



Universidad de Concepción  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Caracterización enzimática de las variantes de *Agmatinase like protein*  
(ALP) H65A y H394A



Seminario de Título presentado a la  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Para optar al título de Biólogo

Matías José Quiñones San Martín

Concepción, Enero de 2014

## 5. RESUMEN

La agmatina es el producto resultante de la descarboxilación del aminoácido L-arginina, por la acción de la enzima arginina descarboxilasa. La agmatina ha sido asociada a importantes funciones en el organismo, entre las que se incluyen: la modulación de la liberación de la insulina desde las células pancreáticas, la excreción de sodio renal e inhibición de la síntesis de óxido nítrico. A nivel cerebral, se le ha involucrado con acciones neurotransmisoras, antineurotóxicas, anticonvulsivas y antidepresivas. La agmatina es el sustrato de la enzima agmatinasa, la cual, por medio de una hidrólisis genera urea y putrescina, esta última, molécula precursora de poli-aminas complejas como espermidina y espermina.

La agmatinasa humana ha sido clonada y su secuencia conserva todos los residuos esenciales para la unión a metales, como en todos los miembros de la familia de las ureohidrolasas, en donde esta enzima posee un 35% de identidad con la agmatinasa de *Escherichia coli*, siendo esta la mejor caracterizada. En nuestro laboratorio se clonó a partir de una librería de cDNA de cerebro de rata, una proteína con actividad agmatinasa, pero que presenta una baja identidad con la superfamilia de las ureohidrolasas y además carece de los residuos típicos que unen el cofactor metálico. La proteína de aproximadamente unos 62,5 KDa, fue denominada ALP (*agmatinase-like protein*) y es hasta hora la única proteína recombinante de mamífero con actividad agmatinasa caracterizada cinéticamente. Se ha demostrado que ALP es inactivada por medio de diálisis extensa contra 10 mM EDTA y se reactiva al incubarse con 5 mM de  $Mn^{2+}$ . Esta información es de particular importancia, ya que plantea el requerimiento de iones metálicos para la actividad catalítica. También es característico de la superfamilia de las ureohidrolasas la formación de un centro binuclear de  $Mn^{2+}$  para la expresión de su máxima actividad catalítica. De singular importancia en ALP, es la presencia de un dominio tipo LIM en el extremo C-terminal. Se ha demostrado que la remoción de este dominio, resulta en la activación de ALP, aumentando de la  $k_{cat}$  10 veces y disminuyendo la  $K_m$  3 veces con respecto a la especie silvestre.

En las ureohidrolasas los iones  $Mn^{2+}$  están estabilizados por residuos de aspartato e histidina altamente conservados. En ALP no es posible identificar mediante análisis bioinformáticos los residuos que estabilizan los iones  $Mn^{2+}$ , considerando que esta enzima posee 5 residuos de histidinas y 22 aspartato. Estudios recientes de nuestro laboratorio nos ha permitido proponer que la histidina 206 sería un ligando para un  $Mn^{2+}$  fuertemente unido y que el residuo de histidina 127 estabilizaría un ion  $Mn^{2+}$  más débilmente unido. En esta tesis se analizó mediante mutagénesis sitio dirigida, la participación de los residuos de histidina 65 y 394 en la actividad y la estabilización del metal activador  $Mn^{2+}$  en ALP. Las mutantes presentaron actividad agmatinasa y un aumento importante en su constante catalítica respecto de ALP (particularmente la especie H65A). Ambas especies fueron más vulnerables a la inactivación térmica lo que indicaría un cambio conformacional que podría mediar la activación. Ambas especies hiperactivadas presentaron una mayor actividad que ALP silvestre, indicando una

conformación más favorable del centro binuclear de  $Mn^{2+}$  lo que se corresponde con la activación de la enzima.

