

ESCUELA DE GRADUADOS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

CARACTERIZACION MOLECULAR Y CINETICA DE LA AGMATINASA DE
***Escherichia coli*: MUTAGENESIS SITIO DIRIGIDA Y MODELAJE MOLECULAR**



MÓNICA ROXANA SALAS GRÁNDEZ
TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
MENCIÓN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

2003

RESUMEN

La agmatinasa (EC 3.5.3.11) cataliza la hidrólisis de la agmatina en putrescina y urea. La agmatina resulta de la hidrólisis de la arginina, catalizada por la arginina descarboxilasa, y es un precursor de la síntesis de poliaminas en bacterias y vegetales y, de acuerdo a recientes estudios, podría desempeñar un rol como neurotransmisor en el cerebro de la rata. Considerando las homologías entre las reacciones catalizadas por la agmatinasa y la arginasa, las relaciones estructurales entre sus sustratos, y la existencia de residuos conservados en sus secuencias aminoacídicas, se considera que estas enzimas pertenecen a una misma familia de proteínas (*familia de las arginasas*). Se piensa que los miembros de esta familia habrían divergido a partir de un origen evolutivo común, para alcanzar cada una de ellas su particular especificidad de sustrato.

Hasta el momento, se dispone de una gran cantidad de información en relación con la arginasa de distintos organismos y tejidos. Más aún, se ha logrado resolver, mediante difracción de rayos x, la estructura de las arginasas de hígado de rata y de *Bacillus caldovelox*. En contraste, la información referente a la agmatinasa es mucho más reducida, y sólo en los últimos años se ha logrado demostrar el requerimiento de iones metálicos y se ha iniciado la identificación de residuos de su sitio activo.

Para un mejor conocimiento de los aspectos funcionales y estructurales de la agmatinasa, en este trabajo se realizaron estudios de modificación química y mutagénesis sitio dirigida y se desarrolló un modelo estructural basado en la homología de la agmatinasa de *E. coli* con la arginasa. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de un centro bimetálico de Mn^{+2} en la agmatinasa de *Escherichia coli*; en este centro binuclear, uno de los Mn^{+2} sería esencial para la catálisis, mientras que el segundo cumpliría una función moduladora. Por otro lado, los estudios

de modificación química y mutagénesis sitio dirigida, apoyan la participación de la His163 y del Asp153 en la función catalítica de la enzima. En los estudios de modelaje molecular por homología de secuencia, se tomó como estructura de referencia a la arginasa de *B. Caldovelo*. La estructura modelada fue muy similar a la de la estructura de referencia, con respecto al número y disposición de elementos estructurales (α -hélices y hojas- β). En general, las diferencias entre las arginasas de *B. caldovelo* y de hígado de rata, son prácticamente las mismas que existen con la agmatinasa y corresponden a las regiones de “*loops*” superficiales. La única excepción son dos “*loops*” localizados a la entrada del sitio activo y determinados por un esqueleto carbonado y algunas cadenas laterales bastante conservadas en las arginasas de *B. caldovelo* y de hígado de rata. Se centró la atención en una región que presenta las mayores diferencias con la arginasa y que comprende un “*loop*” que incluye los residuos C159, Y155 y F161. Dado que en la correspondiente región en la arginasa se localizarían los residuos que participarían en la unión de arginina y el proceso catalítico propiamente tal, nuestra atención se enfocó en esta región, como un intento inicial para entender las diferencias en especificidad entre estas enzimas. El análisis del modelo sugirió la posibilidad de que inserciones introducidas en la mutante triple, incorporando los aminoácidos que formen la correspondiente región en arginasa pudieran originar especies enzimáticas capaces de utilizar la arginina como sustrato. Aún cuando ninguno de los cambios introducidos en esta zona dieron los resultados esperados, este es un aspecto en el cual debiera de insistirse incluyendo la probabilidad de introducir especies quiméricas entre arginasa y agmatinasa.