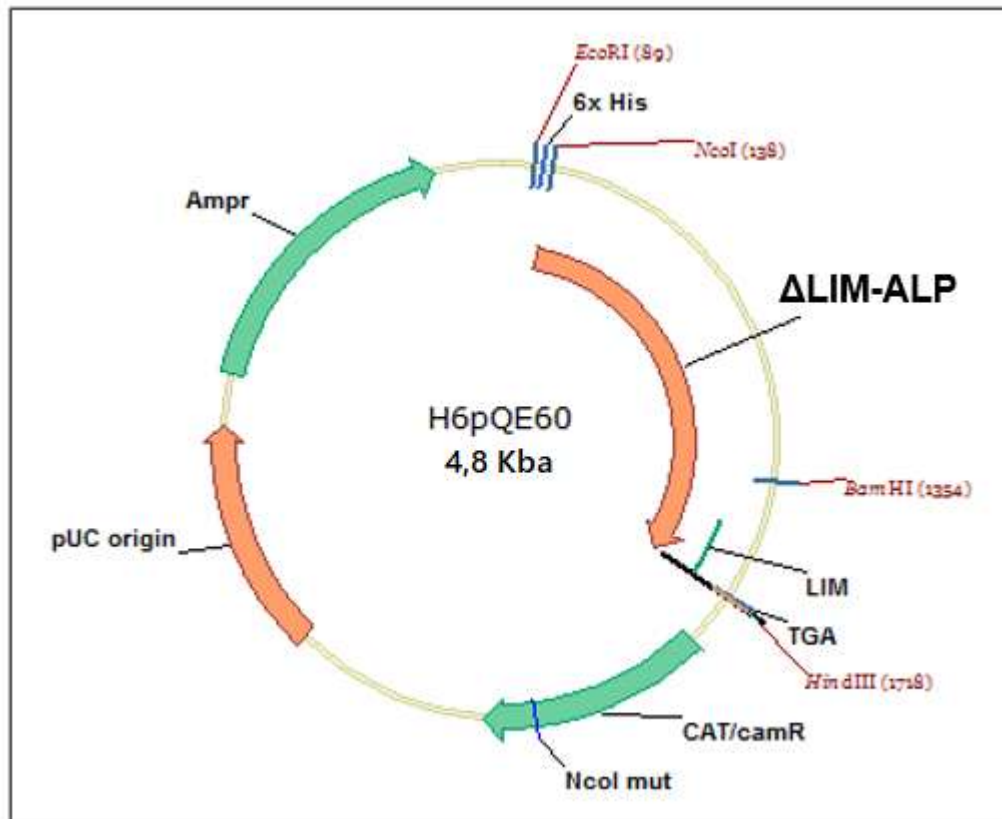


Figura 11. Modelo esquemático del vector utilizado para transformación de bacterias quimiocompetentes.

Oligonucleótidos

Para generar las mutantes simples, a través de la técnica de mutagénesis sitio dirigida, utilizamos el vector H6pQE-60 y se diseñaron los oligonucleótidos de la Tabla 2.

Tabla 2. Diseño de partidores para la generación de mutantes simples de Δ LIM-ALP.

Nombre	Secuencia
Forward E190A	5' – AAGCCAAAATCCCCAGAACCGGCAGCAACCTTGACATTTCCA – 3'
Reverse E190A	5' – TGGAAATGTCAAGGTTGCTGCCGGTTCTGGGGATTTTGGCTT – 3'
Forward Q339A	5' – GACAGAGACGAAGACAGAAGAGCCAACACTCCCCTCCAGGACATT – 3'
Reverse Q339A	5' – ATTCTCCTGGAGGGGAGTGTTGGCTCTTCTCTCTTCGTCTCTGTC – 3'
Forward N340A	5' – GACAGAGACGAAGAGAGAAGACAGGCCACTCCCCTCCAGGAGATT – 3'
Reverse N340A	5' – ATTCTCCTGGAGGGGAGTGGCCTGTCTTCTCTCTTCGTCTCTGTC – 3'

Cepas bacterianas

Dentro de la variedad de cepas se trabajó con las cepas de *E. coli* JM109 (expresión de proteínas) y TOP10 (obtención de ADN plasmidial mutado), que contienen los genes *recA1*, *endA1* y *hsdR*, los que las hacen ideal para clonación de plásmidos y expresión de las mutantes de Δ LIM-ALP.

Medios 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 (2.5%p/v): para un litro de medio se utilizó 10 g de bactotripton, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl con posterior autoclavado.

Caldo Terrific Broth: para 450 mL de medio se mezclaron 12 g de bactotripton y 24 g de extracto de levadura en agua destilada, luego se envió a autoclavar. Posteriormente, se adicionaron 50 mL de solución Sales TB 50X.

Posterior al autoclavado, a los medios se le adicionó ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL.

Métodos

Mutagénesis sitio dirigida de mutantes simples

Los residuos E190, Q339 y N340 fueron reemplazados por alanina, generando de esta forma las mutantes simples E190A, Q339A y N340A en la secuencia codificante de Δ LIM-ALP (457 aa). Para la mutación sitio dirigida usamos el QuickChange Site-Directed mutagenesis Kit junto a la enzima ADN polimerasa KOD Hot Start de alta fidelidad, se siguió el protocolo de nuestro laboratorio, donde se agrega a un tubo eppendorf de 0.5 mL buffer 10XKOD Hot Start DNA polimerasa, buffer MgSO₄ 25mM dNTP 2mM, partidor forward 10 µM, partidor reverse 10 µM, ADN del vector ALP-trunca-His-amino-pQE-60 10 ng/µl (templado), la enzima KOD polimerasa y llenar hasta 50 µL con agua de biología molecular, para posteriormente, realizar una reacción en cadena por polimerasa PCR.

Las parejas de partidores diseñadas para generar las mutantes simples se presentan en la Tabla 2. En cada caso, se introdujo un cambio puntual en una base del codón correspondiente a los residuos E190, Q339 y N340, con el fin de sustituirlos por alanina. La reacción de PCR para la amplificación de los fragmentos mutados se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 2 minutos y 30 segundos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 20 segundos, alineamiento a 68 °C por 15 segundos y extensión a 72 °C por 3 minutos.

Ensayo de digestión enzimática

Posteriormente, el producto de PCR se digirió con 2 µL de la enzima de restricción Dpn I (Thermo scientific) y se incubó durante 16 horas a 37° C para eliminar el plásmido parental.

Ensayo de restricción

Para verificar la integridad de los plásmidos obtenidos, se realizó un ensayo de digestión enzimática utilizando las enzimas de restricción EcoRI y HindIII. A cada reacción se le añadió entre 1 y 5 µL de ADN plasmídico, y 1 µL de las enzimas de restricción correspondientes, tampón de reacción 10X (Buffer R) y agua de calidad para biología molecular, completando un volumen final de 10 µL. Se incubaron los tubos con las reacciones: 2 horas a 37°C (reacción de restricción) y 20 minutos a 80°C (denaturación proteica), luego se conservaron las muestras a 4°C.

Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se preparó un gel de agarosa a una concentración de 1% de agarosa disuelta en una solución TAE 1X, se adicionó la solución de tinción de ácidos nucleicos GreenStar I de Bioneer, en una dilución 1:200 (indicación del fabricante). El marcador de peso molecular que se usó fue GeneRuler 1kb DNA Ladder de Thermo Scientific. La electroforesis se realizó a un voltaje de 90V por 60 minutos, además, la detección del ADN en el gel fue a través de un transiluminador UV acoplado a un fotodocumentador marca Chemiscope series modelo 3100.

Transformación de bacterias quimiocompetentes

Una vez obtenido el producto de la mutagénesis sitio-dirigida, se transformaron bacterias *E. coli* de las cepas JM109 y TOP10 a través del método de quimiocompetencia. Para ello, se agregaron 30 ng del producto de mutagénesis sitio-dirigida a un stock de bacterias quimiocompetentes *E. coli* de ambas cepas, las

que se incubaron 30 minutos en hielo, luego 2 minutos a 42°C (shock térmico) y posteriormente 5 minutos en hielo; para luego ser mezcladas e incubadas en 500µL de medio de cultivo LB sin antibiótico por 1 hora a 37°C con agitación. Luego, se centrifugó el medio de cultivo a 5000 rpm durante 1 minuto, se desechó la mitad de este, se resuspendió el pellet bacteriano en el medio restante y se sembró en una placa de LB agar con ampicilina. Pasadas 16 horas, se seleccionó una colonia y se depositó en un tubo falcon de 50ml, con 15 ml medio LB y ampicilina 100X. Se incubó en shaker por 16 horas a 37°C para que crezcan las bacterias y sinteticen el plásmido. Cabe recordar que este procedimiento se realizó para cada una de las mutantes.

Secuenciación de plásmidos

Para verificar la mutación de interés, se cultivaron 15 mL de medio LB con ampicilina y bacterias *E. coli* TOP10 quimiotransformadas, con cada una de las mutantes ΔLIM-ALP. Luego, se purificaron los plásmidos de estas, utilizando el kit de purificación de plásmidos Plasmid MiniRREP kit. Una vez obtenido el ADN plasmidial, las muestras fueron cuantificadas utilizando un espectrofotómetro marca Qwawell UV-VIS, modelo UV-1700 midiendo la absorbancia a 260 nm. Finalmente, se determinó la secuencia de las mutantes por secuenciación de Sanger en el servicio de secuenciación de la Pontificie Universidad Católica de Chile en Santiago. Se utilizaron los partidores ALP-central, Agma 8, Agma11 Forward E288A y Forward K290A (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencias de partidores utilizados para secuenciar las mutaciones simples de Δ LIM-ALP.

Nombre	Secuencia
Forward ALP-central	5' – GCCCATGGATGACCGTGGCCCTGGTGGAG – 3'
Reverse ALP-central	5' – GCAAGCTTTCACTATGAGTCACTGCCATTCTCCTGGAG – 3'
Agma 8	5' – TGCTTTGTGAGCGGATAACA – 3'
Agma 11	5' – TTACTGGATCTATCAACAGG - 3'
Forward E288A	5' – GCAGATACTATGAGGAGGCCCGTAAGATAATTGAG GACACCGTGG – 3'
Forward K290A	5' – GATACTATGAGGAGGAGCGTGCGATAATTGAGGAC ACCGTGGTTC – 3'

Expresión recombinante de las mutantes simples

Para la expresión proteica de las mutantes simples E190A, Q339A y N340A, se crecieron bacterias *E. coli* JM109 en 10 mL de medio de cultivo LB-ampicilina a 37°C, luego, se pasan a medio de cultivo TB-ampicilina y se incuban 3 horas a 37°C, se monitorea su densidad óptica (OD), con un espectrofotómetro marca Shimadzu, modelo UV-1700, a una longitud de onda de λ 600 nm, hasta que llegue a un rango entre 0.500 – 0.550, donde se le adicionó isopropil- α -tiogalactopiranosido (IPTG) 0.4 mM final y finalmente los medios se incubaron 16 horas a 30°C.

Purificación parcial de las mutantes simples

Para purificar las mutantes E190A, Q339A y N340A, se cosecharon las bacterias de los medios por centrifugación y se les retiro el medio TB, lavando luego el pellet con buffer Tris 10 mM pH 7.5. Luego, se resuspendió el pellet bacteriano en buffer de lisis (KCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, putrescina 2 mM, Mn^{2+} 5 mM, p-

metilsulfonilfluoruro (PMSF) 0,1 mM y DL-ditiotreitol (DTT) 2 mM), se lisaron por sonicación en ciclos de 15 segundos de sonicación por 30 segundos de descanso, durante 8 minutos, a 85% de amplitud, el resultado de la sonicación se centrifugó 40 minutos a 12000 rpm para así separar el extracto proteico del resto de las biomoléculas de las bacterias.

Para la purificación parcial, se preparó una columna de resina DEAE-celulosa, equilibrada a pH 7,5 con buffer Tris-HCl 10 mM pH 7,5, y se cargó el extracto proteico obtenido de 5 a 7 veces. Para comenzar la elución, se lavó con buffer Tris-HCl 10 mM pH 7,5 hasta que el eluido de la columna llegara a una absorbancia a λ 280 nm igual o menor a 0.1 luego, se cargaron buffers Tris-HCl 10 mM pH 7.5 con concentraciones crecientes de KCl (150 mM, 250 mM y 500 mM respectivamente), donde se colectaron las fracciones cromatográficas en tubos en ensayo. A cada fracción se le midieron las proteínas totales determinando la absorbancia a λ 280 nm.

Cuantificación de actividad agmatinasa

Para determinar la actividad agmatinasa de las mutantes simples, empleamos el método de Archibald (1945), el cual, corresponde a un método colorimétrico específico para detectar urea, uno de los productos de nuestra enzima. La reacción se inicia con las siguientes concentraciones finales: 50 mM glicina pH 9.0, 5 mM $MnCl_2$, 20 mM agmatina y 100 μ L de muestra proteica, para un volumen final de 200 μ L. Se incubaron los tubos a 37°C durante 15 minutos, luego, se detuvo la reacción enzimática con 1 mL de solución de mezcla ácida (ácido ortofosfórico 23% y ácido sulfúrico 9%). Finalmente, se agregó 100 μ L del reactivo colorimétrico α -isonitrosopropiofenona al 3% en etanol a cada muestra y se incubaron a 100°C durante 1 hora en oscuridad. Se enfriaron en oscuridad y se midió la absorbancia a λ 540 nm.

Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se determinó a través del método de Bradford (1976), optimizado en el laboratorio con un sistema de tiempo cronometrado, para incubar 5 minutos cada muestra con reactivo de Bradford, y posteriormente, medir a una absorbancia de 595 nm. Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Los datos de la curva de calibración fueron ingresados al programa Excel (Microsoft 365) con el que se determinó la ecuación de la recta para intrapolar los datos de absorbancia. Todas las curvas de calibración presentaron un R^2 mayor a 0.95.

Determinación de parámetros cinéticos de las mutantes simples

Para determinar los parámetros cinéticos de las mutantes simples, se realizaron curvas de saturación con concentraciones de agmatina de 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 5, 8, 10, 12 y 15 mM, 2 mM $MnCl_2$, 50 mM glicina pH 9.0 y 100 μ L de muestra proteica para un volumen final de 200 μ L. Se incubaron los tubos a 37°C durante 15 minutos, luego, se detuvo la reacción enzimática con 1 mL de solución de mezcla ácida. Finalmente, se agregó 100 μ L del reactivo colorimétrico α -isonitrosopropiofenona al 3% en etanol a cada muestra y se incubaron a 100°C durante 1 hora en oscuridad parcial. Se enfriaron en oscuridad total y se midió la absorbancia a λ 540 nm. Los datos obtenidos fueron ingresados al software GraphPad Prism 9 y se ajustaron a la ecuación de Michaelis Menten ($V_i = V_{m\acute{a}x} S / (K_m + S)$) utilizando regresión no lineal. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Ensayo de hiperactivación

Se calentaron 50 μ L de muestra proteica a 60°C a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 15) en presencia de 10 mM $MnCl_2$. Transcurrido el tiempo, se enfriaron en hielo, y posteriormente, se les agregó mix de reacción con las siguientes concentraciones finales: 60 mM agmatina, 125 mM glicina pH 9.0 y se completó con agua destilada para completar un volumen total de 200 μ L. Se incubaron los tubos a 37°C durante 15 minutos, luego, se detuvo la reacción

enzimática con 1 mL de solución de mezcla ácida. Finalmente, se agrgó 100 μ L del reactivo colorimétrico α -isonitrosopropiofenona al 3% en etanol a cada muestra y se incubaron a 100°C durante 1 hora en oscuridad parcial. Se enfriaron en oscuridad total y se midió la absorbancia a λ 540 nm. Los datos fueron graficados en el software GraphPad Prism 9. Los ensayos se realizaron en cuadruplicado.

Ensayo de interacción con distintos metales

Utilizando el método de Archibald antes descrito, se probaron diferentes metales en reemplazo del cofactor. La reacción se inicia con las siguientes concentraciones finales: 8 mM cofactor metálico, 45 mM agmatina, 75 mM glicina pH 9.0 y 100 μ L de muestra proteica para un volumen final de 200 μ L. Se incubaron los tubos a 37°C durante 15 minutos, luego, se detuvo la reacción enzimática con 1 mL de solución de mezcla ácida. Finalmente, se agregó 100 μ L del reactivo colorimétrico α -isonitrosopropiofenona al 3% en etanol a cada muestra y se incubaron a 100°C durante 1 hora en oscuridad parcial. Se enfriaron en oscuridad total y se midió la absorbancia a λ 540 nm. Los datos fueron graficados en el software GraphPad Prism 9. Los ensayos se realizaron en cuadruplicado.

Efecto presencia/ausencia de Mn^{2+} , diálisis e hiperactivación

Se dializaron las muestras proteicas en 1 litro de buffer Tris-HCl 5 mM pH 7.5 durante 2 horas en agitación constante a 4°C. Luego, se calentaron 50 μ L de muestras dializadas y no dializadas a 60°C durante 5 minutos en presencia y ausencia de $MnCl_2$ 10 mM $MnCl_2$. Transcurrido el tiempo, se enfriaron en hielo durante 5 minutos, y posteriormente, se les agregó mix de reacción con las siguientes concentraciones finales: 53 mM agmatina, 113 mM glicina pH 9.0 y se completó con agua destilada para completar un volumen total de 200 μ L. Se incubaron los tubos a 37°C durante 15 minutos, luego, se detuvo la reacción enzimática con 1 mL de solución de mezcla ácida. Paralelamente, se incubaron a 37°C durante 15 minutos muestras proteicas dializadas y no dializadas, sin

hiperactivar, en presencia y ausencia de Mn^{2+} . Al iniciar la reacción, se contó con las siguientes concentraciones finales: 50 mM glicina pH 9.0, 5 mM $MnCl_2$, 21 mM agmatina y 50 μ L de muestra proteica, se completa con agua destilada para un volumen final de 200 μ L. Finalmente, se agregó 100 μ L del reactivo colorimétrico α -isonitrosopropiofenona al 3% en etanol a cada muestra y se incubaron a 100°C durante 1 hora en oscuridad parcial. Se enfriaron en oscuridad total y se midió la absorbancia a λ 540 nm. Los datos fueron graficados en el software GraphPad Prism 9. Los ensayos se realizaron en cuadruplicado.

Electroforesis de proteína en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para la separación de proteínas se emplearon geles de poliacrilamida-SDS al 10%, en los que se cargó un mínimo de 25 μ g de proteína total. La electroforesis se llevó a cabo a 100 voltios por 140 minutos, una vez terminada, se incubó el gel en solución fijadora (metanol 45%, ácido acético 1% y H_2O_d 54%) por 15 minutos en agitación constante, luego se incubó en solución de tinción Azul de Coomassie coloidal (sulfato de amonio 17%, metanol 34%, ácido acético 0.5 % y coomassie G-250 0.1%) durante 15 minutos en agitación constante. Finalmente, se lavó el gel con agua destilada durante toda la noche en agitación constante y se terminó la decoloración incubando en metanol 30% durante 30 a 40 minutos. El gel se fotografió en un fotodocumentador (Mini-Imager Gel Documentation) marca MaestroGen modelo MI-02.

Inmunodetección (Western Blot)

Desde un gel SDS-PAGE (descrito anteriormente), se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, usando buffer de transferencia preparado en el laboratorio, a 100 voltios durante 140 minutos; luego, se bloqueó la transferencia con solución de leche descremada 5% p/v en buffer TBS 1X durante 1 hora en agitación constante. Posteriormente, se lavó la membrana 2 veces con buffer TBS-Tween 1X en agitación constante durante 15 minutos. Después, se procedió a

incubar la membrana con el anticuerpo primario anti-ALP diluido a 1:2000 en buffer TBS 1X, a 4°C, en oscilación constante, durante 16 horas. Transcurrido el tiempo, se retira el anticuerpo primario y se lava la membrana 2 veces, con buffer TBS-Tween 1X durante 15 minutos en agitación constante, para luego, incubar con el anticuerpo secundario IgG anti-rabbit diluido a 1:10000 en buffer TBS 1X, a temperatura ambiente, en agitación constante durante 2 horas, transcurrido el tiempo, se vuelve a lavar la membrana 2 veces con buffer TBS-Tween 1X durante 15 minutos. 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.

Anticuerpos

Para el reconocimiento de las mutantes simples y Δ LIM-ALP, como anticuerpo primario, usamos un anticuerpo policlonal de conejo anti-ALP de cerebro de rata, sintetizado en el laboratorio a partir de la proteína recombinante purificada.

Como anticuerpo secundario, se utilizó IgG de chivo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano.

Análisis de datos

El análisis de secuencias de las mutantes simples se realizaron utilizando el software MEGA11, versión 11.0.13., y la plataforma Expasy (translate), mientras que para el alineamiento de estas se utilizó la plataforma Clúster Omega.

El análisis de datos cinéticos se llevó a cabo usando el software GraphPad Prism versión 9.0.0.121 para Windows.

RESULTADOS

Generación y obtención de ALP- mutantes

Como se logra apreciar en la Fig. 12, el vector (línea continua) y el inserto (línea punteada) no presentan signos de degradación, además de ver el inserto liberado del plásmido.

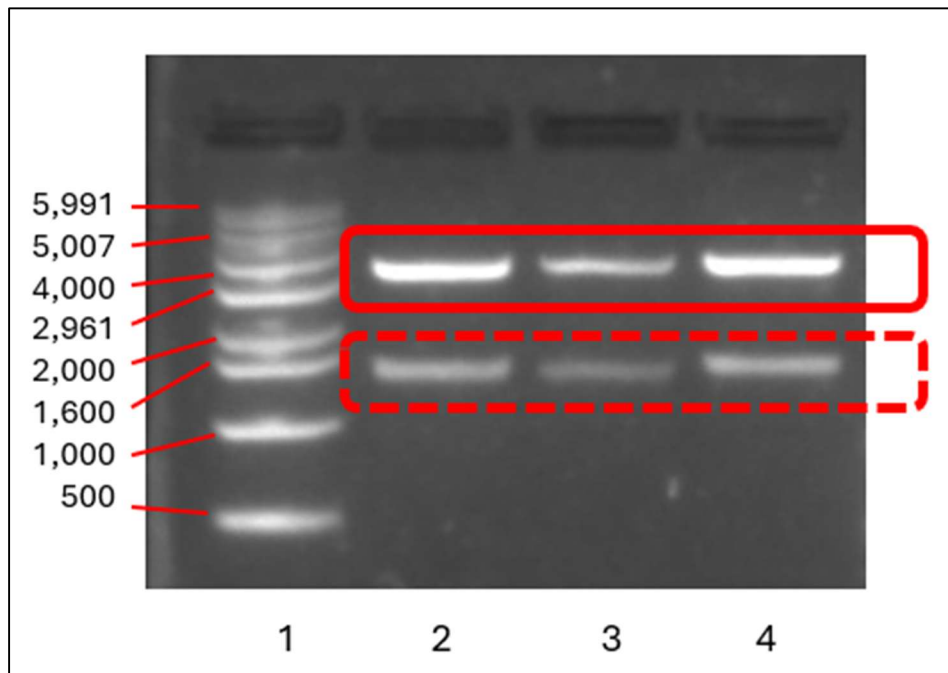


Figura 12. Gel de agarosa al 3% del vector H6pQE-60- Δ LIM-ALP (variantes mutadas), digerido con las enzimas de restricción Nco1 y EcoR1. Carril: 1. Marker (pb); 2. Q339A; 3. E190A; 4. N340A.

En relación con la transformación de bacterias, por el método de quimiocompetencia, esta se llevó a cabo con éxito, obteniendo numerosas colonias bacterianas (Fig. 13), de las cuales, se seleccionó solo una para incubar en medio de cultivo LB con ampicilina 100X a 37°C por 16 horas.

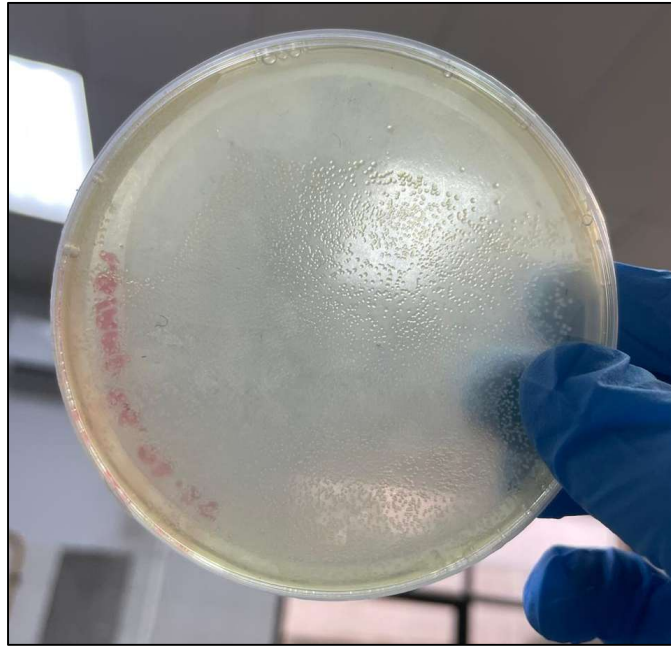


Figura 13. Placa de LB agar con colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con el vector H6pQE-60 mutado para N340A.

A continuación, se determinaron las secuencias génicas de las enzimas mutadas, tal cómo se indica en materiales y métodos. Se tradujeron las secuencias de ADN utilizando la plataforma Expasy y se compararon con la secuencia aminoacídica original de Δ LIM-ALP, utilizando la plataforma Clúster Omega, para detectar posibles anomalías en las secuencias y verificar la mutación generada. También se revisaron los electroferogramas de la secuencia de cada mutante.

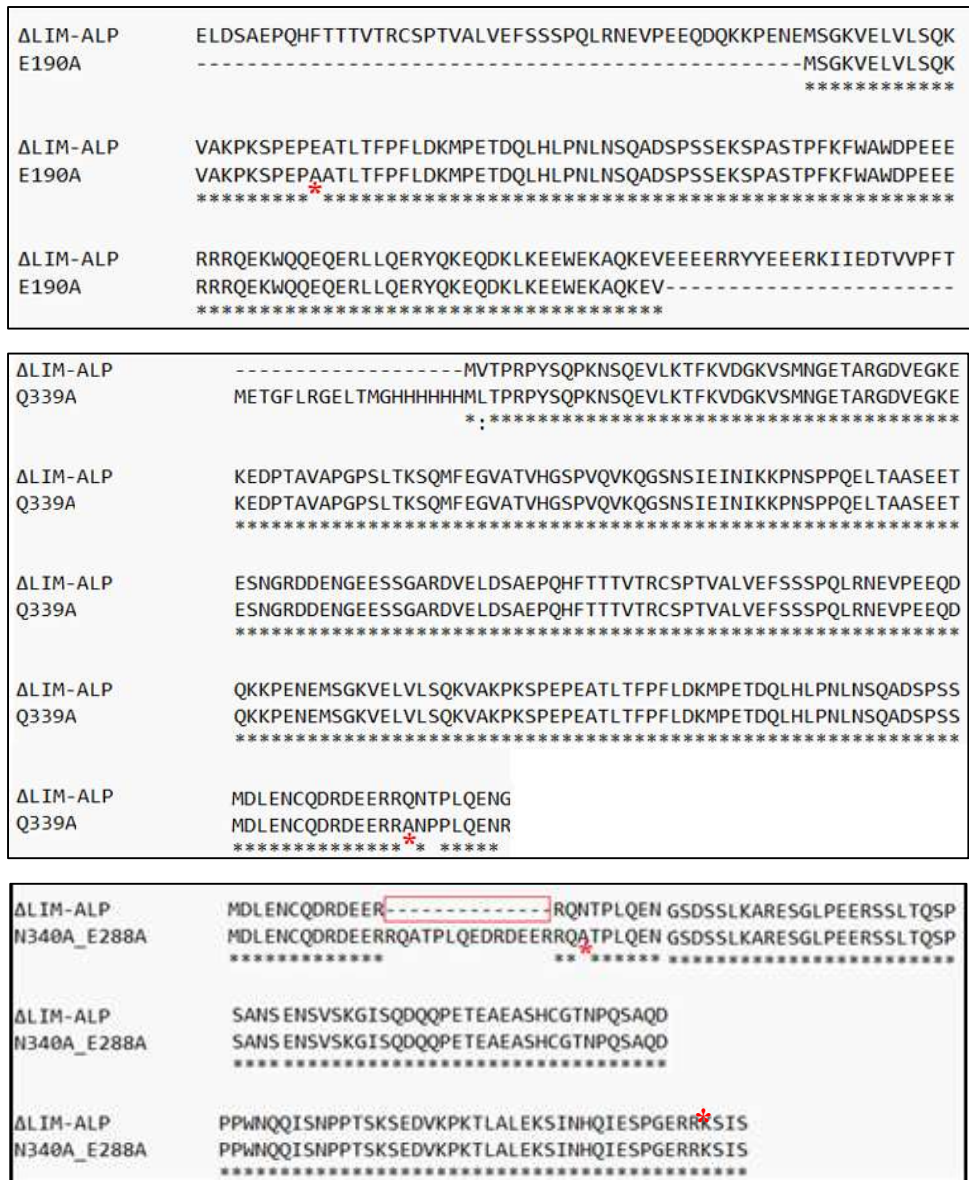
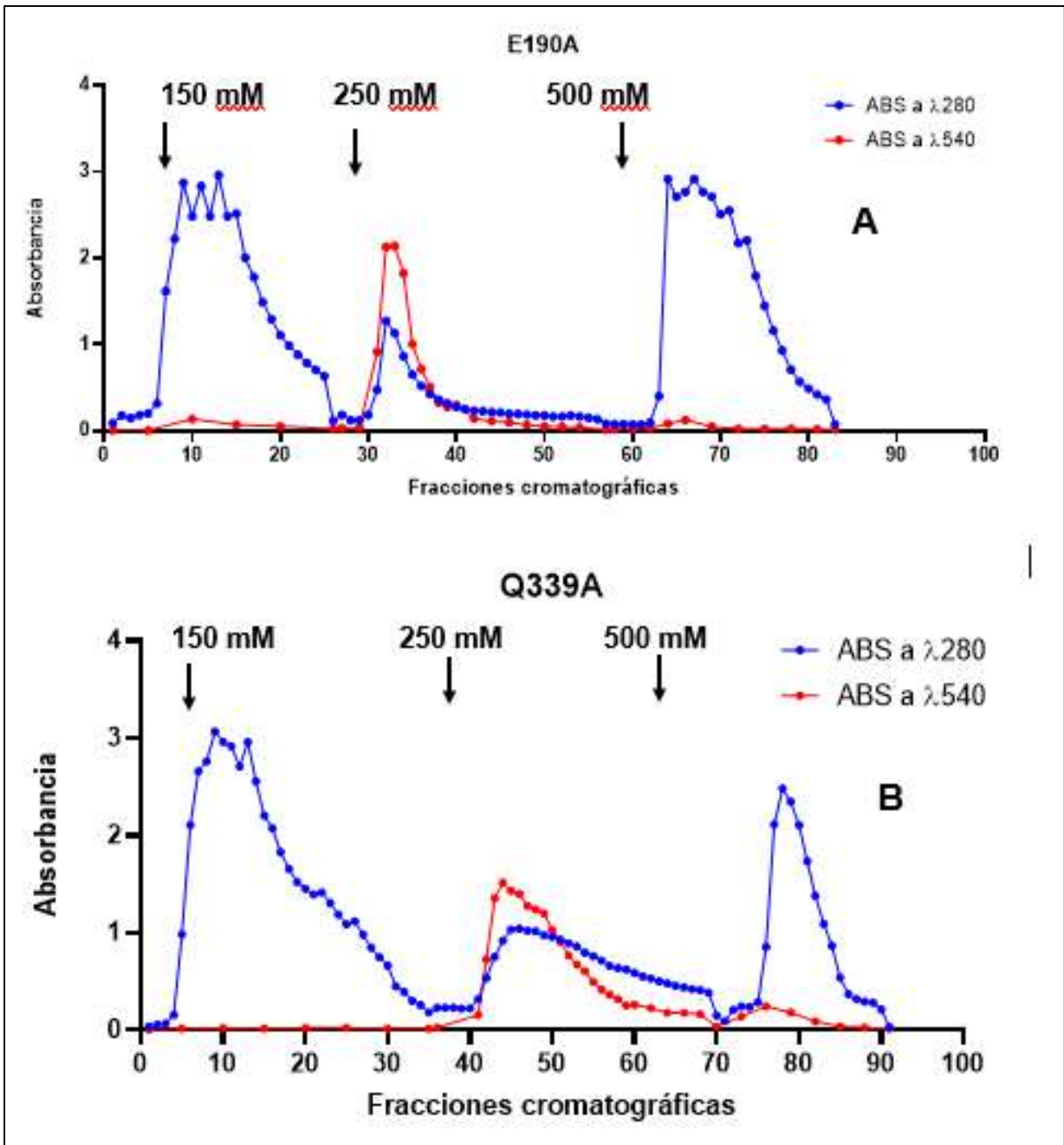


Figura 14. Alineamiento de secuencias de las mutantes con ΔLIM-ALP silvestre. Los asteriscos en rojo indican la presencia y posición de las mutaciones puntuales.

Expresión y purificación parcial de las variantes mutadas

Los extractos proteicos de cada mutante se cromatografiaron en una columna DEAE-celulosa equilibrada con Tris 10 mM, pH 7,5. Como se observa en la Fig. 15 se colectaron las fracciones y se midió a una longitud de onda de $\lambda 280$ nm (proteínas totales), posteriormente se midió la actividad enzimática de las fracciones colectadas a $\lambda 540$ nm. Como indica la estandarización del laboratorio, nuestras mutantes simples eluyeron a una concentración de 250 mM de KCl, que corresponde al segundo peak de elución (en azul), de menor tamaño que los otros 2, y se ve respaldado por un peak de máxima absorbancia (en rojo) que corresponden a las fracciones con actividad agmatinasa. A la concentración de 500 mM de KCl se puede apreciar un pequeño peak de color rojo, que corresponde a fracciones que contienen la enzima agmatinasa endógena de *E. coli*.



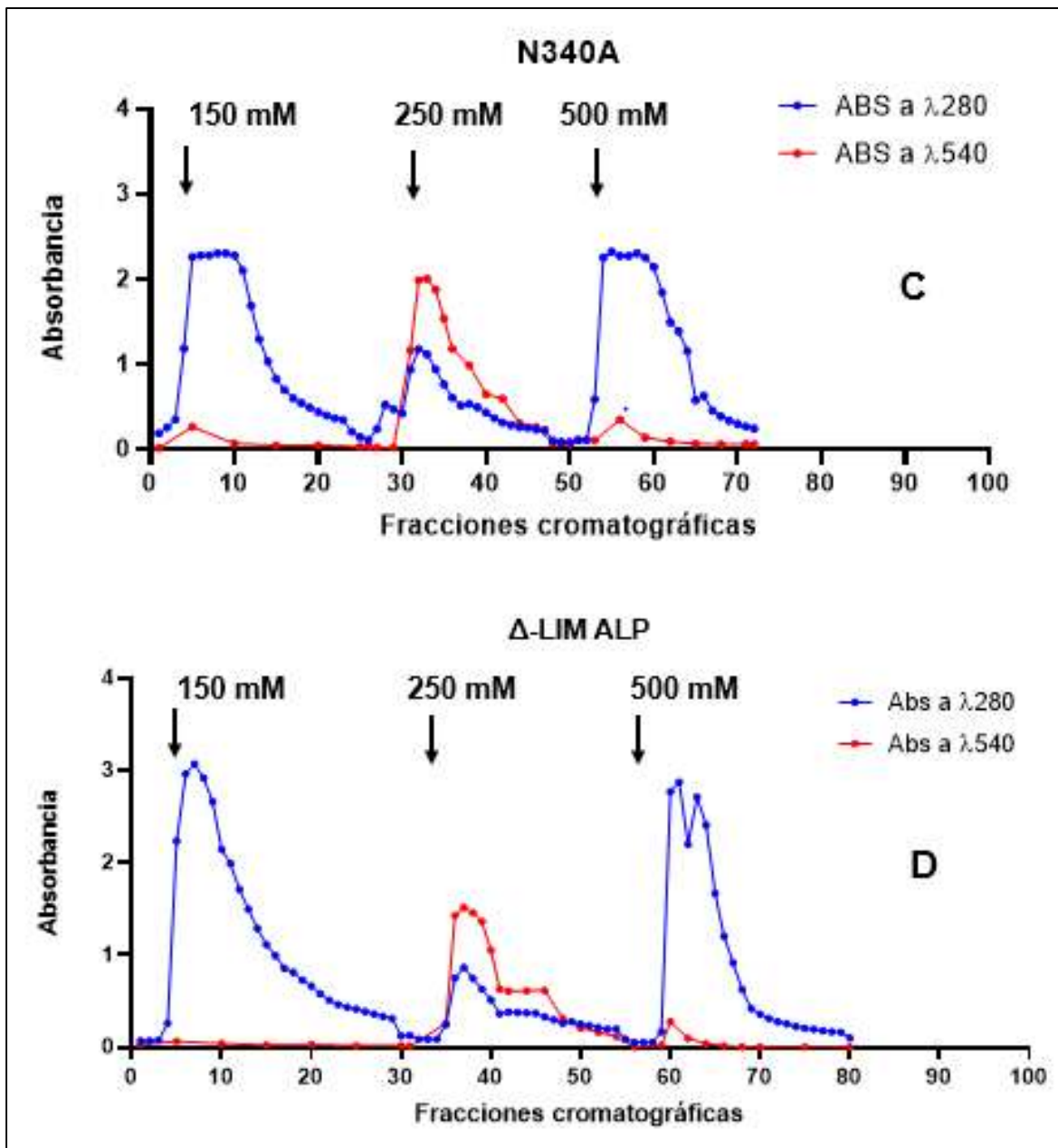


Figura 15. Perfil cromatográfico de las mutantes simples y Δ LIM-ALP, desde la columna de intercambio aniónico DEAE-celulosa (Tris 10 mM, pH 7.5). En azul se muestran aquellas fracciones medidas a λ 280 nm, y en rojo aquellas muestras que se les midió actividad agmatinasa a través del método colorimétrico de Archibald (1945), medidas a λ 540 nm. Las flechas indican los gradientes de KCl a los que se eluyeron las proteínas. **A.** Mutante E190A. **B.** Mutante Q339A. **C.** Mutante N340A. **D.** Δ LIM-ALP.

Para analizar el grado de pureza de las purificaciones, se realizó un SDS-PAGE al 10%, donde se cargó el marcador de peso para proteínas Precision Plus Protein Standards (Dual Color), la albúmina de suero de bobino (BSA, 0.5 µg/mL, 66 kDa) y las muestras de las mutantes simples y Δ LIM-ALP (Fig. 16).

Las mutantes se identificaron a través de la técnica de Western blot, utilizando un anticuerpo policlonal anti-ALP, identificando las variantes (50 KDa), Fig 17.

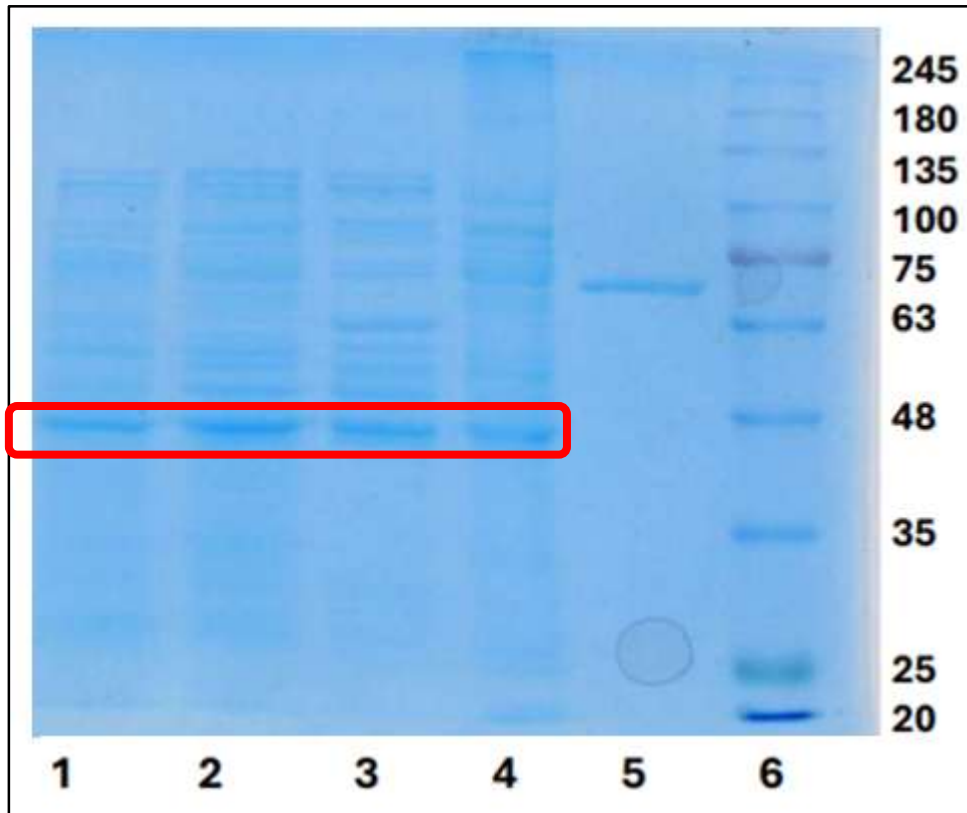


Figura 16. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10%. Carril: 1. Δ LIM-ALP; 2. Mutante N340A; 3. Mutante Q339A; 4. Mutante E190A; 5. Marcador BSA Mutante N340A; 6. Marcador de peso molecular.

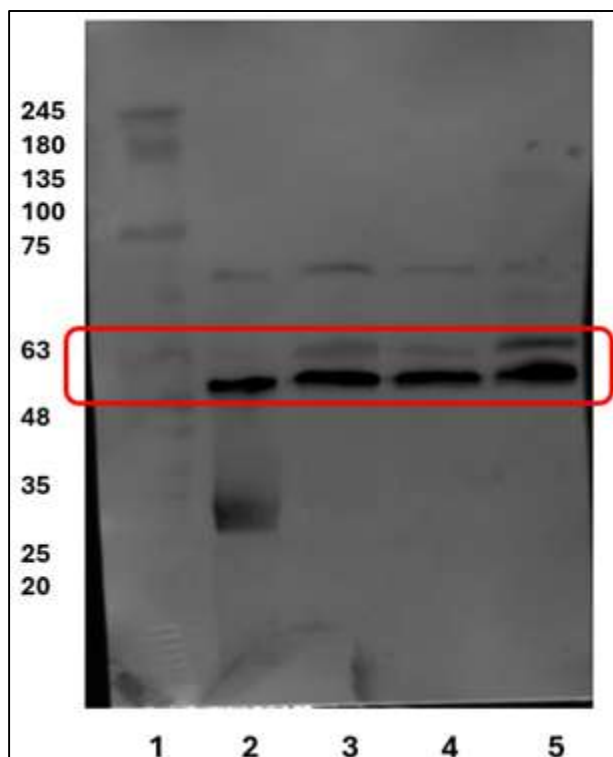


Figura 17. Identificación de mutantes simples por Western blot. Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-ALP diluido 1:2000. Carril: 1. Marcador de peso molecular; 2. Mutante E190A; 3. Mutante Q339A; 4. Mutante N340A; 5. Δ LIM-ALP.

Determinación de parámetros cinéticos

Para determinar los parámetros cinéticos de las mutantes simples se realizaron curvas de saturación (Fig. 18 y 19), siguiendo el método de detección de urea de Archibald descrito anteriormente, se midieron las soluciones obtenidas a una λ 540 nm, luego, se ingresaron los datos al software GraphPad Prism 9, donde, las gráficas de las curvas de saturación presentaron patrones hiperbólicos (Fig. 18). Con el mismo software, se realizó un ajuste no lineal a las gráficas, para poder determinar los parámetros de interés.

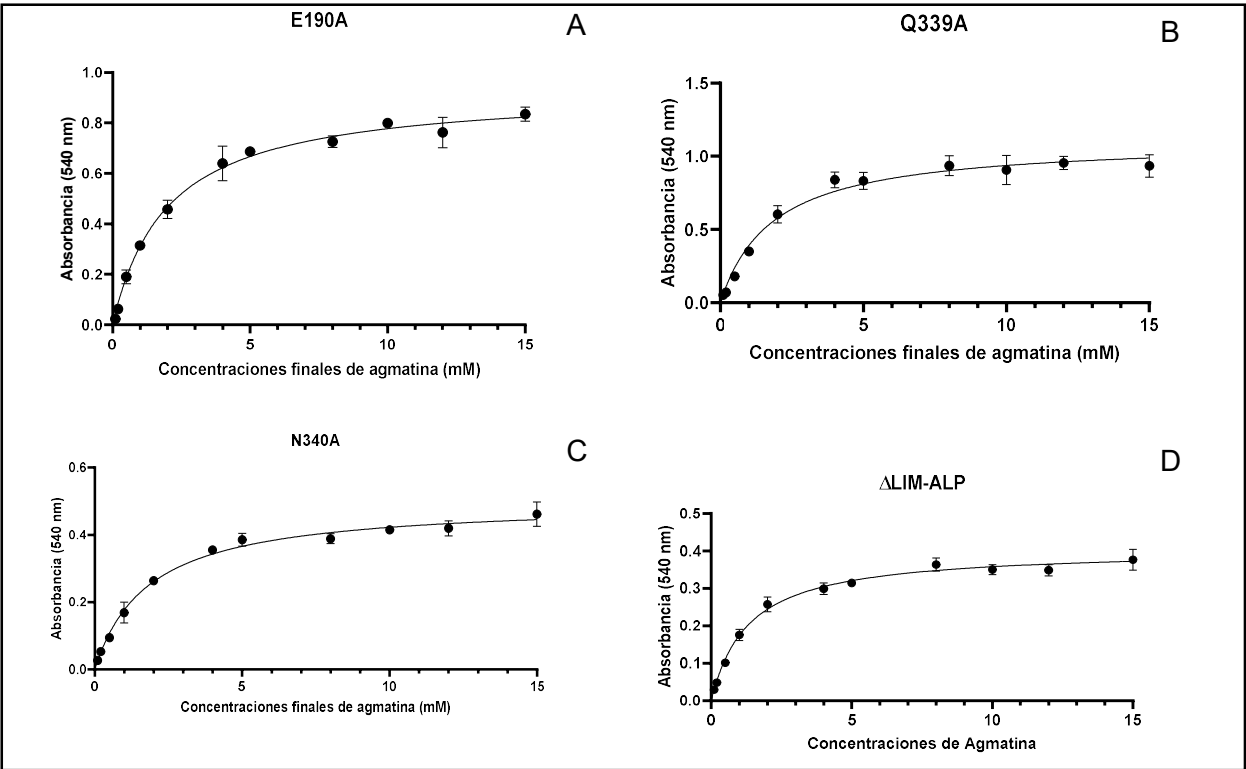


Figura 18. Curvas de saturación para las enzimas mutantes simples y Δ LIM-ALP. Las concentraciones finales de agmatina para los ensayos fueron: 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 5, 8, 10, 12 y 15 mM. A) E190A, B) Q339A, C) N340A y D) Δ LIM-ALP. Experimento representativo de 3 réplicas.

En la Tabla 4 se resumen los parámetros cinéticos, las $V_{m\acute{a}x}$ están normalizadas a una concentración de 75 μ g de proteínas totales. Se observa que las variantes simples E190A, Q339A y N340A presentaron un alza en sus K_m de un 30%, 40% y 39%, respecto de la enzima silvestre. Por otro lado, los valores de las $V_{m\acute{a}x}$ de las mutantes simples se incrementaron en un 22% para la mutante E190A y en un 207% para la mutante Q339A, mientras que la mutante N340A redujo en un 47% su valor de $V_{m\acute{a}x}$.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de las mutantes simples y Δ LIM-ALP.

Variante	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (Abs _{540nm} /15min/75 μ g de prot.)
E190A	1,98 \pm 0.16	0,77 \pm 0.02
Q339A	1,84 \pm 0.20	1,94 \pm 0.03
N340A	1,82 \pm 0.13	0,33 \pm 0.01
Δ LIM-ALP	1,31 \pm 0.09	0,63 \pm 0.00

Se observan incrementos para los valores de K_m de las mutantes simples respecto a Δ LIM-ALP, mientras que las $V_{m\acute{a}x}$ de las mutantes presentaron valores variados.



Figura 19. Tubos de reacción correspondientes a la curva de saturación de la mutante Q339A. Se observa una intensificación progresiva de la reacción colorimétrica asociada a la detección de urea, en función del aumento en la concentración del sustrato agmatina.

Efecto de Mn^{2+} , diálisis e hiperactivación a 60°C en las variantes mutadas

Estudiamos el efecto de diferentes factores sobre la actividad catalítica de la enzima, entre ellos, presencia y ausencia del cofactor Mn^{2+} , efecto de diálisis contra buffer Tris 5 mM pH 7,5 por 2 horas y el fenómeno de hiperactivación enzimática, comportamiento propio de las enzimas arginasas. La hiperactivación involucra un incremento significativo de la actividad ureohidrolasa producto de una incubación a 60°C con Mn^{2+} , se ha descrito que se genera un cambio conformacional que estabiliza el centro binuclear de Mn^{2+} en el sitio activo de la enzima (Uribe *et al.*, 2020). Para esto, comparamos la actividad catalítica de muestras dializadas y no dializadas, en presencia y ausencia de Mn^{2+} , también una muestra fue incubada previamente a 60°C en presencia y ausencia de su cofactor Mn^{2+} , luego se enfriaron en hielo y se midió la actividad agmatinasa. Como control (-) se usaron muestras proteicas sin dializar y sin pre-incubar a 60°C.

En la Fig. 20 se grafican las actividades obtenidas en cada tratamiento y el control. Se observa que la actividad de la enzima silvestre y las mutantes incrementa muy poco al adicionar Mn^{2+} , la actividad disminuye con la diálisis hasta aproximadamente la mitad y no se recupera al adicionar Mn^{2+} posterior a la diálisis. Estos efectos se ven más claramente en la mutante Q339A que presenta mayor actividad. Al incubar a 60°C en presencia de Mn^{2+} la actividad de todas las variantes aumentó significativamente, también aumentó en la enzima dializada. Sin embargo, la magnitud de la hiperactivación es menor en la variante Q339A. El calentamiento en ausencia de Mn^{2+} inactivó completamente a todas las variantes.

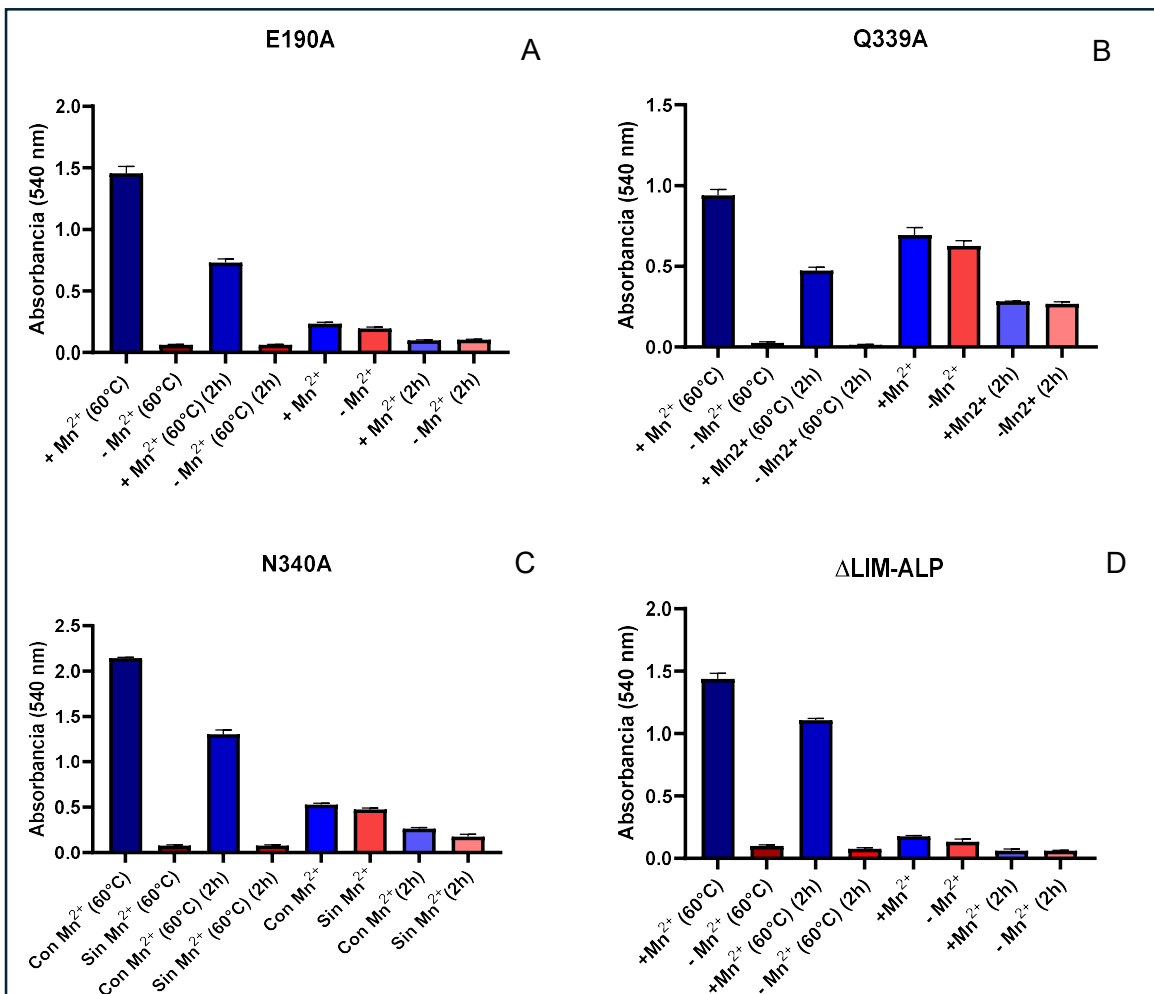


Figura 20. Efecto presencia/ausencia de Mn²⁺, diálisis e hiperactivación a 60°C en las variantes mutadas y ΔLIM-ALP. Las barras azules indican aquellas muestras que fueron tratadas con Mn²⁺ (concentración final 10 mM), las barras rojas aquellas muestras que no fueron tratadas con Mn²⁺. Las primeras 4 barras más oscuras indican aquellas muestras que fueron calentadas a 60°C, las más claras aquellas que no fueron pre-incubadas. **A)** E190A, **B)** Q339A, **C)** N340A y **D)** ΔLIM-ALP.

Ensayos de activación en el tiempo de las variantes mutadas

Estudiamos el efecto de hiperactivación de las mutantes en el tiempo y las comparamos con Δ LIM-ALP. Las muestras se pre-incubaron a 60°C a distintos tiempos, se enfriaron en hielo y luego se incubaron a 37°C. Las mutantes simples y Δ LIM-ALP presentan un comportamiento general similar, su actividad catalítica se incrementa hasta los 8 minutos de pre-incubación a 60°C, y luego, llega a un plató donde su actividad enzimática presenta un patrón irregular hasta los 15 minutos (Fig. 21).

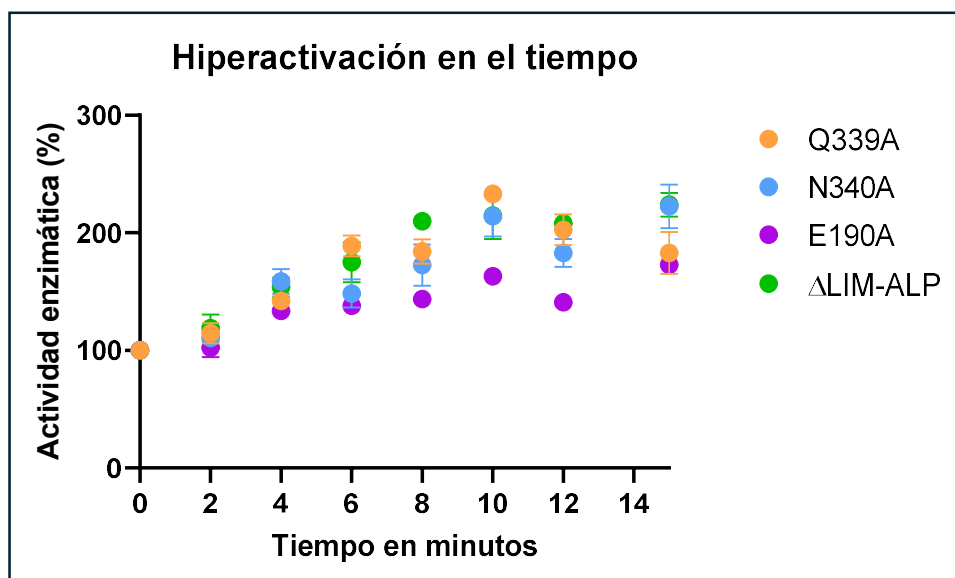


Figura 21. Efecto de hiperactivación en el tiempo de las mutantes simples y Δ LIM-ALP. Círculos: Púrpura: E190A, Naranja: Q339A, Celeste: N340A y en Verde: Δ LIM-ALP.

Actividad de las variantes mutadas con diferentes metales divalentes

Se evaluó la actividad de las mutantes simples y Δ LIM-ALP con distintos metales, como cofactores metálicos se utilizó Mn^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} y Ni^{+2} . Como podemos ver en los gráficos (Fig. 22), el comportamiento general de las mutantes simples es similar al de la enzima control Δ LIM-ALP. Mg^{2+} y Mn^{2+} activaron levemente las variantes, especialmente el último. Ca^{2+} no tuvo efecto en la actividad y Co^{2+} y Ni^{2+} inhibieron la actividad agmatinasa.

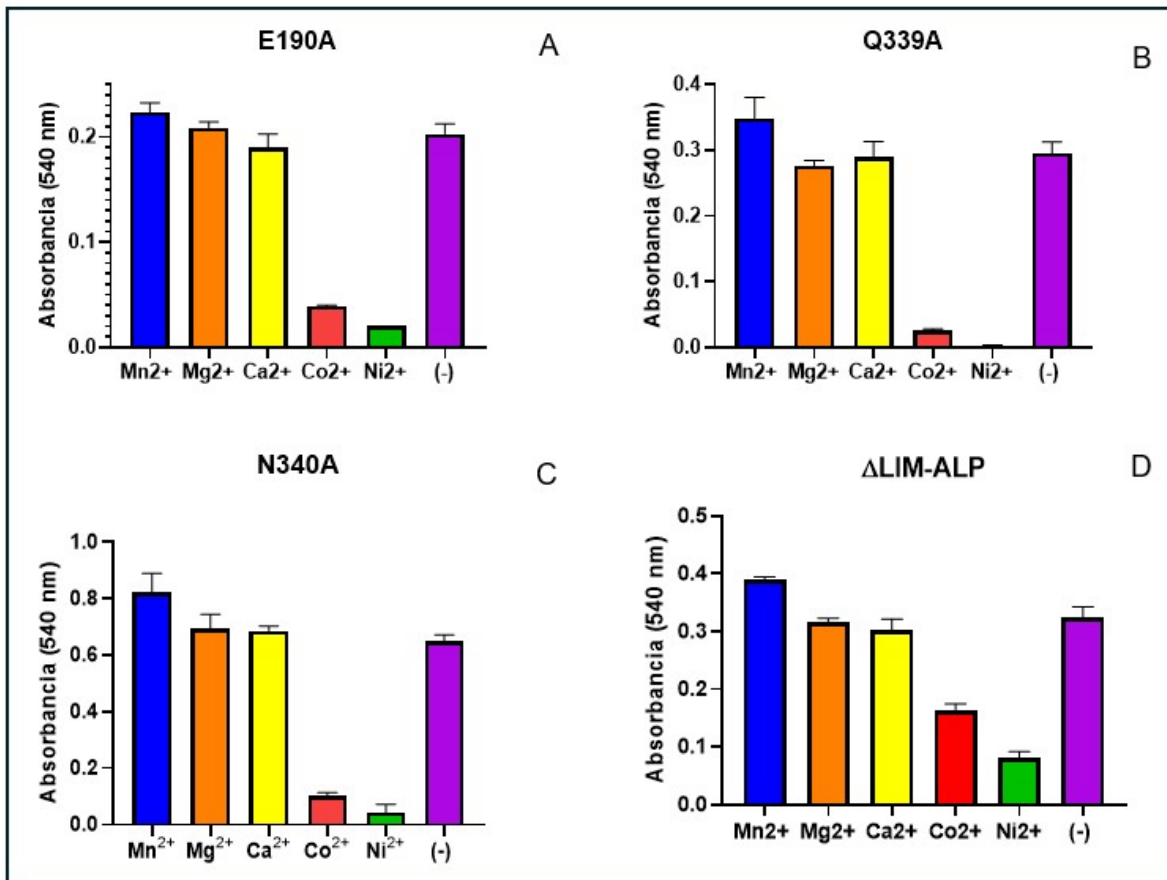


Figura 22. Interacción de las variantes mutadas y Δ LIM-ALP frente a diferentes metales. Barras: Azul: Mn^{2+} , Anaranjado: Mg^{2+} , Amarillo: Ca^{2+} , Rojo: Co^{2+} , Verde: Ni^{2+} , Púrpura: Control (-). A) E190A, B) Q339A, C) N340A y D) Δ LIM-ALP.

DISCUSIÓN

Considerando las múltiples funciones fisiológicas que desempeña la agmatina en mamíferos, como la regulación de la excreción de sodio, la liberación de insulina y catecolaminas, así como sus potenciales aplicaciones terapéuticas, incluyendo propiedades anticonvulsivas, antidepresivas, y su uso como alternativa para el tratamiento del síndrome de abstinencia, enfermedad de Parkinson y/o Alzheimer (Zamanian et al., 2024), el estudio de las enzimas involucradas en la regulación de los niveles de agmatina es relevante para avanzar en el desarrollo de su potencial farmacológico. En relación con las agmatinasas en mamíferos, hasta el momento, ALP es la única enzima con actividad hidrolítica sobre agmatina, ya que, estudios han revelado que la agmatinasa humana no presenta actividad enzimática sobre agmatina, pero si hidroliza otras moléculas guanidínicas como guanidino butirato (Sinn *et al.*, 2022).

En general, las metaloureohidrolasas comparten un sitio activo altamente conservado, compuesto por residuos que coordinan iones Mn^{2+} , correspondientes a dos aspartatos y seis histidinas. 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 (Maturana et al., 2021).

Sin embargo, como se mencionó en la introducción, ALP carece de los residuos clásicos de coordinación presentes en otras enzimas de la familia. Para estudiar los residuos que participan en la coordinación de iones Mn^{2+} en ALP se han realizado diversos estudios, en primer lugar, se generaron mutantes simples de los 5 residuos de histidina de ALP (Quiñones *et al.*, 2015), de los cuales, solo la mutante H206A mostró diferencias significativas respecto al control, disminuyendo 10 veces su afinidad por Mn^{2+} . A continuación, se realizó un modelo estructural de ALP (Reyes *et al.*, 2020) y se propusieron una serie de residuos (E190, N213, Q215, D217, E288

y K290) como posibles coordinantes del metal activador. A continuación se generó una mutante doble (E288/K290) y una mutante triple (N213/Q215/D217), las cuales resultaron inactivas incluso con Mn^{2+} adicionado y pre-incubadas a $60^{\circ}C$ con Mn^{2+} . Estos resultados indicaron que los residuos evaluados eran relevantes para la actividad catalítica de la enzima. Luego, se generaron mutantes simples de cada uno de ellos, de las cuales, se concluyó que se encontraban en la vecindad del sitio activo de ALP, dado que, bastó con reemplazar un solo aminoácido para alterar sus propiedades cinéticas (datos no publicados).

En el presente trabajo se analizó la participación de E190, residuo propuesto para la coordinación de Mn^{2+} , junto con Q339 y N340, localizados en las cercanías del residuo K290.

Para esto, utilizando la isoforma Δ LIM-ALP, se reemplazaron los residuos por alanina, a través de la técnica de mutación sitio dirigida utilizando PCR, y las mutaciones fueron verificadas mediante secuenciación automática. La mutante N340A presento una inserción de 14 aminoácidos aledaña al sitio de la mutación puntual que es importante considerar al analizar los resultados funcionales.

Parámetros cinéticos de la variantes

Las tres variantes mutadas presentaron actividad agmatinasa y al determinar sus parámetros cinéticos, se encontró en las tres un aumento de la K_m entre un 30-40%, lo que podría indicar una alteración desfavorable en la interacción con el sustrato agmatina en los tres casos. En cuanto a la $V_{m\acute{a}x}$, la variante N340A presentó una disminución cercana al 50 %, lo que podría estar influenciado por la inserción de 14 aminoácidos detectada durante la secuenciación. En contraste, la variante Q339A mostró un aumento de más del doble en su $V_{m\acute{a}x}$, sin embargo, este efecto debe ser corroborado con un cálculo más exacto de la k_{cat} de la variante.

Efecto del cofactor Mn²⁺

Los resultados obtenidos muestran que la actividad de la enzima silvestre y de las variantes mutadas aumenta levemente al adicionar Mn²⁺, lo que podría indicar que el sitio de unión del cofactor ya está completo a pesar de que solo el buffer de lisis contenía Mn²⁺. Al someter las proteínas a diálisis, se observó una disminución de la actividad hasta aproximadamente la mitad, y esta no se recuperó tras la adición exógena de Mn²⁺, tanto en las variantes mutadas como en la enzima silvestre. Estos efectos se ven más claramente en la mutante Q339A que presenta mayor actividad. Esto indicaría que en la diálisis se pierde parte del contenido de metal y que no es posible recuperarlo por una simple adición al medir actividad.

La incubación a 60 °C en presencia de Mn²⁺ provocó un aumento significativo en la actividad enzimática de todas las variantes y de la enzima silvestre, tanto en muestras sin diálisis como en aquellas dializadas, aunque en estas últimas el efecto fue de menor magnitud. Este fenómeno de hiperactivación (Hirsch-Kolb et al., 1971) corresponde a un cambio conformacional que se da en la enzima, el cual, posiciona de forma óptima los 2 iones de Mn²⁺. Este cambio corresponde a un paso limitante de la velocidad de la actividad agmatinasa, dado que, si bien ocurre de forma natural a 37°C, se da de forma más rápida en un rango de 55° a 65°C, favoreciendo de esta forma, la reacción catalítica y otorgando termo estabilidad a la enzima. Para la variante Q339A, la magnitud de la hiperactivación es bastante menor, es probable que se deba a que está variante muestra una actividad mucho mayor que las otras y ya está activada.

En contraste, la incubación a 60 °C sin Mn²⁺ resultó en la inactivación completa de todas las variantes y de la enzima silvestre, como se ha descrito previamente (Quiñones et al., 2015). Este hallazgo refuerza la idea de que el proceso de hiperactivación es estrictamente dependiente de la presencia de Mn²⁺.

Al analizar el fenómeno de hiperactivación a través del tiempo, tanto las variantes como la enzima silvestre mostraron un comportamiento similar: un aumento lineal en la actividad hasta los 6–8 minutos, seguido de una meseta que se mantiene hasta los 15 minutos, tras lo cual se observa una pérdida de estabilidad.

En estudios con otros residuos mutados del posible sitio de unión a Mn^{2+} en ALP, las variantes mostraron aumentos mayores en la hiperactivación de hasta 300-400% (datos no publicados).

Finalmente, al evaluar la actividad de las mutantes simples y la silvestre con distintos metales, el comportamiento es similar, solo se observó un efecto aún más inhibitorio para Co^{2+} y Ni^{2+} en la mutante Q339A.

CONCLUSIONES

- Los tres residuos mutados (E190, Q339 y N340) afectaron los parámetros cinéticos de la variante Δ LIM-ALP, lo que indica una alteración en la interacción de la enzima con su sustrato, la agmatina. Sin embargo, estos residuos no son críticos para la actividad de la enzima.
- La inserción en la mutante N340A afectó tanto la K_m como la $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima, pero no su interacción con el metal activador.
- Los residuos estudiados no participan directamente como ligandos coordinantes del metal activador Mn^{2+} , puesto que en cada mutante simple no se alteraron las propiedades funcionales del complejo enzima-metal activador.

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. (1984). Isolation and partial purification of a clonidine-displacing endogenous brain substance. *European journal of biochemistry*, 144(2), 287-293.
- 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.
- Castro, V., Fuentealba, P., Henríquez, A., Vallejos, A., Benítez, J., Lobos, M., ... Uribe, E. (2011). Evidence for an inhibitory LIM domain in a rat brain agmatinase-like protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 512, 107–110.
- Cofré, J., Montes, P., Vallejos, A., Benítez, J., García, D., Martínez-oyanedel, J., ... Uribe, E. (2013). Further insight into the inhibitory action of a LIM / double zinc- finger motif of an agmatinase-like protein. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2, 10–13.
- Fuentes, A., 2024. "Análisis de los residuos relevantes en la coordinación con el cofactor manganeso en la agmatinase like Protein (ALP). Tesis de grado, Universidad de Concepción.
- 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.
- Hirsch-Kolb, H., Kolb, H. J., & Greenberg, D. M. (1971). Nuclear magnetic resonance studies of manganese binding of rat liver arginase. *Journal of Biological Chemistry*, 246(2), 395–401.
- Hong, S., Hara, H., Shimazawa, M., Hyakkoku, K., Kim, C. Y., & Seong, G. J. (2012). Retinal protective effects of topically administered agmatine on ischemic ocular injury caused by transient occlusion of the ophthalmic artery. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(3), 212–215.
- Hyung, J. A., Kyoung Hoon, K., Jiah, L., Jun-yong, H., Hyung Ho, L., Dojin, K., ... Se Won, S. (2004). Crystal Structure of Agmatinase Reveals Structural Conservation and Inhibition Mechanism of the Ureohydrolase Superfamily *. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 50505–50513.
- Lee, W. T., Hong, S., Hwan, S., Hwan, J., Kyung, A., Seong, G., & Lee, J. (2009). Neuroprotective effects of agmatine on oxygen-glucose deprived primary-cultured astrocytes and nuclear translocation of nuclear factor-kappa B. *Brain Research*, 1281, 64–70.
- Li, G., Eshraghi, J., Regunathan, S., Cooper, R., Barrow, C., & Reis, D. (1994). Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science*, 263(5149), 966–969.
- Mella, C., Martínez, F., de los Ángeles García, M. *et al.* (2010). Expresión y localización de una proteína similar a la agmatinasa en el cerebro de rata. *Histochem Cell Biol* 134 , 137-144.
- Perozich, J., Hempel, J., & Morris, S. M. (1998). Roles of conserved residues in the arginase family. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1382, 23–37.
- Quiñones, M., Cofre, J., Benítez, J., García, D., Romero, N., González, A., ... Uribe, E. (2015). Insight on the interaction of an agmatinase-like protein with Mn 2+ activator ions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 145, 65–69.
- Raasch, W., Schafer, U., Chun, J., & Dominiak, P. (2001). Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. *British Journal of Pharmacology*, 133, 755–780.
- Reis, D. J., & Regunathan, S. (2000). Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends in Pharmacological Sciences*, 21, 31–34.

- 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.
- 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.
- Scolnick, L. R., Kanyo, Z. F., Cavalli, R. C., Ash, D. E., & Christianson, D. W. (1997). Altering the Binuclear Manganese Cluster of Arginase Diminishes Thermostability and Catalytic Function. *Biochemistry*, 36(34), 10558–10565.
- 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.
- 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 ureohydrolyases 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.
- Zamanian, MY., Nazifi, M., Khachatryan, LG., Taheri, N., Ivraghi, MS., Menon, SV, Hussein, B., Prasad, KDV., Petkov, I., Nikbakht, N. (2024). The Neuroprotective Effects of Agmatine on Parkinson's Disease: Focus on Oxidative Stress, Inflammation and Molecular Mechanisms. *Inflammation*. <https://doi.org/10.1007/s10753-024-02139-7>.