



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

**Dr. Nelson Carvajal Baeza**

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Profesor Co-Patrocinante

**Dr. Alejandro Reyes G.**

Instituto de Bioquímica

Facultad de Ciencias Biológicas

**CONSECUENCIAS ESTRUCTURALES Y CINÉTICAS DEL  
REEMPLAZO MUTAGÉNICO DE LOS RESIDUOS ASP204 Y  
GLU256 EN LA ARGINASA HUMANA TIPO I**

**Tesis de Grado presentada como  
parte de los requisitos para optar  
al grado de *Licenciado en  
Bioquímica* y **Título Profesional de  
Bioquímico****

**MARCELA JOHANNA LOBOS HERMOSILLA**

**VALDIVIA – CHILE**

**2009**

*Dedicada a mis padres y a Seth...  
mi compañero eterno con todo mi amor.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Enzimología del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Concepción donde realicé esta tesis dentro del marco del proyecto Fondecyt 1070467, quienes fueron un gran apoyo en mi desarrollo como estudiante para llegar a convertirme en un profesional y en especial al Dr. Nelson Carvajal por entregarme su conocimiento y guiarme en esta etapa como mi tutor para el desarrollo de este trabajo de tesis.

A mis compañeros en el Laboratorio de Enzimología del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Concepción: Magaly Encina, María Soledad Orellana, Claudia Mella, Víctor Castro, David García, Pablo Fuentealba, José Rodolfo Benitez, Valentina Valenzuela y en especial a Ricardo Alarcón por su colaboración en la aplicación de técnicas bioinformáticas en esta tesis.

A la profesora Amparo Uribe por su acogida en el Laboratorio de Enzimología por su conocimiento, su preocupación, su afecto casi maternal y finalmente por su amistad.

Agradecer a mi familia por su amor e incondicional apoyo en todo cuanto he emprendido como meta en mi vida.

A mi esposo por su infinito amor, paciencia y por recordarme a diario las cosas que son verdaderamente importantes.

Y a Dios por acompañarme cada segundo y ser mi guía y fuente de fortaleza en el camino para alcanzar el éxito y la verdadera felicidad.

Muchas gracias.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
1. RESUMEN.....	1
1.1 SUMMARY.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 HIPÓTESIS.....	10
2.2 OBJETIVO GENERAL.....	10
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1 Materiales.....	11
3.2 Mutaciones puntuales.....	11
3.3 Obtención y purificación de especies recombinantes de arginasa tipo I.....	13
3.4 Medición de actividad enzimática.....	13
3.5 Determinación de los pesos moleculares.....	14
3.6 Interacción de las enzimas con sustratos, inhibidores y $Mn^{2+}$ .....	14
3.7 Ensayos de cinéticas de denaturación térmica.....	15

3.8	Diálisis contra EDTA.....	15
3.9	Espectros de fluorescencia.....	15
3.10	Obtención de modelos estructurales mediante Modeller 8.1.....	16
4.	RESULTADOS.....	17
4.1	Purificación de las especies silvestres y mutantes de la arginasa humana tipo I..	17
4.2	Tamaños moleculares de las especies silvestres y mutantes.....	17
4.3	Caracterización cinética de las variantes de arginasa humana tipo I.....	20
4.4	Fluorescencia intrínseca de triptófanos de las especies silvestres y mutantes.....	24
4.5	Estabilidad térmica de las variantes de arginasa humana tipo I.....	27
4.6	Efecto de la diálisis de las especies contra EDTA.....	29
4.2	Determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ) para $Mn^{2+}$ .....	31
4.3	Efecto de bajas concentraciones de clorhidrato de guanidina.....	31
4.4	Modelos estructurales de las variantes de arginasa humana tipo I.....	34
5.	DISCUSIÓN.....	37
5.1	CONCLUSIONES.....	42
6.	REFERENCIAS.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Reacción catalizada por la arginasa.....	1
<b>Figura 2.</b> Estructura cristalográfica de la arginasa tipo I de rata.....	7
<b>Figura 3.</b> Análisis electroforético de especies purificadas de arginasa silvestre y mutantes en los residuos Asp204 y Glu256.....	18
<b>Figura 4.</b> Perfil de elución de las especies silvestres y mutantes desde una columna de Sephadex G-100.....	19
<b>Figura 5.</b> Cinéticas de saturación de la variante D204E a pH 9,5 y 7,5.....	22
<b>Figura 6.</b> Fluorescencia intrínseca de residuos de triptófano de la variante D204E y apagamiento de la fluorescencia por acrilamida.....	25
<b>Figura 7.</b> Estabilidad térmica de las especies silvestres y mutantes.....	28
<b>Figura 8.</b> Efecto de diálisis contra EDTA sobre la actividad catalítica de las especies silvestres y mutantes.....	30
<b>Figura 9.</b> Determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ) para $Mn^{2+}$ .....	32
<b>Figura 10.</b> Estructura de la arginasa tipo I humana y modelo obtenido para las especies mutantes D204N y E256D.....	35

**ÍNDICE DE TABLAS**

	Pág.
<b>Tabla I.</b> Partidores utilizados para generar las mutantes puntuales por mutagénesis sitio-dirigida de la arginasa humana tipo I.....	12
<b>Tabla II.</b> Parámetros cinéticos a pH 9,5 y pesos moleculares de especies silvestres y mutantes de la arginasa humana tipo I.....	21
<b>Tabla III.</b> Coeficientes de Hill determinados para las especies silvestres y mutantes de la arginasa humana tipo I a pH 7,5.....	23
<b>Tabla IV.</b> Propiedades fluorescentes de residuos de triptófano de las especies silvestres y mutantes de arginasa humana tipo I.....	26
<b>Tabla V.</b> Constante de disociación para $Mn^{2+}$ ( $K_d$ ) de especies silvestres y mutantes de la arginasa humana tipo I.....	33

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>ArgI</b>	: arginasa humana tipo I
<b>Arg255</b>	: residuo de arginina en la posición 255 de la secuencia aminoacídica de la arginasa humana tipo I
<b>Arg308</b>	: residuo de arginina en la posición 308 de la secuencia aminoacídica de la arginasa humana tipo I
<b>Asp199</b>	: residuo de aspártico en la posición 199 de la secuencia aminoacídica de <i>B. caldovelox</i>
<b>Asp204</b>	: residuo de aspártico en la posición 204 de la secuencia aminoacídica de arginasa humana tipo I
<b><i>B. caldovelox</i></b>	: <i>Bacillus caldovelox</i>
<b><i>E. coli</i></b>	: <i>Escherichia coli</i>
<b>CM</b>	: carboximetil
<b>DEAE</b>	: dietilaminoetil
<b>D204A</b>	: mutante con la sustitución del residuo aspartato por alanina en la posición 204 de la arginasa humana tipo I
<b>D204E</b>	: mutante con la sustitución del residuo aspartato por glutamato en la posición 204 de la arginasa humana tipo I
<b>D204N</b>	: mutante con la sustitución del residuo aspartato por asparragina en la posición 204 de la arginasa humana tipo I
<b>EDTA</b>	: ácido etilendiaminotetraacético
<b>EPR</b>	: resonancia paramagnética de electrones



<b>E256A</b>	: mutante con la sustitución del residuo glutamato por alanina en la posición 256 de la arginasa humana tipo I
<b>E256D</b>	: mutante con la sustitución del residuo glutamato por aspartato en la posición 256 de la arginasa humana tipo I
<b>E256Q</b>	: mutante con la sustitución del residuo glutamato por glutamina en la posición 256 de la arginasa humana tipo I
<b>Glu256</b>	: residuo de glutamato en la posición 256 de la secuencia aminoacídica de la arginasa humana tipo I
<b>Glu262</b>	: residuo de glutamato en la posición 256 de la secuencia aminoacídica de la arginasa humana tipo I
<b>IPTG</b>	: isopropiltio- $\beta$ -D-galatóside
<b><math>K_{cat}</math></b>	: constante catalítica
<b><math>K_d</math></b>	: constante de disociación
<b><math>K_i</math></b>	: constante de inhibición
<b><math>K_m</math></b>	: constante de Michaelis
<b><math>K_{sv}</math></b>	: constante de Stern-Volmer
<b>NTA</b>	: nitrilo triacético
<b>ON</b>	: óxido nítrico
<b>PAGE</b>	: electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>SDS</b>	: dodecil sulfato de sodio
<b><math>V_{max}</math></b>	: velocidad máxima
<b>2PHA</b>	: archivo en formato .pdb de la estructura cristalina de la arginasa humana tipo I disponible en bases de datos de proteínas

## 1. RESUMEN

La arginasa (EC 3.5.3.1) cataliza la hidrólisis de la L-arginina en L-ornitina y urea y requiere de un catión bivalente, especialmente  $Mn^{2+}$  para su acción catalítica. Participa en el ciclo de la urea y regula los niveles intracelulares de arginina. Compitiendo con las óxido nítrico sintasas por el sustrato común, regularía los niveles de ON, lo que la transforma en una proteína blanco para el tratamiento de alteraciones del músculo liso.

En la estructura de las arginasas de mamíferos, se destaca un motivo en forma de S ubicado en la interface entre los monómeros. Hasta ahora, los estudios se han limitado al rol del motivo en la mantención del estado oligomérico. Nuestro interés se ha centrado, por el contrario, en los aspectos funcionales. Como hipótesis, sugerimos que el motivo es esencial para la expresión de los efectos cooperativos, teniendo como eje central a la Arg308 en el caso de la arginasa tipo I. Previamente, demostramos que la mutante R308A es monomérica y se reasocia hasta el estado trimérico cooperativo en presencia de bajas concentraciones de guanidina.

En este trabajo, mutamos el Asp204, que interacciona con la Arg308 de la subunidad vecina, y el Glu256, propuesto como importante para la oligomerización. Concretamente, generamos y analizamos las variantes D204A, D204N, D204E, E256A, E256Q y E256D de arginasa humana tipo I. No observamos diferencias cinéticas al pH óptimo de 9,5 o en la fluorescencia de triptófanos. Sin embargo, las mutantes D204A y E256Q resultaron ser monoméricas. Por otro lado, D204E resultó ser trimérica y cinéticamente cooperativa a pH 7,5, mientras que la D204N, también trimérica, presentó una cinética hiperbólica.

Los resultados obtenidos apoyan la importancia de las interacciones intermonoméricas entre Arg308 y Asp204 para la expresión de los efectos cooperativos para el sustrato. También sugieren un rol para el Glu256 en las propiedades cooperativas de la enzima.

## 1.1 SUMMARY

Arginase (EC 3.5.3.1) catalyses the hydrolysis of L-arginine to l-ornithine and urea, and requires a bivalent cation, especially  $Mn^{2+}$ , for catalytic activity. It is a component of the urea cycle, and regulates the intracellular levels of L-arginine. By competing with nitric oxide synthases for a common substrate, arginase regulates the levels of NO, which makes the enzyme a target for treatment of smooth muscle disorders.

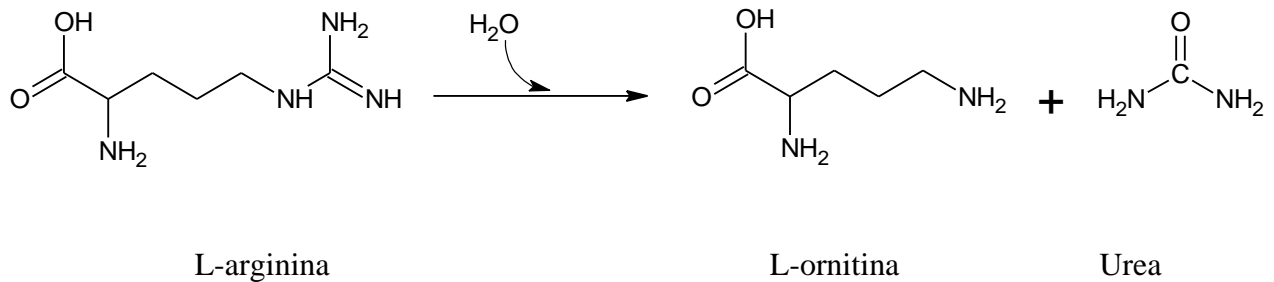
Mammalian arginases contain an unusual S-shaped motif, located at the intermonomeric interface. Until now, the studies were limited to the structural role of the motif. On the contrary, our interest was focused on functional aspects and our hypothesis has been that the motif is essential for cooperative effects for the substrate, having Arg308 as a central axis. Previously, we have shown that the R308A mutant is monomeric and reassociates to the trimeric, cooperative state in the presence of low concentrations of guanidinium chloride.

We have now mutated Asp204 that interacts with Arg308 in the neighbour subunit and Glu256, proposed as important for oligomerization. Concretely, the arginase I variants D204A, D204E, D204N, E256Q, E256A y E256D were generated and examined. No differences were observed in the kinetic parameters at pH 9.5, or in tryptophan fluorescence. However, the D204A y E256Q variants were monomeric. On the other hand, D204E was trimeric and kinetically cooperative at pH 7.5, whereas hyperbolic kinetics was exhibited by D204N, also trimeric.

Results obtained strongly support the importance of the intermonomeric interaction between Arg308 and Asp204 for expression of the cooperative effects for the substrate. Results also suggest a role for Glu256 in the cooperative properties of the enzyme.

## 2. INTRODUCCIÓN

La arginasa (L-arginina amidinohidrolasa, EC 3.5.3.1) cataliza la hidrólisis de la arginina, generando ornitina y urea como productos (Figura 1).



**Figura 1.** Reacción catalizada por la arginasa.

Se trata de una enzima ampliamente distribuida en los organismos vivos, y cuya función catalítica es absolutamente dependiente de un ion metálico bivalente, especialmente  $Mn^{2+}$  (Carvajal *et al.*, 1995; Jenkinson *et al.*, 1996; Morris *et al.*, 2004). Con excepción de la arginasa monomérica de *Concholepas concholepas* (Carvajal *et al.*, 1984), las arginasas descritas hasta ahora son proteínas oligoméricas, encontrándose en forma homotrimérica en eucariontes y como un dímero de trímeros en procariontes (Jenkinson *et al.*, 1996)

En los animales superiores, y especialmente en el hombre, la arginasa existe en dos formas isoenzimáticas, que difieren en su distribución celular y función fisiológica (Yu *et al.*, 2003). La arginasa I es citosólica y se expresa fundamentalmente en el hígado, donde cataliza la reacción final del ciclo de la urea. Por su parte la arginasa tipo II es mitocondrial y característica de

tejidos extrahepáticos (Gotoh *et al.*, 1996; Cama *et al.*, 2003 a y b). Entre ambas isoenzimas existe un 55% de identidad en su secuencia aminoácidica, conservándose todos los residuos que han sido definidos como críticos o esenciales para la unión del sustrato y el metal activador, así como para la catálisis propiamente tal (Perozich *et al.*, 1997).

Desde un punto de vista funcional, a la arginasa I se la asocia con la síntesis de urea en el hígado, mientras que a la isoenzima II se la ha asociado con la regulación de los niveles de arginina disponibles para la síntesis de proteínas, poliaminas, prolina, glutamato, agmatina y óxido nítrico (Wu *et al.*, 1998; Kepka-Lenhart *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Satriano *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2004; Morris, 2009). De acuerdo a los estudios más recientes, esta última función también se asociaría a la isoenzima I, especialmente la existente en tejidos extrahepáticos (Morris, 2009). Ambas isoenzimas, y especialmente la arginasa tipo I, han sido asociadas a una serie de alteraciones patológicas. Por ejemplo, la deficiencia de arginasa tipo I resulta en una hiperargininemia caracterizada por episodios de hiperamonemia y retardo del crecimiento además de otras complicaciones. La hiperargininemia es una enfermedad heterogénea resultante de mutaciones puntuales en el gen de la arginasa humana tipo I. Una mutación que cambia el residuo de arginina en la posición 291 (R291X), ha sido identificada como la que podría llevar a la producción de una proteína trunca carente de los 32 aminoácidos finales del extremo C-terminal del total de 323 aminoácidos de una subunidad de arginasa tipo I (Haraguchi *et al.*, 1990; Ash *et al.*, 1998). La arginasa también ha emergido recientemente como un regulador crítico en la síntesis de óxido nítrico, por lo que se la considera un potente marcador de desordenes del músculo liso dependientes de óxido nítrico, incluyendo enfermedades vasculares, asma y disfunción eréctil (Christianson, 2004). Más aún, a través de ella, se ha proyectado una

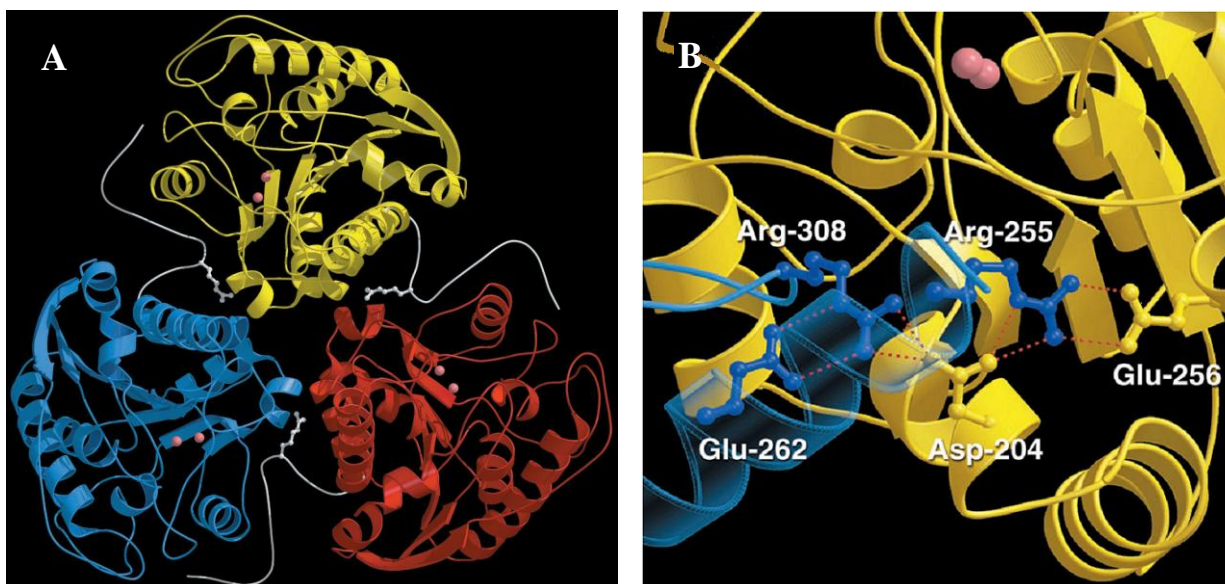
intervención farmacológica para esta clase de patologías, empleando inhibidores específicos y de alta afinidad para la arginasa (Cama *et al.*, 2003a; Maarsing *et al.*, 2008).

Una propiedad general de las arginasas es su dependencia de un ion metálico bivalente, especialmente  $Mn^{2+}$ , para su actividad catalítica y estabilidad estructural. En relación a esto, se ha observado que preparaciones purificadas de la enzima son activas aún en ausencia de  $Mn^{2+}$ , aunque su actividad prácticamente se duplica al incubar las especies semiactivadas con  $Mn^{2+}$  5 mM durante 20 minutos a 60 °C. Mediante estudios de EPR, se ha demostrado que las especies totalmente activadas contienen un centro binuclear de  $Mn^{2+}$  (Ash *et al.*, 2000) y se caracterizan, por lo tanto, por una estequiometría metal/enzima igual a 2. Por otro lado, se ha observado que preparaciones que contienen 1  $Mn^{2+}$ /subunidad son catalíticamente activas (Orellana *et al.*, 2002). Ambos iones metálicos se unen con afinidades muy distintas a la enzima. En el caso de la enzima de hígado de rata y la enzima humana, el ion metálico más débilmente unido, identificado como  $Mn^{2+}_A$ , es coordinado por los residuos His101, Asp124, Asp128 y Asp232. Por su parte, el ion más firmemente unido ( $Mn^{2+}_B$ ) es coordinado por los residuos His126, Asp124, Asp234 y Asp232 (Ash *et al.*, 1998; Cavalli *et al.*, 1994; Scolnick *et al.*, 1997; Orellana *et al.*, 2002; Carvajal *et al.*, 1999 y 2004b).

Varias arginasas han sido clonadas, comprobándose que sus secuencias muestran la conservación de los residuos considerados como esenciales, tanto para la unión del ion metálico como de la arginina, así como para la hidrólisis del sustrato. La función de estos residuos ha sido definida utilizando mutaciones sitio-dirigidas (Carvajal *et al.*, 1999; Carvajal *et al.*, 2004a; Cavalli *et al.*, 1994), modificaciones químicas (Carvajal *et al.*, 2004b; Cavalli *et al.*, 1994; Daghigh *et al.*, 1996) y en el caso de las arginasas de mamíferos y de la bacteria *Bacillus*

*caldovelox*, además por sus estructuras cristalográficas (Kanyo *et al.*, 1996; Bewley *et al.*, 1999; Constanzo *et al.*, 2005).

La estructura cristalina de la arginasa tipo I muestra una estructura globular de aproximadamente 40 x 50 x 50 Å, un plegamiento tipo conformación  $\alpha/\beta$  para cada monómero, y un motivo inusual en forma de S en su extremo C-terminal. Este motivo, que se localiza en la interface subunidad-subunidad y media cerca del 54% de las interacciones intermonoméricas (Kanyo *et al.*, 1996; Ash *et al.*, 1998; Constanzo *et al.*, 2005), comprende 19 aminoácidos (del residuo 304 al 322 en la arginasa humana tipo I). Las principales interacciones intermonómeros, observadas en la estructura de la arginasa tipo I de rata, están dadas por puentes salinos, siendo claves los que se establecen entre los residuos Arg308 y Arg255 de un monómero con los residuos Asp204 y Glu256 de un monómero vecino como se observa en la figura 2 (Labulo *et al.*, 2001). Como ya se mencionó, la secuencia del dominio S se encuentra altamente conservada en las arginasas de hígado humano, de rata, ratón y *Xenopus laevis*, y se ha sugerido que participa en la estabilización de los respectivos estados oligoméricos. En concordancia con esto, las mutaciones puntuales de Arg308 por alanina o glutamato o lisina, se traducen en la disociación de las enzimas humanas y de la rata en monómeros catalíticamente activos (Labulo *et al.*, 2001; García *et al.*, 2009).



**Figura 2. Arginasa tipo I de rata.** **A)** Estructura cristalográfica del homotrímero de la arginasa tipo I de rata. En color blanco se muestra el motivo en forma de S en el extremo C-terminal de cada monómero en la interface entre subunidades. **B)** Modelo de la interface subunidad-subunidad de la arginasa tipo I silvestre. Se muestran los enlaces salinos formados entre el residuo Arg308 de un monómero (en azul) y Asp204 del monómero adyacente (en amarillo) y también el puente salino entre los residuos Arg255 de una subunidad (en azul) y el residuo Glu256 de la subunidad vecina (en amarillo) (*Labulo et al., 2001*)



Resulta particularmente interesante el caso de la arginasa de *Bacillus caldovelox*, una proteína hexamérica que carece de un residuo equivalente a Arg308, aunque al ser cristalizada en presencia de arginina, aparece con este aminoácido unido en un sitio localizado precisamente en la interface subunidad-subunidad (Bewley *et al.*, 1999). En estas estructuras, el grupo guanidino de la arginina exógena es estabilizado por un enlace de hidrógeno bifurcado con el Asp199 de un monómero vecino. Este residuo corresponde al residuo Asp204 que forma un enlace similar con Arg308 en las arginasas animales. Más aun, al superponer las estructuras de las enzimas de hígado de rata y de *B. caldovelox*, se observa que el grupo guanidino de Arg308 de la enzima de rata se superpone con el grupo guanidino de la arginina exógena en la enzima bacteriana.

Como ya se mencionó, la sustitución del residuo Arg308 por alanina genera monómeros catalíticamente activos, que se reasocian y recuperan las propiedades cooperativas para el sustrato en presencia de bajas concentraciones de clorhidrato de guanidina. Como explicación para estos cambios, hemos sugerido que la guanidina imitaría al grupo guanidino de la arginina en la posición 308, formando puentes salinos nucleados por este residuo en la interface subunidad-subunidad de la enzima silvestre (García *et al.*, 2009).

En cuanto al residuo Glu256 de la arginasa humana tipo I, también localizado en la interface monómero-monómero, los datos cristalográficos indican que formaría un puente salino intermonómero con el residuo Arg255 de la subunidad vecina (Sabio *et al.*, 2001). Este último es un residuo altamente conservado en las arginasas y se le atribuye un importante papel en el mantenimiento de la estructura trimérica de la enzima. También podría participar en la comunicación entre subunidades y, de esta manera, verse envuelto en las interacciones subunidad-subunidad que median los efectos cooperativos para el sustrato que muestra la arginasa tipo I en condiciones fisiológicas de pH.

Continuando con nuestros estudios acerca de las interacciones intermonoméricas en la arginasa, en este trabajo nos propusimos analizar las consecuencias cinéticas y estructurales de la mutación de los residuos Glu256 y Asp204 de la arginasa humana tipo I, incluyendo el desarrollo de un modelo tridimensional de esta región. Los resultados obtenidos apoyan fuertemente la conclusión de que los puentes intermonómeros entre estos residuos y las Arg308 y Arg255 respectivamente, no sólo desempeñan un importante rol estructural en la arginasa humana tipo I, sino también en los aspectos funcionales de la enzima. Con ello, se da un apoyo adicional a un rol esencial del dominio estructural en forma de S en las interacciones monómero-monómero que explican los efectos cooperativos para el sustrato, teniendo como eje central un residuo de arginina (Arg308 en el caso de la enzima tipo I).

## **2.1 HIPÓTESIS**

El motivo en S es esencial para las interacciones entre monómeros que explican efectos cooperativos para el sustrato en la arginasa humana tipo I, teniendo como eje central la Arg308, que además desempeña un importante rol estructural. Las mutaciones puntuales en los residuos Asp204 y Glu256, que interactúan con Arg308 y Arg255 del monómero vecino respectivamente, generarían la disociación de la enzima en monómeros catalíticamente activos.

## **2.2 OBJETIVO GENERAL**

Generar mutantes de los residuos Asp204 y Glu256 y analizar las consecuencias cinéticas y estructurales de su reemplazo en la arginasa humana tipo I, incluyendo el desarrollo de un modelo tridimensional de esta región.

## **2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Reemplazar mediante mutagénesis sitio dirigida el residuo Asp204 por alanina, asparragina y glutamato; y el residuo Glu256 por alanina, glutamina y aspartato en la arginasa humana tipo I.
2. Caracterizar cinética y estructuralmente las variantes de la arginasa humana tipo I generadas (D204A, D204N, D204E, E256A, E256Q y E256D).
3. Obtener modelos estructurales de la interface subunidad-subunidad en las variantes de la arginasa humana tipo I mediante el programa Modeller 8.1.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

**3.1 Materiales.** Todos los reactivos empleados fueron obtenidos de fuentes comerciales (Sigma Chemical Co, Merck, Promega) y correspondían a los de mayor pureza disponible y fueron utilizados sin mayor purificación. Los partidores se obtuvieron de Bios Chile. Los reactivos para PCR, digestión y ligación fueron obtenidos de Invitrogen. Los kits para la extracción de plásmidos fueron obtenidos de Omega Bio-tek. Como medios de cultivo se utilizaron LB (5 g de bacto triptona, 25 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl por medio litro de medio; la ampicilina usada estaba a concentración de 0,1 mg/ml) y Terrific Broth/ampicilina (12 g de bacto triptona, 24 g de extracto de levadura, 4 ml de glicerol, 17 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 72 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  por litro de medio; la ampicilina se utilizó a una concentración de 0,1 mg/ml)

**3.2 Mutaciones puntuales.** Para generar las mutaciones puntuales, se empleó el Kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis de Stratagene, ampliamente utilizado para realizar mutaciones puntuales, deleciones o inserciones de uno o varios aminoácidos. El método utiliza la ADN polimerasa *Pfu* Turbo y la endonucleasa *DpnI*, específica para digerir ADN metilado o hemimetilado y que, por lo tanto, digiere selectivamente las hebras de ADN parentales, dejando inalteradas las hebras que incorporaron la inserción. El método requiere del diseño de partidores que se aparean con la región de la mutación (Tabla I). La pequeña cantidad que se requiere de ADN molde, la alta fidelidad de la ADN polimerasa *Pfu* Turbo y el bajo número de ciclos de temperatura, contribuyen a una alta eficiencia en la obtención de las mutaciones y disminuye la posibilidad de generar mutaciones al azar durante la reacción. La presencia de la mutación y la ausencia de mutaciones no deseadas se corroboraron por secuenciación automática del gen.

**Tabla I.** Partidores utilizados para generar las mutantes puntuales por mutagénesis sitio-dirigida de la arginasa humana tipo I

PARTIDORES	SECUENCIA
ARGI_D204A_Sentido	5' CA ATG ACT GAA GTG <b>GCG</b> AGA CTA GGA ATT GGC AAG G 3'
ARGI_D204A_Antisentido	5' C CTT GCC AAT TCC TAG TCT <b>CGC</b> CAC TTC AGT CAT TG 3'
ARGI_D204E_Sentido	5' G ACT GAA GTG <b>GAA</b> AGA CTA GGA ATT GGC AAG GTG ATG G 3'
ARGI_D204E_Antisentido	5' C CAT CAC CTT GCC AAT TCC TAG TCT <b>TTC</b> CAC TTC AGT C 3'
ARGI_E256A_Sentido	5' GGT CTG ACA TAC AGA <b>GCA</b> GGT CTC TAC ATC ACA G 3'
ARGI_E256A_Antisentido	5' C TGT GAT GTA GAG ACC <b>TGC</b> TCT GTA TGT CAG ACC 3'
ARGI_E256D_Sentido	5' GGA GGT CTG ACA TAC AGA <b>GAT</b> GGT CTC TAC ATC ACA G 3'
ARGI_E256D_Antisentido	5' C TGT GAT GTA GAG ACC <b>ATC</b> TCT GTA TGT CAG ACC TCC 3'
ARGI_E256Q_Sentido	5' GGA GGT CTG ACA TAC AGA <b>CAA</b> GGT CTC TAC ATC ACA G 3'
ARGI_E256Q_Antisentido	5' C TGT GAT GTA GAG ACC <b>TTG</b> TCT GTA TGT CAG ACC TCC 3'

**3.3 Obtención y purificación de especies recombinantes de arginasa tipo I.** Para obtener las arginasas recombinantes, se transformó la cepa JM109 de *E. coli* con el plásmido pBluescript II KS(+), que contiene el ADNc para la arginasa humana tipo I (cedido por el Dr. Stephen Cederbaum, UCLA, Los Angeles) y se indujo la expresión de la proteína con isopropil  $\beta$ -D-galactopiranosido (IPTG). Para la purificación de las especies recombinantes silvestres y mutantes de arginasa de hígado humano, se empleó una cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE-celulosa, equilibrada y eluída con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5). Las fracciones activas, eluídas con el amortiguador de lavado de la columna, fueron calentadas a 60° C por 5 min en presencia de  $Mn^{2+}$  2 mM. Luego de centrifugar a 14.000 rpm por 15 min, el sobrenadante fue cromatografiado en una columna de CM-celulosa, equilibrada con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5). La especies de arginasa fueron eluídas con Tris-HCl 10 mM/KCl 150 mM (pH 7,5). La pureza de las preparaciones fue analizada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS, seguida de tinción con Azul de Coomassie. También se realizó un análisis por Western Blot, utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-arginasa de rata tipo I que se reveló con un anticuerpo anti IgG de conejo.

**3.4 Medición de actividad enzimática.** La actividad arginasa se midió por el método de Archibald (Archibald, 1945), que consiste en determinar la cantidad urea generada por la hidrólisis de la arginina, empleando  $\alpha$ -isonitrosopropiofenona como reactivo colorimétrico. Los amortiguadores empleados fueron Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) y glicina-NaOH 50 mM (pH 9,5). Las reacciones fueron iniciadas agregando la enzima a soluciones de sustrato y amortiguador previamente equilibradas a 37° C y detenidas a los tiempos apropiados, agregando 1ml de una mezcla de ácido ortofósforico al 23% y ácido sulfúrico al 9%. Luego se agregó 0,1ml de  $\alpha$ -

isonitrosopropiofenona al 3% en etanol y se calentó por una hora a 100° C. Después de enfriar en oscuridad, se midió la absorbancia a 540nm.

**3.5 Determinación de los pesos moleculares.** Los pesos moleculares de las enzimas nativas y mutantes fueron determinados mediante cromatografías de filtración en una columna calibrada de Sephadex G-100. La columna fue equilibrada y eluída con una solución amortiguadora que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y KCl 50 mM. Como marcadores de tamaño molecular se emplearon las siguientes proteínas: arginasa humana tipo I (110 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), albúmina de suero de bovino (66 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa).

**3.6 Interacción de las enzimas con sustratos, inhibidores y  $Mn^{2+}$ .** Se realizaron estudios cinéticos de velocidad inicial y de inhibición por productos, y se analizó el efecto del pH (pH 9,5 y pH 7,5) sobre los parámetros cinéticos ( $K_m$ ,  $V_{máx}$ ) para el sustrato. Los resultados fueron analizados, mediante regresión no lineal, empleando el programa GraphPad Prism 5.0.

Se determinaron las constantes de disociación del metal más firmemente unido, mediante el empleo de NTA como amortiguador metálico (Carvajal *et al.*, 1995). La solución amortiguadora contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8,5), KCl 80 mM, NTA 10 mM y las concentraciones de metal libre fueron calculadas utilizando el software MaxChelator WINMAXC 2.4 (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>). Las especies enzimáticas fueron previamente dializadas contra EDTA 10 mM en Tris-HCl 5 mM (pH 7,5) por 4 horas a 4°C y luego en forma exhaustiva contra el amortiguador en ausencia del quelante.

**3.7 Ensayos de cinética de denaturación térmica.** Para comparar la estabilidad térmica de las especies silvestres y mutantes, se las incubó por tiempos variables a 70°C en glicina-NaOH 50 mM, pH 9,5 y  $Mn^{2+}$  2 mM. Las actividades residuales fueron medidas como se mencionó anteriormente y se expresaron como porcentaje de la actividad de cada especie no calentada ( $t_0$ ).

**3.8 Diálisis contra EDTA.** Las especies fueron sometidas a diálisis contra EDTA 10 mM/Tris 5mM a pH 7,5 y a 4 °C por 2,5 horas. Luego, se midió actividad enzimática de las especies antes y después de este tratamiento, tanto en presencia como en ausencia de  $Mn^{2+}$  2 mM. Las actividades fueron medidas a pH 9,5.

**3.9 Espectros de fluorescencia.** Los ensayos de fluorescencia intrínseca de triptófanos se realizaron a 25° C en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301. La concentración de proteína usada en los ensayos fue de 40-50 µg/ml y se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm. El ancho del haz de excitación y emisión fue de 1,5 nm y el espectro fue corregido restando el espectro de la solución amortiguadora en ausencia de proteína. La solución amortiguadora contenía Tris-HCl 10mM y  $MnCl_2$  2mM. Se realizaron ensayos de apagamiento de fluorescencia de triptófanos agregando diferentes concentraciones de acrilamida (0; 12,5; 24,7; 48,5; 97,6; 181,2; 357,4 y 556,9 mM) a la solución de proteína pura y se determinaron las constantes de Stern-Volmer, para obtener información acerca del grado de exposición de los triptófanos. Los resultados fueron analizados mediante el uso de la ecuación de Stern-Volmer:

$$F_0 / F = 1 + K_{sv} [Q]$$



donde  $F$  y  $F_0$  corresponden a las intensidades de fluorescencia con y sin apagador,  $[Q]$  es la concentración del apagador y  $K_{sv}$  es la constante de Stern-Volmer. Los gráficos fueron ajustados mediante regresión lineal.

**3.10 Obtención de modelos estructurales mediante Modeller.** Para la construcción de los modelos se utilizó el programa Modeller 8.1 (Marti-Renom *et al.*, 2000). Modeller es un programa que permite obtener modelos a partir de estructuras tridimensionales conocidas que presentan similitud de secuencia. Para su uso se requiere un molde, un archivo de alineamiento de secuencias entre el molde y la secuencia que se quiera modelar denominado \*.ali y un archivo que contenga los comandos para ejecutar Modeller. Se utilizó como molde la arginasa tipo I humana (pdb 2PHA). A partir de esta estructura, fueron obtenidos los modelos para las mutantes D204N y E256D. El alineamiento, se realizó entre el templado de 2PHA (cadena A y B) y la secuencia con la mutación correspondiente de las especies generadas (cadenas A y B) (Hsieh *et al.*, 2009). En el estudio realizado, se utilizó un protocolo de Dinámica Molecular (very\_slow MD annealing). Se generaron 10 modelos, de los cuales 1 fue elegido en base a su menor energía de función objetivo (vale recalcar que los 10 modelos obtenidos en cada situación no mostraron diferencias significativas entre ellos). Para validar los modelos obtenidos se utilizó Procheck (Morris *et al.*, 1992; Laskowski *et al.*, 1993) para observar la estereoquímica y Prosa II (Sippl, 1993) fue utilizado para verificar si los modelos obtenidos presentaban problemas energéticos.

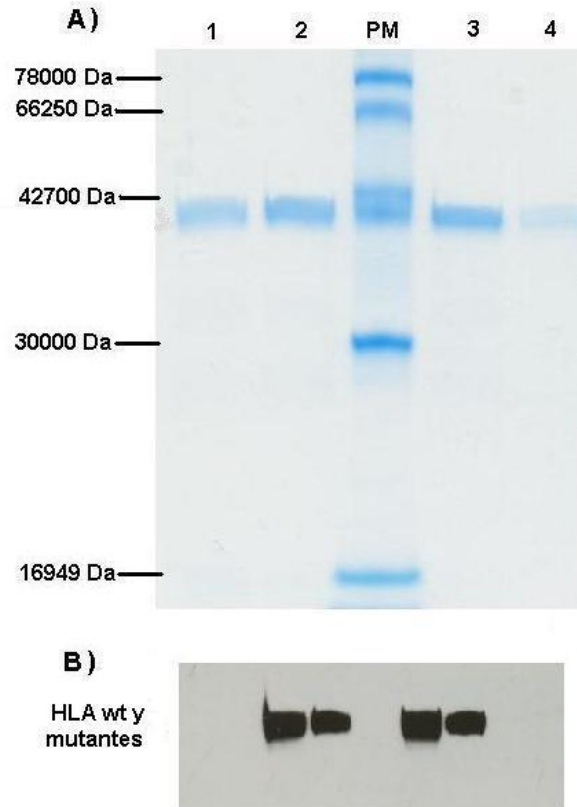
## 4. RESULTADOS

### *4.1 Purificación de las especies silvestres y mutantes de la arginasa humana tipo I*

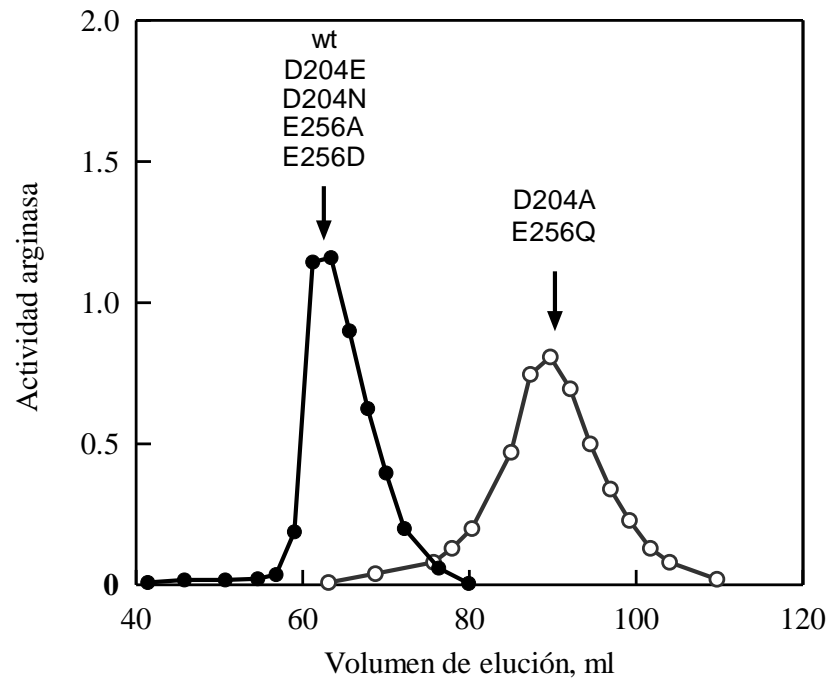
Todas las especies de arginasa humana tipo I, tanto silvestres como mutantes, fueron purificadas como se describe en Materiales y Métodos. El grado de pureza de las preparaciones obtenidas fue analizado mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE al 12%). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3, que incluye la inmunodetección de las especies empleando un anticuerpo policlonal anti-arginasa I de rata.

### *4.2 Tamaños moleculares de las especies silvestres y mutantes*

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos al cromatografiar las especies de arginasa en una columna de Sephadex G-100. Aquí se puede apreciar que las mutaciones Asp204→alanina (D204A) y Glu256→glutamina (E256Q), generaron especies de menor tamaño que las mutantes D204E, D204N, E256A y E256D, que eluyeron en un volumen equivalente al de la enzima silvestre, cuyo tamaño molecular es de 110 kDa. De acuerdo a sus volúmenes de elución, las mutantes D204A y E256Q corresponderían a especies monoméricas con un tamaño molecular aproximado de 35 kDa.



**Figura 3. Análisis electroforético de especies purificadas de arginasa silvestre y mutantes en los residuos Asp204 y Glu256** A) Gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE al 12 %); (1) especies silvestres (HLA wt); (2) D204A;(3) D204E; (4) E256Q. (B) Immunodetección, utilizando un anticuerpo anti-arginasa I de rata.



**Figura 4. Perfil de elución de las especies silvestres y mutantes desde una columna de Sephadex G-100.** Como estándares de tamaño molecular, se emplearon: alcohol deshidrogenasa (150 kDa), albumina de suero bobino (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y arginasa tipo I (110 kDa).

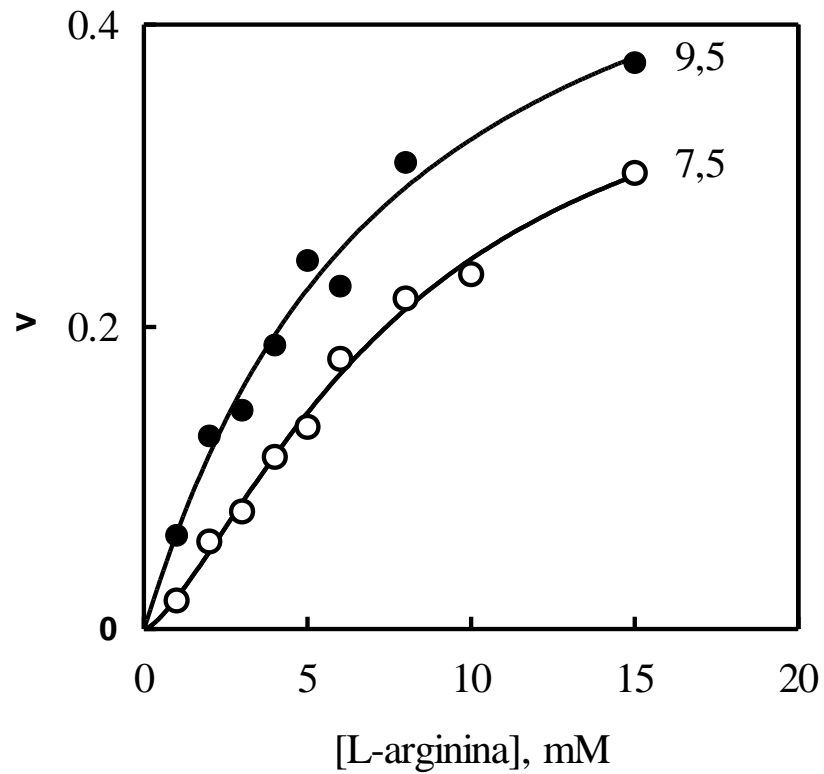
### ***4.3 Caracterización cinética de las variantes de arginasa humana tipo I***

Los estudios cinéticos realizados al pH óptimo (pH 9,5) mostraron un comportamiento hiperbólico tanto para las especies silvestres como las resultantes de los cambios mutagénicos en las posiciones 204 y 256. Como se puede ver en la tabla II, a este pH no se observaron cambios relevantes en los parámetros cinéticos para el sustrato o en las constantes de inhibición por el producto ornitina o el clorhidrato de guanidina (Gdn-HCl), empleado como análogo estructural del otro producto, la urea. En estos estudios no se analizó directamente el efecto de la urea, debido a que nuestro ensayo de actividad se basa precisamente en la determinación colorimétrica de este producto. En términos de valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$ , la variante D204N no se diferenció en forma significativa de la especie silvestre; no se incluye en la tabla II porque para esta especie particular no se hicieron estudios de inhibición.

Bajo las condiciones más fisiológicas de pH 7,5, tanto las mutantes monoméricas D204A y E256Q como las especies triméricas D204N y E256A presentaron una cinética hiperbólica, lo que contrasta con el comportamiento cooperativo de la enzima silvestre a este pH (Carvajal, 1982). Por el contrario, al igual que la enzima silvestre, la variante D204E presentó un comportamiento cooperativo (Figura 5). Resultados equivalentes se obtuvieron en el caso de la variante E256D. En la tabla III se muestran los valores de los coeficientes de Hill determinados para todas las especies analizadas.

**Tabla II.** Parámetros cinéticos a pH 9,5 y pesos moleculares de especies silvestres y mutantes de la arginasa humana tipo I. (Los valores de los parámetros cinéticos indicados en esta tabla corresponden a los resultados de dos experimentos realizados en duplicado y las desviaciones estándar no fueron superiores al 5 %).

<i>Enzima</i>	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_i^{orni}$ (mM)	$K_i^{Gdn}$ (mM)	$k_{cat}/K_m$ Seg <sup>-1</sup> /M <sup>-1</sup>	<i>Peso</i> <i>Molecular</i> (kDa)
<i>silvestre</i>	3,1	190	1,0	50	61,3	110
<i>D204A</i>	8,6	202	2,0	35	23,5	35
<i>D204E</i>	4,6	185	1,5	75	40,2	110
<i>E256A</i>	1,5	195	1,5	56	45,3	110
<i>E256Q</i>	4,0	165	6,0	78	41,3	35
<i>E256D</i>	3,3	195	1,0	63	59,1	110



**Figura 5.** Cinéticas de saturación de la variante D204E a pH 9,5 y 7,5. Para este estudio se utilizó buffer Glicina-NaOH 50 mM, pH 9,5 y buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, en presencia de  $\text{Mn}^{2+}$  2 mM.

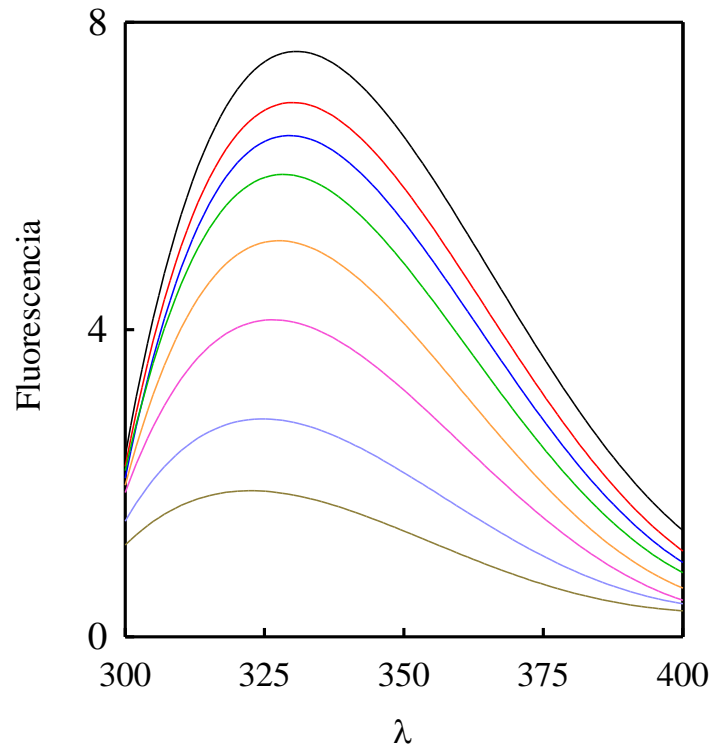
**Tabla III.** Coeficientes de Hill determinados para las especies silvestres y mutantes de la arginasa humana tipo I a pH 7,5

<i>Enzima</i>	<i>Coficiente de Hill</i>
<i>Silvestre</i>	1,8
<i>HLA-D204A</i>	0,9
<i>HLA-D204E</i>	1,4
<i>HLA-D204N</i>	1,0
<i>HLA-E256A</i>	1,1
<i>HLA-E256Q</i>	0,8
<i>HLA-E256D</i>	1,5



#### ***4.4 Fluorescencia intrínseca de triptófanos en las especies silvestres y mutantes***

Como una manera de detectar eventuales efectos estructurales de las mutaciones introducidas en la arginasa tipo I, analizamos las propiedades fluorescentes intrínsecas de residuos de triptófano y su apagamiento en presencia de acrilamida. A modo de ejemplo, en la figura 6 se muestran los resultados obtenidos para la mutante D204E y en la tabla IV se resumen las propiedades de todas las especies analizadas. Las curvas de apagamiento fueron lineales hasta concentraciones del orden de 0,5 M de acrilamida, no dando muestras de residuos de triptófano con distintos grados de exposición. Los máximos de emisión de las especies analizadas en este trabajo concuerdan con valores previamente reportados para las especies nativas de arginasa (Sabio *et al.*, 2001). De acuerdo a los resultados obtenidos, cualquier cambio estructural que pudiera resultar como consecuencia de las mutaciones, no alteraría significativamente la región en que se encuentran los residuos de triptófano de la arginasa tipo I.



**Figura 6. Fluorescencia intrínseca de residuos de triptófano de la variante D204E y apagamiento de la fluorescencia por acrilamida.** Las concentraciones de acrilamida fueron 0, 12,5, 24,7, 48,5, 97,6, 181,2, 357,4 y 556,9 mM. Las constantes de apagamiento de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) fueron determinadas a partir de las pendientes de gráficas de  $(F_0/F)$  versus la concentración de acrilamida.  $F_0$  y  $F$  representan las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia de acrilamida, respectivamente.

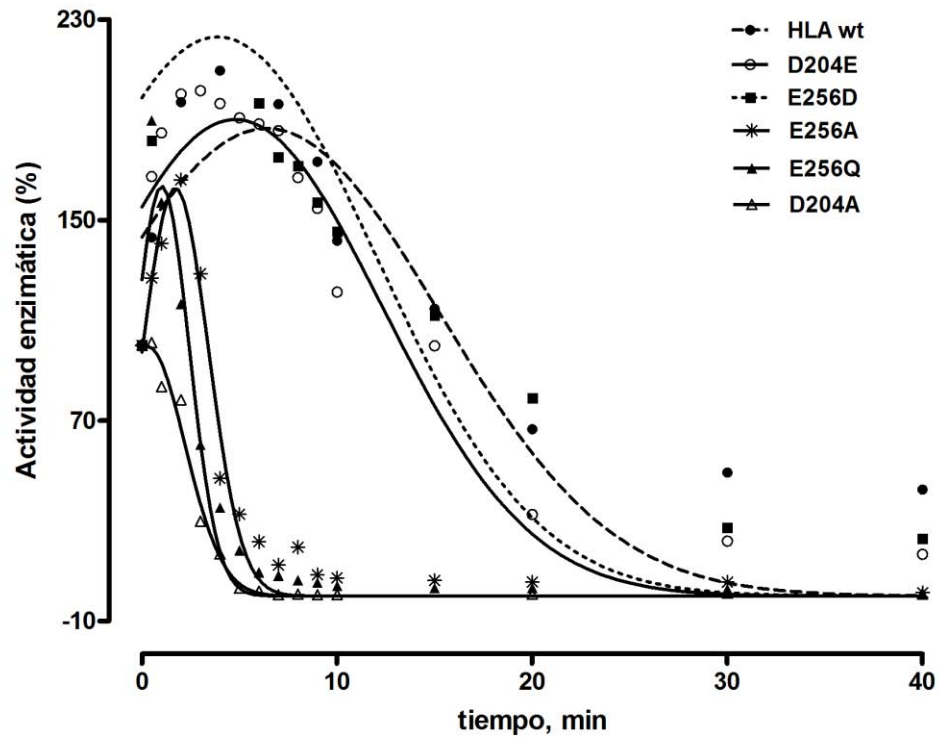
**Tabla IV.** Propiedades fluorescentes de residuos de triptófano de las especies silvestres y mutantes de arginasa humana tipo I

<b>Especie</b>	$\lambda_{max}$ (nm)	$K_{sv}$ ( $M^{-1}$ )
Silvestre	331	5,89
D204A	332	5,69
D204E	331	5,21
D204N	330	5,27
E256A	331	6,88
E256Q	330	5,99
E256D	333	5,82

#### ***4.5 Estabilidad térmica de las variantes de arginasa humana tipo I***

En contraste con las propiedades fluorescentes de las especies silvestres y mutantes, se observaron diferencias significativas en la estabilidad térmica de algunas de ellas. Como se observa en la figura 7, las mutantes D204E y E256D presentaron un comportamiento similar al de la enzima silvestre, mientras que las especies mutantes D204A, E256Q, E256A, resultaron ser mucho más vulnerables a la inactivación.

Estos resultados pueden relacionarse con los resultados obtenidos para las constantes de afinidad por el metal en todas las especies (resultados que se detallan más adelante), ya que la afinidad de la enzima por el metal está íntimamente relacionada con la estabilidad de la enzima en su estado trimérico siendo la única excepción para esto la especie mutante E256A.

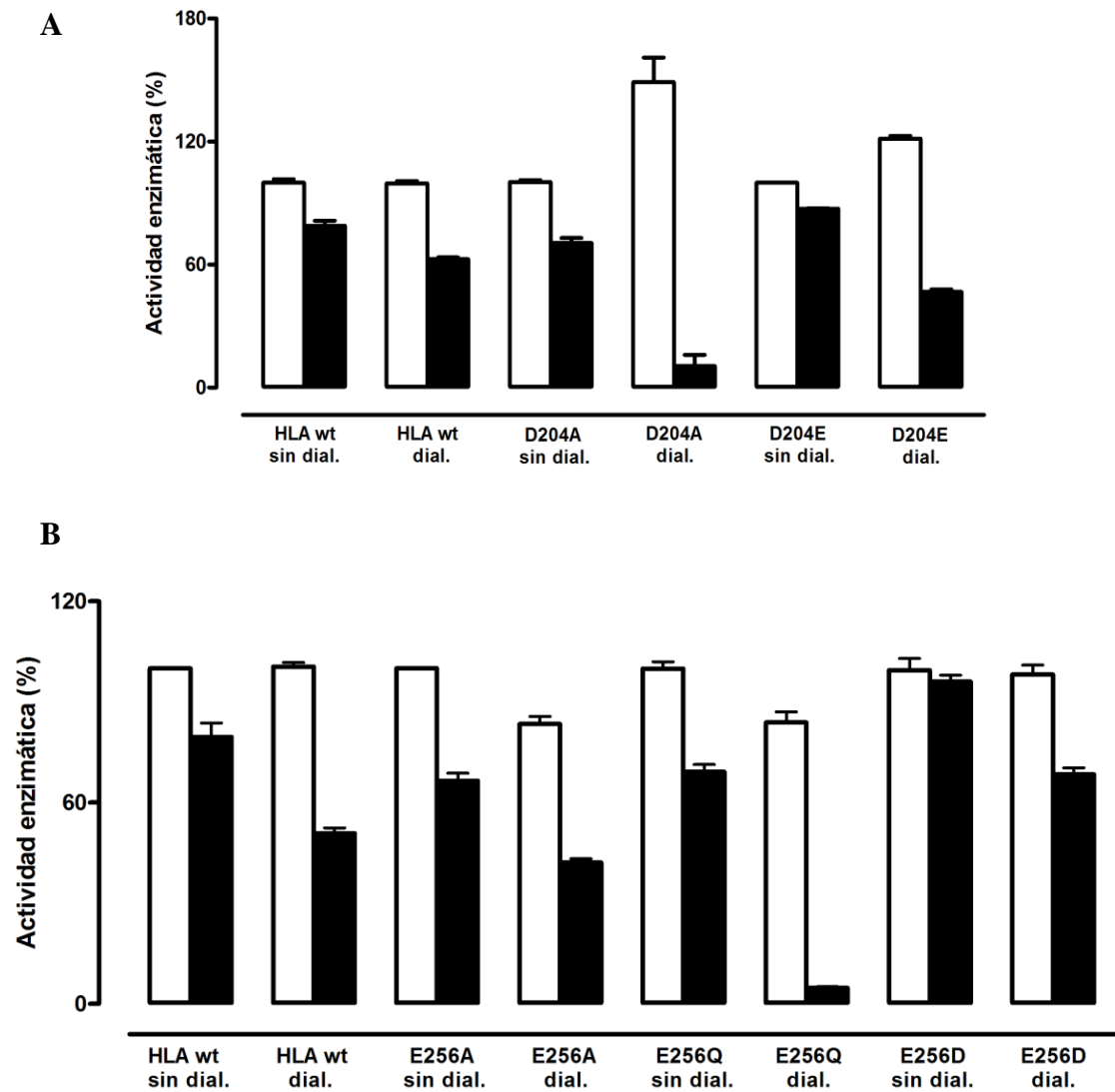


**Figura 7.** Estabilidad térmica de las especies silvestres y mutantes. Las incubaciones se realizaron a 70°C en buffer glicina-NaOH 50 mM, pH 9,5 y en presencia de  $Mn^{2+}$  2 mM.

#### ***4.6 Efecto de diálisis de las especies contra EDTA***

De acuerdo con información previa, especialmente derivada de nuestro laboratorio, al dializar la arginasa tipo I contra EDTA 5 mM por 2 horas a 4°C, la enzima retiene aproximadamente un 50 % de su actividad y la recupera totalmente en presencia del metal. Se sabe, además, que la actividad parcial está dada por el metal más firmemente unido, que resiste el procedimiento de diálisis (Orellana *et al.*, 2002). Para remover este ion metálico se requiere una diálisis más prolongada contra el quelante y el resultado es la obtención de especies absolutamente dependientes de la adición de  $Mn^{2+}$  para expresar su actividad hidrolítica de arginina (Carvajal *et al.*, 1971).

Como puede observarse en la figura 8, la mayoría de las mutantes analizadas se comportó de la misma manera que la forma silvestre de la enzima. La diálisis contra EDTA por 2 horas generó especies parcialmente activas en ausencia de  $Mn^{2+}$ , recuperando su actividad inicial en presencia del metal. Las excepciones fueron las mutantes D204A (Figura 8 A) y E256Q (Figura 8 B), que resultaron prácticamente inactivadas por la diálisis, aunque ambas recuperaron su actividad inicial en presencia del metal.



**Figura 8. Efecto de diálisis contra EDTA sobre la actividad catalítica de las especies silvestres y mutantes.** La actividad enzimática se expresa como porcentaje de la actividad de cada especie medida antes de dializar contra EDTA 10 mM/Tris 5 mM pH 7,5 por 2,5 horas y a continuación 2 horas solo contra Tris 5 mM pH 7,5. En barras blancas se muestran los resultados obtenidos en presencia del ion metálico, y en barras negras las medidas en su ausencia. A) Comportamiento de las especies mutantes del residuo Asp204. B) Comportamiento de las especies mutantes del residuo Glu256.

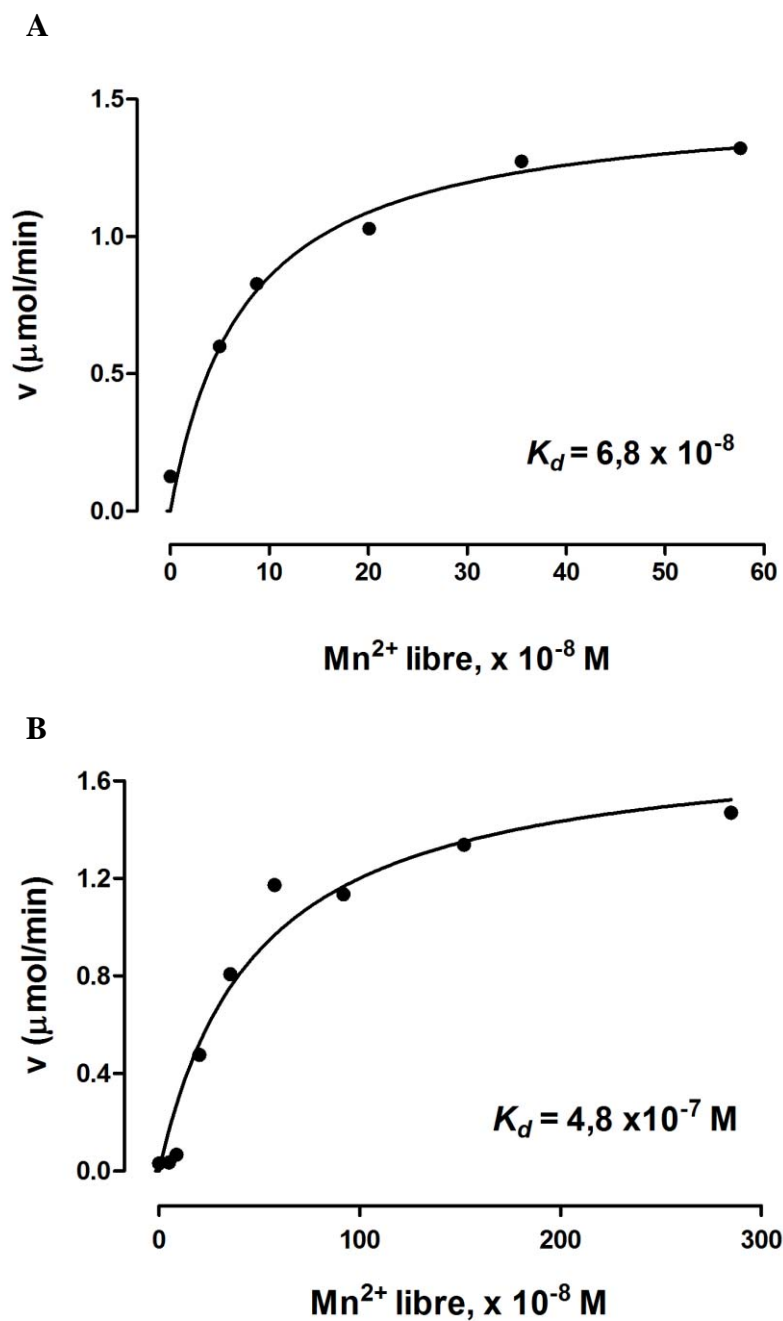
#### ***4.7 Determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ) para $Mn^{2+}$***

La reactivación de especies inactivas en ausencia del metal mostró una relación hiperbólica con la concentración de  $Mn^{2+}$  libre, determinadas mediante el empleo de nitrilotriacetato (NTA) como amortiguador metálico. Como se muestra en la tabla V, los valores de  $K_d$  para  $Mn^{2+}$  de las especies silvestres y mutantes triméricas no fueron significativamente diferentes, mientras que la afinidad por el metal más firmemente unido disminuyó en forma importante en el caso de las especies monoméricas D204A (Figura 9) y, especialmente, en el caso de la variante E256Q.

#### ***4.8 Efecto de bajas concentraciones de clorhidrato de guanidina***

En estudios previos, hemos demostrado que, en presencia de bajas concentraciones de clorhidrato de guanidina (< 5 mM), las especies monoméricas de la variante R308A de la arginasa humana tipo I se reasocian hasta el estado trimérico y recuperan las propiedades cooperativas que expresa la enzima silvestre a pH 7,5. En contraste con la variante R308A, con ninguna de las mutantes analizadas en este trabajo se observaron variaciones en los tamaños moleculares o las velocidades iniciales en todo el intervalo de concentraciones de sustrato (0,5-20 mM). Los efectos observados previamente son, por lo tanto, específicos para la variante R308A.





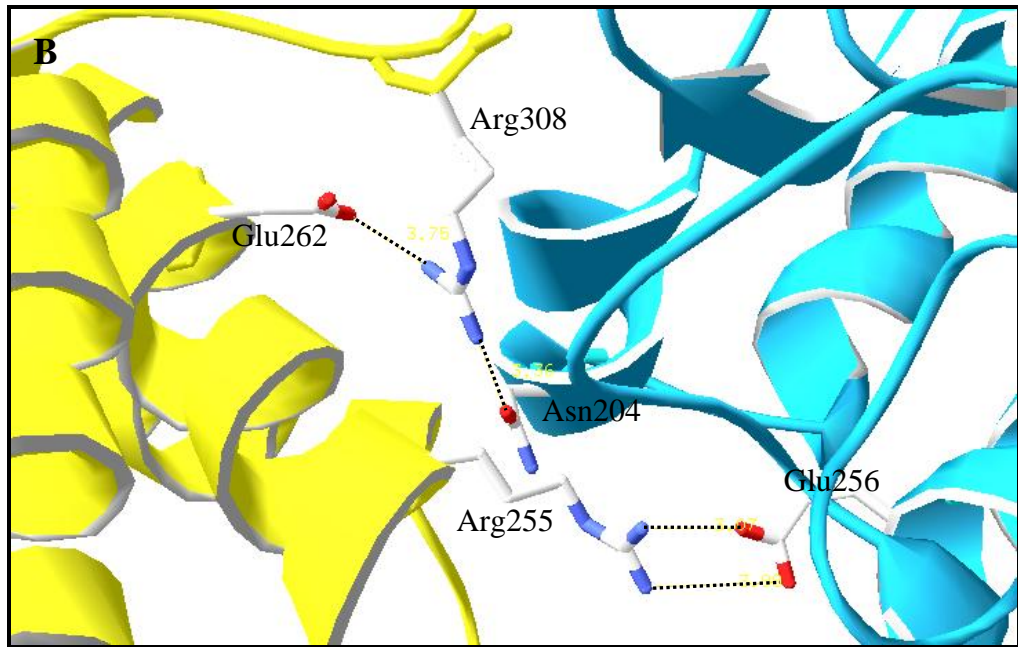
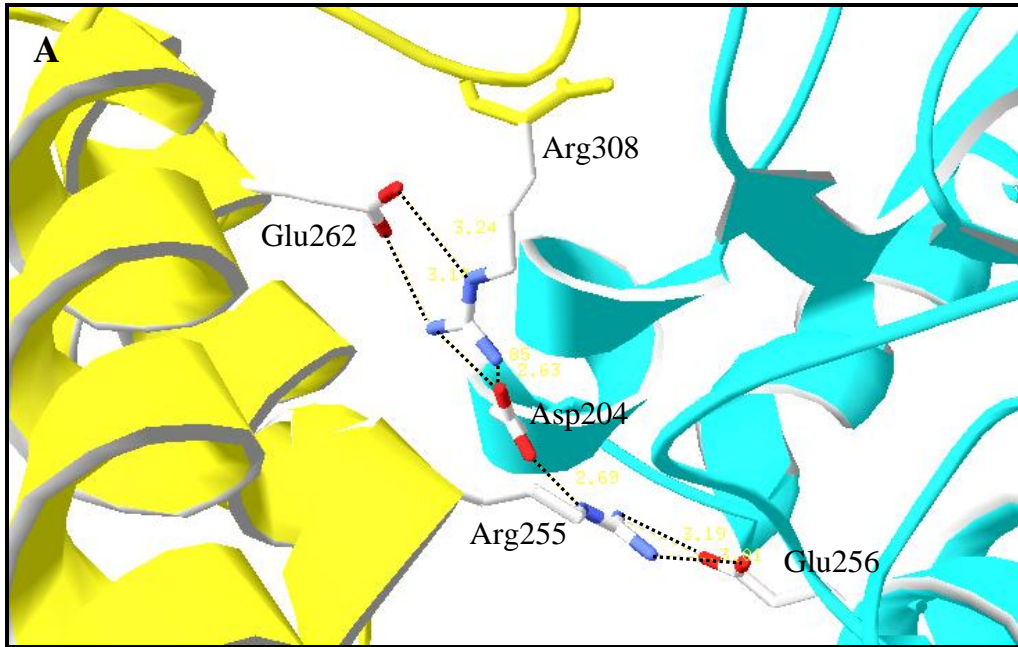
**Figura 9. Determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ) para  $\text{Mn}^{2+}$ .** En la figura se detalla los resultados obtenidos para la enzima A) silvestre y B) la variante D204A de la ArgI. Los experimentos se realizaron utilizando el amortiguador metálico Tris 10 mM/ KCl 80 mM/ NTA-KOH 10 mM, a pH 8,5 y a 37°C.

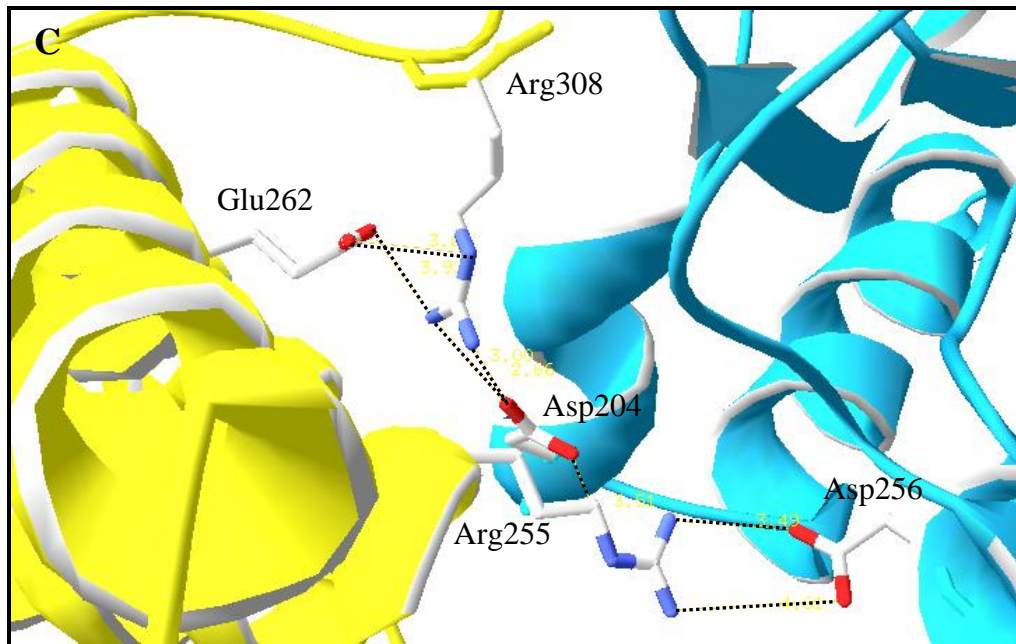
**Tabla V.** Constantes de disociación para  $Mn^{2+}$  ( $K_d$ ) de especies silvestres y mutantes de la arginasa humana tipo I

<i>Especie</i>	<i><math>K_d</math> para <math>Mn^{2+}</math> (M)</i>
Silvestre	$6,8 \times 10^{-8}$
D204A	$4,8 \times 10^{-7}$
D204E	$5,0 \times 10^{-8}$
E256A	$2,6 \times 10^{-8}$
E256Q	$2,0 \times 10^{-5}$
E256D	$7,5 \times 10^{-8}$

#### ***4.9 Modelos estructurales de las variantes arginasa humana tipo I***

Para complementar, y ayudar a la comprensión de los resultados experimentales, realizamos un análisis bioinformático de modelamiento de las especies D204N y E256D, empleando el programa Modeller. La estrategia empleada para generar los modelos que se muestran en la figura 10, es equivalente a la utilizada para analizar un problema equivalente en relación con la enzima málica humana (Hsieh *et al.*, 2009). En general, los modelos estructurales son concordantes con nuestros resultados experimentales.





**Figura 10. Estructura de la Arginasa tipo I humana y modelos estructurales generados para las especies mutantes.** A) Estructura cristalográfica de la arginasa tipo I humana silvestre, B) modelo de la mutante D204N y C) modelo de la mutante E256D obtenido por Modeller. Se observa el espacio inter-subunidad en donde los residuos analizados forman puentes salinos entre las subunidades A, en amarillo, y B en azul. Las visualizaciones se editaron en Swiss-Pdb Viewer 4.01. Las interacciones de puentes salinos entre residuos se realizaron manualmente.

## 5. DISCUSIÓN

Previamente, hemos sugerido que un motivo estructural en forma de S y, particularmente el residuo Arg308, participa en la estabilización del estado trimérico y la expresión de las propiedades cooperativas de la arginasa humana tipo I bajo condiciones fisiológicas de pH (García *et al.*, 2009). Dado que la Arg308 interacciona con el Asp204 de una subunidad vecina en este trabajo analizamos las consecuencias estructurales y funcionales de mutaciones sitio-dirigidas a nivel de este último residuo. Adicionalmente, también dirigimos nuestra atención al residuo Glu256, que ha sido postulado como esencial para la mantención de la estructura oligomérica de la arginasa de mamíferos.

La sustitución del Asp204 por alanina condujo a la desestabilización del trímero y la consecuente formación de especies monoméricas catalíticamente activas, mientras que las mutaciones Asp204→Glu y Asp204→Asn generaron especies que mantuvieron el estado trimérico característico de la forma silvestre de la enzima. El estado monomérico de las especies resultantes de la mutación Asp204→Ala sería fácilmente explicado considerando la interrupción del puente salino con el residuo Arg308 del monómero adyacente. Por otro lado, la cinética hiperbólica exhibida por la mutante D204A es enteramente concordante con el estado monomérico de esta variante

Las propiedades de las mutantes D204E y D204N no son discordantes con el rol asignado a la interacción Arg308-Asp204. En efecto, a pesar del incremento en un átomo de carbono, es razonable suponer una interacción Arg308-Glu204, análoga a la interacción Arg308-Asp204. Por otro lado, la estructura trimérica de la mutante D204N podría explicarse tomando en cuenta que, como se observa en la figura 10 B, la disposición que toma del grupo R del residuo de asparagina

por el cual se mutó el aspártico en la posición 204, favorece la interacción con una de sus cargas negativas con el guanidino de la Arg308 manteniendo así la estructura trimérica de esta mutante al igual que la enzima silvestre, pero que la interrupción del puente salino que originalmente también existe entre Asp204 y la Arg255 (interacción intermonomérica), como se aprecia en la figura 10 A, provocaría la pérdida de la comunicación entre monómeros y con esto de los efectos cooperativos observados en esta mutante a pH 7,5 en relación a la enzima silvestre.

A pesar de no observarse diferencias en los tamaños moleculares de las especies D204E y D204N, nuestros resultados indican que se trata de especies triméricas funcionalmente diferenciables. En efecto, a pH 7,5, la mutante D204E presentó un comportamiento cinético cooperativo para su sustrato, lo que contrasta con el carácter típicamente hiperbólico de la cinética exhibida por la variante D204N. La expresión de los efectos cooperativos para el sustrato dependería, por lo tanto, de la correcta y particular interacción electrostática que se establece entre Asp204 y la Arg308.

En apoyo a la importancia del grupo guanidino en la posición 308, hemos demostrado que, en presencia de bajas concentraciones de guanidina, las especies monoméricas R308A recuperan tanto la organización cuaternaria, como las propiedades cooperativas que caracterizan a la enzima silvestre a pH 7,5. En base a estos resultados, sugerimos que la guanidina actuaría “imitando” al grupo de la Arg308 (García *et al.*, 2009). En concordancia con esta explicación, todas las mutantes analizadas en este trabajo, y no sólo la variante monomérica D204A, fueron totalmente insensibles a las concentraciones de guanidina que alteran las propiedades de la variante D204A.

En cuanto a las mutaciones en el residuo Glu256, la especie E256Q resultó ser monomérica, mientras que las variantes E256A y E256D mantuvieron la estructura trimérica de la enzima silvestre. En cualquier caso, todas las especies fueron enteramente equivalentes a la enzima

silvestre al pH óptimo. El tamaño molecular determinado aquí para la mutante E256Q coincide con resultados previos de Sabio *et al.*, quienes concluyeron que el carácter monomérico de la mutante E256Q se explicaría por ser el residuo Glu256 esencial para la oligomerización de la enzima (Sabio *et al.*, 2001). Sin embargo, nuestros resultados, especialmente para la mutante E256A, sugieren que la naturaleza monomérica de la mutante E256Q se explica por la naturaleza del residuo de glutamina que le sustituye al glutamato, más que por la pérdida del puente salino entre los residuos Glu256 de una subunidad y la Arg255 de la subunidad vecina. Sin embargo, el carácter no cooperativo de la cinética exhibida por la mutante E256A a pH 7,5 indica que la mencionada interacción es esencial para la expresión de las propiedades regulatorias de la enzima. Al respecto, hay que hacer notar que la variante E256D, también con una estructura trimérica, mantuvo el carácter cooperativo de su cinética a pH 7,5. Esto concuerda con las características del modelo estructural generado para esta especie. En efecto, como se muestra en la figura 10 C, los puentes salinos entre los residuos Arg255 (subunidad A) y Asp256 (subunidad B) se mantuvieron inalterados con el cambio del residuo Glu256 por aspartato en esta posición. A pesar del acortamiento del grupo R del aminoácido sustituido, el modelo estructural predice que aun es posible mantener estas interacciones con el residuo Arg255 de la subunidad vecina.

Para analizar los efectos de las mutaciones sobre la interacción de las variantes con el cofactor metálico, es necesario tomar en cuenta las siguientes consideraciones (Orellana *et al.*, 2002): (1) que en su estado de máxima actividad, la arginasa contiene un centro binuclear de  $Mn^{2+}$ , en que uno de los iones metálicos se une con una afinidad considerablemente mayor que el otro; (2) la remoción del metal más débilmente unido, mediante diálisis por 2,5 horas a 4°C contra EDTA 10 mM/Tris-HCl 5 mM (pH 7,5) y luego 2 horas en ausencia del quelante, genera especies mononucleares que expresan aproximadamente el 50 % de la actividad de las especies



binucleares; (3) que las especies mononucleares resultantes se convierten en binucleares cuando se las incuba por 10 min a 60 °C con  $\text{Mn}^{2+}$  2 mM. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el cambio de Asp204 por alanina o de Glu256 por glutamina en la interfase se acompaña de un cambio conformacional que altera la interacción de la enzima con el metal más fuertemente unido en el sitio activo, con la consiguiente inactivación total de las especies dializadas contra EDTA 10 mM/Tris 5mM pH 7,5 por 2,5 horas (Figura 8). La menor afinidad de las especies D204A y E256Q por el manganeso se asoció a una menor estabilidad térmica de estas variantes. Esto no es sorprendente, ya que es un hecho perfectamente establecido que la estabilidad de la arginasa depende estrictamente de la presencia de manganeso en su sitio activo. Al respecto, las subunidades inactivas (que carecen de  $\text{Mn}^{2+}$  en sus sitios activos) son marcadamente más sensibles a la inactivación térmica que las especies triméricas activas que contienen el cofactor metálico unido (Carvajal *et al.*, 1995). Por su parte, en un particular estado conformacional, no asociado a una menor afinidad por el metal, habría que buscar la explicación para la menor estabilidad térmica de la variante E256A. Con la información disponible no es posible ahondar más en este punto.

Aparte de diferencias en los tamaños moleculares y las estabilidades térmicas de algunas de las variantes, no detectamos alteraciones importantes en la fluorescencia intrínseca de sus residuos de triptófanos. Tampoco se observaron cambios significativos entre las constantes de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) para los apagamientos con acrilamida (Tabla IV). Las curvas de apagamientos fueron lineales hasta las concentraciones de 0,5 M de acrilamida, lo que permite descartar residuos de triptófanos con distintos grados de exposición. Particularmente interesante resulta constatar que las propiedades fluorescentes no se alteran en forma importante ni siquiera al disociarse la enzima. El ambiente al que están expuestos los residuos de triptófanos sería, por lo

tanto, esencialmente equivalente, si no idéntico, en las especies monoméricas y oligoméricas de la arginasa humana tipo I independiente de los cambios mutagénicos introducidos en su secuencia.

Como se ha mencionado, los estudios cinéticos realizados al pH óptimo de 9,5 mostraron un comportamiento hiperbólico para todas las especies analizadas, sin diferencias relevantes en los valores de  $K_m$ ,  $k_{cat}$  o las constantes de inhibición por ornitina o el clorhidrato de guanidina, análogo estructural de la urea. El carácter competitivo de las inhibiciones, concuerdan con un mecanismo cinético al azar en equilibrio rápido para las especies silvestres y mutantes (Reczkowski y Ash, 1994). Esto significa que, a pesar de los cambios mutagénicos introducidos en la zona intermonomérica, se mantendría la característica esencial del sitio activo, con zonas independientes para la unión de los productos, y prácticamente con la misma afinidad en todas las especies.

Por último, el análisis de los modelos estructurales generados en este trabajo concuerda con los resultados experimentales, enfatizando la importancia de los residuos Arg308 y Glu256 en la mantención de la estructura cuaternaria de la arginasa tipo I.

## 5.1 CONCLUSIONES

Los resultados contenidos en este trabajo de tesis corroboran nuestra hipótesis que propone al residuo Asp204 como un componente importante entre las interacciones intermonómeros de la arginasa humana tipo I para el mantenimiento de la estructura cuaternaria de la enzima. Ello se explicaría por su interacción con el residuo Arg308 del motivo en forma de S. También se agregan a estas interacciones intermonoméricas las formadas entre los residuos Glu256 y la Arg255 de la subunidad adyacente, como parte de los determinantes estructurales del comportamiento cooperativo de la enzima.

En resumen, la expresión de los efectos cooperativos para el sustrato sería mediada, en forma conjunta, por las interacciones específicas que establecen tanto el motivo estructural en forma de S, incluida como componente esencial la Arg308, como el residuo Glu256. Una alteración en cualquiera de estos tres componentes afectaría las interacciones intermonómeros que explican la cooperatividad, incluso en especies que mantienen su organización cuaternaria.

Como hipótesis para futuras investigaciones proponemos, aparte del residuo Arg308, a la Arg255, como esencial en la mediación de efectos cooperativos.

## 6. REFERENCIAS

1. Archibald, R. M. (1945) Colorimetric determination of urea. *J. Biol. Chem.*, 157,507-518.
2. Ash, D. E., Scolnick, L. R., Kanyo, Z. F., Vockley, J. G., Cederbaum, S. D. y Christianson, D. W. (1998). Molecular basis of hyperargininemia: structure-function consequences of mutations in human liver arginase. *Mol. Genet. Metab.*, 64,243-9.
3. Ash, D. E., Cox, J. D. y Christianson, D. W. (2000). Arginase: a binuclear manganese metalloenzyme. *Met. Ions. Biol. Syst.*, 37,407-28.
4. Bewley, M. C., Jeffrey, P. D., Patchett, M. L., Kanyo, Z. F. y Baker, E. N. (1999). Crystal structure of *Bacillus caldovelox* arginasa in complex with substrate and inhibitors reveals new insights into activation, inhibition and catalysis in the arginase superfamily. *Structure*, 7, 435-448.
5. aCama, E., Colleluori, D.M., Emig, F.A., Shin, H., Kim, S.W., Kim, N.N., Traish, A.M., Ash, D.E. y Christianson, D.W. (2003). Human arginase II: crystal structure and physiological role in male and female sexual arousal. *Biochemistry*, 42(28),8445-51.
6. bCama, E., Emig, F.A., Ash, D.E. y Christianson, D.W. (2003). Structural and functional importance of first-shell metal ligands in the binuclear manganese cluster of arginase I. *Biochemistry*, 42(25),7748-58.

7. Carvajal, N., Venegas, A., Oestreicher, G. y Plaza, M. (1971). Effect of manganese on the quaternary structure of human liver arginase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 250, 437-442.
8. Carvajal, N., Acoria, M., Rodríguez, J. P., Fernández, M. y Martínez, J. (1982). Evidence for cooperative effects in human liver arginase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 701, 146-148.
9. Carvajal, N., Bustamante, M., Hinrichsen, P. y Torres, A. (1984). Properties of arginase from the sea mollusc *Concholepas concholepas*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B, 591-594.
10. Carvajal, N., Torres, C., Uribe, E. y Salas, M. (1995). Interaction of arginase with metal ions: studies of the enzyme from human liver and comparison with other arginases. *Comp Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 112, 153-9.
11. Carvajal, N., Olate, J., Salas, M., Uribe, E., López, V., Herrera, P. y Cerpa, J. (1999). Chemical modification and site-directed mutagenesis of human liver arginase: evidence that the imidazole group of histidine-141 is not involved in substrate binding. *Arch. Biochem. Biophys.*, 371, 202-206.
12. a Carvajal, N., Orellana, M. S., Salas, M., Enríquez, P., Alarcón, R., Uribe, E. y López, V. (2004). Kinetic studies and site-directed mutagenesis of *Escherichia coli* agmatinase. A role for Glu274 in binding and correct positioning of the substrate guanidinium group. *Arch Biochem Biophys.*, 430, 185-90.

- 13. b** Carvajal, N., Uribe, E., Lopez, V. y Salas, M. (2004). Inactivation of human liver arginase by Woodward's reagent K: evidence for reaction with His141. *Protein J.*, 23(3), 179-83
- 14.** Cavalli, R. C., Burke, C. J., Kawamoto, S., Soprano, D. R. y Ash, D. E. (1994). Mutagenesis of rat liver arginase expressed in *Escherichia coli*: role of conserved histidines. *Biochemistry*, 33(35), 10652-7.
- 15.** Christianson, D. (2004). Arginase: Structure, mechanism, and physiological role in male and female sexual arousal. *Acc. Chem. Res.*, 38, 191-201.
- 16.** Constanzo, L., Sabio, G., Mora, A., Rodriguez, P., Ochoa, A., Centeno, F. y Christianson, D. (2005). Crystal structure of human arginase I at 1.29-Å resolution and exploration of inhibition in the immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 102, 13058-63.
- 17.** Daghigh, F., Cavalli, R. C., Soprano, D. R. y Ash, D. E. (1996). Chemical modification and inactivation of rat liver arginase by N-bromosuccinimide: reaction with His141. *Arch. Biochem. Biophys.*, 327, 107-112
- 18.** García, D., Uribe, E., Lobos, M., Orellana, M. y Carvajal, N. (2008) Studies on the functional significance of C-terminal S-shaped motif in human arginase type I: Essentiality for cooperative effects. *Arch. Biochem. Biophys.*, 481(1), 16-20.

19. Gotoh, T., Sonoki, T., Nagasaki, A., Terada, K., Takiguchi, M. y Mori, M. (1996). Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. *FEBS Lett.*, 395, 119-22.
20. Haraguchi, Y., Aparicio, R., Takiguchi, M., Akaboshi, I., Yoshino, M., Mori, M. Y. y Matsuda, I. (1990). Molecular basis of argininemia. *J. Clin. Invest.*, 86, 347-350.
21. Hsieh, J-Y., Liu, J-H., Fang, Y-W, Hui-Chih y Hung, H-C. (2009). Dual roles of Lys57 at the dimer interface of human mitochondrial NAD(P)+-dependent malic enzyme. *Biochem. J.*, 420, 201–209
22. Jenkinson, C. P., Grody, W. W. y Cederbaum, S. D. (1996). Comparative properties of arginases. *Comp. Biochem. Biophys.*, 114B, 107-132.
23. Kanyo, Z. F., Scolnick, N. R., Ash, D. E. y Christianson, D. W. (1996). Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase, *Nature*. 383, 554-557.
24. Kepka-Lenhart, D., Mistry, S.K., Wu, G. y Morris, S.M. Jr. (2000). Arginase I: a limiting factor for nitric oxide and polyamine synthesis by activated macrophages? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279(6), R2237-42.

25. Laskowski, R. A., Moss, D. S. y Thornton, J. M. (1993). Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J. Mol. Biol.*, 231(4),1049-67.
26. Lavulo, L. T., Sossong, T. M. Jr, Brigham-Burke, M. R., Doyle, M. L., Cox J. D., Christianson, D. W. y Ash, D. E. (2001). Subunit-subunit interactions in trimeric arginase. Generation of active monomers by mutation of a single amino acid. *J. Biol. Chem.*, 276, 14242-8.
27. Li, G., Meininger, C. J., Hawker, J. R. Jr, Haynes, T. E., Kepka-Lenhart, D., Mistry, S. K., Morris, S. M. Jr. y Wu, G. (2001). Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 280(1), E75-82.
28. Maarsing, H., Zaagsma, J. y Meurs, H. (2008). Arginine homeostasis in allergic asthma. *Eur. J. Pharmacol.* 585, 375-384.
29. Marti-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F. y Sali, A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29:291-325.
30. Morris, A. L., MacArthur, M. W., Hutchinson, E. G. y Thornton, J. M. (1992). Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins*, 12(4),345-64.



31. Morris, S. M. (2004). Recent advances in arginine metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 7,45-51.
32. Morris, S. M. (2009). Recent advances in arginine metabolism: rules and regulation of the arginases. *British J. Pharmacol.* 157, 92-930.
33. Orellana, M. S., López, V., Uribe, E., Fuentes, M., Salas, M. y Carvajal, N. (2002). Insights into the interaction of human liver arginase with tightly and weakly bound manganese ions by chemical modification and site-directed mutagenesis studies. *Arch Biochem. Biophys.*, 403(2),155-9.
34. Perozich, J., Hempel, J. y Morris, S. M. Jr. (1997). Roles of conserved residues in the arginasa family. *Biochim. Biophys. Act.*, 1382,23-37.
35. Reczkowski, R. y Ash, E. (1994). Rat liver arginase: Kinetic mechanism, alternate substrates and inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.*, 312, 31-37.
36. Sabio, G., Mora, A., Rangel, M. A., Quezada, A., Marcos, C. F., Alfonso, J. C., Soler, G. y Centeno, F. (2001). Glu-256 is a main structural determinant for oligomerisation of human arginasa I. *FEBS letters*, 501,161-165.

37. Satriano, J. (2004). Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. *Amino Acids*, 4, 321-9.
38. Scolnick, L., Kanyo, Z., Cavalli, C., Ash, D. y Christianson, D. (1997). Altering the binuclear manganese cluster of arginasa diminishes thermostability and catalytic function. *Biochem.*, 36, 10558-10565.
39. Sippl, M. J. (1993). Recognition of error in three-dimensional structures of proteins. *Proteins*, 17(4), 355-62.
40. Wu, G., Morris, S. M. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.*, 336, 1-17.
41. Yu H, Yoo PK, Aguirre CC, Tsoa RW, Kern RM, Grody WW, Cederbaum SD, Iyer RK. (2003). Widespread expression of arginase I in mouse tissues. Biochemical and physiological implications. *J. Histochem. Cytochem.*, 51, 1151-60.