



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Magister en Bioquímica y
Bioinformática

Caracterización de la interacción ALP-Mn²⁺



JAIME VLADIMIR COFRÉ RUBILAR
CONCEPCIÓN-CHILE
2013

Profesor Guía: Elena Amparo Uribe Pérez
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

1. RESUMEN

La agmatina es sintetizada por descarboxilación de la L-arginina, reacción catalizada por la enzima arginina descarboxilasa, la que a su vez es hidrolizada por la agmatinasa generando urea y putrescina. Esta amina catiónica se ha asociado a importantes acciones que incluyen: modulación de la liberación de insulina y de la excreción de sodio renal, inhibición de la síntesis de óxido nítrico, reducción de la dependencia al alcohol y morfina, y acciones neurotransmisoras.

Nuestro grupo de investigación ha reportado el clonamiento y expresión de una proteína de cerebro de rata activa como agmatinasa, cuya identidad es tan solo un 12% con respecto a la agmatinasa de *E. coli* (la mejor caracterizada de las agmatinasas). La proteína denominada ALP (*agmatinase like protein*), es la única proteína recombinante de mamíferos con una significativa actividad agmatinasa *in vitro* que ha sido caracterizada cinéticamente. Presenta en su extremo carboxilo un dominio LIM de unión a metales, al cual se le ha asignado un rol regulatorio.

Se ha descrito para agmatinasas y para ALP, la dependencia de Mn^{++} para su actividad catalítica, sin embargo, en ALP no existe evidencia concreta del contenido de Mn^{++} en la enzima. En éste trabajo pudimos detectar y cuantificar en fracciones purificadas y catalíticamente activas de ALP y especies mutantes, la presencia del metal activador Mn^{++} que varió de 1 a 2 por subunidad. Al someter a tratamientos con EDTA y posterior diálisis, las muestras perdieron su actividad y su contenido de Mn^{++} . Debido a la baja identidad de secuencia con los miembros de la familia ureo-hidrolasa, en ALP no es posible identificar mediante métodos bioinformáticos los posibles ligandos del metal activador Mn^{++} , por esto se reemplazó mediante mutagénesis sitio-dirigida, residuos de histidina, reconocidos como ligandos para el metal en las ureo-hidrolasas. Constantes cinéticas, así como análisis de fluorescencia intrínseca de triptófanos y apagamientos con acrilamida de las mutantes H127A, H206A y H435A, indicaron que la catálisis y

estructura de ALP no fue significativamente perturbada por las mutaciones puntuales. Las constantes de disociación (K_d) para Mn^{++} en las distintas especies proteicas, fueron de magnitud comparable, excepto para la mutante H206A cuya constante de disociación (1.8×10^{-7} M) fue un orden de magnitud mayor, lo que indica una menor afinidad de ésta mutante hacia el ion metálico Mn^{++} , sugiriendo que la histidina 206 sería un ligando para este ion. Al incubar fracciones purificadas activas de ALP y especies mutantes en presencia de Mn^{++} a 65 °C, se observó una significativa hiperactivación en la actividad agmatinasa de la enzima silvestre, ALP-trunca en el dominio LIM así como especies H206A y H435A, sólo la mutante H127A no mostró un incremento significativo en su actividad luego de la incubación con Mn^{++} a 65°C, lo que sugiere que este residuo H127 sería crítico para la unión y estabilización de un segundo metal, fenómeno que se produciría en las condiciones de hiperactivación.

Los resultados observados de la interacción enzima-metal activador en ALP son compatibles con conclusiones previas dilucidadas en las ureo-hidrolasas, que argumentan la presencia de un centro binuclear de Mn^{++} en el sitio activo de la enzima. Proponemos que la histidina 206 sería un ligando para el ion Mn^{++} firmemente coordinado, y que la histidina 127 sería crítico para la unión de un segundo metal, necesario para el estado de hiperactivación.