

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



**CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE AGMATINASA DE
Escherichia coli Y MUTANTE N130DS137C DE ARGINASA
RECOMBINANTE DE HÍGADO HUMANO CON
ACTIVIDAD AGMATINASA**

Tesis de Magíster presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción
como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en ciencias, mención
Bioquímica

Por

PAULA FABIOLA ENRÍQUEZ VERA

Tutor: Dr. Nelson Carvajal Baeza

2005

RESUMEN

La arginasa (EC 3.5.3.1) y la agmatinasa (EC 3.5.3.11) catalizan reacciones de hidrólisis de un sustrato guanidínico y generar urea como uno de los productos. Aparte de las homologías estructurales entre sus sustratos (la agmatina resulta de la descarboxilación de la arginina por la arginina descarboxilasa), las secuencias aminoacídicas de estas enzimas presentan un alto grado de homología, lo que ha llevado a incluirlas en la llamada “*familia de las arginasas*”, considerándose que 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 dispone de la estructura tridimensional de las isoformas de arginasa de mamífero y de la enzima de *Bacillus caldovelox*. Por el contrario, la información referente a la agmatinasa es muy 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. Además, se ha resuelto la estructura cristalina de la agmatinasa de *Deinococcus radiodurans* y, en nuestro laboratorio, hemos desarrollado un modelo estructural para la enzima de *Escherichia coli*.

El análisis de las secuencias aminoacídicas revela la presencia de residuos altamente conservados en los miembros de la familia de las arginasas y sus estructuras muestran también un alto grado de homología. Entre los residuos conservados se destacan algunos que participarían en la interacción de estas enzimas con su respectivo sustrato y el ión metálico. Por su parte, la superposición de sus estructuras muestra una significativa diferencia en un lazo (“loop”) que, en el caso de la arginasa, contiene residuos que interaccionarían con los

grupos α -amino y α -carboxilo de la arginina. Dado que el loop correspondiente a la agmatina es más corto, nuestra hipótesis es que esta zona es determinante para las diferencias de especificidad entre la arginasa y la agmatinasa.

Como una manera de contribuir al mejor conocimiento de las propiedades catalíticas de la agmatinasa, en este trabajo hemos analizado las características cinéticas de la enzima de *E. coli*. Además, mediante mutagénesis sitio-dirigida reemplazamos por alanina el glut-274, un residuo que estaría involucrado en la interacción de la enzima con el grupo guanidino del sustrato. Por último, las propiedades cinéticas fueron comparadas con las correspondientes a una mutante N130DS137C de la arginasa humana. Se incluyó esta mutante porque, a diferencia de la enzima silvestre, ella presenta una significativa actividad agmatinasa.

Los estudios de inhibición mostraron que la putrescina y el ión guanidinio, Gdn^+ , se comportan como inhibidores competitivos de la agmatinasa de *E. coli*. Por su parte, la actividad arginasa de la mutante N130DS137C fue inhibida en forma no competitiva por la ornitina y en forma competitiva por Gdn^+ . Para esta mutante, la agmatina se comportó como un inhibidor competitivo con respecto a la arginina. Considerando al Gdn^+ como un análogo estructural de la urea, los resultados obtenidos sugieren un mecanismo al azar y en equilibrio rápido para la agmatinasa y un mecanismo secuencial ordenado para la mutante de arginasa. Esto último contrasta con un mecanismo al azar y en equilibrio rápido derivado para la arginasa silvestre. Resulta, por lo tanto, claro que las mutaciones introducidas en la arginasa determinan una importante alteración estructural en el sitio activo de la enzima, lo que explicaría los cambios de especificidad observados. El cambio sería desde una conformación con dos sitios independientes para la unión de los productos, a otra en que la unión del primer producto es indispensable para la unión del segundo. En la nueva conformación, tanto la

arginina como la agmatina se unirían en una forma apropiada para ser atacadas por el hidroxilo unido a manganeso, lo que explicaría la actividad agmatinasa de la mutante.

Los estudios cinéticos realizados con la mutante E274A mostraron cambios sólo en la actividad catalítica y la interacción de la enzima con el Gdn^+ , pero no con la putrescina, En base a estos resultados concluimos que el Glu274 es requerida principalmente para un correcto posicionamiento del grupo guanidino de la agmatina, para un ataque nucleofílico eficiente por parte de un hidróxido unido al metal.

Los resultados obtenidos aportan importante información en relación con la agmatinasa y las diferencias y semejanzas entre esta enzima y la arginasa.

