

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION



Estudio de los determinantes estructurales de las diferencias de especificidad entre la arginasa de hígado humano y la agmatinasa de *Escherichia coli*.

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, área Biología Celular y Molecular.

Por

María Soledad Orellana Orellana

Tutor: Dr. Nelson Carvajal B.

2009

RESUMEN

Las analogías entre la arginasa y la agmatinasa incluyen la estructura de sus sustratos (la agmatina es el derivado descarboxilado de la arginina), las reacciones que catalizan (hidrólisis con producción de urea), el requerimiento de Mn^{2+} , las funciones equivalentes de residuos específicos y el mecanismo cinético de la reacción. Esto contrasta con sus marcadas diferencias de especificidad, ya que el sustrato de una prácticamente no es hidrolizado por la otra.

Al comparar las estructuras cristalinas disponibles para las arginasas de hígado humano, de hígado de rata y de *B. caldovelox*, un modelo estructural que hemos generado para la agmatinasa de *E. coli* y la estructura cristalina de la agmatinasa de *D. radiodurans*, se observa una importante diferencia en la extensión de un lazo que contribuye a la formación del sitio activo y que contiene los residuos que interaccionan con el grupo alfa carboxilo de la arginina. Considerando estos hechos, en este trabajo hemos propuesto que los determinantes estructurales de la especificidad de la arginasa y la agmatinasa están dados por la secuencia y la estructura que presenta el lazo que comprende desde la Ala-125 a la Pro-144 en la arginasa de hígado humano. Esta secuencia contribuye a la formación del sitio activo y contiene los residuos que unen el grupo alfa carboxilo de la arginina; los aminoácidos que forman este lazo y la estructura que estos adoptan determinarían la correcta ubicación de la red de puentes de hidrógeno que permite a la arginasa no sólo unir a la arginina, sino que ubicarla en una posición correcta para su hidrólisis. Algo equivalente ocurriría en el caso de la agmatinasa, que sólo reconoce e hidroliza a la agmatina. Específicamente, este trabajo de tesis doctoral tuvo los siguientes objetivos: (a) definir, mediante mutagénesis sitio dirigida, en la arginasa hepática humana, la participación de los

residuos Asn-130, Ser-137 y Asn-139 en la especificidad por la arginina; (b) generar especies quiméricas de arginasa de hígado humano, reemplazando los residuos I129 a P144 para el lazo A y P181 al L193 para el lazo B, por los correspondientes según el alineamiento aminoacídico con la agmatinasa de *E. coli*; (c) generar especies quiméricas de agmatinasa de *E. coli* reemplazando los residuos T154 al D162, para el lazo A y T188 al F190 para el lazo B, por los correspondientes en la arginasa hepática humana; (d) analizar las especies mutantes y quiméricas, mediante estudios cinéticos de velocidad inicial e inhibición por productos y análogos estructurales de los sustratos y los productos, de las respectivas reacciones de hidrólisis; (e) analizar la interacción de las enzimas con el metal y (f) analizar las propiedades estructurales de las especies quiméricas, incluyendo la determinación de los tamaños moleculares y análisis de sus propiedades espectrales mediante fluorescencia intrínseca de triptófanos.

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan nuestra hipótesis respecto a la función del lazo A en la arginasa. Concretamente, hemos sido capaces de alterar la especificidad de la arginasa, al generar la especie quimérica que sólo es activa con agmatina como sustrato, por los reemplazos I129→T, N130→Y y T131→A junto a la eliminación de los residuos 132, 133 y 134, todos ellos presentes en el lazo donde están ubicados aquellos que unen el grupo alfa carboxilo de la arginina. De esta forma, concluimos que el lazo que interacciona con el grupo alfa carboxilo del sustrato sería determinante para discriminar el tipo de sustrato que es susceptible de hidrólisis, además de ubicarlo en una posición correcta con respecto al ion hidroxilo que realizaría el ataque nucleofílico para generar la reacción de hidrólisis.

En forma paralela, hemos encontrado una región crítica para la afinidad de la unión de la arginasa con la arginina, que corresponde al lazo donde se encuentran los residuos que interactúan con el grupo alfa amino de la arginina. Específicamente, luego del reemplazo conjunto de los residuos D181→T y V182→E se obtuvo una especie que mantuvo su valor de k_{cat} prácticamente inalterado con un aumento muy significativo de la K_m para arginina.

Por otro lado, hemos analizado diversas especies quiméricas de la agmatinasa, modificando los residuos de ambos lazos por separado y en conjunto, mediante reemplazos equivalentes a los realizados en la arginasa. Sin embargo, todas las especies generadas sólo presentaron actividad con agmatina como sustrato. Los resultados obtenidos sugieren que, a diferencia de la arginasa, los lazos A y B no contribuirían en forma exclusiva a la especificidad de la agmatinasa, existiendo otras zonas que también contribuirían a la correcta localización de la agmatina para una hidrólisis eficiente en el sitio activo de la agmatinasa. Dado que estas regiones no fueron incluidas en nuestros experimentos, esto explicaría por qué alteraciones en el lazo A tienen efecto sobre la especificidad de sustrato de la arginasa, pero no de la agmatinasa.