

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION



**Aspectos Estructurales y Cinéticos
de la Interacción de la Arginasa Humana Tipo II
con Sustratos, Iones Metálicos e Inhibidores**

Tesis doctoral presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, mención Biología Celular y Molecular

Por

Vasthi López Palma

2004

RESUMEN

Los mamíferos contienen dos isoenzimas de arginasas: una citosólica, localizada fundamentalmente en hígado (arginasa tipo I), y otra mitocondrial, característica de tejidos extrahepáticos (arginasa tipo II).

Hasta ahora, la mayor parte de los estudios se han concentrado en la arginasa tipo I, a pesar de un interés creciente por la participación de la isoenzima II en la regulación de los niveles de arginina disponibles, especialmente, para la síntesis de óxido nítrico. Como una manera de contribuir al conocimiento de la isoenzima II, este trabajo de tesis doctoral tuvo los siguientes objetivos generales: (a) analizar las propiedades cinéticas de la isoforma II; (b) demostrar que, al igual que la isoforma I, especies de la arginasa humana II que contienen 1 Mn^{2+} /subunidad, son catalíticamente activas, aunque pueden ser hiperactivadas por unión de un segundo Mn^{2+} , (c) definir, mediante mutagénesis sitio-dirigida, la participación de los residuos conservados en la familia de las arginasas (His-120, His-145, His-160, Asp-147, Asn-149) en la interacción de la enzima con el sustrato y los iones metálicos activadores y su eventual participación en la catálisis.

En nuestra opinión, los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen en forma significativa al conocimiento de la enzima arginasa y, especialmente, de la isoforma humana II, en tres aspectos fundamentales: (a) Hemos demostrado que las especies mononucleares son catalíticamente activas y, en base a sus propiedades cinéticas, estamos en condiciones de sugerir que ellas constituyen la forma fisiológicamente relevante de la enzima; (b) Hemos demostrado que, pesar de las similitudes en términos de secuencia y estructura terciaria y cuaternaria, existen diferencias significativas en los sitios activos de las isoformas de arginasa humana, las que se reflejan en sus interacciones con el metal activador, el sustrato e inhibidores; (c) Mediante mutagénesis sitio-dirigida, hemos sido capaces, de alterar la especificidad de una especie de arginasa, convirtiendo a la enzima II en proteína con actividad agmatinasa, lo que no tiene precedente en la literatura.

La actividad catalítica de una preparación purificada de arginasa tipo II fue prácticamente duplicada por incubación con Mn^{2+} 2 mM durante 20 minutos a 60 °C (hiperactivación). La enzima presentó una cinética hiperbólica al pH óptimo de 9,5, tanto en su estado hiperactivado, como semi-activado. Por el contrario, a pH 7,5, la hiperactivación se acompañó de un cambio desde una cinética cooperativ a una hiperbólica. Los efectos cooperativos para el sustrato desaparecieron en presencia de bajas concentraciones de agmatina, un análogo estructural del sustrato e inhibidor competitivo de la enzima, lo que sugiere la presencia de un sitio alostérico en la enzima tipo II. Al igual que la cooperatividad para el sustrato, la funcionalidad de este sitio, expresada como una activación por agmatina a bajas concentraciones de arginina, no se manifiesta en la enzima hiperactivada, y tampoco en la enzima tipo I.

En base a estudios cinéticos de inhibición en presencia del producto ornitina y los análogos de la ornitina (putrescina) y urea (ion Gdn^+), proponemos un mecanismo cinético que comprende la unión de la arginina como el primer sustrato, la liberación secuencial ordenada de ornitina y urea, y la formación de un complejo abortivo enzima-ornitina.

Considerando las propiedades de las mutantes H120N y H145N, sugerimos que la actividad de la arginasa tipo II, depende estrictamente de un Mn^{2+} unido firmemente a la proteína coordinado por la His-120, aunque esta actividad puede ser estimulada por otro Mn^{2+} que se une en forma más lábil, coordinado por la His 145. Este último ion manganeso sería necesario sólo para llevar a la arginasa de un estado activo a uno de mayor actividad. Los estudios de mutagénesis sitio-dirigida también sugieren una función esencial para la asparagina-147, probablemente estabilizando al agente nucleofílico, mediante un puente hidrógeno. Sugieren, además, que la histidina-160 es crítica, pero no esencial, para la actividad catalítica de la arginasa tipo II, probablemente permitiendo una adecuada orientación del sustrato, y participando como una lanzadera de protones desde el solvente al grupo ϵ -amino de la ornitina, previo a la disociación del producto.

Un resultado particularmente interesante lo constituyó la actividad agmatinásica de la mutante N149D, que no presentó actividad arginasa, lo que podría explicarse por una

repulsión entre la carga negativa introducida y el grupo α -carboxilo del sustrato. Por el contrario, al carecer de este grupo, la agmatina podría unirse y ser hidrolizada por la enzima. Este y otros residuos vecinos serían los determinantes de las diferencias de especificidad entre la arginasa y la agmatinasa.

