Caracterización Enzimática y Estudio Cinético de factores determinantes en la actividad de Arginasa I recombinante de hígado humano.

Roberto Amigo B., Manuel Torres B.

Resumen

La arginasa es una enzima que se encuentra en el hígado, perteneciente a la familia de las hidrolasas. Cataliza la hidrólisis del aminoácido L-arginina para obtener urea, producto que participa importantemente en el ciclo de la urea, y formación de ornitina presente en la síntesis de otros aminoácidos como prolina y aspártico. En este estudio experimental se analizaron los aspectos y parámetros cinéticos de la arginasa I recombinante de hígado humano. Para caracterizar la enzima luego de su producción y posterior purificación se determinó la concentración de proteína mediante el método de Bradford, la actividad enzimática y la actividad específica, su *Km* y *Vmáx*. Luego, la reacción se sometió a diversas condiciones de pH, presencia de activadores e inhibidores, iones metálicos, diferencias en las concentraciones de enzima y sustrato, construyéndose curvas de progreso, de saturación y dobles recíprocos, con las cuales se pudieron discutir y concluir los resultados en base a la variación en sus parámetros cinéticos, que determinan la especificidad de la enzima por el sustrato y su eficiencia.

Introducción

Toda reacción química está determinada tanto cinética como termodinámicamente por constantes de equilibrio que establecen básicamente la relación entre las concentraciones de reactivos y productos cuando las reacciones reversibles poseen la misma velocidad de formación como de desaparición de producto. En los organismos y más generalmente en cualquier tipo de sistema no ocurre lo contrario y todas las reacciones en cualquier vía metabólica, tanto de síntesis como de degradación están determinadas por sus correspondientes constantes de equilibrio. El problema es que muchas veces estas reacciones ocurren a velocidades considerablemente bajas, no satisfaciendo las necesidades de formación de producto o de degradación de los reactivos in vivo. Es aquí donde intervienen las enzimas, proteínas que catalizan las reacciones aumentando considerablemente sus velocidades encontrando una vía alternativa con una energía de activación menor, estabilizando el estado de transición entre el sustrato y el producto, proporcionándole a la reacción una velocidad mucho mayor comparada con la velocidad si no participará el catalizador en la reacción. Las enzimas y en general, todos los catalizadores, nunca alteran el equilibrio ya que el aumento sustancial de producto también se verá reflejado en aumentos en la concentración de reactivos. Estas moléculas sólo aumentan en una inmensa proporción la velocidad de la reacción termodinámicamente favorable.

Existen diversos factores que son capaces de alterar de alguna manera la eficiencia catalítica de una enzima. Uno de ellos es el pH, muy influyente, sobre todo cuando existe presencia de aminoácidos desprotonables, los que al variar su carga pueden influir en la conformación y el plegamiento de la proteína alterando interacciones puente-hidrógeno, iónicas, y de Fuerzas de Van der Waals, modificando químicamente su sitio activo y por consiguiente afectando la eficiencia en su función. También lo hace la presencia de cofactores como iones metálicos que estabilizan su conformación o participan directamente en la catálisis, así también las moléculas inhibidoras que pueden competir con el sustrato para unirse a la enzima, o evitar que el complejo enzima-sustrato genere el producto debido a la estabilización que le proporciona el interferente alterando sus parámetros cinéticos, u otras activadoras que aumentarán la eficiencia de la enzima.

Por otro lado, las concentraciones de sustrato o la concentración de enzima presente, afectarán en algún grado la reacción, reflejándose en un cambio de velocidad o de actividad.

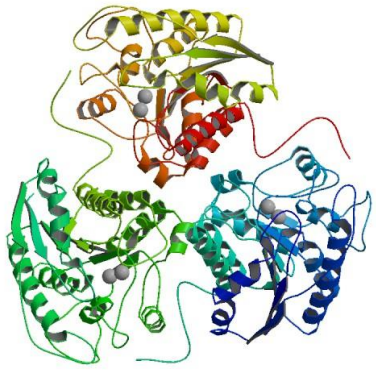


Figura 1.
Estructura Arginasa I, en donde los Mn^{2+} están representados con bolitas plomas (PDB).

La siguiente caracterización y estudio cinético se realizará sobre la Arginasa I(Fig. 1) (EC 3.5.3.1), una enzima hepática ,con una estructura cuaternaria formada por un trímero, dependiente del ión divalente Manganeso (Mn^{+2}), que cataliza una reacción citosólica; la hidrólisis del aminoácido L-arginina produciendo urea y L-ornitina. Esta reacción ocurre en organismos ureotélicos en los que está enzima tiene un rol fundamental en el ciclo de la urea(1)(Fig. 2).

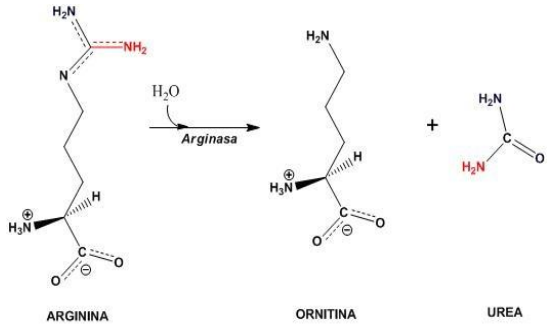


Figura 2.
Reacción catalizada por Arginasa I.

El Mn^{+2} es el activador fisiológico, y la enzima contiene 2 iones por subunidad, los cuales se ubican en la parte inferior de la hendidura del sitio activo y forman una resonancia electrónica paramagnética con espines acoplados en centros binucleares(2) (Fig. 3). Estudios también revelan esta función satisfecha por Ni^{+2} y Co^{+2} (3) (4) y algunos casos por Fe^{+2} y Cd^{+2} (5) (6). Para la enzima del hígado humano los valores en la curvas de pH vs Vmáx entregan un pKa de 7.8-7.9 (7). Estos valores de pK son consistentes con el pK esperado para la ionización de moléculas de solventes formando puentes con el centro Mn2+-Mn2+ (8), y se cree que el puente metálico hidroxilado es el responsable de la catálisis.
El análisis sobre estas condiciones y el estudio de las curvas de progreso,

saturación y dobles recíprocos nos entregarán datos y observaciones que serán materia de análisis de acuerdo a los datos e información ya presente en la literatura.

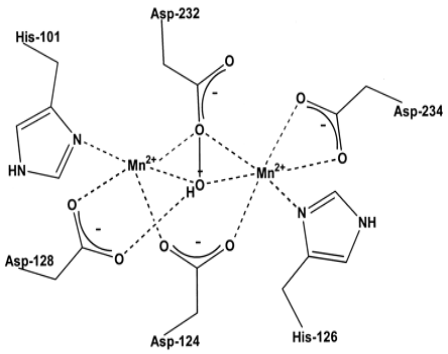


Figura 3.
Centro binuclear, Arginasa I de rata.

Las mediciones de actividad se harán en base a la reacción que ocurre entre la urea producida por la catálisis y el reactivo α-isonitroso propiofenona en medio ácido a 100 °C, que genera un compuesto coloreado con un máximo de absorción a 540 nm y con el fundamento de estos resultados se analizará la variación de la Km y la Vmáx en función de las variantes antes ya mencionadas.

Objetivos:

Comprobar los efectos influyentes en la cinética de la Arginasa I recombinante de hígado humano y realizar su caracterización en relación a los ensayos siguientes:

- Cuantificación de la muestra de enzima.
- Determinación de la actividad enzimática y actividad enzimática específica.
- Análisis electroforético.
- Representación de una curva de progreso.
- Representación de la curva de saturación y dobles recíprocos
- Cálculo de la Km y Vmáx.
- Representación del efecto de la concentración de enzima.
- Representación del efecto de pH, iones metálicos e inhibidores.

Materiales y Métodos

Materiales:

- Cronómetro
- Tubos de ensayo
- Tubos Eppendorf 1,0 mL y 1,5 mL
- Micro pipetas de p10, p20, p200 y p1000
- Cubetas de vidrio para medición absorciométrica de 1 cm.
- Equipamiento:
    - Espectrofotómetro, marca Arquimed, modelo SP-2000
    - Sistema para geles de acrilamida Mini Protean II (BIOLAD)
    - Baño termorregulador
    - Incubadora térmica
    - Agitador
- Reactivos:
    - Enzima Arginasa I recombinante de hígado humano (1:50)
    - Tampón de glicina 200 mM pH 9,0
    - Arginina 200 mM pH 7,5
    - $MnCl_2$ 12,5 mM

- Reactivo de Bradford (Merck)
- Mezcla Acida(Preparación, 640 mL H_2O destilada, 90 mL H_2SO_4, 270 mL H_3PO_4 y mantener en frío mientras se prepara)
- α-isonitroso propiofenona al 3% en etanol
- PAGE-SDS
- Buffer de carga (Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,025%, beta-mercaptoetanol 5%)
- Inhibidores(ornitina y lisina)
- Solución de iones metálicos (Mn^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+})
- Solución Stándard, albúmina de suero de bovino 25 µg/mL.

Métodos:

Preparación de la enzima recombinante

Para obtener la enzima se usó la cepa bacteriana electropotente E.coli JM 109. A la cepa se le inserto, mediante electroporación, un plásmido que contenía el gen para expresar la Arginasa I. Las bacterias se cultivaron en placas LB a 37°C. Una colonia fue crecida en caldo LB a 37°C durante 16 hrs y posteriormente fue inducido con IPTG (0,5 mM) y cultivado en medio TB por 16 hrs a 37°C. Las bacterias fueron sedimentadas por centrifugación por 10 min a 4080 x g y luego se lavaron con TRIS (10 mM, pH 7,5). A continuación se suspendió en tampón de lisis y se agrego PMSF (0,1mM) y DTT (2mM). La suspensión de bacterias fue sonicada y luego centrifugada por 10 min a 12011 x g. El sobrenadante que se obtuvo y que contiene a la enzima se mantuvo refrigerado.

Determinación de la actividad enzimática de la Arginasa I

Para determinar la actividad enzimática de la Arginasa I, se preparan 4 muestras en tubos de ensayos. A los tubos se les agrega los siguientes reactivos, Glicina (50 mM,pH 9,0), Arginina (50 mM, pH 7,5), $MnCl_2$(2,5 mM) y agua destilada. Al final se le agrega la enzima con distintas diluciones para cada tubo, 1:50, 1:500 y 1:800 al blanco no se le agrega enzima. Todos los tubos deben tener un volumen final de 1 ml. Inmediatamente después de agregar la enzima se incuban los tubos a 37°C por 10 min. Luego se le agrega 1 mL de mezcla ácida para detener la reacción y en seguida se le agrega 0,1 mL de α-isonitroso propiofenona (él que reacciona con la urea formada en la catálisis). Enseguida se agitan los tubos y se incuban a 100°C por 30 min tapados con bolitas de vidrio. Luego de pasado los 30 min. se deja enfriar en la oscuridad ya que el compuesto coloreado es fotosensible. Se lee la absorbancia a 540 nm.

Determinación de proteínas por el método de Bradford

Primero se realiza una curva de calibración con el estándar de Albumina de suero de bovino. Se preparan 6 tubos

más un blanco que no tendrá la albúmina. A cada tubo se le agregan distintos volúmenes del estándar, 10, 40, 80, 120, 160 y 200 µL. Además se le agrega a cada uno 200 µL de reactivo de Bradford y agua destilada hasta que cada tubo llegue a un volumen final de 1 ml. Se deja incubar 5 minutos a temperatura ambiente. El reactivo de Bradford forma un complejo coloreado que tiene su maximo de absorbancia a 595 nm. Se lee la abosrbancia.
Para cuantificar, se hacen tres tubos que contienen diluciones de 1:50, 1:500, 1:800 de la enzima Arginasa. A cada uno de los tubos se les agrega 50 µL de alguna dilución y 200µL de reactivo de Bradford y agua destilada hasta completas 1mL. Se deja incubar a temperatura ambiente por 5 minutos y se lee la absorbancia a 595 nm.

Separación de proteínas mediante electroforesis en gel denaturante

Se prepara el gel PAGE-SDS. El gel concentrador se prepara con un 5 % de acrilamida y se lleva a un volumen final de 2,5 ml. Mientras que el gel separador se prepara con un 12 % de acrilamida y se lleva a un volumen final de 5 ml. Además de la acrilamida cada gel contiene TRIS (pH 8,8), SDS, per-sulfato de amonio, TEMED y agua. Simultáneamente a la preparación de los geles, se preparan las muestras agregando en un tubo Eppendorf 20 (µL) de la muestra de enzima y 5 (µL) del buffer de carga 5x, y se incuban a 100°C por 5 min. Posteriormente el gel separador se coloca abajo en el molde de vidrio y el gel concentrador se coloca arriba. Una vez colocadas las muestras en los respectivos carriles, junto con el marcador de peso molecular, correr el gel a 100 Volt, hasta que caiga el frente de corrida. Sacar el gel del contenedor de vidrio y ponerlo en el contenedor de plástico que contiene la solución fijadora. Se agita la solución por 20 min a temperatura ambiente. Eliminar solución fijadora en contenedor de plástico destinado para ello y agregar al gel la solución de tinción y se dejara por 12 a 18 hrs. Luego se observarán los resultados.

Preparación de la curva de progreso de la enzima

Se preparan 8 tubos enumerados con 1 mL de mezcla ácida en cada uno de ellos. Luego se prepara el blanco agregando 250 µL del tampón de glicina (pH 9,0), 200µL de $MnCl_2$, Arginina hasta alcanzar una concentración de 25mM (pH 7,5) rellenando con agua destilada hasta un volumen de 1 mL. Simultáneamente se prepara un tubo de incubación que contiene 2500 µL del tampón de glicina, 2000 µL de $MnCl_2$, Arginina hasta alcanzar una concentración de 25mM y rellenando con agua destilada hasta 9 mL y se completa a 10 mL agregando los 1000 µL restantes de enzima con una dilución 1:1000. Inmediatamente después de agregar la enzima, se mezcla y se saca una alícuota de 1 ml y se vacía en el tubo 1; este corresponderá al tiempo cero. Se mantiene el tubo de incubación en el baño a 37 °C y se van retirando alícuotas de 1mL a los tiempos de 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos agregándose a los tubos (cada uno con 1 mL de mezcla ácida) 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 respectivamente. El blanco se deja incubar durante los 30 min y se le agrega 1mL de mezcla ácida. Luego de haber sacado la ultima alícuota y haber retirado el blanco del baño termorregulador a los 37 °C a cada tubo se le agrega 100µL del reactivo α-isonitroso propiofenona, se agitan y se incuban a 100°C por 30 min tapados con bolitas de vidrio. Luego se deja enfriar en oscuridad. Se lee absorbancia a 540 nm.

Después se repite el mismo procedimiento solo que se usa una concentración de sustrato de 50mM.

Preparación de la curva de saturación de la enzima

Se preparan 7 tubos siguiendo los mismos protocolos para determinar la actividad enzimática, con la única diferencia que en cada tubo se agregan 100 µL de arginina hasta alcanzar en cada tubo concentraciones finales de 2, 2,5, 5, 10, 20, 30 y 50mM. Se prepara un blanco con 100 µL de arginina a cualquier concentración y sin adicionarle la enzima. Después de agregar la enzima (dilución 1:1000) a los 7 tubos se incuba inmediatamente a 37°C por 8 minutos. Pasado el tiempo de incubación se agrega a cada tubo 1 mL de mezcla ácida, incluyendo al blanco y se agregan 100µL dereactivo α-isonitroso propiofenona, se agita y se vuelven a incubar por 30 minutos a 100° C tapados con bolitas de vidrio y se lee absorbancia a 540 nm.

Efecto de la concentración de enzima

Se preparan 6 tubos siguiendo los mismos métodos para determinar la actividad enzimática, con la diferencia que ahora a cada tubo se agregan distintas concentraciones de enzima siempre en un volumen final de 1mL. Se agregan 20, 40, 60, 80, 100 y 120µL de arginasa a cada tubo. El blanco se prepara sin la enzima. Después de agregar la enzima se sigue el mismo método de incubación por 8 minutos, posteriormente se adiciona 1mL de mezcla ácida, se agita y se hace reaccionar cada tubo con 100µL de α-isonitroso propiofenona, se vuelve a agitar y se hace incubar por 30 minutos a 100° C. Se enfría en oscuridad y se mide absorbancia a 540nm.

Efecto del pH

Se prepara una dilución de enzima 1:1000. Después se determina la actividad enzimática usando la misma metodología del cálculo de actividad enzimática, solo que no se le agrega glicina, a cambio, a cada tubo se le agregara un tampón a pH 6,5, 7,5, 8,5, 9,5, 10,5, 12,5. Al blanco no se le agrega la enzima, y se le agrega cualquier tampón. Después de agregada la enzima se incuba a 37°C durante 10 min y posteriormente se adiciona 1mL de mezcla ácida, se agita y se hace reaccionar cada tubo con 100µL de α-isonitroso propiofenona, se vuelve a agitar y se hace incubar por 30 minutos a 100° C. Se enfría en oscuridad y se mide absorbancia a 540nm.

Efecto de inhibidores

Se prepara una dilución de enzima 1:1000. Después usando el mismo protocolo para determinar actividad enzimática, se preparan 6 tubos, a los cuales ahora se le agregan 100µL de distintas concentraciones de ornitina (pH 7,5), las concentraciones son de 0, 10, 25, 50, 100 y 200mM. Al blanco no se le agrega la enzima, pero si se le agrega ornitina, no importa la concentración. Luego se sigue la misma metodología para determinar actividad enzimática. Se incuba a 37°C durante 10 minutos y posteriormente se adiciona 1mL de mezcla ácida, se agita y se hace reaccionar cada tubo con 100µL de α-isonitroso propiofenona, se vuelve a agitar y se hace incubar por 30 minutos a 100° C. Se enfría en oscuridad y se mide absorbancia a 540nm.

Luego se realiza el mismo experimento cambiando la ornitina por lisina (pH 7,5)

a las mismas concentraciones.

Efecto iones metálicos

Se prepara una dilución de enzima 1:1000. Luego, de acuerdo al mismo protocolo para determinar actividad enzimática con la excepción que a los tubos no se les agrega $MnCl_2$, en cambio, se les agrega un diferente ion metálico. Para determinar la actividad con cada ion, se realizan dos tubos de actividad, preparados exactamente igual con 40mM de cada ion correspondiente, para que sea más certera la medición. Además se prepara un tubo control que contiene la enzima, pero no contiene ningún ion. Se prepara un blanco para cada determinación de ion, pero no se le agrega la enzima. Luego se incuba a 37°C durante 10 min. La medición de la actividad en términos de absorbancia se realiza de la misma manera que los procedimientos anteriores. El ensayo se realiza para los siguientes iones metálicos: Mn^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}.

Resultados y Discusión

Determinación de la actividad enzimática de la Arginasa I

Luego de haber realizado el procedimiento se obtuvieron los siguientes resultados en las mediciones:

	Muestra sin diluir	Dilución 1	Dilución 2
Dilución	1:50	1:500	1:800
Absorbancia(540nm)	1,983	1,27	1,125

Tabla 1. Valores de absorbancia a 540nm, de diferentes diluciones de la muestra

Hay que tener en cuenta que *1 unidad de Absorbancia (540nm) = 1µmol de urea* para el desarrollo del siguiente análisis. Por lo tanto, nuestros datos indican que la enzima sin diluir (1:50) cataliza la formación de 1,983µmoles de urea, la *dilución 1* forma 1,27 µmoles de urea y la *dilución 2* forma 1,125 µmoles de urea. Todas estos datos corresponden a las mediciones hechas en 10 minutos de incubación, por lo que de acuerdo a la siguiente relación

$$Actividad\ enzimática = \frac{\mu moles\ urea\ form.}{t\ incubación}$$

Se tiene lo siguiente:

	Muestra sin diluir	Dilución 1	Dilución 2
Actividad enzimática	0,1983µmol urea/min	0,127µmol urea/min	0,1125µmol urea/min

Tabla 2. Valores de actividad enzimática, de cada dilución

Determinación de concentración de proteínas y actividad específica.

Luego de haber realizado el protocolo del método de Bradford para cuantificar proteínas se obtuvo la siguiente curva de calibración:

Curva de Calibración						
Tubo	1	2	3	4	5	6
Albúmina (µg/mL)	1	4	8	12	16	20
Absorbancia (595nm)	0,047	0,267	0,445	0,645	0,913	1,015

Tabla 3. Valores de absorbancia a 595nm, de diferentes concentraciones de standar albumina

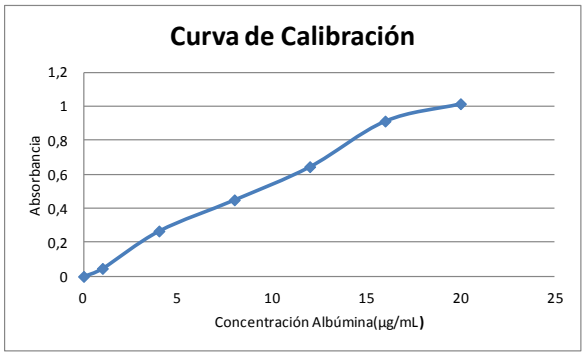


Gráfico 1. Curva de Calibración estándar Albúmina

Utilizando la zona lineal, en donde la concentración es directamente proporcional a la absorbancia, eliminando el último punto y así disminuyendo el riesgo de error en la medición de nuestra muestra de Arginasa I. Se tiene:

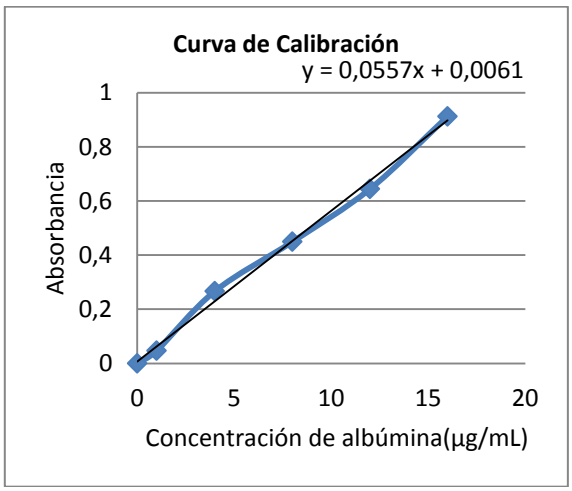


Grafico 2. Curva de Calibración standar Albumina en la zona lineal

Del gráfico 2, obtenemos la pendiente, que correspondería a nuestro coeficiente de extinción molar (Ɛ)

$$Ɛ = 0{,}0557(cm/µg) \text{ (Fig.4)}$$

Nuestras mediciones para cuantificar la concentración de la enzima Arginasa:

Tubo	A	B	C
Dilución	1:50	1:500	1:800
Absorbancia (595nm)	0,624	0,052	0,071

Tabla 4. Lectura Absorbancia (595nm) de las diferentes diluciones de enzima con el método de Bradford

Con los datos obtenidos en la Tabla 4, usando el Ɛ (Fig.4) y con un ancho de cubeta (b) de 1cm se puede calcular la concentración de proteínas, usando la ecuación de Lambert-Beer. (Fig.5)

$$A = C \times Ɛ \times \text{b (Fig.5)}$$

Usamos la absorbancia de la muestra sin diluir, ya que está dentro de la zona lineal y esta justo en la mitad de la curva de calibración (Ver Tabla 4 y Gráfico 2). Se interpola el valor y se reemplazan los datos conocidos en la ecuación (Fig.5)

$$C = \frac{A}{Ɛ \times \text{b}} = \frac{0{,}624}{0{,}0557} = 11{,}2\ \frac{\mu g}{mL}$$
$$= 0{,}0112 \frac{mg}{mL}\ (Fig.6)$$

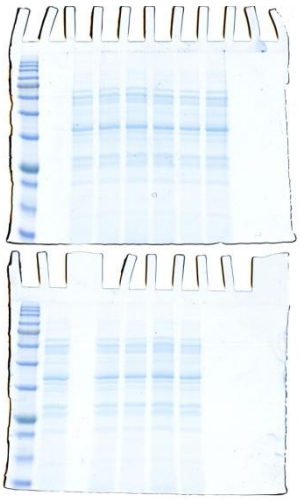
Como conocemos la actividad enzimática de la enzima (Tabla 2), y la concentración de enzima (Fig.6) determinamos la actividad específica de la Arginasa I recombinante de hígado humano.

$$Actividad\ específica = \frac{Act.enzimática}{Concent.de\ enzima}$$

$$= \frac{0{,}1893}{0{,}0112} = 17{,}705 \frac{\mu moles\ urea}{min \times mg\ de\ prot}\ (Fig.7)$$

Separación de proteínas mediante electroforesis en gel denaturante

Después de haber realizado el protocolo para la electroforesis, se aprecian los resultados. Las proteínas corrieron en el gel de acuerdo a su peso molecular(KDa) y se aprecian de acuerdo al marcador de peso en el primer carril. Nuestra proteína corresponde al último carril.



Preparación de la curva de progreso de la enzima

Luego de realizado todo el procedimiento descrito, usando concentraciones de 25mM y 50mM de sustrato, se obtuvieron las siguientes tablas y gráficos.

Tiempo(min)	Absorbancia	[urea] µmol
0	0,02	0,02
3	0,384	0,384
5	0,468	0,468
10	1,19	1,19
15	1,762	1,762
20	1,91	1,91
25	1,945	1,945
30	1,997	1,997

Tabla 5: Valores de absorbancia obtenidos, usando una concentración de sustrato de 25mM.

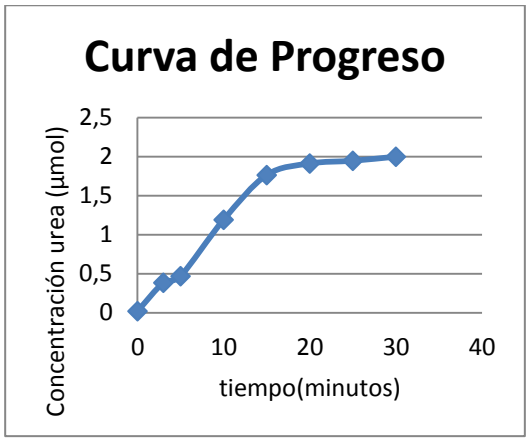


Gráfico 3. Curva de Progreso 25nM sustrato.

Tiempo(min)	Absorbancia	[urea] µmol
0	0,008	0,008
3	0,187	0,187
5	0,405	0,405
10	0,608	0,608
15	0,94	0,94
20	1,154	1,154
25	1,248	1,248
30	1,408	1,408

Tabla 6: Valores de absorbancia obtenidos, usando una concentración de sustrato de 50 mM.

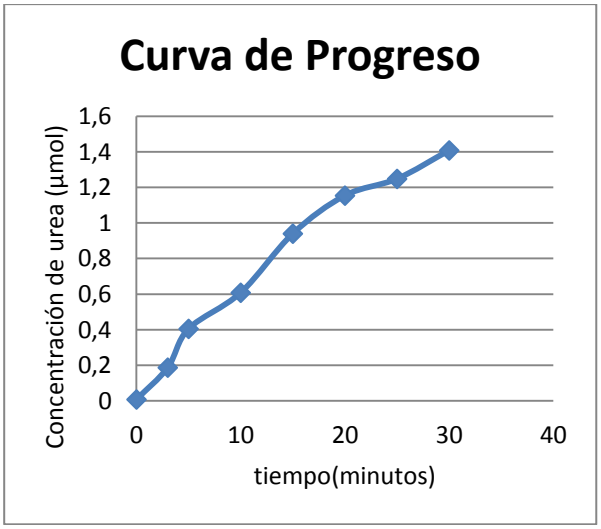


Gráfico 4. Curva de Progreso 50mM sustrato.

Al observar el Gráfico 3, el gráfico se mantiene lineal hasta aproximadamente los 15 min, luego se llega a un equilibrio, donde la velocidad formación de urea es igual a la velocidad de desaparición de la urea por lo que no se ve un cambio neto. La velocidad también se hace muy baja y cinéticamente tiende a cero debido a una muy baja concentración de sustrato en ese instante de tiempo. En la zona lineal de la curva, se calcula la pendiente que representa la velocidad inicial usando 25mM como concentración de sustrato.

$$V\ inicial = 0{,}117 \mu\text{mol urea/min}$$

Al observar el Gráfico 4, la curva se mantiene lineal hasta aproximadamente los 30 min, donde se deduce que el equilibrio se alcanzará en tiempos mayores debido a que hay mas sustrato disponible para que la reacción se detenga cinéticamente. Es por esto que no logramos ver la meseta típica de la hipérbole rectangular. En la zona lineal de la curva se calcula la pendiente, al igual que en la observación anterior, la que representa la velocidad inicial usando 50mM como concentración de sustrato.

$$V\ inicial = 0{,}0502\ \mu\text{mol urea/min}$$

Curva de Saturación

Se espera que al ir variando la concentración de sustrato, manteniendo la concentración de enzima constante, la velocidad irá aumentando hasta llegar a una zona de saturación, donde toda la enzima se encuentra como complejo enzima-sustrato, por lo tanto se alcanza la velocidad máxima ($V_{máx}$). Si seguimos aumentando la concentración de sustrato, no veremos cambio alguno en la curva ya que la enzima ya está saturada.

Si por otro lado aumentamos la concentración de enzima en la zona de saturación, la curva tendrá un nuevo aumento hasta llegar a una nueva zona de saturación por lo que su velocidad máxima en estas condiciones aumentará.

Luego de haber realizado el procedimiento descrito, con un tiempo de incubación de 8 min (tiempo hasta donde nuestra curva de progreso es lineal), se obtuvieron los siguientes valores de absorbancia, a los cuales se le calculó la velocidad. (Tabla 7)

[Sustrato] mM	Absorbancia	Veloc.(µmol/min)
0	0	0
2	0,095	0,012
2,5	0,35	0,044
5	0,475	0,06
10	0,531	0,066
20	0,618	0,077
30	0,589	0,074
50	0,615	0,077

Tabla 7: La tabla muestra valores de absorbancia y de velocidad, con respecto a la concentración de sustrato.

Con los valores de la Tabla 7 se construye la curva de saturación.

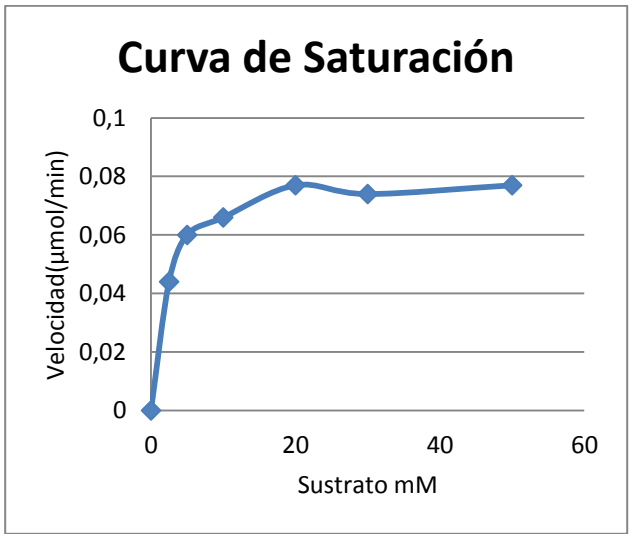


Gráfico 5.Curva de Saturación, sin el punto de 2 mM de sustrato.

Se visualiza como la curva del gráfico 5, tiene un comportamiento hiperbólico consistente con la cinética de Michaelis-Menten, posee una $V_{máx}$ en la zona de saturación, y una concentración de sustrato (K_m), a la cual $V = {Vmáx}/{2}$ El comportamiento de Michaelis-Menten, es descrito por la siguiente ecuación

$$V = \frac{Vmáx \times [Sustrato]}{Km + [Sustrato]}$$

Para poder obtener los parámetros cinéticos, Km y Vmax. Hay que realizar un gráfico de doble recíproco (Gráfico 6). Para ello se tabulan los datos de 1/ [S] y 1/V (Tabla 8), pero no tabulamos el punto que contiene 2 mM de sustrato, ya que probablemente se cometió un error en la preparación de ese punto y nos conduciría a una medición menos precisa de los parámetros.

1/[S]	1/V
0,4	22,727
0,2	16,667
0,1	15,152
0,05	12,987
0,03	13,514
0,02	12,987

Tabla 8: Datos para construir gráfico de doble recíproco.

Con estos datos se construye nuestro gráfico de dobles recíprocos (Grafico 6). Con el cual podremos calcular una buena aproximación de K_m y $V_{máx}$.

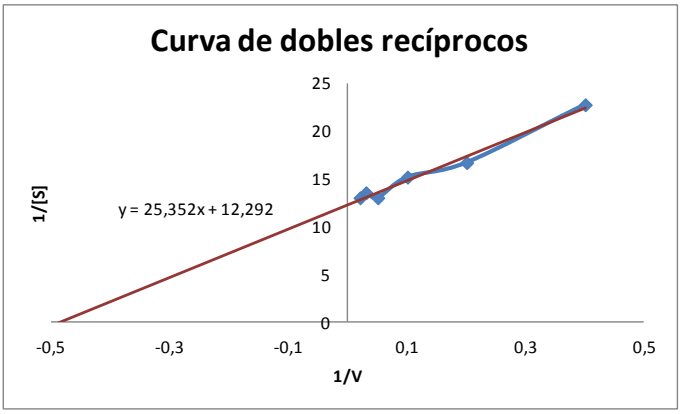


Gráfico 6: Gráfico de doble recíproco, donde se muestra la intersección con el eje y, y el eje x.

Con el Grafico 6 podemos obtener los parámetros cinéticos, para esto se usa la siguiente ecuación, que representa la linealización de la ecuación de Michaelis-Menten.

$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{Vmáx} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{Vmáx} \quad (Figura\ 9)$$

De la ecuación (Figura 9) se deduce que la intersección de la recta con el eje y, es el valor de ${1}/{Vmáx}$. Luego viendo la recta obtenida en el Grafico 6, podemos calcular Vmax.

$$\frac{1}{Vmáx} = 12{,}292 \rightarrow Vmáx = 0{,}0814\left(\frac{\mu mol}{min}\right)$$

Nuevamente de la ecuación (Figura 9), se deduce que la pendiente de la recta es ${Km}/{Vmáx}$, y como anteriormente calculamos la $Vmáx$, y del Gráfico 6 podemos obtener la pendientetenemos la pendiente, podemos calcular la Km.

$$\frac{Km}{Vmáx} = 25{,}352 \rightarrow Km = 2{,}06(mM)$$

Con los parámetros obtenidos, podemos calcular la K específica, que nos da un

acercamiento de la eficiencia de la enzima.

$$Kesp = \frac{Vmáx}{Km}$$

Luego reemplazando nuestros datos, obtenemos.

$$Kesp = \frac{0{,}0843}{2{,}26} \rightarrow Kesp = 0{,}037(\frac{\mu mol}{min \times mM})$$

Resumiendo:

K_m	2,06 (mM)
$V_{máx}$	0,0814(µmol/min)
K_{esp}	0,037

Por lo tanto para nuestra enzima hasta 2,06mM de sustrato tiene la mejor respuesta pues la concentración será directamente proporcional a la velocidad en ese intervalo.
Según estos valores hipotéticamente en el organismo se esperaría que las concentraciones de arginina fluctuaran en estos valores de concentración.

Efecto de la concentración de e enzima

Al aumentar la concentración de enzima esperamos que la gráfica aumente de forma lineal, ya que la velocidad irá aumentado en la misma proporción a medida que se aumenta la concentración de enzima.

Después de haber realizado el procedimiento correspondiente, se obtuvieron los siguientes datos. (Tabla 9)

Vol.Enzima (µL)	Absorbancia (540 nm)	Velocidad (µmol/min)
0	0	0
20	0,0094	0,0094
40	0,229	0,0229
60	0,381	0,0381
80	0,595	0,0595
100	0,88	0,088
120	1,048	0,1048

Tabla 9: Valores de absorbancia y velocidad, variando el volumen de enzima agregado.

Con estos datos se construye un gráfico de actividad enzimática, a medida que aumentamos el volumen de enzima de cada muestra. (Grafico 7)

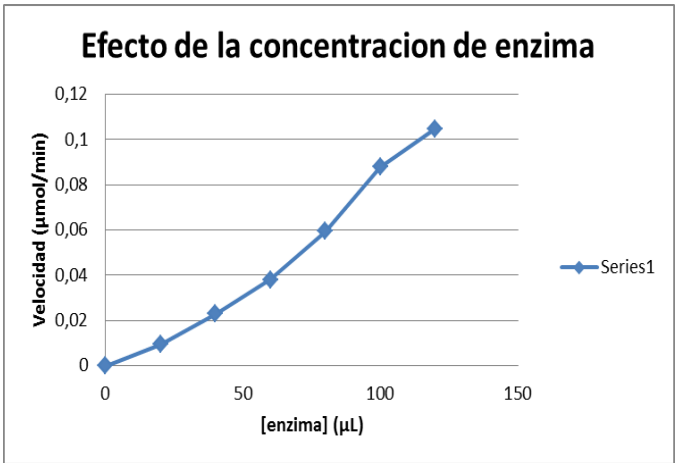


Gráfico 7: Tendencia que sigue la velocidad, a medida que aumentamos la concentración de enzima.

Observamos que la tendencia en el gráfico 7 de la actividad enzimática aumenta directamente proporcional a la concentración de enzima, aunque no se forma una teóricamente una recta, se observa claramente la tendencia a ser una. Estos resultados son consistentes con nuestro análisis, debido a que la velocidad depende de la concentración de complejo enzima-sustrato; al aumentar la concentración del catalizadores, habrá más sustrato unido, aumentará la concentración del complejo y la velocidad aumentará.

Efecto del pH

El pH debería afectar notablemente la actividad enzimática, esto debido a que los aminoácidos que se encuentran en el sitio activo se pueden ionizar, dependiendo de la concentración de H^+ en el medio en el que se encuentra la enzima, por consiguiente la actividad enzimática se verá afectada, ya que la enzima realiza su función, solo cuando los aminoácidos del sitio activo se encuentran en su forma funcional. Con los resultados que obtendremos, veremos cuál es el pH óptimo de la enzima. De la literatura se sabe que los aminoácidos que cumplen un rol importante en la función de la arginina I son el residuo Glu277, que juega un papel importante en el reconocimiento del sustrato, y el residuo His141, que se encuentra al borde del sitio activo y funciona como una lanzadera de protones(2).

Los datos obtenidos a distintos pH se encuentran en la Tabla 10.

pH	Absorbancia (540 nm)	Velocidad (µmol/min)
6,5	0,338	0,0338
7,5	1,415	0,1415
8,5	1,9	0,19
9,5	2	0,2
10,5	2,045	0,2045
12,5	1,7	0,17

Tabla 10: Valores de velocidad, con distintos tampones de pH.

Con estos datos se construye un gráfico que nos muestre como varia la actividad de la enzima, a distintos valores de pH. (Gráfico 8)

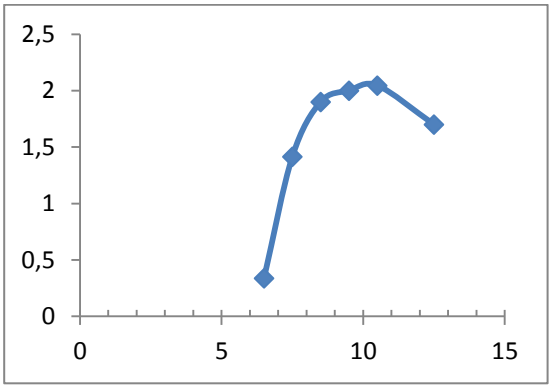


Gráfico 8: Actividad de la enzima, a distintos pH.

En el Gráfico 8 se observa que el pH óptimo de la enzima, se encuentra aproximadamente a pH 10. Además se observa que la tendencia de la curva coincide con el resultado esperado, a pH menores y mayores a 9,5-10, la actividad enzimática comienza a decaer. En la literatura se comprueba que el pH óptimo de la Arginasa I de hígado humano se encuentra entre pH 9,5-10(2).

Cabe destacar que en el organismo el pH está muy lejos de estar dentro de este rango de valores, más aún el pH fisiológico ronda alrededor de 7,5. Esto se puede deber a las necesidades de producto y de regulación.

Efecto de inhibidores

Se analizaron los efectos de dos inhibidores, lisina y ornitina. Estos inhibidores pueden ser competitivos, a-competitivos o mixtos, en este experimento no se determinara que clase de inhibidores son, solo se mostrara el efecto que tienen como inhibidores sobre la actividad enzimática. Aunque podríamos deducir de la estructura de la lisina y la ornitina (Figura 10 y 11), que pueden ser inhibidores competitivos debido a la similitud estrucutral y al

desplazamiento del equilibrio por parte de la ornitina.

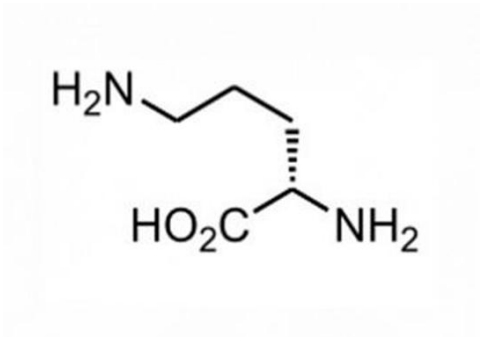


Figura 10: Estructura simplificada de la ornitina.

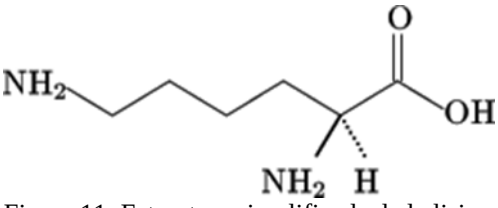


Figura 11: Estructura simplificada de la lisina.

Los datos obtenidos en el laboratorio se muestran en la Tabla 11 y en la Tabla 12.

Conc.Inhibidor (mM)	Absorbancia (540 nm)	Velocidad (µmol/min)
0	1,384	0,1384
1	1,245	0,1245
2,5	1,204	0,1204
5	1,183	0,1183
10	1,087	0,1087
20	0,976	0,0976

Tabla 11: Valores de velocidad a distintas concentraciones del inhibidor lisina.

Conc.Inhibidor (mM)	Absorbancia (540 nm)	Velocidad (µmol/min)
0	1,605	0,1605
1	0,42	0,042
2,5	1,285	0,1285
5	1,145	0,1145
10	0,789	0,0789
20	0,712	0,0712

Tabla 12: Valores de velocidad a distintas concentraciones del inhibidor ornitina.

Con los valores que se muestran en las Tablas 11 y 12, se construye un gráfico, para ver el efecto de los inhibidores lisina y ornitina, sobre la actividad enzimática de la Arginasa I. (Gráfico 9).

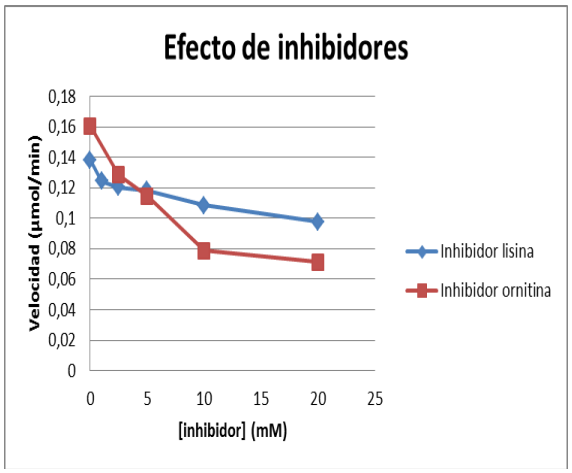


Gráfico 9: En azul, se muestra el efecto del inhibidor lisina sobre la actividad. En rojo se muestra el efecto del inhibidor ornitina sobre la actividad.

Del Gráfico 9, podemos deducir, que ambos inhibidores tuvieron un efecto negativo en la actividad enzimática de la Arginasa. La lisina y la ornitina son inhibidores competitivos pues ambos aminoácidos poseen dos grupos amino y de la literatura se sabe que el más potente es la ornitina ya que las Ki de la ornitina es menor que la Ki de la lisina(8).

Se comprueba su efecto ya que ambos disminuyen la actividad enzimática a medida que aumenta su concentración y la relación cuantitativa que indica que la ornitina es un inhibidor más potente que la lisina.
La ornitina también desplaza la formación ya que es un producto de la catálisis.

Efecto de iones metálicos

Dado que la Arginasa I, contiene Mn^{+2} como co-factor, es deducible que otros metales divalentes tengan un efecto en la actividad enzimática de la Arginasa.

Del procedimiento descrito anteriormente se obtuvieron los siguientes datos. (Tabla 13)

Ion	Absorbancia(540nm)	Control
$Mn2^{+}$	1,704	0,395
$Mg2^{+}$	1,289	0,395
Ca^{2+}	0,826	0,395
$Cu2^{+}$	0,0065	0,395
Co^{2+}	0,077	0,395
Ni^{2+}	0,012	0,395
Zn^{2+}	0,0125	0,395

Tabla 13: Datos de las absorbancias para cada ion, y el control, que no contiene ningún ion, pero si contiene la enzima.

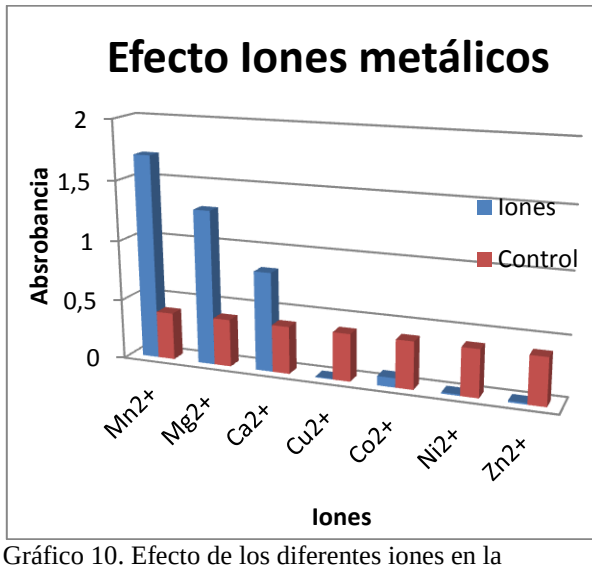


Gráfico 10. Efecto de los diferentes iones en la actividad de la enzima.

Nuestras observaciones entregan valores de actividad que indican una activación de la enzima por parte del catión $Mn^{2+,}$ $Mg^{2+,}$ Ca^{2+} y no del Cu^{2+},Co^{2+},Ni^{2+} y Zn^{2+}

Esta activación por parte de estos iones se puede deber a la similitud electrónica entre ellos. Los datos son similares y consistentes con los establecidos en la literatura.(9)

Referencias

1. Jenkinson, C. P., Grody, W. W., and Cederbaum, S. D. (1996) Comparative properties of arginases. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 114, 107–132.

2. Reczkowski, R. S. & Ash, D. E. (1992) EPR evidence of binuclear Mn(II) centers in rat liver arginase. J. Am. Chem. Soc. 114: 10992–10994.

3. Hellerman, L. & Perkins, M. E. (1935) Activation of enzymes. J. Biol. Chem. 112: 175–194.

4. Mora, J., Tarrab, R., Martuscelli, J. & Soberon, G. (1965) Characteristics of arginase from ureotelic and non-ureotelic animals. Biochem. J. 96: 588–594.

5. Anderson, A. B. (1945) The activation of Jack-Bean arginase by cobalt, manganese, and iron. Biochem. J. 39: 139–142.

6. Edlbacher, S. & Baur, H. (1958) The nature of yeast and liver arginase. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 254: 275–284.

7. 25. Sossong, T. M., Jr., Khangulov, S. V., Cavalli, R. C., Soprano, D. R., Dismukes, G. C. & Ash, D. E. (1997) Catalysis on dinuclear Mn(II) centers: hydrolytic and redox activities of rat liver arginase. J. Biol. Inorg. Chem. 2: 433–443.

8. Hunter A. & Downs C. (1945) The inhibition of arginase by amino acids. J.Biol.Chem. 157: 427-446.

9.Richards M. & Hellerman L.(1940) Activation of enzimes:VI. Purified liver arginase:reversible inactivation and reactivation. J.Biol.Chem. 134: 237-252