



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

*“Análisis evolutivo de los
Inhibidores de proteasas serínicas
(SERPINAS)
Un enfoque estructural”*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:

Giovani Medina Palacios

Dirigida por:

Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz.
M.I.B.B Gustavo Ortega Lule.



FACULTAD DE
CIENCIAS

2001

295880



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



ERIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Análisis evolutivo de los inhibidores de proteasas serínicas (serpinas). Un enfoque estructural"

realizado por Medina Palacios Giovani

con número de cuenta 9022050-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz

Blanca Hayde Ruiz O.

Propietario

M.I.B.B. Gustavo Ortega Lule

Gustavo Ortega Lule

Propietario

M.I.B.B. Saúl Cano Colín

Saúl Cano Colín

Suplente

Dr. Jesús Ramírez Santos

Jesús Ramírez Santos

Suplente

M. en C. Guadalupe Barajas Guzmán

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M.

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

AGRADECIMIENTOS

QUIERO AGRADECER :

Mi padre Áureo a mi madre Gema, a mi gran hermano Omar a mi cuñada Cynthya (a los que quiero mucho), por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida.

A mi Novia Paola Martínez.

A todas las personas que estuvieron presentes durante mi formación académica y que de alguna forma hicieron posible que se llevara a cabo este trabajo (Maestros).

A todos los que me brindaron y me han brindado su cariño, apoyo, confianza y paciencia.

Adrián Guevara, Alma Deita, Angeles Cancino, Alejandra Juárez, Alfredo Arciniega, Angela Arango (GRACIAS), Bárbara Cuesta, Bernardo Sachman, Carlos Deita, Edmundo González, Erika Biztraín, Carolina Escamilla, Daphné Gadar, Gabriel Del Angel Gabriel García, Gustavo Ortega, Henry Carmona, Ivalú, Julieta Rosell, Krivsova Montaña, Luis Rosales, Marcela Varela, Miguel Deita, Ofelia Delgado, Pablo Reyes, Paula Santoyo.

Armando Del Valle, Claudia Coronel, Diana Reyna, Liliana Mascarua, Víctor.

Alejandra, Antonio Sánchez, Fabian Ramírez, Francisco Franco, Jesús García, Lisset, Lourdes, Luz María Bautista, Marisol, Omar Sandoval, Tania Aranda.

Adriana, Bere, Campanita, Edson, Enrique, Eva, Güero, Maritza, Mauricio, Mayra, Toño, Vero.

(A todos los que omita por eso de las prisas)

Al Dr. Nicolas Gues por modificar el su programa Swispdb Viewer para poder llevar a cabo los análisis de Estructura.

A mis tutores por el apoyo académico prestado.

A todos los miembros del laboratorio por su apoyo y amistad.

Dra. Blanca Ruiz O., Dra. Verónica Monroy M., M.I.B.B Gustavo Ortega L., M. en C. Luis Rosales L., M. en C. Francisco López L., Q.F.B Georgina Zárate G., L.I.B.B Elizabeth Rodríguez S.

PD: Y a mi futuro Sobrino

Este trabajo se llevo a cabo en el Laboratorio de la Dra. Blanca H. Ruiz Ordaz, del departamento de Biología Molecular y Biotecnología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Este trabajo fue apoyado en parte por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), con el proyecto No. IN214700, así como por el CONACYT, proyecto No.- 33377-M

RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo un análisis de las relaciones evolutivas de los inhibidores de proteasas serínicas (serpinas). Inicialmente se construyó un alineamiento estructural a partir de 29 secuencias de miembros del grupo que contaban con coordenadas cristalográficas descritas, el cual funcionó como un alineamiento base, para construir un segundo alineamiento con un enfoque estructural; ambos alineamientos mostraron la formación de 7 grupos funcionales y/o estructurales. Posteriormente se llevaron a cabo cálculos de mapas de isopotencial electrostático del asa del centro reactivo de las serpinas, en su forma cortada y no-cortada, con lo cual se ponderaron los diferentes alineamientos, haciéndose más compactos los grupos estructurales .

Uno de los puntos relevantes del árbol filogenético final, es que sus ramas agruparon a proteínas que se encontraron relacionadas entre sí funcionalmente, de esta manera la topología pudo explicarse en términos de una diversificación funcional de esta superfamilia de proteínas.

ÍNDICE

Agradecimientos	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tablas	iv
Lista de alineamientos.....	v
Lista de cladogramas	v

INTRODUCCIÓN

1.- Las serpinas una superfamilia de proteínas	1
2.- Propiedades características	2
3.- Distribución	4
4.- Tamaño y composición.....	7

ANTECEDENTES

5.- Estructura génica y evolución.....	10
6.- Cristales de las serpinas	11
7.- Estructuras cristalográficas completas.....	12
8.- El dominio central	14

ESTRUCTURA NATIVA DE LAS SERPINAS

9.- Movilidad del asa del centro activo y el mecanismo de inhibición de las serpinas	17
10.- Formación del complejo serpina-proteasa, co-cristalización de la α 1-antitripsina/tripsina.....	20
11.- La estabilidad del complejo proteasa-serpina.....	23
12.- La interfase α 1antitripsina-tripsina.....	24

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....

HIPÓTESIS.....

OBJETIVOS

O. General

O. Particulares.....

DISEÑO EXPERIMENTAL

MATERIALES Y MÉTODOS

I.- Cristales

II.- Secuencias.....

III.- Mapas de isopotencial electrostático

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Base de datos de los cristales

Base de datos de las secuencias

Root mean square (RMS).....

Alineamiento estructural

Alineamiento de secuencias

Alineamientos

Cladogramas de los cristales, de las secuencias y de los MIPES.....

Análisis filogenético

Mapas de isopotencial electrostático.....

Análisis filogenético (cristales + secuencias)

CONCLUSIONES

PERSPECTIVAS

REFERENCIAS

Glosario

LISTA DE FIGURAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1.- Figura (1). Conformaciones de las serpinas	3
2.- Figura (2). Representación esquemática de la estructura primaria de las serpinas	8
3.- Figura (3). Alineamiento de las asas con el centro reactivo (Reactive Center Loop).....	9
4.- Figura (4). Estructura de la ovoalbúmina, ilustrando el plegamiento tridimensional de las serpinas.....	15
5.- Figura (5). Comparación de las asas del centro activo, mostrando la conformación canónica.....	17
6.- Figura (6). Reacción cinética mínima de la serpina con su proteasa afin	19
7.- Figura (7). Formación del complejo serpina-proteasa	21
8.- Figura (8). Modificación del sitio activo.....	22
9.- Figura (9). Interfase del complejo α_1 - antitripsina-tripsina.....	25

MAPAS DE DENSIDAD ELECTROSTÁTICA (M.I.P.E)

10.- Figura (10). M.I.P.E del grupo de las α_1 - antitripsinas cortadas	57
11.- Figura (11). M.I.P.E del grupo de las α_1 - antitripsinas no cortadas.....	58
12.- Figura (12). M.I.P.E del grupo de las α_1 - antitripsinas cortadas	59
13.- Figura (13). M.D.E. del Inhibidor del activador del plasminógeno, NC....	60
14.- Figura (14). M.I.P.E del Inhibidor del activador del plasminógeno, C	62
15.- Figura (15). M.I.P.E del grupo de las antitrombinas, NC.....	63
16.- Figura (16). M.I.P.E del grupo de las antitrombinas, C.	64
17.- Figura (17). M.I.P.E de la Inhibidora de la elastasa de leucocitos, la ovoalbúmina y la serpina 1SEK	65

LISTA DE TABLAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1.- Tabla 1. Serpinas plasmáticas humanas	5
2.- Tabla 2. Distribución de las serpinas.....	6
3.- Tabla 3. Cristales cuyas coordenadas cristalográficas se utilizaron para llevar a cabo el alineamiento estructural.....	36
4.- Tabla 4. Secuencias de serpinas utilizadas para llevar a cabo el alineamiento estructural y para el análisis filogenético.....	37
5.- Tabla 5. Root mean square (RMS) existentes entre los alineamientos estructurales de los cristales	40
6.- Tabla 6. Tabla de root mean square (RMS) de los grupos de Cristales	35
7.- Tabla 7. Conservación de residuos, tanto el alineamiento realizado con Swiss Pdb Viewer, como con el programa Clustalw.....	41
7.- Tabla 8. Alineamiento de la estructura primaria de las asas con el centro reactivo.....	9

LISTA DE ALINEAMIENTOS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1.- Alineamiento estructural (1) llevado a cabo con el programa Swiss pdb Viewer versión 3.7	46
2.- Alineamiento de secuencias (2) llevado a cabo con el programa Clustalw versión 1.7	49

LISTA DE CLADOGRAMAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1.- Cladograma 1, de los cristales de serpinas	53
2.- Cladograma 2 de las secuencias de serpinas	54
3.- Cladograma 3 de los cristales + secuencias	67

GLOSARIO

Alineamiento.-Proceso matemático mediante el cual cada aminoácido en una secuencia es comparado contra los aminoácidos de otra u otras, basado en una matriz de similitud (Serie de Blosum, Serie de PAM).

Alineamiento Estructural.- Procedimiento que encuentra los aminoácidos de una secuencia que se encuentran cerca de la secuencia de referencia, respetando las regiones de estructura secundaria.

Árbol Filogenético.- Estructura matemática que se utiliza para modelar la historia evolutiva de organismos, grupos y/o secuencias. Este patrón actual de las relaciones históricas es la filogenia del grupo con el cual tratamos e interpretamos.

Blast@.- (Basic Local Alignment Search Tool) es un conjunto de programas de búsqueda, designados para explorar en todas las bases de datos disponibles de ADN o proteínas, secuencias similares para una proteína o región de ADN determinados. Utiliza un algoritmo eurístico capaz de detectar similitud entre las secuencias que comparten regiones aisladas de similitud. (Altschul et al., 1990). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Bootstrap.- Método para medir el error de muestreo, este consiste en tomar múltiples muestras de la población en estudio y comparar los estimados obtenidos en las múltiples muestras. La dispersión de estos estimados son un indicador de error de muestreo, esto es, que tanto variarían nuestras conclusiones dependiendo de la muestra que tomemos.

Cladograma.- Es el más básico de los árboles, es este se muestran los grupos y las relaciones relativa de ancestría común compartida por las secuencias.

Clustalw.- Es un programa para el análisis de secuencias, ya sea de proteínas o ácidos nucleicos, llevando a cabo alineamientos múltiples, así como cálculos de los árboles filogenéticos.

Iterative Magic Fit.- Opción del programa Swisspdb Viewer. Este procedimiento escogerá automáticamente los mejores pares de carbonos α de los aminoácidos equivalentes en las cadenas y las alineará en un procedimiento tridimensional. Posteriormente las desviaciones de RMS serán minimizadas.

Magic Fit.- Opción del programa Swiss Pdb Viewer. Este procedimiento escogerá automáticamente los mejores pares de carbonos α de los aminoácidos equivalentes en las cadenas y las alineará en un procedimiento tridimensional.

Mapas de Isopotencial Electrostatico.- Representación gráfica en forma de malla con valores positivos y negativos antagónicos, que se proyecta alrededor de una molécula, la cual representa el alcance del potencial electrostático derivado de la Ecuación de Poisson Boltzman.

Potencial Electrostatico.- Es la energía potencial por unidad de carga, donde dos objetos cargados (en este caso aminoácidos), interactúan unos con otros (de acuerdo con la tercera ley de Newton) y de esta manera ejercen influencias en el campo electrostático entre ellas, dando como resultado una adición entre las dos. Esta adición entre las cargas aminoácidos dentro de una proteína es proyectada en la superficie molecular.

NCBI.- Base pública de datos para la información generada en el Campo de la Biología Molecular establecida en 1988, entre sus principales objetivos está la de crear bases de datos públicas, dirigir

la investigación en el campo de la Biología computacional, desarrollar herramientas de software para el análisis del Genoma, además de proporcionar información en la rama de la Biomedicina. Todo esto para un mejor entendimiento de los procesos moleculares que afectan la salud humana.

NJ Plot.- Es un programa que permite desplegar y modificar árboles filogenéticos. NJplot es conveniente para enraizar árboles que no presentan raíz que provienen de métodos como parsimonia o máxima similitud.

PDB. - Siglas de la palabra Inglesa Protein Data Bank. Base de datos internacional de procesamiento y distribución de estructuras macromoleculares tridimensionales determinadas experimentalmente, cuyo sitio web es: <http://www.rcsb.org/pdb/>

RMS.- Siglas de la palabra Inglesa Root Mean Square. Sirven para designar el valor promedio en ángstroms, existente entre los carbonos α de un alineamiento estructural. Esta acercamiento sirve para evaluar si el acoplamiento entre dos moléculas es óptimo.

Swiss pdb Viewer.-

Tree View.- Programa computacional que permite visualizar árboles filogenéticos con diferentes formatos como NEXUS, PHYLIP, Hennig86, ClustalW.

INTRODUCCIÓN

1.- LAS SERPINAS: UNA SUPERFAMILIA DE PROTEÍNAS

En 1980 Hunt y Dayhoff encontraron una similitud entre la estructura primaria de la ovoalbúmina, la α 1-antitripsina y la antitrombina humana (Hunt y Dayhoff.,1980), proponiendo la existencia de una nueva superfamilia de proteínas. A partir de este reporte, otras proteínas de la superfamilia fueron rápidamente identificadas, basándose en la similitud de su estructura primaria (Doolittle,1983; Hill *et al.*,1984). Un año más tarde, en 1985, Carrell y Travis propusieron el término SERPINA (un acrónimo de las palabras inglesas **serine proteinase inhibitor**), ya que la mayoría de estas proteínas describen las propiedades de esta superfamilia como inhibidores de proteasas serínicas (Carrell y Travis., 1985). Conforme la familia crece, el nombre se ha vuelto inapropiado, ya que existen serpinas que no son inhibidoras (Zou *et al.*,1994; Steele *et al.*, 1993) e incluso serpinas que inhiben proteasas cisteínicas (Ray *et al.*,1992 ; Takeda *et al.*, 1995), sin embargo, a la fecha el nombre de serpinas permanece.

2.- PROPIEDADES CARACTERÍSTICAS DE LAS SERPINAS

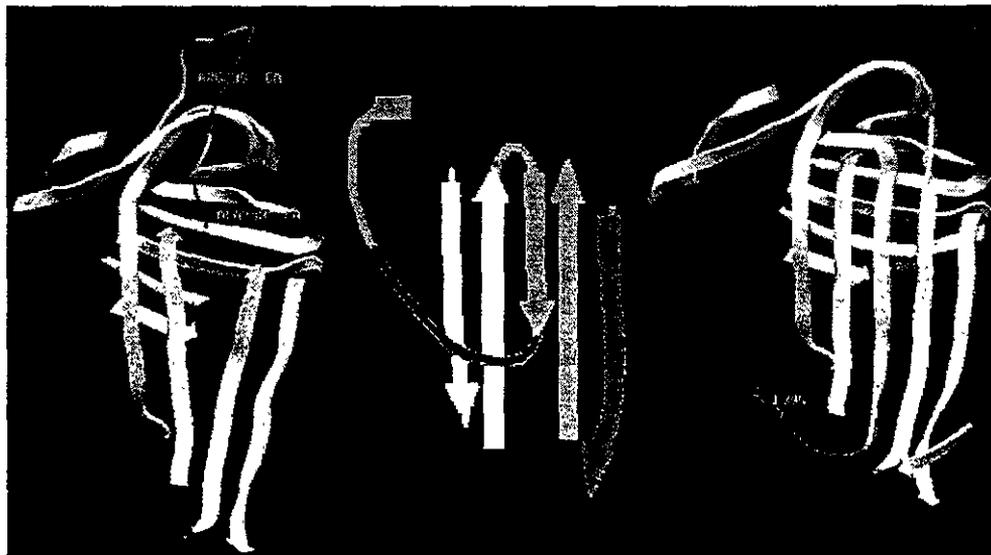
Las serpinas difieren de otras familias de inhibidores de proteasas serínicas, en que poseen un mecanismo de inhibición que tiene que ver con una profunda modificación conformacional, o una transición de S-R (**S**tressed, estresada – **R**elaxed, relajada) como parte esencial de su mecanismo de inhibición, (Carrell y Owen, 1986; Whisstock *et al.*, 1998). Otra característica es que esta familia de proteínas, en contraste con casi todas las proteínas, se pliega en una forma nativa que es metaestable (Creighton, 1992). Lo cual está relacionado con la necesidad de presentar un cambio conformacional durante la inhibición con su proteasa afin, además de que los complejos formados serpina-proteasa son covalentes y por lo tanto irreversibles.

Estas proteínas requieren una inserción parcial del asa con el centro reactivo como una hebra- β extra entre las tres hebras β existentes, para que el mecanismo de inhibición opere efectivamente (Gettins *et al.*, 1993).

Las serpinas se clasifican en tres tipos de acuerdo a los diferentes estados conformacionales presentes (Whisstock *et al.*, 1998): (a) en el primero se agrupan las que se encuentran en forma no cortada o en un estado S (**S**tressed), en el cual el asa con el centro reactivo, se encuentra fuera de la molécula y libre, para interactuar con la proteinasa; (b) al segundo grupo pertenecen las que se encuentran en un estado cortado o R (**R**elaxed), en donde el corte es acompañado por un cambio conformacional en el cual el asa con el centro reactivo forma una hebra β adicional la que se internaliza en medio de la hoja A, acompañada por una pérdida de su actividad inhibitoria. (c) el tercero, está integrado por serpinas que presentan una

forma alternativa del estado R no cortado en forma latente, en donde el asa con el centro reactivo se encuentra parcialmente insertado en la hoja A, con su cadena polipeptídica intacta. La estructura latente se describió inicialmente, en el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), el cual puede entrar espontáneamente en el estado latente (Mottonen *et al.*, 1992) y posteriormente, en la antitrombina (Carrell *et al.*, 1994; Jin *et al.*, 1997). Se ha propuesto la forma latente en la α 1-antitripsina (Lomas *et al.*, 1995) y en la α 1-antiquimiotripsina (Chan y Lomas, 1998), pero no existen estructuras cristalográficas disponibles de este estado conformacional.

(FIGURA 1)



(a) Forma activa o (S)
Stressed

b) Forma latente

(c) Forma cortada o (R)
Relaxed

FIGURA 1 Diagrama esquemático, ilustra las regiones del asa con el centro reactivo (rojo) en las tres formas de las serpinas. (a) En la forma activa (S) el asa puede interactuar con su proteasa afin, los primeros residuos de la serpin forman una nueva hoja β entre las hebras β 15 y β 5 A. (b) Forma latente, esta no se ha descrito estructuralmente, (c) Como resultado de la interacción con las proteasas, la molécula de serpin resulta cortada (R) en la región del asa con el centro reactivo en el sitio P1-P1', dando como resultado una nueva hoja β (C)

3. DISTRIBUCIÓN DE LAS SERPINAS

Las serpinas se han identificado en vertebrados e invertebrados (Salzet *et al.*, 1999) y su distribución va desde la proteína Z en la cebada (Brandtt *et al.*, 1990), hasta la ovoalbúmina de gallina (Hunt y Dayhoff., 1980; Stein *et al.*, 1990), junto con una gran variedad de serpinas en mamíferos (Huber y Carrell, 1989), en anfibios, insectos (Kanost *et al.*, 1989; Takagi *et al.*, 1990), parásitos y en el virus de la viruela; sin embargo, éstas no se han encontrado en bacterias.

Fisiológicamente, se han encontrado presentes en el plasma, en células tumorales (Zou *et al.*, 1994), en astrocitos (Abraham *et al.*, 1993; Pasternack *et al.*, 1989), en queratinocitos (Jensen *et al.*, 1995) y en líneas celulares epiteliales de retina (TABLA 2), (Steele *et al.*, 1993).

Dos de las primeras serpinas que se identificaron, la antitrombina y la α 1-antitripsina, forman parte de un grupo de serpinas humanas que juntas representan cerca del 10% del total de proteínas presentes en el plasma. Estas serpinas plasmáticas están relacionadas en procesos fisiológicos muy importantes tales como la coagulación, la fibrinólisis, la inflamación y la respuesta inmune, entre otras, con diferentes patologías asociadas a su deficiencia (TABLA 1).

TABLA 1. Serpinas plasmáticas humanas, patologías asociadas a su deficiencia (D) o exceso (E).

Serpina	[I] µg/ml	[I] µM	Proteinasas fisiológicas Inhibidas	Otras proteinasas inhibidas	Patología asociada	Referencia
α ₁ -Inhibidor de la proteinasas	1300	24.5	Elastasa de neutrófilos	Tripsina, elastasa pancreática	Efisema (D)	45, 46
α ₁ - Antiquimiotripsina	250	4.0	Catepsina G	Quimiotripsina	Alzheimer (¿?)	47
α ₂ -Antiplasmina	49	1.0	Plasmina	Tripsina, quimiotripsina	Hemorragia (D)	48
Antitrombina	130	2.3	Trombina, factor Xa	tripsina, plasmina, otras proteinasas de la coagulación	Trombosis (D)	49
Inhibidor de la C1	180	1.7	C1s,C1r, kalicreína h, factor XIIa	tPA, factor XIa, quimiotripsina	Angiodema (D)	50
Kallistatina	13.5	0.3	Kalicreína tisular	¿?	Hipo-hiper- tensión (¿?)	51
Cofactor II de heparina	80	1.2	Trombina	Quimiotripsina, catepsina G,	Trombosis(¿ ?)	52
PAI-1	0.02	0.000 4	tPA, uPA	Tripsina	Hemorragia (D), Trombosis (E)	53
PAI-2	<0.00 5	<7*10 ⁻ 5	tPA, uPA	¿?	Cáncer (¿?)	20
Inhibidor de la Proteína C	2-5	0.1	Proteína C activada, tPA, uPA, acrosina	Trombina, factor Xa, quimiotripsina	¿?	54

Tabla tomada del libro, Serpins: Structure, Function and Biology. Gettins, et al. Chapman y Hall, 1993., p 3.

TABLA 2. Distribución de las serpinas en las diferentes especies

Humanas

α_1 -Antiquimiotripsina
 α_2 -Antiplasmina
 α_1 -Inhibidor de la proteasa
 Angiotensinógeno
 Antitrombina
 Inhibidor de la C1
 Globulina unidora de corticosteroides (CBG)
 Cofactor II de heparina
 Kallistatina
 Inhibidor de la elastasa de leucocitos
 Maspina
 Factor pigmentario derivado del epitelio-1
 Factor pigmentario derivado del epitelio-2
 Nexina 1
 Inhibidor de la proteína C
 Antígeno celular de carcinomas escamosos
 Globulina unidora de tiroxinas

Otros Mamíferos

α_1 -Inhibidor de la proteasa (mandril, chinchilla, ardilla, perro, burro, gerbo caballo, cabra, visón, gerbo de Mongolia, mono, ratón, cerdo, conejo, rata, oveja, zarigüeya).
 α_1 -Antiquimiotripsina (vaca, cerdo, cabra).
 Angiotensinógeno (vaca, ratón, rata, conejo, oveja)
 Antitrombina (vaca, ratón, cerdo, conejo, oveja).
 Inhibidor de la C1 (cobayo, rata).
 Proteína unidora de colágeno (ratón, rata).
 Contrapsina (rata, ratón).
 Globulina unidora de corticosteroides (rata, conejo, mono).
 Cofactor II de heparina (conejo).
 Kalistatina (rata).
 Inhibidor de la elastasa de leucocitos (caballo, cerdo).

Peces

α_1 -Inhibidor de la proteasa (carpa).

Anfibios

Ep-45 (*Xenopus laevis*)

Aves

Antitrombina (gallinas)
 Ovoalbúmina (gallinas, codornices)

Artrópodos

α_1 -Antiquimiotripsina (*Bombix mori*)
 Ala serpin (*Manduca sexta*)
 Serpina (*Drosophila melanogaster*)
 Inhibidor de la coagulación (*Limulus polyphemus*)

Nemátodos

Serpinas (*Schistosoma hematobium*, S. *Mansoni*, *Brugia malayi*)

Plantas

Proteína Z (cebada)
 Inhibidor de la quimiotripsina (trigo)
 Z4, Z7 (cebada)

Hongos

Globulina unidora de corticosteroides (CBG)
 (levaduras)

Virus

crmA
 SPI-3 (virus de la vaccinia)
 SERP1 (Myxoma virus)

Bacterias

No se han encontrado

Tabla tomada del libro, Serpins: Structure, Function y Biology. Gettins, et al. Chapman y Hall, 1993., p 4.

4.- TAMAÑO Y COMPOSICIÓN DE LAS SERPINAS

Las serpinas poseen un dominio central conservado, de cerca de 360 residuos de aminoácidos, estos representan la región de homología estructural, la cual contribuye con cerca de 40 kDa del peso total. Los extremos amino y carboxilo (N-C) difieren en extensión y, en muchos casos, existen carbohidratos unidos a sitios no conservados. Las serpinas presentan un amplio grado de glicosilación y, en algunos casos, como en el inhibidor de la C-1, representa aproximadamente el 40% de la masa total. (FIGURA 2). Se han reportado otras modificaciones postraduccionales, como la fosforilación de dos serinas en la ovoalbúmina (Nisbet et al., 1981), o la sulfatación de dos tirosinas en el cofactor II de heparina (Hortin et al., 1986). Estas proteínas son secretadas como precursores, conteniendo una señal de corte N-terminal hidrofóbica. Algunas serpinas, como el PAI-2 (Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 2) existe tanto en forma de precursor como en su forma activa.

La región del sitio reactivo (asa de las serpinas) es homóloga en todas las serpinas; sin embargo, se puede dividir en dos regiones: una con alta similitud y otra región de baja similitud.

Los sitios con una alta similitud se localizan en la región que comprende los residuos P15 a P10 (utilizando la nomenclatura de Schechter y Berger para designar los residuos C-terminal o N-terminal del enlace susceptible a corte), (Schechter y Berger, 1967), (FIGURA 3). Esta zona está se considera, mecánicamente hablando, como crucial para el proceso de inserción; mientras que la región de baja similitud se encuentra en la zona del asa con

el sitio reactivo. Estas variaciones en la región P1-P1' dan como resultado diferencias en la especificidad con su proteinasa afín.

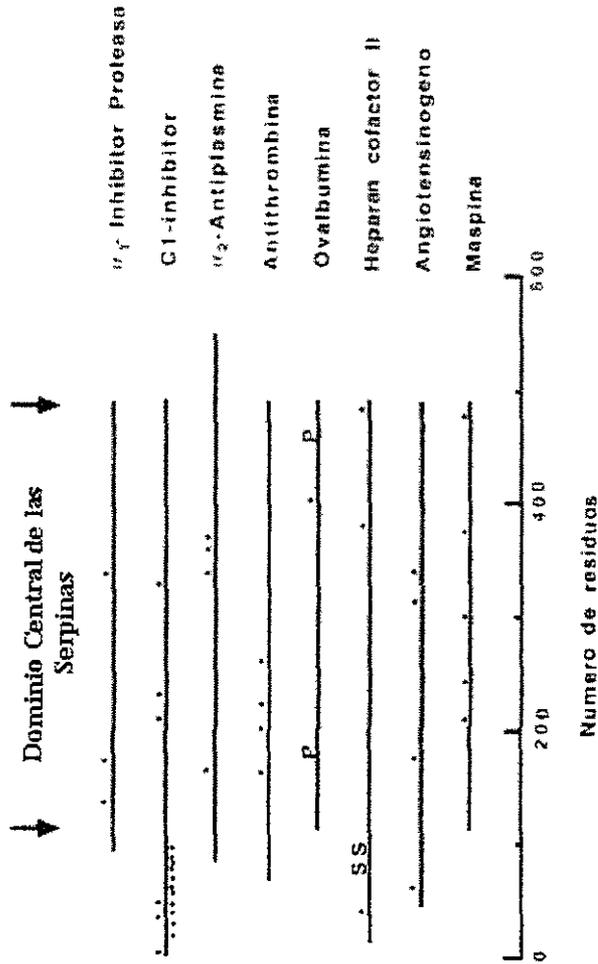


FIGURA 2. Representación esquemática de la estructura primaria de las serpinas para ilustrar el tamaño y la localización del núcleo proteínico conservado, (core). Los asteriscos muestran los diferentes sitios de glicosilación (*), así mismo se muestran diferentes modificaciones post-traduccionales en donde P representa una fosfoserina, y la S representa una tirosina sulfatada. Para el inhibidor de la proteína C, debido a su alta glicosilación es difícil representar todos los sitios en la región N-terminal.

Figura tomada del libro, Serpins: Structure, Function and Biology. Gettins, *et al.* Chapman y Hall, 1993., p 5

R C L

	P17	P16	P15	P14	P13	P12	P11	P10	P9	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2	P3'	P4'	P5'	Ref
INHIBITORY SERPINS																							
α_1 -Antichymotrypsin	Glu	Glu	Gly	Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	<u>Leu</u>	<u>Ser</u>	Ala	Leu	Val	Glu	62
α_1 -Antitrypsin	Glu	Lys	Gly	Thr	Glu	Ala	Ala	Gly	Ala	Met	Phe	Leu	Glu	Ala	Ile	Pro	<u>Met</u>	<u>Ser</u>	Ile	Pro	Pro	Glu	63
Antithrombin	Glu	Glu	Gly	Ser	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Thr	Ala	Val	Val	Ile	Ala	Gly	<u>Arg</u>	<u>Ser</u>	Leu	Asn	Pro	Asn	64
α_2 -Antiplasmin	Glu	Val	Gly	Val	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Ser	Ile	Ala	Met	Ser		<u>Arg</u>	<u>Met</u>	Ser	Ser	Ser	Phe	65
Barley Z protein	Glu	Glu	Gly	Thr	Glu	Ala	Gly	Ala	Ala	Thr	Val	Ala	Met	Gly	Val	Ala	<u>Met</u>	<u>Ser</u>	Met	Pro	Leu	Lys	66
C1-inhibitor	Glu	Thr	Gly	Val	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Ile	Ser	Val	Ala		<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	Leu	Leu	Val	Phe	67
<i>crmA</i>	Glu	Glu	Tyr	Thr	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Cys	Ala	Leu	Val	Ala		<u>Asp</u>	<u>Cys</u>	Ala	Ser	Thr	Val	68
HEL1	Glu	Glu	Gly	Thr	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Thr	Ile	Met	Leu	<u>Ala</u>	<u>Met</u>	Pro	Glu	Glu	Asn	69
Heparin cofactor II	Glu	Glu	Gly	Thr	Gln	Ala	Thr	Thr	Val	Thr	Thr	Ala	Gly	Phe	Met	Pro	<u>Leu</u>	<u>Ser</u>	Thr	Gln	Val	Arg	70
Kallistatin	Asp	Glu	Gly	Thr	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr	Phe	Ala	Ile	Lys	Phe	<u>Phe</u>	<u>Ser</u>	Ala	Gln	Thr	Asn	71
LICI	Glu	Glu	Gly	Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Ile	Ser	Ser	Val	Val	Ala	Gly	Val	<u>Arg</u>	<u>Ser</u>	Gly	Trp	Lys	Arg	72
LICI2	Glu	Glu	Gly	Ser	Glu	Ala	Ala	Ala	Val	Ser	Gly	Val	Val	Val	Met	Leu	<u>Lys</u>	<u>Ser</u>	Ala	Ser	His	Asn	73
<i>Manduca sexta</i> Ala-serpin	Glu	Glu	Gly	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Ala	Phe	Gly	Ile	Val	Pro	<u>Ala</u>	<u>Ser</u>	Leu	Ile	Leu	Thr	74
PAI-1	Glu	Ser	Gly	Thr	Val	Ala	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Val	Ile	Val	Ser	Ala	<u>Arg</u>	<u>Met</u>	Ala	Pro	Glu	Glu	75
PAI2	Glu	Glu	Gly	Thr	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	Val	Met	Thr	Gly	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	Gly	His	Gly	Gly	76
Protein C inhibitor	Glu	Ser	Gly	Thr	Arg	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly	Thr	Ile	Phe	Thr	Phe	<u>Arg</u>	<u>Ser</u>	Ala	Arg	Leu	Asn	77
Protease nexin-1	Glu	Asp	Gly	Thr	Lys	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Thr	Ala	Ile	Leu	Ile	Ala	<u>Arg</u>	<u>Ser</u>	Ser	Pro	Pro	Trp	78
PI-6	Glu	Glu	Gly	Thr	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Ile	Met	Met	Met	<u>Arg</u>	<u>Cys</u>	Ala	Arg	Phe	Val	79
SCCA-1	Glu	Glu	Gly	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Val	Gly	Phe	Gly	<u>Ser</u>	<u>Ser</u>	Pro	Ala	Ser	Thr	20
SCCA-2	Glu	Glu	Gly	Val	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Val	Val	Phe	Glu	<u>Leu</u>	<u>Ser</u>	Ser	Pro	Ser	Thr	20
Schistosome serpin	Glu	Ser	Gly	Ile	Glu	Ala	Thr	Thr	Val	Thr	Ser	Pro	Ile	Phe	Val	Pro	<u>Phe</u>	<u>Ser</u>	Ala	Ile	Ile	Pro	80
NON-INHIBITORY SERPINS																							
Ovalbumin	Glu	Ala	Gly	Arg	Glu	Val	Val	Gly	Ser	Ala	Glu	Ala	Gly	Val	Asp	Ala	<u>Ala</u>	<u>Ser</u>	Val	Ser	Glu	Glu	81
CBG	Glu	Glu	Gly	Val	Asp	Thr	Ala	Gly	Ser	Thr	Gly	Val	Thr	Leu	Asn	Leu	<u>Thr</u>	<u>Ser</u>	Lys	Pro	Ile	Ile	82
TBG	Glu	Lys	Gly	Thr	Glu	Ala	Ala	Ala	Val	Pro	Glu	Val	Glu	Leu	Ser	Asp	<u>Gln</u>	<u>Pro</u>	Glu	Asn	Thr	Phe	83
Angiotensinogen (h)	Ala	Asp	Glu	Arg	Glu	Pro	Thr	Glu	Ser	Thr	Gln	Gln	Leu	Asn	Lys	Pro	<u>Glu</u>	<u>Val</u>	Leu	Glu	Val	Thr	84
PFDF	Glu	Asp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Gly	Leu	Gln	Pro	Ala	His	<u>Leu</u>	<u>Thr</u>	Phe	Pro	Leu	Asp	6

TABLA 8. Alineamiento de la estructura primaria de las asas con el centro reactivo (RCL), P17-P3'. De las serpinas con función inhibitoria y de las carentes de ésta. La nomenclatura del sitio P1-P1' es la utilizada por Schechter y Berger. Tabla tomada del libro, Serpins: Structure, Function y Biology, Gettins, et al. Chapman y Hall, 1993., p 6.

ANTECEDENTES

5.- ESTRUCTURA GÉNICA Y EVOLUCIÓN.

Se conoce que las diferentes serpinas presentes en los mamíferos han evolucionado a través de la duplicación de genes y su posterior divergencia, dando lugar a un gran número de genes que codifican para diferentes serpinas, dentro de un mismo organismo. Cada uno de estos genes codificando para una proteína con una región activa única que le confiere una actividad fisiológica característica (Hill y Hastie.,1987). Al menos siete estructuras genómicas de las serpinas se han identificado en base al número, tamaño y localización de los intrones y exones. Las **ov-serpins** (que contienen genes caracterizados por el de la ovoalbúmina (Woo *et al.*,1981), SCCA (Schneider *et al.*,1995), PAI-2 (Ye *et al.*, 1989) y el gen Y (Heilig *et al.*,1982): La familia de **α -1PI**, contiene α -1PI (Leicht *et al.*,1982), α 1-antiquimiotripsina (Bao *et al.*, 1987), CBG (Underhill *et al.*,1989) y el angiotensinógeno (Jeunemaitre *et al.*,1992); la **antitrombina** (Prochownik *et al.*, 1985) ; **PAI-1** (Loskutoff *et al.*,1987); **PI-6**(Sun *et al.*,1995); **inhibidor de la C-1** (Bock *et al.*,1986) y la familia de la **α ₂-antiplasmina** (Hirosawa *et al.*, 1988). Existen reportes previos (Richard 1996; Michael Salzet, 1999; James, 2000), en los cuales se analizaron las relaciones existentes en la superfamilia de serpinas desde un punto de vista filogenético clásico, es decir, mediante la comparación de la estructura primaria de las proteínas, la cual es muy diferente (poco conservada) a lo largo de toda la familia. Sin embargo, paradójicamente, la estructura tridimensional de las serpinas es muy conservada en los diferentes grupos

6. CRISTALES DE LAS SERPINAS

La primera estructura tridimensional, obtenida a partir de una estructura cristalográfica de serpina reportada en 1984, fue la del α_1 -inhibidor de la proteasa (α_1 -antitripsina), la cual presenta el asa del centro reactivo cortada, y por lo tanto inactiva (Löeberman *et al.*, 1984). Seis años después se reportó la placalbúmina (Wright *et al.*, 1990) seguida por la ovoalbúmina (Stein *et al.*, 1991), una serpina sin propiedades inhibitorias conocidas. Posteriormente, aparecieron nuevas estructuras en estado cortado y no cortado (Mourey *et al.*, 1990; Baumann *et al.*, 1991; Baumann *et al.*, 1992; Mourey *et al.*, 1993), como es el caso del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) (Mottonen *et al.*, 1992). En 1994 aparecen las primeras estructuras de serpinas no cortadas con capacidad de inhibición, la antitrombina y la α_1 -antiquimiotripsina (Schreuder *et al.*, 1994; Carrell *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1994). Éstas nos han ayudado a entender no sólo la estructura de la familia de las proteínas; sino también, el mecanismo fisicoquímico de su funcionamiento y que, a pesar de las diferencias presentes en su estructura primaria (la cual se utilizó al principio para identificarlas), reflejan una alta similitud en cuanto a estructura terciaria. Así mismo, se ha podido visualizar el cambio estructural que pueden presentar estas proteínas (Stein y Chotia., 1991), el cual involucra a la región del asa con el centro reactivo y a dos de las hebras β .

7.-ESTRUCTURAS CRISTALOGRÁFICAS COMPLETAS

A la fecha, se encuentran depositadas en el Protein Data Bank (PDB), las coordenadas de 27 cristales de serpinas, aunque se espera que esto vaya en aumento en los próximos años. El hecho de que hasta ahora solo se hayan reportado las coordenadas cristalográficas de un complejo serpina+proteínasa (α 1-antitripsina / tripsina, con el número de acceso al PDB, 1EZK, (Huntington *et al.* 2000), podría reflejar la inestabilidad de tales complejos en el proceso de cristalización, lo cual puede afectar directamente el mantenimiento de una población homogénea de tales complejos durante el tiempo necesario para su cristalización. De hecho, los cristales utilizados para la determinación de la primera estructura de una serpina (α 1-inhibidor de la proteínasa o α 1-antitripsina en su forma cortada) resultaron de un intento para cristalizar el complejo α 1-inhibidor de la proteínasa + tripsinógeno. También hay que tomar en cuenta las modificaciones que son responsables de la micro-heterogeneidad en la población de proteína, lo que interfiere en la obtención de los cristales apropiados para la difracción de rayos X.

La ovoalbúmina fue una de las primeras serpinas en ser cristalizada, con esta serpina los primeros cristales para la difracción de rayos X se obtuvieron cuyo se utilizó una isoforma fosforilada en dos residuos de serina (Stein *et al.* 1991). Aún aquí, en la celda unitaria se encontraron cuatro moléculas de ovoalbúmina, cada una con pequeñas diferencias en la orientación del la hélice α presente en la región del asa con el centro reactivo.

Gracias a la gran similitud que existe entre las estructuras de las serpinas, ha sido posible simplificar el análisis de los datos obtenidos en la difracción de rayos X, utilizando métodos de reemplazo molecular, para casi todas las serpinas analizadas a la fecha, en lugar de la preparación de derivados de átomos pesados.

8.- EL DOMINIO CENTRAL DE LAS SERPINAS

El dominio central en las serpinas está muy conservado y contiene los residuos 21 al 389 (utilizando la numeración del α 1-inhibidor de la proteinasa o α 1-antitripsina); éste se compone de tres hojas β y nueve hélices α . Las hojas β se designan con las letras A, B y C, y las hélices α de la A a la I. La hoja β A abarca la mayoría de los residuos y está compuesta por 5 hebras (s1A a la s5A), seguida por la hoja β B, la que posee 6 hebras y la hoja β C. (figura 4). Existen diferencias significativas en cuanto a la estructura de las serpinas, pero éstas se relacionan tanto con la conformación que posee el asa con el centro reactivo, como con las interacciones con las hebras β A y C. Estas hojas se encuentran de forma antiparalela con la excepción notable de las bandas centrales (s3A y s5A), las cuales se encuentran en forma paralela en la serpina no cortada, cuyo la serpina entra en contacto con su proteinasa afín y se lleva a cabo el corte en el sitio P1-P1', el asa con el centro reactivo se internaliza como una nueva hebra (s4A), en medio de estas dos hebras β , quedando de manera antiparalela y, por lo tanto, estabiliza la nueva hoja por los puentes de hidrógeno formados.

Alrededor de estas hojas β se encuentran varias hélices α , esto en conjunto, da una estructura tipo elipsoidal con dimensiones aproximadas de 70 Å x 50 Å x 50 Å, dándonos un volumen aproximado de $1.75 \times 10^5 \text{ Å}^3$.

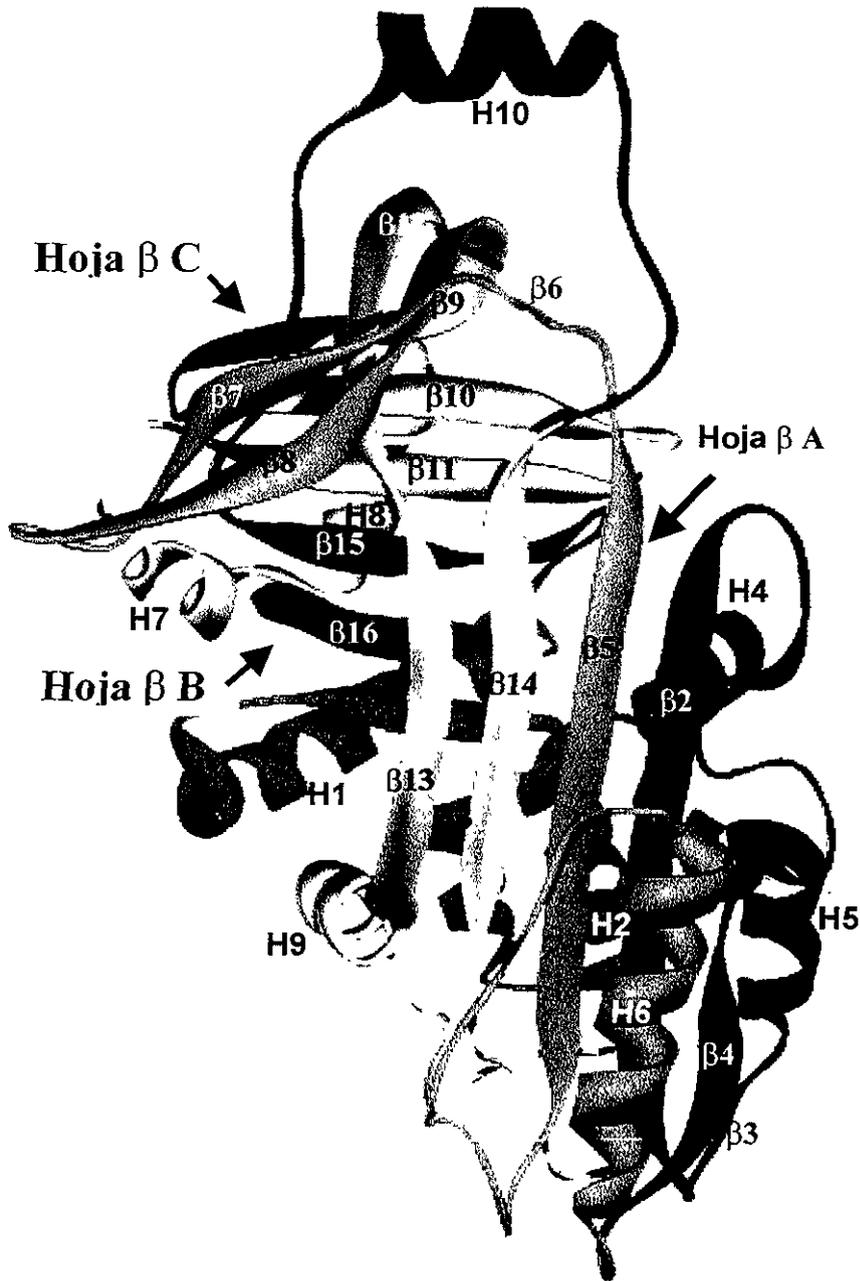


FIGURA 4. Diagrama esquemático de la estructura de la ovoalbúmina, la cual ilustra el plegamiento tridimensional de las serpinas. La estructura está compuesta de un cuerpo compacto de tres hojas β antiparalelas, denominadas A, B y C. Estas están rodeadas por hélices α . La cadena polipeptídica está coloreada en secciones desde el extremo N-terminal para facilitar el seguimiento de la cadena en el orden, verde, azul, amarillo, rojo y rosa. La región roja corresponde al asa con el sitio reactivo (aunque en la ovoalbúmina no funciona como tal por poseer una hélice- α). (La numeración se tomó del libro, del Introduction to Protein Structure 2ª ed, Branden y Tose, 1999., p 111)

La estructura nativa de las serpinas es inusual, ya que éstas se pliegan de manera natural en una forma que es metaestable, este plegamiento se conoce como estado estresado o conformación S (stressed). Después de que ocurre el corte por la proteasa afin, la serpina se encuentra en un estado conformacional relajado o R (relaxed), siendo más estable que la estructura nativa.

Entre las diferencias estructurales presentes en las serpinas, la más importante de las conformaciones S-R, es la hoja β A, esta se forma por la inserción de los residuos del asa con el centro reactivo (Reactive Center Loop o RCL) como una nueva hebra β denominada hoja 4 A (s4A), la cual entra entre las hebras s3A y s5A, que son paralelas para formar un complejo de hojas antiparalelas las que son más estables. Como resultado de esta inserción de asa, los residuos P1-P1' se separan 70 Å. (figura 1).

9.-MOVILIDAD DEL ASA CON EL CENTRO REACTIVO Y EL MECANISMO DE INHIBICIÓN DE LAS SERPINAS.

La capacidad que posee el asa con el centro reactivo de las serpinas de asumir diferentes conformaciones, parece ser la parte central del mecanismo de inhibición. Para que el asa se pueda unir a su proteasa blanco, esta tiene que adoptar una conformación denominada canónica (figura 5), ya que se han observado otras conformaciones en el asa que no son adecuadas para unirse al sitio activo de la proteasa. Dentro del asa de la serpina existe una región muy conservada en el extremo amino, la cual parece ser muy importante para el reconocimiento con el centro activo de la proteasa. Existe evidencia del comportamiento en mutantes de serpinas, que la inserción de uno o más residuos en esta región, puede afectar o modificar la actividad de inhibición presente en las serpinas (Skriver *et al.*, 1991; Hood *et al.*,1994; Hopkins *et al* 1993; Hopkins y Stone., 1995 ; Stein y Carrell 1995.)

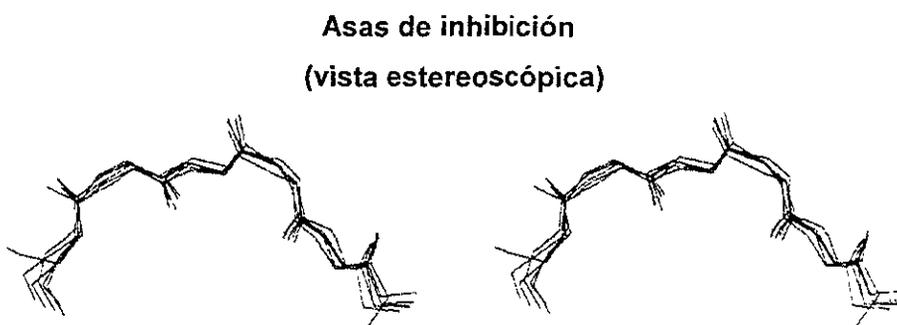


FIGURA 5. Comparación de seis asas del centro reactivo, que muestran la conformación conservada llamada conformación canónica. Figura tomada del libro, Serpins: Chemistry and Biology of Serpins. Rank Church, *et al.* Advances in Experimental Medicine and Biology.1997.,Vol 425. p 6.

La región del asa con el centro reactivo involucrada en la inserción, contiene los residuos P₂₀ - P₁₅, y se le conoce como región de bisagra. Estos residuos participan en el movimiento de la hebra βA, ayudando al resto del asa con el centro reactivo a adoptar la conformación final de la misma. La secuencia de la región bisagra es altamente conservada en las serpinas que presentan capacidad de inhibición, sus residuos de aminoácidos poseen pequeñas cadenas laterales, observándose que mutaciones puntuales en esta zona, disminuyen la formación de complejos estables de serpina-proteasa (tabla 8). Después de la formación inicial del complejo de Michaelis (EI), este puede dar lugar a un rearrreglo conformacional para dar lugar a la formación de un complejo inhibitorio final EI*, el cual decae lentamente y se descompone dando lugar tanto a la serpina cortada como a la enzima activa con una constante de K₅. La segunda opción es de que ocurra una deacilación hidrolítica para dar lugar a la serpina cortada (I') y la enzima activa (E). (figura 6). Aunque el complejo estable podría disociarse lentamente para dar lugar a la serpina cortada (I'). (Cooperman, *et al.*, 1993; Patston, *et al.*, 1991). Las constantes más importantes del mecanismo de inhibición irreversible son la constante de formación de un complejo estable (k_{on}) y la de estequiometría de inhibición (SI).

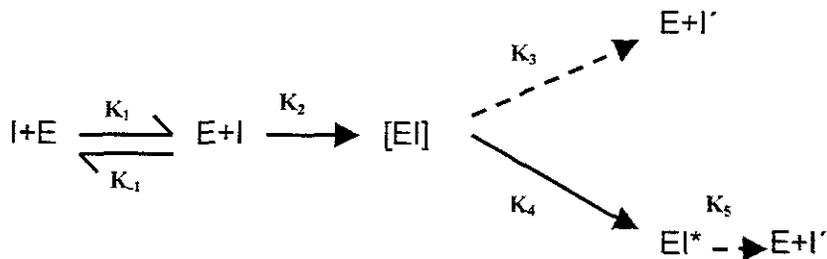


FIGURA 6. Esquema de la reacción mínima cinética de la serpina I con la proteasa afín E, para la formación de un complejo estable y covalente EI*. Se muestra la formación inicial del complejo no covalente de Michaelis EI, el cual es seguido por la acilación de la enzima para formar el complejo inicial acil-enzima [EI]. El complejo intermedio [EI], puede dar lugar a un rearrreglo conformacional para dar lugar a la formación de un complejo inhibitorio final EI*, el cual decae lentamente y se descompone dando lugar tanto a la serpina cortada como a la enzima activa con una constante de K5. La segunda opción es de que ocurra una deacilación hidrolítica para dar lugar a la serpina cortada (I') y la enzima activa (E). Se muestra en líneas negras la reacción y en punteadas las posibles rutas alternas.

La estequiometría de inhibición (SI), es el número de moléculas de serpina requeridas para inhibir una molécula de proteasa; esto se determina por las proporciones relativas de las dos rutas de inhibición, tal que SI iguala a $1+k_3/k_2$. Las mutaciones en la región mecánica que funciona como bisagra, pueden dar lugar a un marcado descenso en el valor de K_{ass} con un incremento en el valor de SI. (Hopkins *et al.*, 1993; Hood *et al.*, 1994; Hopkins y Stone., 1995). Estos resultados concuerdan con las mutaciones en la región de bisagra, que afectan el valor de la formación de complejos estables desde el inicio; por lo que la movilidad de la región bisagra es importante para la formación de complejos estables.

10.- FORMACIÓN DEL COMPLEJO SERPINA-PROTEASA, CO-CRISTALIZACIÓN DE LA α 1-ANTITRIPSINA / TRIPSINA.

El cocrystal de la α 1 antitripsina / tripsina es importante, ya que estas son las primeras coordenadas cristalográficas del tipo que se obtienen, estas tienen el número de acceso al PDB, 1EZK. En la figura 7 se muestra un esquema de la formación de este complejo. Wright y Scarsdale, 1995, propusieron que la inhibición involucraba la inserción del asa con el centro reactivo de la serpina, como una nueva hebra β A en la molécula, con un desplazamiento de polo a polo de la proteasa. No obstante, existía un desacuerdo en cuanto a la inserción del asa, ya que existe evidencia de una inserción tanto parcial (Picard *et al.* 1999) como completa (Stratikos y Gettins 1999; Fa. M *et al.* 2000) del asa con el centro reactivo.

En la estructura cristalográfica de la α 1-antitripsina podemos ver que existe una incorporación total del asa con el centro reactivo. De hecho, la conformación de la α 1-antitripsina en el complejo se sobrepone o alinea con la estructura de la α 1-antitripsina cortada (Loebermann, 1984) (Root Mean Square (RMS) de 0.52 Å para todos los C α). Esta estructura fue la base para proponer la metaestabilidad de las serpinas (Carrell, 1985).

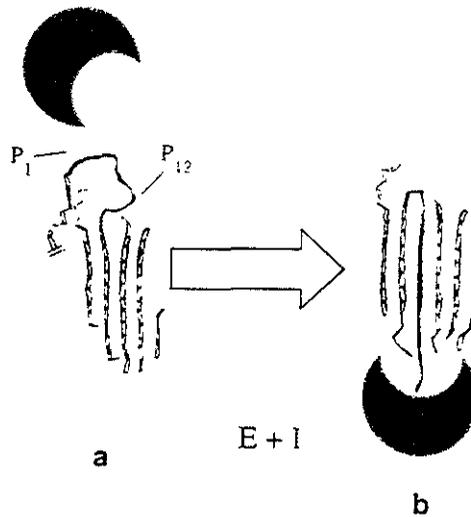
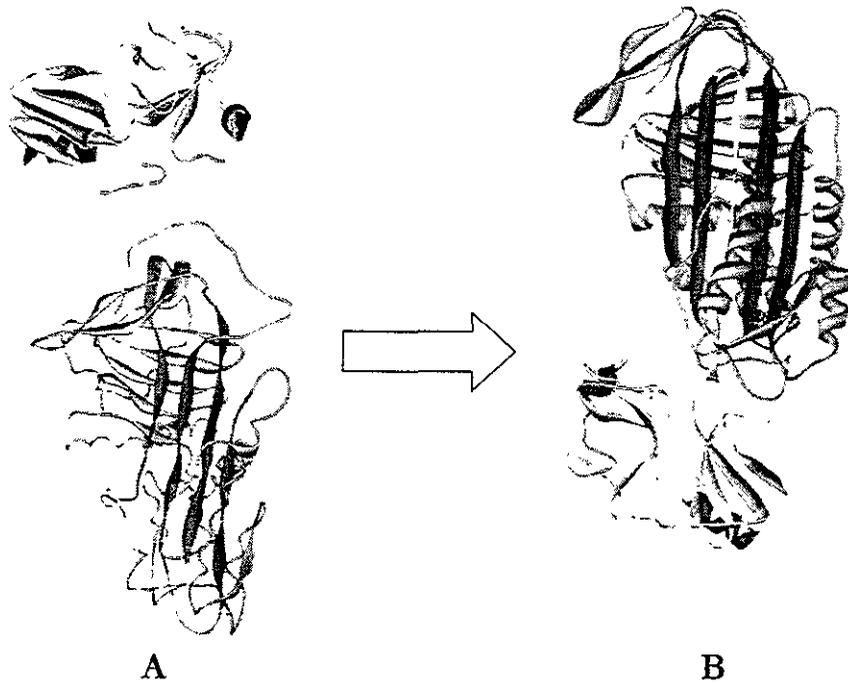


FIGURA 7 Formación del complejo serpina - proteasa. La figura A muestra a la $\alpha 1$ - antitripsina en su forma nativa con la tripsina alineada en posición de acoplamiento, mientras que en B se muestra el complejo con una inserción completa del asa con el centro reactivo en la hoja A . En la parte inferior se muestra una figura más esquemática.

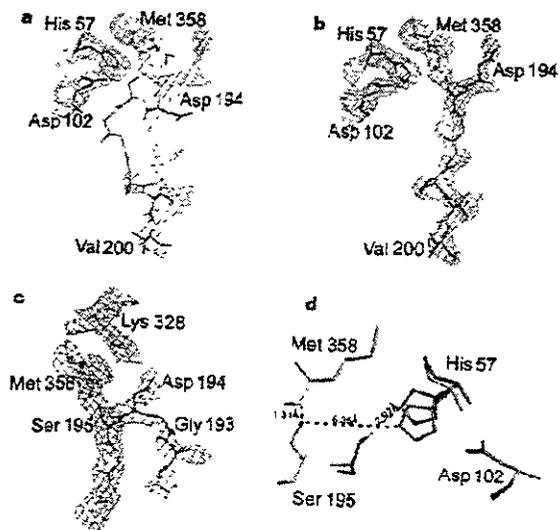


FIGURA 8. Modificación del sitio reactivo. El enlace éster y la distorsión del sitio reactivo de la tripsina y la metionina 358 es evidente. Del estado inicial (a), al final (b). El modelo refinado de densidad electrónica (c), muestra la compactación del asa con el centro reactivo, que da como resultado la pérdida del hoyo de oxianión y el reemplazo del puente salino estabilizante entre el amino N-terminal y Asp 194 de la tripsina con la Lys 328 de la α_1 -antitripsina. (d), La tríada catalítica de la tripsina nativa, es ampliamente distorsionada en el complejo, con un cambio de la Ser 195 a la His 57, más allá de la proximidad del puente de hidrógeno. El acoplamiento está centrado en la Asp 102.

De la estructura del complejo serpina-proteasa 1EZX, no se esperaba una deformación inducida en la proteasa (Figura 8). Esta perturbación que podría ocurrir en el complejo se propuso en estudios previos (Herve y Ghelis, 1991; Kaslik *et al* 1995; Stavridi *et al* 1996), mostrando que podría existir una pérdida en la estabilidad y un incremento en la vulnerabilidad a proteólisis en el complejo. La habilidad de desnaturalizar parcialmente a su proteínasa afin es única en las serpinas, y la ventaja que les confiere esta característica es hacer al complejo más susceptible a la degradación.

11.- LA ESTABILIDAD DEL COMPLEJO PROTEASA-SERPINA

Comparada con otras familias de inhibidores de proteasas serínicas, los complejos de proteasas y serpinas pueden persistir por meses, incluso años *in vivo* (Olson *et al*, 1995). Antes de que apareciera la primera co-cristalización de una serpina con su proteasa, existía la duda de si el intermediario acil persiste como resultado de la exclusión del agua del sitio reactivo de la serpina que se requiere para la hidrólisis, o si la distorsión del sitio reactivo es lo que previene la desacilación catalítica. El análisis del cocristal excluye la primera opción, ya que en la región adyacente al sitio reactivo es incompatible con la exclusión del agua de este sitio. Sin embargo, no se observan moléculas de agua en la cercanía del enlace éster o de la histidina catalítica 57 (figura 8 a, b).

En la figura 8 d existe una gran distorsión en el sitio catalítico de la tripsina con un movimiento de la Ser 195 a una posición de más de 6 Å de su pareja catalítica la His 57. Esta proximidad es necesaria, tanto para la desacilación catalítica, como para el movimiento de la Ser 195, destruyendo el hoyo de oxianión adyacente a esta (N-H de la Gly 193 y la Ser 195), el cual se requiere para la estabilización del estado tetrahédrico de transición. Esta modificación es una consecuencia directa del tamaño limitado del asa con el centro reactivo, lo cual salva la unión éster de la Ser 195 de la catálisis.

12.- LA INTERFASE α 1 ANTITRIPSINA-TRIPSINA

La interfase serpina-proteasa en el complejo de la α 1 antitripsina / tripsina está limitada por dos grandes contactos que contribuyen a la estabilidad del complejo, estos son: Lys 328 de la α 1-antitripsina, el cual forma un puente salino con el Asp 194 (FIGURA 8 c), y la Asn 314, la cual forma tres puentes de hidrógeno con los oxígenos del carbonilo de la cadena principal en la tripsina. Estas interacciones no son únicas para la tripsina y son las que ayudan en la estabilización de los complejos serpina-proteasa en los miembros de la familia. (FIGURA 9).

La distorsión de la Ser 195 está ligada a la pérdida del ordenamiento de la molécula de tripsina, los factores más importantes parecen ser fuerzas de impedimento estérico. Por las cuales la proteasa es oprimida hacia la serpina. Esto puede explicar el por que las serpinas han evolucionado como proteínas metaestables, ya que a partir de que la energía se libera (posterior al corte), el complejo resultante es una molécula hiperestable en términos energéticos. De esta manera, el acoplamiento estérico de las dos estructuras provoca un colapso importante en la estructura de la tripsina.

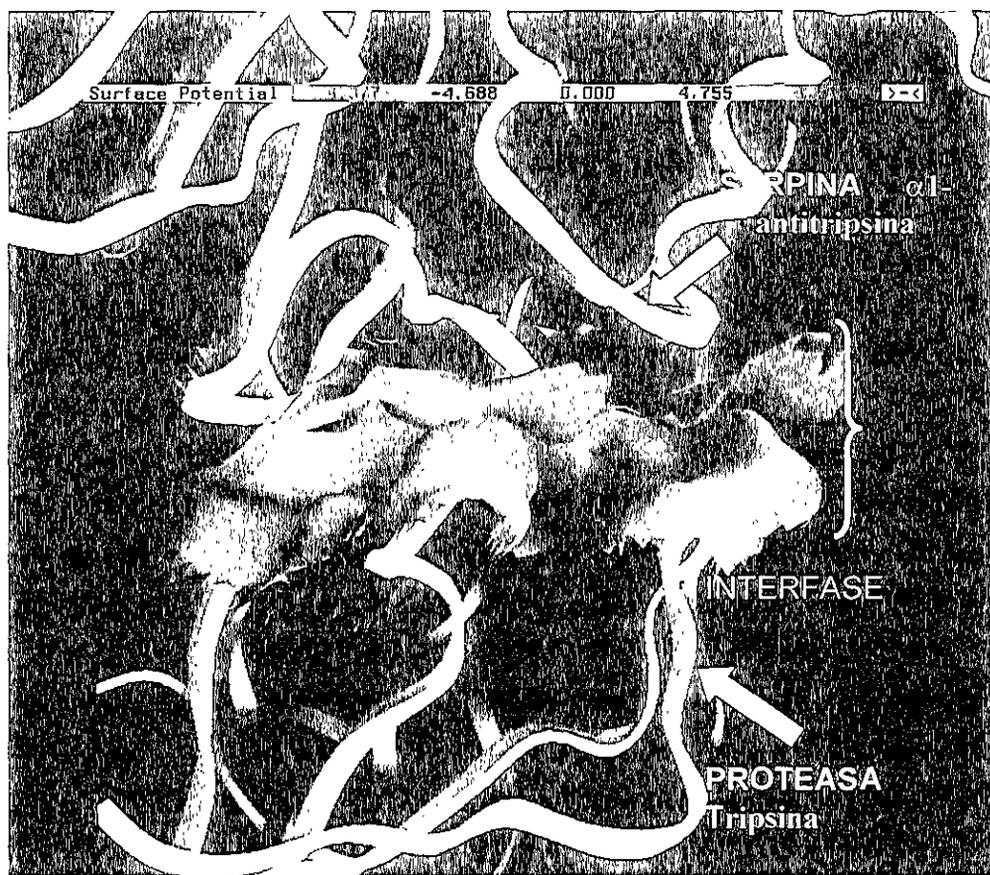


FIGURA 9. Se muestra la interfase que forman la serpina (α_1 - antitripsina) (arriba) y su proteasa afín (tripsina) (abajo). Solo se muestra la superficie molecular en la interfase, el resto de las moléculas se representa en listones. Se muestra en color rojo las regiones de la molécula cargadas negativamente y en azul las regiones de la molécula cargadas positivamente. La imagen se llevó a cabo con el programa GRASP.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la relación evolutiva del grupo, utilizando un enfoque estructural, ya que pese a la gran cantidad de mutaciones acumuladas a lo largo del proceso evolutivo (que se traduce en una baja similitud de secuencia) tanto su estructura tridimensional como el mecanismo de acción de estas proteínas es muy conservado.

Con base en lo anterior, propusimos la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

Al ser las serpinas una superfamilia de proteínas muy diferentes a nivel de estructura primaria, pero muy conservadas a nivel conformacional, el enfoque evolutivo estructural nos permitirá evaluar la relación estructura – función de los diferentes grupos de la familia.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la relación evolutiva del grupo, utilizando un enfoque estructural, ya que pese a la gran cantidad de mutaciones acumuladas a lo largo del proceso evolutivo (que se traduce en una baja similitud de secuencia) tanto su estructura tridimensional como el mecanismo de acción de estas proteínas es muy conservado.

Con base en lo anterior, propusimos la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

Al ser las serpinas una superfamilia de proteínas muy diferentes a nivel de estructura primaria, pero muy conservadas a nivel conformacional, el enfoque evolutivo estructural nos permitirá evaluar la relación estructura – función de los diferentes grupos de la familia.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- **Analizar** la relación evolutiva en la superfamilia de los inhibidores de proteasas serínicas (serpinas), tanto a nivel de su estructura terciaria como en la primaria, expresada en términos de árboles filogenéticos, *ponderó con mapas de isopotencial electrostático de cada uno de los cristales de serpinas.*

OBJETIVOS PARTICULARES

- **Generar** una base de datos que contenga las serpinas secuenciadas a la fecha, así como de los cristales de serpinas.
- Llevar a cabo los siguientes alineamientos estructurales de las serpinas:
 - a) Un alineamiento de estructura primaria.
 - b) Un alineamiento conformacional de estructura secundaria.
 - c) Un alineamiento general, basados en el alineamiento conformacional.
- **Calcular** los mapas de isopotencial electrostático, a partir de las coordenadas cristalográficas de las serpinas.

DISEÑO EXPERIMENTAL

CRISTALES

Búsqueda con BLASTp de las serpinas reportadas en el PDB



Verificación de las coordenadas de las serpinas.



Clasificación de las serpinas obtenidas en cortadas (asa con el centro reactivo cortada) y no cortadas (asa con el centro reactivo intacta)



Alineamiento conformacional para obtener RMS y alineamiento de secuencia con la información de las estructuras secundarias.

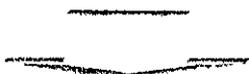


Conversión del alineamiento conformacional a formato de Clustalw.

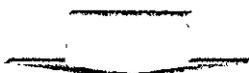
a) Cálculo del árbol filogenético y confiabilidad del mismo.



Construcción del cladograma, tomando en cuenta como patrón el alineamiento conformacional y añadiendo las secuencias de todas las serpinas.



Análisis de las proyecciones de potencial electrostático en las superficies moleculares y mapas de densidad electrostática.



b) Alineamiento de las estructuras primarias de los cristales. Cálculo del árbol filogenético y confiabilidad del mismo.

SECUENCIAS

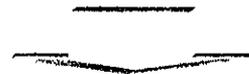
Escrutinio con BLASTp no redundante, en las bases de datos de secuencias de aminoácidos



Obtención de las secuencias únicas de las serpinas.



cálculo de confiabilidad del cladograma.



MATERIALES Y MÉTODOS

I Cristales

1.- Se llevó a cabo una búsqueda tipo Blastp (Basic Local Alignment Search Tool) para proteínas en la página del National Center of Biotechnology Information (NCBI) (Altschul et al., 1990) tomando como sonda la serpina del PDB 1HLE (Inhibidor de la elastasa de leucocitos de caballo) para obtener las diferentes coordenadas cristalográficas de serpinas depositadas en el Protein Data Bank (PDB).



2.- Se tomaron los números de acceso para posteriormente obtener cada una de las coordenadas cristalográficas, verificando de manera visual cada uno de estos con la ayuda del programa Swisspdb Viewer 3.7 (Guey y Peitsch., 1999).



3.- Se utilizó la secuencia primaria (obtenida de las coordenadas cristalográficas) como sonda para realizar una búsqueda cruzada en el PDB.



4.- De la búsqueda anterior se obtuvieron 27 estructuras. Si la celda unitaria presentaba más de dos moléculas se procedió a separarlas para utilizar una sola y si estas se encontraban en conformaciones diferentes se mantuvo una de cada una.



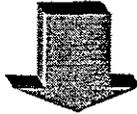
5.- Con la ayuda del programa Swisspdb Viewer (Guex y Peitsch., 1999), se obtuvo el valor de Root Mean Square (RMS) para el alineamiento estructural general de todas las serpinas, y para cada uno de los grupos de cristales de serpinas, esto con los parámetros **Magic fit, e Iterative Magic Fit**, además de generar los alineamientos de cada uno de los 32 cristales con el parámetro **Generate Estructural Alignment**. Con el objeto tanto de obtener el menor RMS X (promedio), como el mejor alineamiento estructural con un mayor número de aminoácidos idénticos y similares.



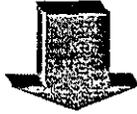
6.- El mejor alineamiento estructural, así como uno de los RMS X menores fue el del cristal 1AS4. Este alineamiento estructural se pasó al formato del alineamiento del programa Clustalw 1.7, (Thompson, *et al.*, 1994) para posteriormente llevar a cabo el cálculo del correspondiente árbol filogenético, la confiabilidad de los árboles se ensayó sometiéndolo a 100 ciclos de Bootstrap en el mismo programa.

II Secuencias

Todas las secuencias analizadas en este estudio fueron obtenidas de una búsqueda con Blast con el parámetro no redundante (nr) en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Altschul *et al.*, 1990), se utilizaron las secuencias primarias derivadas de las coordenadas cristalográficas como sonda para asegurar la no omisión y repetición de alguna secuencia, este proceso se hizo iterativo hasta que no se obtuvo una nueva secuencia.



Se removieron todas las secuencias redundantes, los fragmentos y las patentes.



Para el alineamiento estructural se utilizó como semilla el alineamiento del 1as4, y se alinearon todas las secuencias contra este en el programa Clustalw 1.7 (Thompson *et al.*, 1994), se calculó el correspondiente cladograma y se ensayó su confiabilidad sometiéndolo a 100 ciclos de Bootstrap en el mismo programa.

III Mapas de isopotencial electrostático



Los mapas de isopotencial electrostático, se llevaron a cabo utilizando el programa Grasp versión 2.11, con las coordenadas cristalográficas de las serpinas encontradas, calculando primero la Superficie Molecular con un radio de 1.4 Å y después el potencial electrostático con la ecuación lineal de Poisson-Boltzmann, resolviéndola cíclicamente hasta alcanzar la convergencia electrostática. El número de ciclos para alcanzar la convergencia se determinó por el mismo programa.

Alineamientos de Secuencias

El alineamiento estructural, se llevó a cabo con la ayuda del programa Swisspdb Viewer 3.7 (Guex y Peitsch., 1999), con las coordenadas cristalográficas de las 32 serpinas, mediante los parámetros **Magic Fit** (Este procedimiento escogerá automáticamente los mejores pares de carbonos α de los aminoácidos equivalentes en las cadenas y las alineará en un procedimiento tridimensional), e **Iteractive Magic Fit** (este procedimiento es como el anterior. solo que las desviaciones de RMS serán minimizadas), así como el de **Generate Structural Aligment** (esta herramienta encontrará los aminoácidos relacionados espacialmente y pondrá los espacios apropiados en el alineamiento de las secuencias). De esta manera se obtendrá tanto una tabla tanto de RMS general como una para cada grupo.

Por otro lado, los alineamientos múltiples de las secuencias de aminoácidos se construyeron con la ayuda del programa Clustalw 1.7 (Thompson *et al.*,

1994) con una matriz BLOSUM, utilizando los parámetros, Open Gap Penalty 10.00 y Extensión Gap Penalty 0.05.

Árboles

Para la visualización de los árboles filogenéticos se utilizaron los programas Tree View (Page, 1996) y NJ Plot (Perriere y Gouy, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Base de datos de los cristales

En la tabla 3, se enlista la base de datos de los cristales de serpinas que se formó a partir de la búsqueda de Blast en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Altschul *et al.*, 1990). Se calcularon los Mapas de Isopotencial Electroestático (MIPES), a partir de las coordenadas cristalográficas de las serpinas, utilizando como sonda al inhibidor de la elastasa de leucocitos (1HLE). De esta manera se obtuvieron las coordenadas cristalográficas de las serpinas depositadas en el PDB, las cuales se verificaron de manera visual con el programa Swisspdb Viewer 3.7, separando las moléculas que presentaban dímeros y conservando una de las conformaciones diferentes (Cortadas y no Cortadas).

Base de datos de las secuencias

En la Tabla 4, se muestra la segunda base de datos que se formó mediante Blast en el NCBI con el parámetro no redundante (nr) y utilizando las secuencias primarias derivadas de las coordenadas cristalográficas como sonda para asegurar la no omisión y repetición de alguna secuencia. Removiendo las secuencias redundantes, los fragmentos y las patentes.

Root Mean Square (RMS).

Los resultados del cálculo del RMS (Root Mean Square), de los alineamientos estructurales con el programa Swisspdb viewer 3.7, se presentan en la Tabla 5, donde se muestran las distancias existentes en Å, entre los alineamientos de las 29 coordenadas cristalográficas de las diferentes serpinas. Para llevar a cabo comparación entre los grupos existentes de cristales, se hizo un segundo cálculo de RMS, esta vez tomando solo en cuenta a los miembros de cada grupo (por ejemplo, las antitrombinas con las antitrombinas, las antitripsinas con las antitripsinas, etc.). Los resultados se muestran en la **Tabla 6**.

TABLA 6

RMS DE LOS GRUPOS DE CRISTALES

Grupo	RMS promedio del alineamiento en Å.	Residuos Promedio	aa idénticos (*)	aa similares (.)	% de identidad total
ANTITROMBINAS	1ath-b 0.717	428	9	40	11.42
INHIBIDORES DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO	9pai 0.84	378	49	81	34.3
α 1- ANTITRIPSINAS	7api 0.486	368	198	25	60.6
α 1- ANTIQUIMIOTRIPSINAS	4caa 0.442	356	316	2	89.32

Tabla 6. Muestra el RMS promedio del mejor alineamiento estructural de cada grupo. En la distancia promedio en Å, se muestra arriba el número de acceso al PDB de la proteína contra la cual se alinearon los otros miembros del grupo. No se presentan los tres grupos restantes ya que solo cuentan con un solo representante (1HLE, 1OVA y 1SEK).

Para poder comparar los dos alineamientos (el estructural y el de secuencias), se identificaron los aminoácidos conservados, en este caso idénticos, en ambos alineamientos, generando una tabla de secuencias consenso (Tabla 7).

3 TABLA DE CRISTALES CUYAS COORDENADAS CRISTALOGRAFICAS SE UTILIZARON PARA LLEVAR A CABO EL ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL.

Clasificación (serpina)	ID PDB	Fuente	Resolución [Å]	Valor_R	Cadena	Residuos	PM [kD]	hélices-α	Hojas-β	Estado	Notas	Referencias
Antiquimotripsina	1AS4	<i>Homo sapiens</i>	2.10	1.198	1AS4 A	341	38554	10 31.38%	15 34.02%	C	Mutada A349R	(Lukacs et al. 1998)
α-1 Antiquimotripsina	1QMN	<i>Homo sapiens</i>	2.27	0.197	1QMN A	401	45292	10 24.94%	19 32.17%	C	Mutada	(Goopu et al. 2000)
α-1 Antiquimotripsina	2ACH	<i>Homo sapiens</i>	2.70	0.181	2ACH A	360	40645	9 29.44%	14 29.72%	C		(Baumann et al. 1991)
Antiquimotripsina	3CAA	<i>Homo sapiens</i>	2.40	0.190	3CAA A	341	38554	9 27.57%	14 33.43%	C	Mutada A347R.	(Lukacs et al. 1998)
Antiquimotripsina	4CAA	<i>Homo sapiens</i>	2.90	0.199	4CAA A	341	38524	10 29.91%	14 32.55%	C	Mutada T345R	(Lukacs et al. 1996)
α-1 Antitripsina	1ATU	<i>Homo sapiens</i>	2.70	0.195	1ATU	374	41983	11 15.24%	15 10.70%	NC	Mutada F51L, T59A, T68A, A70G, M374I, S381A, K387R	(Ryu et al. 1996)
α-1 Antitripsina	1KCT	<i>Homo sapiens</i>	3.46	0.184	1KCT	394	44238	5 5.33%	9 6.60%	NC	Mutada T59A, T68A, A70G, A70G	(Song et al. 1995)
α-1 Antitripsina	1PSI	<i>Homo sapiens</i>	2.90	0.218	1PSI	394	44280	9 25.38%	17 28.68%	NC	Mutada F51L	(Elliott et al. 1996)
α-1 Antitripsina	1QLP	<i>Homo sapiens</i>	2.00	0.231	1QLP A	394	44314	9 25.13%	15 26.90%	NC	Synonimos α-1-inhibidor de la proteinasa. -1- Antiproteinasa	(Elliott por publicar)
α-1 Antitripsina	1QMB	<i>Homo sapiens</i>	2.60	0.212	1QMB A	326	36565	9 30.98%	12 30.67%	C		(Huntington et al. 1999)
α-1 Antitripsina (modificada)	7API	<i>Homo sapiens</i>	3.00	0.193	7API A	347	39053	10 29.39%	13 31.70%	C		(Engl et al. 1989)
α-1 Antitripsina (modificada)	9API	<i>Homo sapiens</i>	3.00	0.209	9API A	347	39053	11 27.67%	13 31.12%	C		(Engl et al. 1989)
Inhibidor del activador del plasminogeno Tipo 1	1A7C	<i>Homo sapiens</i>	1.95	0.181	1A7C A	379	42814	9 27.44%	15 29.82%	C	Mutada A335E	(Xue et al. 1998)
Inhibidor del activador del plasminogeno Tipo 1	1B3K	<i>Homo sapiens</i>	2.99	0.247	1B3K A	379	42719	10 26.91%	15 28.50%	NC	Mutada	(Sharp et al. 1999)
Inhibidor del activador del plasminogeno Tipo 1	1CSG	<i>Homo sapiens</i>	2.60	No disponible	1CSG A	402	45047	9 25.12%	15 31.34%	C		(Tucker et al. 1995)
Inhibidor del activador del plasminogeno Tipo 1	1DB2	<i>Homo sapiens</i>	2.70	0.255	1DB2 A	377	42452	9 27.06%	16 28.65%	NC	Mutada	(Nar et al. 2000)
Inhibidor del activador del plasminogeno Tipo 1	9PAI	<i>Homo sapiens</i>	2.70	0.181	9PAI A	379	42782	9 26.65%	18 33.51%	C	Mutada A335P	(Aertgeerts et al. 1995)
Antitrombina	1ANT_I	<i>Homo sapiens</i>	3.00	0.214	1ANT I	432	49027	10 24.07%	14 22.92%	NC		(Carrell et al. 1994)
Antitrombina	1ANT_L	<i>Homo sapiens</i>	3.00	0.214	1ANT L	432	49027	10 22.45%	14 25.93%	C		
Antitrombina III	1ATH_A	<i>Homo sapiens</i>	3.20	0.179	1ATH A	432	49027	9 24.07%	18 29.40%	NC		(Schreuder et al. 1994)
Antitrombina III	1ATH_B	<i>Homo sapiens</i>	3.20	0.179	1ATH B	432	48935	9 23.15%	15 29.17%	C		
Antitrombina III	1ATT_A	<i>Bos taurus</i>			1ATT A	421	47760	10 24.94%	16 30.64%	C		(Mouret et al. 1992)
Antitrombina	1AZX_I	<i>Homo sapiens</i>	2.90	0.203	1AZX I	432	49027	11 27.98%	15 25.69%	NC		(Jim et al. 1997)
Antitrombina	1AZX_L	<i>Homo sapiens</i>	2.90	0.203	1AZX L	432	49027	11 25.69%	15 28.24%	C		
Antitrombina III	1BR8_I	<i>Homo sapiens</i>	2.90	0.230	1BR8 I	432	49027	9 23.84%	16 24.54%	NC		(Skinner et al. 1998)
Antitrombina III	1BR8_L	<i>Homo sapiens</i>	2.90	0.230	1BR8 L	432	49027	11 24.54%	18 26.39%	C		
Inhibidor de la elastasa de Leucocitos	1HLE	<i>Equus caballus</i>	1.95	0.176	1HLE A	345	38870	10 31.01%	12 32.75%	C		(Baumann et al. 1992)
Ovalbumina	1OVA	<i>Gallus domesticus</i>	1.95	0.169	1OVA A	386	42737	11 29.53%	14 29.79%	NC		(Stein et al. 1991)
Serpina	1SEK	<i>Manduca sexta</i>	2.10	0.199	1SEK	378	42208	10 27.78%	15 31.22%	NC		(Li et al. 1999)

3 Muestra los 29 cristales obtenidos en el PDB mediante Difracción de rayos X, se pueden ver el nombre completo de la proteína, el número de acceso o GI, el nombre científico mismo, la técnica utilizada, la resolución, el valor R, la cadena y el número de residuos, su peso Molecular, el porcentaje de hojas -β y hélices-α, el estado en el que se encuentra la a, la clasificación y algunas notas

TABLA 4
SECUENCIAS DE SERPINAS UTILIZADAS PARA LLEVAR A CABO TANTO EL
ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL COMO EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

#	# DE ACCESO (GI)	NOMBRE	ORGANISMO
1	1378123	SERPIN 1.TOBACCO HORNWORM	<i>Manduca sexta</i>
2	1378122	SERPIN 1.TOBACCO HORNWORM	<i>Manduca sexta</i>
3	1378126	SERPIN 1.TOBACCO HORNWORM	<i>Manduca sexta</i>
4	1378131	SERPIN 1.TOBACCO HORNWORM	<i>Manduca sexta</i>
5	1378125	SERPIN 1.TOBACCO HORNWORM	<i>Manduca sexta</i>
6	1378129	SERPIN 1.TOBACCO HORNWORM	<i>Manduca sexta</i>
7	1378130	SERPIN 1.TOBACCO HORNWORM	<i>Manduca sexta</i>
8	1378132	SERPIN 1.TOBACCO HORNWORM	<i>Manduca sexta</i>
9	1378127	SERPIN 1.TOBACCO HORNWORM	<i>Manduca sexta</i>
10	1378133	SERPIN 1.TOBACCO HORNWORM	<i>Manduca sexta</i>
11	1378128	SERPIN 1.TOBACCO HORNWORM	<i>Manduca sexta</i>
12	1378124	SERPIN 1.TOBACCO HORNWORM	<i>Manduca sexta</i>
13	241584	ANTICHYMOTRYPSIN II	<i>Bombyx mori</i>
14	2149091	SERPIN-2	<i>Manduca sexta</i>
15	6572145	SERINE PROTEASE INHIBITOR (SERPIN-2)	<i>Drosophila melanogaster</i>
16	6572147	SERINE PROTEASE INHIBITOR (SERPIN-3)	<i>Drosophila melanogaster</i>
17	6572143	SERINE PROTEINASE INHIBITOR (SERPIN-1)	<i>Drosophila melanogaster</i>
18	6572153	SERINE PROTEASE INHIBITOR (SERPIN-6)	<i>Drosophila melanogaster</i>
19	6572149	SERINE PROTEASE INHIBITOR (SERPIN-4)	<i>Drosophila melanogaster</i>
20	6002108	SERPIN PUTATIVE	<i>Drosophila melanogaster</i>
21	6002110	SERPIN PUTATIVE	<i>Drosophila melanogaster</i>
22	6002112	SERPIN PUTATIVE	<i>Drosophila melanogaster</i>
23	1585834	SERPIN	<i>Pachystacus lemniscatus</i>
24	6572145	SERINE PROTEASE INHIBITOR (SERPIN-5)	<i>Drosophila melanogaster</i>
25	5911717	Removido a petición del Autor	
26	583741	ANTITHROMBIN III	[synthetic construct]
27	1168462	ANTITHROMBIN-III	<i>Bos taurus</i>
28	4972629	SERPIN-LIKE PROTEIN	<i>Homo sapiens</i>
29	510194	ZG-21P	<i>Rattus norvegicus</i>
30	2462592	NEUROSERPIN	<i>Mus musculus</i>
31	4263819	PUTATIVE SERPIN	<i>Arabidopsis thaliana</i>
32	2160141	STRONG SIMILARITY TO TRITICUM AESTIVUM SERPIN	<i>Arabidopsis thaliana</i>
33	6652102	F22C12 21	<i>Arabidopsis thaliana</i>
34	3335344	SIMILAR TO SERPIN GENE HOMOLOG GB	<i>Arabidopsis thaliana</i>
35	6692103	F22C12 22	<i>Arabidopsis thaliana</i>
36	4597253	PUTATIVE SERPIN	<i>Arabidopsis thaliana</i>
37	2739364	PUTATIVE SERPIN	<i>Arabidopsis thaliana</i>
38	6911860	PIN-LIKE PROTEIN	<i>Arabidopsis thaliana</i>
39	5634730	TZE6 14	<i>Arabidopsis thaliana</i>
40	3608130	PUTATIVE SERPIN	<i>Arabidopsis thaliana</i>
41	3608129	PUTATIVE SERPIN	<i>Arabidopsis thaliana</i>
42	2130110	SERPIN ANTITHROMBIN III	<i>Triticum aestivum</i>
43	1885350	SERPIN	<i>Triticum aestivum</i>
44	5734504	SERPIN	<i>Triticum aestivum</i>
45	5734506	SERPIN	<i>Triticum aestivum</i>
46	1885346	SERPIN TRYPSIN INHIBITORY	<i>Triticum aestivum</i>
47	131091	PROTEIN Z (Z4) (MAJOR ENDOSPERM ALBUMIN)	<i>Hordeum vulgare</i>

G-5
ISEK

-1
ombina

G-2
 bitor de la
 astasa de
 eucitos

48.	100612	PROTEIN Z4	<i>Hordeum vulgare</i>
49	1310677	PROTEIN Z-TYPE SERPIN	<i>Hordeum vulgare</i>
50	1197577	SERPIN (CAPACITY OF CHYMOTRYPSIN INHIBITION)	<i>Hordeum vulgare</i>
51	19071	PROTEIN ZX	<i>Hordeum vulgare</i>
52	6630690	SIMILAR TO SERPIN - WHEAT	<i>Oryza sativa</i>
53	2435563	CONTAINS SIMILARITY TO PFAM DOMAIN PF00079 (SERPIN)	<i>Caenorhabditis elegans</i>
54	2435565	CONTAINS SIMILARITY TO PFAM DOMAIN PF00079 (SERPIN)	<i>Caenorhabditis elegans</i>
55	5163416	SERPIN	<i>Hyphantria cunea</i>
56	9691167	SERPIN 27A	<i>Drosophila melanogaster</i>
57	484490	PLACENTAL THROMBIN INHIBITOR (CAP)	<i>Homo sapiens</i>
58	818903	HOMOLOGUE OF HUMAN PROTEINASE INHIBITOR 6 (PI-6)	<i>Mus musculus</i>
59	6685760	SERINE PROTEINASE INHIBITOR B-43	<i>Bos taurus</i>
60	1709895	CYTOPLASMIC ANTIPROTEINASE 2 (CAP2)	<i>Homo sapiens</i>
61	6678101	SERINE PROTEASE INHIBITOR 6	<i>Mus musculus</i>
62	1709896	CYTOPLASMIC ANTIPROTEINASE 3 (CAP3)	<i>Homo sapiens</i>
63	417185	LEUKOCYTE ELASTASE INHIBITOR (LEI)	<i>Sus scrofa</i>
64	481621	SERPIN -PIG(BSUPERFAMILY ANTITHROMBIN III)	<i>Sus scrofa domestica</i>
65	266344	LEUKOCYTE ELASTASE INHIBITOR	<i>Homo sapiens</i>
66	462410	LEUKOCYTE ELASTASE INHIBITOR (LEI)	<i>Equus caballus</i>
67	129581	PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-2	<i>Mus musculus</i>
68	2398729	EXPRESSION OF THE MURINE PAI-2 GENE	<i>Mus musculus</i>
69	266730	PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-2	<i>Rattus norvegicus</i>
70	1352712	PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-2, PLACENTAL	<i>Homo sapiens</i>
71	266995	SQUAMOUS CELL CARCINOMA ANTIGEN 1 (SCCA-1)	<i>Homo sapiens</i>
72	887465	LEUPIN	<i>Homo sapiens</i>
73	6677659	SQUAMOUS CELL CARCINOMA ANTIGEN 2 (SCCA-2)	<i>Mus musculus</i>
74	6018510	HURPIN	<i>Homo sapiens</i>
75	6018506	HURPIN	<i>Homo sapiens</i>
76	5911368	HEADPIN	<i>Homo sapiens</i>
77.	4826902	PROTEASE INHIBITOR 10 (OVALBUMIN TYPE BOMAPIN)	<i>Homo sapiens</i>
78	3098615	HETEROCHROMATIN-ASSOCIATED PROTEIN MENT	<i>Gallus gallus</i>
79	129293	(PLAKALBUMIN) (GAL D II)	<i>Gallus gallus</i>
80	129294	OVALBUMIN	<i>coturnix japonica</i>
81	129295	GENE X PROTEIN (OVALBUMIN-RELATED)	<i>Gallus gallus</i>
82	129296	GENE Y PROTEIN (OVALBUMIN-RELATED)	<i>Gallus gallus</i>
83	4505149	MESANGIUM PREDOMINANT GENE, MEGSIN	<i>Homo sapiens</i>
84	4505702	PROTEASE INHIBITOR 5 (MASPIN)	<i>Homo sapiens</i>
85	134823	SERINE PROTEINASE INHIBITOR 1	<i>Vaccinia virus (strain Copenhagen)</i>
86	222703	SERINE PROTEINASE INHIBITOR	<i>Vaccinia virus</i>
87	476328	SERPIN-LIKE PROTEIN	<i>Rabbitpox virus</i>
88	4090828	SERPIN C14R	<i>Ectromelia virus</i>
89	59259	NUCLEOTIDE SEQUENCE OF XHO I O FRAGMENT OF ECTROMELIA VIRUS	<i>Ectromelia virus</i>
90	476330	SERPIN-LIKE PROTEIN	<i>Cowpox virus</i>
91	464797	SERINE PROTEINASE INHIBITOR 1	<i>Varicella virus</i>
92	1174422	SERINE PROTEINASE INHIBITOR 2	<i>Rabbitpox virus</i>
93	134826	SERINE PROTEINASE INHIBITOR 2	<i>Vaccinia virus (strain WR)</i>
94	3334643	SERPIN	<i>Ectromelia virus</i>
95	123123	HEMORRHAGE-INDUCING 39 KD PROTEIN	<i>Cowpox virus</i>
96	464798	SERINE PROTEINASE INHIBITOR 2	<i>Varicella virus</i>
97	4090821	SERPIN C7R	<i>Ectromelia virus</i>
98	5585900	SERINE PROTEINASE INHIBITOR SERP2	<i>Myxoma virus</i>

G-3
 valbúmina

G-7
ripsinas

G-6

miotripsinas

.1
mbinas4
or del
or del
ógeno

99	1537066	SERP2	<i>Myxoma virus</i>
100	6578674	SERPIN (SERP-2)	<i>Rabbit fibroma virus</i>
101	1174241	POTATIVE SERINE PROTEASE INHIBITOR	<i>Swinepox virus (STRAIN KASZA)</i>
102	3132621	HEPARIN COFACTOR II	<i>Xenopus laevis</i>
103	3132623	HEPARIN COFACTOR II	<i>Gallus gallus</i>
104	2143953	REGENERATION ASSOCIATED SERPIN-1	<i>Rattus norvegicus</i>
105	1008922	α -1-ANTIPROTEINASE E	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
106	3023208	α -1-ANTITRYPSIN	<i>Mus musculus</i>
107	114299	ANTITHROMBIN-III HOMOLOG	<i>Fowlpox virus (isolate HP-438[Munich])</i>
108	1083848	α -1-ANTIPROTEINASE PRECURSOR	<i>Menones unguiculatus</i>
109	164291	α -1 PROTEINASE INHIBITOR	<i>Didelphis virginiana</i>
110	4126465	α -1-ANTIPROTEINASE	<i>Xenopus laevis</i>
111	115852	CORTICOSTEROID-BINDING GLOBULIN (CBG)	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
112	6689984	ENDOPIN 1	<i>Bos taurus</i>
113	134483	SERINE PROTEASE INHIBITOR 2 1	<i>Rattus norvegicus</i>
114	546321	PROTEIN C INHIBITOR	<i>Homo sapiens</i>
115	439153	SERINE PROTEASE INHIBITOR	<i>Cyprinus carpio</i>
116	213046	α -1 ANITRYPSIN	<i>Cyprinus carpio</i>
117	283798	ESTROGEN-REGULATED PROTEIN EP45	<i>Xenopus laevis</i>
118	438481	SERPIN	<i>Bos taurus</i>
119	166062	UTERINE MILK PROTEIN	<i>Ovis aries</i>
120	127407	M-T8 PROTEIN	<i>Myxoma virus (strain Lausanne)</i>
121	476105	RECEPIN	<i>Homo sapiens</i>
122	6524006	M152R	<i>Myxoma virus</i>
123	2337922	SERP3	<i>Myxoma virus</i>
124	2144993	M9-R PROTEIN	<i>Myxoma virus (strain Lausanne)</i>
125	1888432	SERPIN-1-LIKE PROTEIN	<i>murine herpesvirus 6B</i>
126	6957493	TACHYZOITE SERINE PROTEINASE INHIBITOR	<i>Toxoplasma gondii</i>
127	1016710	MEC-9L	<i>Caenorhabditis elegans</i>
128	7271542	ORF FPV044 SERPIN GENE FAMILY PROTEIN	<i>Fowlpox virus</i>
129	7271538	ORF FPV040 SERPIN GENE FAMILY PROTEIN	<i>Fowlpox virus</i>
130	7271508	ORF FPV010 SERPIN GENE FAMILY PROTEIN	<i>Fowlpox virus</i>
131	7271702	ORF FPV204 SERPIN GENE FAMILY PROTEIN	<i>Fowlpox virus</i>
132	29535	C1 INHIBITOR	<i>Homo sapiens</i>
133	555731	SERPIN	<i>Schistosoma japonicum</i>
134	436016	SERPIN	<i>Schistosoma mansoni</i>
135	1732049	EPC-1	<i>Homo sapiens</i>
136	1144299	PIGMENT EPITHELIUM-DERIVED FACTOR	<i>Homo sapiens</i>
137	6755444	STROMAL CELL DERIVED FACTOR 3	<i>Mus musculus</i>
138	2275601	SERPIN	<i>Petromyzon marinus</i>
139	1098827	47 KDA HEAT SHOCK PROTEIN	<i>Danio rerio</i>
140	90044	PROBABLE PROTEINASE INHIBITOR - RABBIT PLASMID	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
141	93214	MAP1 PROTEIN	<i>Myxoma virus (strain Lausanne)*D147</i>
142	134829	SERINE PROTEINASE INHIBITOR 3	<i>Vaccinia virus (strain WR)</i>
143	2772670	SERPIN SPI-3	<i>Vaccinia virus</i>
144	464799	SERINE PROTEINASE INHIBITOR 3	<i>Varola virus</i>
145	2145124	H14-B	<i>Ectromelia virus</i>
146	134828	SERINE PROTEINASE INHIBITOR 3	<i>Vaccinia virus (strain Copenhagen)</i>

Tabla 4 Las secuencias en este estudio se obtuvieron de una búsqueda de Blast _p del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Altschul *et al.*, 1990) Las secuencias que se muestran en esta tabla, se encuentran organizadas como aparecen en el Cladograma 3 además de que se indica el grupo conformacional al que se encuentran relacionadas

	1as4	1qmm	2ach	3cap	4cap	1atu	1kct	1psi	1qip	1qmb	7apl	9apl	1a7c	1b3k	1c9s	1db2	9pai	1anll	1anll	1athá	1athb	1atta	1azxl	1áxl	1br8l	1br8L	1hc	1ova	1sek
1as4	0	0.79	0.7	0.52	0.67	1.62	1.56	1.34	1.33	0.94	0.92	0.89	1.26	1.39	1.39	1.46	1.33	1.33	1.01	1.26	0.99	1.08	1.37	1.03	1.04	1.05	0.93	1.09	1.36
1qmm	0.79	0	1.01	0.7	0.94	1.62	1.68	1.45	1.37	1.17	1.12	1.13	1.41	1.44	1.65	1.82	1.53	1.37	1.11	1.34	1.12	1.24	1.37	1.19	1.23	1.2	1.22	1.2	1.33
2ach	0.7	1.01	0	0.86	0	1.6	1.61	1.37	1.29	0.96	0.97	0.95	1.23	1.42	1.37	1.43	1.27	1.26	1.04	1.24	1	1.09	1.32	1.09	0.97	1.08	0.95	1.12	1.35
3cap	0.52	0.7	0.86	0	0.6	1.67	1.59	1.52	1.46	1.05	0.94	0.96	1.29	1.4	1.45	1.45	1.41	1.37	1.02	1.3	1	1.15	1.33	1.04	1.12	1.06	1.09	1.26	1.39
4cap	0.67	0.94	0.6	0.79	0	1.6	1.65	1.35	1.37	1.04	1	1	1.31	1.46	1.46	1.45	1.35	1.25	1.03	1.2	1.01	1.1	1.28	1.12	1.04	1.12	0.94	1.09	1.31
1atu	1.62	1.62	1.6	1.67	1.6	0	1.53	1.3	1.3	1.4	1.41	1.45	1.72	1.55	2.13	1.57	1.66	1.64	1.65	1.58	1.62	1.67	1.62	1.92	1.64	1.68	1.56	1.49	1.58
1kct	1.56	1.68	1.61	1.59	1.65	1.53	0	1.31	1.33	1.51	1.51	1.53	1.72	1.66	2.22	1.62	1.72	1.6	1.68	1.55	1.62	1.62	1.6	1.65	1.69	1.64	1.69	1.55	1.6
1psi	1.34	1.45	1.37	1.52	1.35	1.3	1.31	0	0.54	0.99	1.06	1.03	1.55	1.39	2.23	1.43	1.56	1.4	1.39	1.38	1.57	1.54	1.25	2.15	1.64	1.52	1.38	1.2	1.3
1qip	1.33	1.37	1.29	1.46	1.37	1.3	1.33	0.54	0	0.98	1.04	1.04	1.59	1.39	2.21	1.38	1.52	1.42	1.54	1.32	1.56	1.57	1.24	1.51	1.53	1.51	1.38	1.13	1.27
1qmb	0.94	1.17	0.96	1.05	1.04	1.4	1.51	0.99	0.98	0	0.65	0.62	1.25	1.28	1.32	1.34	1.28	1.34	1.21	1.37	1.18	1.17	1.29	1.19	1.19	1.22	0.97	1.14	1.4
7apl	0.92	1.12	0.97	0.94	1	1.41	1.51	1.06	1.04	0.65	0	0.25	1.25	1.41	1.41	1.48	1.34	1.38	1.15	1.33	1.17	1.15	1.34	1.17	1.12	1.23	1.02	1.24	1.46
9apl	0.89	1.13	0.95	0.96	1	1.45	1.53	1.03	1.04	0.62	0.25	0	1.26	1.4	1.39	1.43	1.31	1.38	1.19	1.33	1.14	1.14	1.36	1.16	1.06	1.2	0.99	1.28	1.43
1a7c	1.26	1.41	1.23	1.29	1.31	1.72	1.72	1.55	1.59	1.25	1.25	1.26	0	1.16	0.78	1.08	0.73	1.38	1.36	1.4	1.34	1.26	1.44	1.36	1.28	1.38	1.24	1.57	1.45
1b3k	1.39	1.44	1.42	1.4	1.46	1.55	1.66	1.39	1.39	1.28	1.41	1.4	1.16	0	1.16	0.65	1	1.39	1.44	1.39	1.42	1.33	1.36	1.37	1.39	1.43	1.3	1.37	1.32
1c9s	1.39	1.65	1.37	1.45	1.46	2.13	2.22	2.23	2.21	1.32	1.41	1.39	0.78	1.16	0	1	0.61	1.44	1.43	1.46	1.42	1.37	1.49	1.35	1.51	1.43	1.32	1.55	1.54
1db2	1.46	1.82	1.43	1.45	1.45	1.57	1.62	1.43	1.38	1.34	1.48	1.43	1.08	0.65	1	0	0.84	1.42	1.48	1.37	1.47	1.36	1.31	1.38	1.35	1.4	1.27	1.38	1.31
9pai	1.33	1.53	1.27	1.41	1.35	1.66	1.72	1.56	1.52	1.28	1.34	1.31	0.73	1	0.61	0.84	0	1.42	1.4	1.41	1.37	1.3	1.51	1.34	1.36	1.35	1.21	1.39	1.5
1anll	1.33	1.37	1.26	1.37	1.25	1.64	1.6	1.4	1.42	1.34	1.38	1.38	1.38	1.39	1.44	1.42	1.42	0	1.19	0.56	1.11	1.17	1.12	1.21	1	1.2	1.22	1.34	1.29
1anll	1.01	1.11	1.04	1.02	1.03	1.65	1.68	1.39	1.54	1.21	1.15	1.19	1.36	1.44	1.43	1.48	1.4	1.19	0	1.1	0.52	0.77	1.3	0.76	0.9	0.67	1.06	1.28	1.29
1athá	1.26	1.34	1.24	1.3	1.2	1.58	1.55	1.38	1.32	1.37	1.33	1.33	1.4	1.39	1.46	1.37	1.41	0.56	1.1	0	1.05	1.05	1.05	1.18	1.52	1.11	1.15	1.27	1.18
1athb	0.99	1.12	1	1	1.01	1.62	1.62	1.57	1.56	1.18	1.17	1.14	1.34	1.42	1.42	1.47	1.37	1.11	0.52	1.05	0	0.64	1.22	0.58	0.71	0.57	0.99	1.1	1.31
1atta	1.08	1.24	1.09	1.15	1.1	1.67	1.62	1.54	1.57	1.17	1.15	1.14	1.26	1.33	1.37	1.36	1.3	1.17	0.77	1.05	0.64	0	1.22	0.8	0.8	0.77	0.98	1.34	1.34
1azxl	1.37	1.37	1.32	1.33	1.28	1.62	1.6	1.25	1.24	1.29	1.34	1.36	1.44	1.36	1.49	1.31	1.51	1.12	1.3	1.05	1.22	1.22	0	1.29	1.14	1.24	1.1	1.04	1.17
1áxl	1.03	1.19	1.09	1.04	1.12	1.92	1.65	2.15	1.51	1.19	1.17	1.16	1.36	1.37	1.35	1.38	1.34	1.21	0.76	1.18	0.58	0.8	1.29	0	0.92	0.64	1.13	1.33	2.18
1br8l	1.04	1.23	0.97	1.12	1.04	1.64	1.69	1.64	1.53	1.19	1.12	1.06	1.28	1.39	1.51	1.35	1.36	1	0.9	1.52	0.71	0.8	1.14	0.92	0	0.75	0.89	1.48	1.31
1br8L	1.05	1.2	1.08	1.06	1.12	1.68	1.64	1.52	1.51	1.22	1.23	1.2	1.38	1.43	1.43	1.4	1.35	1.2	0.67	1.11	0.57	0.77	1.24	0.64	0.75	0	1.07	1.31	1.34
1hc	0.93	1.22	0.95	1.09	0.94	1.56	1.69	1.38	1.38	0.97	1.02	0.99	1.24	1.3	1.32	1.27	1.21	1.22	1.06	1.15	0.99	0.98	1.1	1.13	0.89	1.07	0	1.02	1.32
1ova	1.09	1.2	1.12	1.26	1.09	1.49	1.55	1.2	1.13	1.14	1.24	1.28	1.57	1.37	1.55	1.38	1.39	1.34	1.28	1.27	1.1	1.34	1.04	1.33	1.48	1.31	1.02	0	1.18
1sek	1.36	1.33	1.35	1.39	1.31	1.58	1.6	1.3	1.27	1.4	1.46	1.43	1.45	1.32	1.54	1.31	1.5	1.29	1.29	1.18	1.31	1.34	1.17	2.18	1.31	1.34	1.32	1.18	0
Sum	35.71	39.56	35.53	36.68	35.23	49.65	50.38	43.36	42.29	35.9	35.78	35.56	41.2	41.91	45.51	42.11	41.09	39.99	36.29	39.1	34.98	36.01	40.24	38.42	36.76	36.53	35.45	39.37	42.94
X	1.024	1.236	1.110	1.146	1.101	1.552	1.574	1.355	1.322	1.122	1.118	1.111	1.288	1.310	1.422	1.316	1.284	1.250	1.134	1.222	1.093	1.125	1.258	1.201	1.149	1.142	1.108	1.230	1.342
S	0.322	0.329	0.307	0.336	0.37	0.322	0.325	0.386	0.358	0.29	0.331	0.332	0.32	0.294	0.436	0.322	0.333	0.296	0.343	0.296	0.367	0.337	0.269	0.424	0.344	0.349	0.278	0.27	0.303

Tabla 5. Root Mean Square (RMS), calculada con Swisspdb Viewer. Se muestran las distancias en Å existentes entre los 29 alineamientos de los cristales. En las tres últimas filas se muestran los datos estadísticos (media y desviación estándar), en gris los datos del mejor alineamiento estructural de la 1as4 (α 1- Antiquimotupsina).

TABLA 7

CONSERVACIÓN DE RESIDUOS TANTO DEL ALINEAMIENTO REALIZADO CON SWISS PDB VIEWER COMO CON EL PROGRAMA CLUSTALW.

(a) Alineamiento Estructural Llevado a cabo con el programa Swiss Pdb Viewer 3.7 (Guex y Peitsch., 1999)			(b) Alineamiento de secuencias Llevado a cabo con el programa Clustalw 1.7 (Thompson <i>et al.</i> , 1994)	
Número de Residuo Consenso	Aminoácido	Estructura secundaria en la que se ubica	Número de residuo consenso	Aminoácido
1	F	Hélice- α	1	F
18	N	Asa	18	N
173	I	Hélice- α	126	F
174	N	Hélice- α	137	I
181	T	Asa	138	N
206	V	Hebra- β	145	T
207	N	Hebra- β	149	I
211	F	Hebra- β	167	V
215	W	Hebra- β	168	N
219	F	Asa	172	F
229	F	Hebra- β	176	W
242	M	Hebra- β	180	F
287	P	Hebra- β	190	F
339	P	Hebra- β	203	M
353	L	Hélice- α	242	P
362	F	Asa	289	P
402	E	Hebra- β	298	L
			307	F
			340	E
			342	G

17 aminoácidos (*) 45 similares (.) Identidad total del 13.57%.	20 aminoácidos (*) 87 similares (.) Identidad total del 26.7%.
--	---

Tabla 7. Se muestran los residuos consenso de cada uno de los alineamientos (el alineamiento estructural y el de secuencias), en el alineamiento estructural se indica en que tipo de estructura secundaria se encuentra dicho residuo. La numeración se tomó en cuenta desde el primer aminoácido consenso; en los dos alineamientos, corresponde al aminoácido fenilalanina.

Alineamiento Estructural.

El mejor alineamiento estructural se obtuvo a partir de la proteína 1as4 (α 1-Antiquimiotripsina de *Homo sapiens*) ya que presentó el menor valor de RMS promedio, así como el mayor número de aminoácidos idénticos (*) y similares (.), y por lo tanto con una mayor identidad total (Ver Alineamiento 1 y Tabla 7). Este alineamiento de 457 residuos presentó un puntaje de similitud de 17 aminoácidos idénticos (*) y 45 similares (.), lo cual da una identidad total del 13.57% y un RMS final de 1.094 Å, con una desviación estándar de 0.328 Å el cual incluye la estructura secundaria tanto de las hélices- α , hebras- β como las diferentes asas, una de ellas es el asa con el centro reactivo.

Alineamiento de Secuencias.

El alineamiento 2, se llevó a cabo mediante el programa Clustalw 1.7, esta vez sin tomar en cuenta la estructura tridimensional, a partir de las 29 secuencias provenientes de las coordenadas cristalográficas, es decir, utilizando solamente la información de la estructura primaria de las proteínas. Este alineamiento, en los 400 residuos presenta un puntaje de 20 aminoácidos idénticos (*) y 87 similares (.), con una identidad total del 26.7%. Asimismo, no respeta las regiones estructurales (como hélices- α y hebras- β y asas) tan bien como el obtenido con el programa Swisspdb viewer 3.7.

Alineamientos

Aunque el mejor alineamiento estructural resultó ser el de la α 1-antiquimiotripsina (1AS4; Tabla 5), los 28 alineamientos restantes fueron similares y todos se encontraron en el rango promedio de 1 a 1.574 Å, esto nos sugiere que la estructura tridimensional se conserva muy bien, ya que los carbonos α , que forman parte del esqueleto proteico principal, no se encuentran a gran distancia entre ellos, existiendo homogeneidad en el grupo.

Al analizar el alineamiento generado con la α 1-antiquimiotripsina (1AS4; alineamiento 1), pudimos observar que se conservaron las zonas de estructura secundaria, como las hélices α , las hebras β y las asas. En este alineamiento estructural 17 sitios mostraron una conservación del 100% [marcados en el alineamiento por un asterisco, (*)]. Asimismo, pudimos observar que existen 45 sitios que están substituidos por aminoácidos equivalentes, conservando sus características fisicoquímicas, estos se encuentran señaladas por un punto (.). Tomando en cuenta ambos sitios, se calculó el porcentaje de identidad total del alineamiento, siendo de un 13.57%.

Cuando se hizo un alineamiento estructural en cada uno de los grupos, el porcentaje de identidad total se elevó considerablemente (Tabla 6); desde un 11.42% para el grupo de las antitrombinas, hasta un 89.32% en el grupo de las α 1-antiquimiotripsinas. Esto nos indicó la amplia plasticidad del grupo para soportar cambios en su estructura primaria (substituciones de aminoácidos) sin perder la conformación tridimensional y posiblemente su mecanismo de inhibición.

Otra de las ventajas que presentó el alineamiento estructural, es que pudimos localizar los sitios de firma y ubicarlos en las diferentes estructuras secundarias (Tabla 7). El primer aminoácido que se conservó en las 29 estructuras, fue la fenilalanina (F), con base a que este se conservó en ambos alineamientos, se definió como el aminoácido consenso, a partir del cual se numeraron el resto de los aminoácidos en ambos alineamientos. Otro aminoácido que se conservó en las 29 estructuras, fue el ácido glutámico (E), que en el alineamiento estructural se encuentra en la posición 402, cerca del extremo carboxilo terminal y antes del sitio de corte P1-P1'. La conservación de este aminoácido es importante ya que se encuentra en la región mecánica denominada región de la bisagra. El ácido glutámico 402 es uno de los aminoácidos que permite se lleve a cabo la translocación del asa con el centro reactivo, posterior al corte por su proteasa serínica afín.

Otro punto importante del alineamiento estructural es la zona del asa con el centro reactivo (P1-P18). es que es una región altamente hidrofóbica, debido a la presencia de aminoácidos con grupos R no polares (A, V, L, I, M, P). Dentro de esta misma región estructural, en el extremo carboxilo terminal, se encuentra el sitio susceptible a corte (P1-P1'), en donde el sitio P1 está implicado con la especificidad por su proteasa, a excepción de la ovoalbúmina. Cabe mencionar que la ovoalbúmina es una proteasa serínica que no presenta actividad de inhibición y con base en nuestro alineamiento la pérdida de actividad inhibitoria se podría explicar a nivel estructural, ya que en la zona en donde se da el corte y el reconocimiento por la proteasa serínica, esta proteína

presenta una estructura de hélice α , lo cual por un lado impide el reconocimiento del sitio haciendo que sea menos susceptible de corte ya que no se encuentra expuesto como en las asas de las demás serpinas y por otro lado al estar involucrada esta región en la formación de la hélice α es más estable perdiendo la metaestabilidad característica en la superfamilia.

El análisis comparativo del alineamiento estructural, se llevó a cabo contra un segundo alineamiento con las 29 secuencias derivadas de las coordenadas cristalográficas de serpinas, sin tomar en cuenta su estructura secundaria (Alineamiento 2). Las diferencias se pudieron apreciar a simple vista, siendo este último alineamiento el óptimo en el sentido estricto, ya que fue más compacto, con menos grados de libertad (menos gaps a partir del primer aminoácido consenso contra 457 aminoácidos del alineamiento estructural), presentó 20 aminoácidos idénticos (*), y 87 aminoácidos similares (.) con una identidad total del 26.7% contra una identidad total del 13.57% del alineamiento estructural. No obstante, pese a que este fue un mejor alineamiento, no se pudieron analizar las secuencias desde un punto de vista estructural, además de que no se respetaron las zonas con estructura secundaria tan bien como en el alineamiento estructural.

Alineamiento Estructural 1

Llevado a cabo con el programa Swiss pdb Viewer versión 3.7
(Guex y Peitsch., 1999).

Hélices- α
Hojas- β



Sito de corte.



Sito de corte.

```
1 5 50
Las4 -----GLASAVNDRAPSLYKQLVWKAP-DK-NVIFSPSLSISTALAPLSLGAHNNTLTTEILKGLK
2ach -----LGLASAVNDRAPSLYKQLVWKAP-DK-NVIFSPSLSISTALAPLSLGAHNNTLTTEILKGLK
3caa -----ASAVNDRAPSLYKQLVWKAP-DK-NVIFSPSLSISTALAPLSLGAHNNTLTTEILKGLK
4caa -----SANDRAPSLYKQLVWKAP-DK-NVIFSPSLSISTALAPLSLGAHNNTLTTEILKGLK
1QMN -----LASAVNDRAPSLYKQLVWKAP-DK-NVIFSPSLSISTALAPLSLGAHNNTLTTEILKGLK
latu -----PTFNKITPNLADEAPSLYRQLAHQSN-ST-NILFSPVSIAAAFAMLSLCAKGDTHDEILEGLN
1kct -----HPTFNKITPNLADEAPSLYRQLAHQSN-ST-NILFSPVSIATAAFAMLSLGTAKADTHDEILEGLN
1ps1 -----FNKITPNLADEAPSLYRQLAHQSN-ST-NILFSPVSIATAAFAMLSLGTAKADTHDEILEGLN
1QLP -----FNKITPNLADEAPSLYRQLAHQSN-ST-NILFSPVSIATAAFAMLSLGTAKADTHDEILEGLN
1QMB -----KITPNLADEAPSLYRQLAHQSN-ST-NILFSPVSIATAAFAMLSLGTAKADTHDEILEGLN
7ap1 -----HPTFNKITPNLADEAPSLYRQLAHQSN-ST-NILFSPVSIATAAFAMLSLGTAKADTHDEILEGLN
9ap1 -----HPTFNKITPNLADEAPSLYRQLAHQSN-ST-NILFSPVSIATAAFAMLSLGTAKADTHDEILEGLN
1a7c -----HPSPSYVAHLASDEGVRVFOQVAQASK-DR-NVVFSPYGVASVLAAMLQLTGGETQQQIQAAAG
1B3K -----YVAHLASDEGVRVFOQVAQASK-DR-NVVFSPYGVASVLAAMLQLTGGETQQQIQAAAG
1C5G -----VHPSPSYVAHLASDEGVRVFOQVAQASK-DR-NVVFSPYGVASVLAAMLQLTGGETQQQIQAAAG
1DB2 -----HPSPSYVAHLASDEGVRVFOQVAQASK-DR-NVVFSPYGVASVLAAMLQLTGGETQQQIQAAAG
9pa1 -----VHPSPSYVAHLASDEGVRVFOQVAQASK-DR-NVVFSPYGVASVLAAMLQLTGGETQQQIQAAAG
lant1 -----RDIPMNPNCIYRSPEKK AINRRVWELSKANSREAFATFYQHLDLADSKNDND-NIFLSPSLSISTAFAMTKLGCANDTLQOLMEVFK
lant1 -----DIPMNPNCIYRS AINRRVWELSKANSREAFATFYQHLDLADSKNDND-NIFLSPSLSISTAFAMTKLGCANDTLQOLMEVFK
latha -----ICTCIYRRVWELSKANSREAFATFYQHLDLADSKNDND-NIFLSPSLSISTAFAMTKLGCANDTLQOLMEVFK
lathb -----PMCIAYWELSKANSREAFATFYQHLDLADSKNDND-NIFLSPSLSISTAFAMTKLGCANDTLQOLMEVFK
latta -----VEDVCTAKPRDIPMNPNCIYRATEGQSEQKIPGATNRRVWELSKANSREAFATFYQHLDLADSKN-DNDNIFLSPSLSISTAFAMTKLGCANNILTLQOLMEVFK
lax1 -----GSPVDICTAKPRDIPMNPNCIYRSKIPEATNRRVWELSKANSREAFATFYQHLDLADSKNDND-NIFLSPSLSISTAFAMTKLGCANDTLQOLMEVFK
lax1 -----VDICTAKPRDIPMNPNCIYRSKIPEATNRRVWELSKANSREAFATFYQHLDLADSKNDND-NIFLSPSLSISTAFAMTKLGCANDTLQOLMEVFK
lbr8I -----ICTAKPRDIPMNPNCIYRSPETNRRVWELSKANSREAFATFYQHLDLADSKN-DNDNIFLSPSLSISTAFAMTKLGCANDTLQOLMEVFK
lbr8L -----CTAKPRDIPMNPNCIYRS AINRRVWELSKANSREAFATFYQHLDLADSKNDND-NIFLSPSLSISTAFAMTKLGCANDTLQOLMEVFK
hle -----MEQLSTANTHFAVDLFRALNESDP-TG-NIFISPLSISALAMIFLSTRGNTAAQVSKALY
lovae -----GSIAGASMDFCFDVPRKELKVEHA-NE-NIFYQPIAIMSALAMVYLGAKDSTRTOINKVYR
isek -----GETDLQKILRESMDQPTAQMFSSEVVKAMP-CQ-NVVLARSVLPPLGQLALASVGESHEDELLRALA
```

```
100 150
Las4 FNLIT-ETS-EAEIHH-----QSFOH-LLRTLNQS-SDELQL-----SMGNAM-FVKEQLSLLDL-FTEDAKRL
2ach FNLIT-ETS-EAEIHH-----QSFOH-LLRTLNQS-SDELQL-----SMGNAM-FVKEQLSLLDL-FTEDAKRL
3caa FNLIT-ETS-EAEIHH-----QSFOH-LLRTLNQS-SDELQL-----SMGNAM-FVKEQLSLLDL-FTEDAKRL
4caa FNLIT-ETS-EAEIHH-----QSFOH-LLRTLNQS-SDELQL-----SMGNAM-FVKEQLSLLDL-FTEDAKRL
1QMN FNLIT-ETS-EAEIHH-----QSFOH-LLRTLNQS-SDELQL-----SMGNAM-FVKEQLSLLDL-FTEDAKRL
latu FNLIT-EIP-EAQIHH-----EGFOE-LLRTLNQP-DSQLQL-----TTGNGL-FLSEGLKLVDR-FLEDVKKL
1kct FNLIT-EIP-EAQIHH-----EGFOE-LLRTLNQP-DSQLQL-----TTGNGL-FLSEGLKLVDR-FLEDVKKL
1ps1 FNLIT-EIP-EAQIHH-----EGFOE-LLRTLNQP-DSQLQL-----TTGNGL-FLSEGLKLVDR-FLEDVKKL
1QLP FNLIT-EIP-EAQIHH-----EGFOE-LLRTLNQP-DSQLQL-----TTGNGL-FLSEGLKLVDR-FLEDVKKL
1QMB FNLIT-EIP-EAQIHH-----EGFOE-LLRTLNQP-DSQLQL-----TTGNGL-FLSEGLKLVDR-FLEDVKKL
7ap1 FNLIT-EIP-EAQIHH-----EGFOE-LLRTLNQP-DSQLQL-----TTGNGL-FLSEGLKLVDR-FLEDVKKL
9ap1 FNLIT-EIP-EAQIHH-----EGFOE-LLRTLNQP-DSQLQL-----TTGNGL-FLSEGLKLVDR-FLEDVKKL
1a7c FKID-D-----KGM-----PALRH-LYKELMGP-WNKDEI-----STDAI-FVQRDLKLVQG-FMPHFRL
1B3K FKID-D-----DKGMA-----PALRH-LYKELMGP-WNKDEI-----STDAI-FVQRDLKLVQG-FMPHFRL
1C5G FKID-D-----KGM-----PALRH-LYKELMGP-WNKDEI-----STDAI-FVQRDLKLVQG-FMPHFRL
1DB2 FKID-D-----DKGMA-----PALRH-LYKELMGP-WNKDEI-----STDAI-FVQRDLKLVQG-FMPHFRL
9pa1 FKID-D-----KGM-----PALRH-LYKELMGP-WNKDEI-----STDAI-FVQRDLKLVQG-FMPHFRL
lant1 FDTIS-EKT-SDQIHH-----FFFAK-LNCRLYRK-ANKSSK-----LVSANRFLGDKSLTFNET-YQDISELV
lant1 FDTIS-EKT-SDQIHH-----FFFAK-LNCRLYRKANKSSK-----VSANRL-FGDKSLTFNET-YQDISELV
latha FDTIS-EKT-SDQIHH-----FFFAK-LNCRLY-----RSSK-----LVSANRFLGDKSLTFNET-YQDISELV
lathb FDTI-----I-SDQIHH-----FFFAK-LNCRLYR-----SKL-----VSANRL-FGDKSLTFNET-YQDISELV
latta FDTIS-EKT-SDQIHH-----FFFAK-LNCRLYRKANKSSK-----VSANRL-FGDKSLTFNET-YQDISELV
lax1 FDTI-----SEKTSQIHH-----FFFAK-LNCRLYRKANKSSKLV-----SANRFLGDKSLTFNET-YQDISELV
lax1 FDTI-----SEKIS-DQ-IR-----FFFAK-LNCRLYRKANKSSK-----VSANRL-FGDKSLTFNET-YQDISELV
lbr8I FDTI-----SEKT-SDQIHH-----FFFAK-LNCRLYRKANKSSK-----VSANRL-FGDKSLTFNET-YQDISELV
lbr8L FDTI-----TSDQIHH-----FFFAK-LNCRLYRKANKSSK-----VSANRL-FGDKSLTFNET-YQDISELV
hle FD-----TVEDHH-----SRFOS-LNADINKP-GAPYIL-----KLANRL-YGEKTYNPLAD-FLASTQK
lovae FD-----KLPFGFOSIEAQCGTSVNVHSSLRDILNQITKP-NDVYSFSLASRL-----YAEERYPIILP-VLQCVKEL
isek L-----PNDNVTK-----DVFAD-LNRGVRVAVKGVLDLKMA-----SKIYVAKGLELNDL-FAAVSRDL
```


ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS 2

Llevado a cabo con el programa programa Clustalw, versión 1.7, (Thompson et al., 1994).

Sequence alignment output showing protein sequences from 1BR8_I to 1SEK_ aligned with reference sequences. The alignment is shown in a block format with gaps represented by dashes. Key reference sequences include HGSPVDICTAKPRDIPMNP... and MDMQPGDAAQKTDTS...

Continuation of sequence alignment output, showing sequences from 1BR8_I to 1SEK_ aligned with reference sequences. The alignment continues with sequences like QQLMEVFKFDITIS and DEILEGLNFNLT.

```

1BR8_I SNKTEGRITDVIIPSEAINELTVLVLVNTIYFKGLWKSKEPENTRRELKELFYKADGESCSASMMYQEGK-FRYRRAVEG---TQVLELFPKGGDDITMVLII
1BR8_L SNKTEGRITDVIIPSEAINELTVLVLVNTIYFKGLWKSKEPENTRRELKELFYKADGESCSASMMYQEGK-FRYRRAVEG---TQVLELFPKGGDDITMVLII
1AZX_L SNKTEGRITDVIIPSEAINELTVLVLVNTIYFKGLWKSKEPENTRRELKELFYKADGESCSASMMYQEGK-FRYRRAVEG---TQVLELFPKGGDDITMVLII
1AZX_I SNKTEGRITDVIIPSEAINELTVLVLVNTIYFKGLWKSKEPENTRRELKELFYKADGESCSASMMYQEGK-FRYRRAVEG---TQVLELFPKGGDDITMVLII
1ATH_A SNKTEGRITDVIIPSEAINELTVLVLVNTIYFKGLWKSKEPENTRRELKELFYKADGESCSASMMYQEGK-FRYRRAVEG---TQVLELFPKGGDDITMVLII
1ANT_L SNKTEGRITDVIIPSEAINELTVLVLVNTIYFKGLWKSKEPENTRRELKELFYKADGESCSASMMYQEGK-FRYRRAVEG---TQVLELFPKGGDDITMVLII
1ANT_I SNKTEGRITDVIIPSEAINELTVLVLVNTIYFKGLWKSKEPENTRRELKELFYKADGESCSASMMYQEGK-FRYRRAVEG---TQVLELFPKGGDDITMVLII
1ATH_B SNKTEGRITDVIIPSEAINELTVLVLVNTIYFKGLWKSKEPENTRRELKELFYKADGESCSASMMYQEGK-FRYRRAVEG---TQVLELFPKGGDDITMVLII
1ATT_A SNKTEGRITDVIIPQAINEFTVLVLVNTIYFKGLWKSKEPENTRRELKELFYKADGESCSASMMYQEGK-FRYRRAVEG---TQVLELFPKGGDDITMVLII
1HLE_A KGGTEGKIPELLVKGMVDNMTKLVLAIAIYFKGNVQOKEMKEATRDAPEFLNKDKTKTVKVMYQKCK-FPYNYIEDLK---CRVLELFPYQGGELSMIILL
1QMN_A KNGTRGKITDLIKD--LDSQTMVLYNYIYFKAKWEMPPDPQDTHQSRFYLSKKKVWVPMMSLHHLTIPYFRDEELS---CTVVELKYTG-NASALFIL
2ACH_A KNGTRGKITDLIKD--LDSQTMVLYNYIYFKAKWEMPPDPQDTHQSRFYLSKKKVWVPMMSLHHLTIPYFRDEELS---CTVVELKYTG-NASALFIL
3CAA_A KNGTRGKITDLIKD--LDSQTMVLYNYIYFKAKWEMPPDPQDTHQSRFYLSKKKVWVPMMSLHHLTIPYFRDEELS---CTVVELKYTG-NASALFIL
4CAA_A KNGTRGKITDLIKD--LDSQTMVLYNYIYFKAKWEMPPDPQDTHQSRFYLSKKKVWVPMMSLHHLTIPYFRDEELS---CTVVELKYTG-NASALFIL
1PSI_EKGTQKGIIVDLVKE--LDRDTPFALVNYIYFKGKWERPPEVKDTEEDFHVQDVTTVKVPMMKRLGM-FNIQHCKKLS---SWLLMKYLG-NATAIFFL
1QLP_A EKGTQKGIIVDLVKE--LDRDTPFALVNYIYFKGKWERPPEVKDTEEDFHVQDVTTVKVPMMKRLGM-FNIQHCKKLS---SWLLMKYLG-NATAIFFL
7API_A EKGTQKGIIVDLVKE--LDRDTPFALVNYIYFKGKWERPPEVKDTEEDFHVQDVTTVKVPMMKRLGM-FNIQHCKKLS---SWLLMKYLG-NATAIFFL
9API_A EKGTQKGIIVDLVKE--LDRDTPFALVNYIYFKGKWERPPEVKDTEEDFHVQDVTTVKVPMMKRLGM-FNIQHCKKLS---SWLLMKYLG-NATAIFFL
1KCT_KKGTQKGIIVDLVKE--LDRDTPFALVNYIYFKGKWERPPEVKDTEEDFHVQDVTTVKVPMMKRLGM-FNIQHCKKLS---SWLLMKYLG-NATAIFFL
1QMB_A EKGTQKGIIVDLVKE--LDRDTPFALVNYIYFKGKWERPPEVKDTEEDFHVQDVTTVKVPMMKRLGM-FNIQHCKKLS---SWLLMKYLG-NATAIFFL
1ATU_EKGTQKGIIVDLVKE--LDRDTPFALVNYIYFKGKWERPPEVKDTEEDFHVQDVTTVKVPMMKRLGM-FNIQHCKKLS---SWLLMKYLG-NATAIFFL
1CSG_A KHTKGMISNLLGKGAVDQLTRVLVNYALYFNQKQKTPFPDSSTHRRLFKHSDGTSVSVPMMAQTNK-FNYTEFTTPDGHYDILELPHYGDTLSMFIAA
9PAI_A KHTKGMISNLLGKGAVDQLTRVLVNYALYFNQKQKTPFPDSSTHRRLFKHSDGTSVSVPMMAQTNK-FNYTEFTTPDGHYDILELPHYGDTLSMFIAA
1A7C_A KHTKGMISNLLGKGAVDQLTRVLVNYALYFNQKQKTPFPDSSTHRRLFKHSDGTSVSVPMMAQTNK-FNYTEFTTPDGHYDILELPHYGDTLSMFIAA
1B3K_A KHTKGMISNLLGKGAVDQLTRVLVNYALYFNQKQKTPFPDSSTHRRLFKHSDGTSVSVPMMAQTNK-FNYTEFTTPDGHYDILELPHYGDTLSMFIAA
1DB2_A KHTKGMISNLLGKGAVDQLTRVLVNYALYFNQKQKTPFPDSSTHRRLFKHSDGTSVSVPMMAQTNK-FNYTEFTTPDGHYDILELPHYGDTLSMFIAA
1OVA_A ESQTNGIIRNVLPQSSVDSQAMVLAIAIYFKGLWKAFAKDEEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGL-FRVASMASEK---MKILELFPFASGTMMSMLVLL
1SEK_EDQTTNRIKNLVDPPALDETRSVLAIAIYFKGSKWDKENKERTMDRDFHVSCKDKTIKVPTMIKKKD-VRYADVPELD---AKMIEMSYEGDQASMIILL

```

```

1BR8_I PKPEKS---LAKVEKELT-PEVLQEWL--DELEEMMLVVHMPFRFRIEDGFSLKEQLQDMGLVDLFSPEKSKLPGIVAEGRDDLYVSDAFHKAFLEVNBE
1BR8_L PKPEKS---LAKVEKELT-PEVLQEWL--DELEEMMLVVHMPFRFRIEDGFSLKEQLQDMGLVDLFSPEKSKLPGIVAEGRDDLYVSDAFHKAFLEVNBE
1AZX_L PKPEKS---LAKVEKELT-PEVLQEWL--DELEEMMLVVHMPFRFRIEDGFSLKEQLQDMGLVDLFSPEKSKLPGIVAEGRDDLYVSDAFHKAFLEVNBE
1AZX_I PKPEKS---LAKVEKELT-PEVLQEWL--DELEEMMLVVHMPFRFRIEDGFSLKEQLQDMGLVDLFSPEKSKLPGIVAEGRDDLYVSDAFHKAFLEVNBE
1ATH_A PKPEKS---LAKVEKELT-PEVLQEWL--DELEEMMLVVHMPFRFRIEDGFSLKEQLQDMGLVDLFSPEKSKLPGIVAEGRDDLYVSDAFHKAFLEVNBE
1ANT_L PKPEKS---LAKVEKELT-PEVLQEWL--DELEEMMLVVHMPFRFRIEDGFSLKEQLQDMGLVDLFSPEKSKLPGIVAEGRDDLYVSDAFHKAFLEVNBE
1ANT_I PKPEKS---LAKVEKELT-PEVLQEWL--DELEEMMLVVHMPFRFRIEDGFSLKEQLQDMGLVDLFSPEKSKLPGIVAEGRDDLYVSDAFHKAFLEVNBE
1ATH_B PKPEKS---LAKVEKELT-PEVLQEWL--DELEEMMLVVHMPFRFRIEDGFSLKEQLQDMGLVDLFSPEKSKLPGIVAEGRDDLYVSDAFHKAFLEVNBE
1ATT_A PKLEXT---LAKVEQELT-PDMLQEWL--DELTETLLVVHMPFRFRIEDSFVKEQLQDMGLVEDLFSPEKSKLPGIVAEGRSGLYVSDAFHKAFLEVNBE
1HLE_A PDCIEDESTGLEKIEKQLT-LDKLRWTKPENLYLAEBVNVHLPRFKLEESYDLTSHLARLGVQDLFNRGKADLSGMSG--ARDLPVSKI IHKSFVDLNBGE
1QMN_A PDQDK---MEEVEAML-L-PETLKRWRD-SLEFREIGELYLPKFSISRDNLDNILLQLGIEEAF-T-SKADLSGITG--ARNLAVSQVHVKAULDVFBE
2ACH_A PDQDK---MEEVEAML-L-PETLKRWRD-SLEFREIGELYLPKFSISRDNLDNILLQLGIEEAF-T-SKADLSGITG--ARNLAVSQVHVKAULDVFBE
3CAA_A PDQDK---MEEVEAML-L-PETLKRWRD-SLEFREIGELYLPKFSISRDNLDNILLQLGIEEAF-T-SKADLSGITG--ARNLAVSQVHVKAULDVFBE
1AS4_A PDQDK---MEEVEAML-L-PETLKRWRD-SLEFREIGELYLPKFSISRDNLDNILLQLGIEEAF-T-SKADLSGITG--ARNLAVSQVHVKAULDVFBE
4CAA_A PDQDK---MEEVEAML-L-PETLKRWRD-SLEFREIGELYLPKFSISRDNLDNILLQLGIEEAF-T-SKADLSGITG--ARNLAVSQVHVKAULDVFBE
1PSI_PDEGK---LQHLENELT-HDIITKFLN-NEDRS-ASLHLPKLSITGTYDLKSVLQGLGITKVSF-NGADLSGVTE--EAPLKLSKAVHKAVLTIIDBK
1QLP_A PDEGK---LQHLENELT-HDIITKFLN-NEDRS-ASLHLPKLSITGTYDLKSVLQGLGITKVSF-NGADLSGVTE--EAPLKLSKAVHKAVLTIIDBK
7API_A PDEGK---LQHLENELT-HDIITKFLN-NEDRS-ASLHLPKLSITGTYDLKSVLQGLGITKVSF-NGADLSGVTE--EAPLKLSKAVHKAVLTIIDBK
9API_A PDEGK---LQHLENELT-HDIITKFLN-NEDRS-ASLHLPKLSITGTYDLKSVLQGLGITKVSF-NGADLSGVTE--EAPLKLSKAVHKAVLTIIDBK
1KCT_PDEGK---LQHLENELT-HDIITKFLN-NEDRS-ASLHLPKLSITGTYDLKSVLQGLGITKVSF-NGADLSGVTE--EAPLKLSKAVHKAVLTIIDBK
1QMB_A PDEGK---LQHLENELT-HDIITKFLN-NEDRS-ASLHLPKLSITGTYDLKSVLQGLGITKVSF-NGADLSGVTE--EAPLKLSKAVHKAVLTIIDBK
1ATU_PDEGK---LQHLENELT-HDIITKFLN-NEDRS-ASLHLPKLSITGTYDLKSVLQGLGITKVSF-NGADLSGVTE--EAPLKLSKAVHKAVLTIIDBK
1CSG_A PYEKEVP---LSALTNILS-AQLISHWK--GNMTRLRLLVLPKFSLETEVDLRKPLENLGMDMFRQFQADFTSLSD--QEPLHVAQALQKVKIEVNBES
9PAI_A PYEKEVP---LSALTNILS-AQLISHWK--GNMTRLRLLVLPKFSLETEVDLRKPLENLGMDMFRQFQADFTSLSD--QEPLHVAQALQKVKIEVNBES
1A7C_A PYEKEVP---LSALTNILS-AQLISHWK--GNMTRLRLLVLPKFSLETEVDLRKPLENLGMDMFRQFQADFTSLSD--QEPLHVAQALQKVKIEVNBES
1B3K_A PYEKEVP---LSALTNILS-AQLISHWK--GNMTRLRLLVLPKFSLETEVDLRKPLENLGMDMFRQFQADFTSLSD--QEPLHVAQALQKVKIEVNBES
1DB2_A PYEKEVP---LSALTNILS-AQLISHWK--GNMTRLRLLVLPKFSLETEVDLRKPLENLGMDMFRQFQADFTSLSD--QEPLHVAQALQKVKIEVNBES
1OVA_A PDEYSG---LEQLESIN-PEKLTWNTSSNVMEERKIKVYLPKMKMEKYNLTVLMMAMGITDVFS--SANLSGISS--AESLKI SQAVHAHAHEINBA
1SEK_PNQYDG---ITALBQKIKDPKALSRAE--ERLYNTEVEIYLPKFKIETTDLKEVLSNMNIKKLFTPGAARLENLLKT--KESLYVDAAIQKAFIEVNBES

```

350 400

P15 10 5 1 1 5 10 15

```

1BRF_I CSEAAAASTAVVIAGRSLNPNRVTFKANRPFLVFIREVPLNTIIFMGRVANPCVK-----*
1SP8_L CSEAAAASTAVVIAGRSLNPNRVTFKANRPFLVFIREVPLNTIIFMGRVANPCVK-----*
1AZX_L CSEAAAASTAVVIAGRSLNPNRVTFKANRPFLVFIREVPLNTIIFMGRVANPCVK-----*
1AZX_I CSEAAAASTAVVIAGRSLNPNRVTFKANRPFLVFIREVPLNTIIFMGRVANPCVK-----*
1ATH_A CSEAAAASTAVVIAGRSLNPNRVTFKANRPFLVFIREVPLNTIIFMGRVANPCVK-----*
1ANT_L CSEAAAASTAVVIAGRSLNPNRVTFKANRPFLVFIREVPLNTIIFMGRVANPCVK-----*
1ANT_I CSEAAAASTAVVIAGRSLNPNRVTFKANRPFLVFIREVPLNTIIFMGRVANPCVK-----*
1ATH_B CSEAAAASTAVVIAGRSLNPNRVTFKANRPFLVFIREVPLNTIIFMGRVANPCVK-----*
1ATT_A CSEAAAASTVVISIAGRSLR---VTFKANRPFLVLIREVALNTIIFMGRVANPCVD-----*
1HL8_A CTEAAAATAGTILLA-----*
1QNT_A CTEASAATAVKITLLSAL---VETRTIVRFNRPFMLIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA---*
2AC8_A CTEASAATAVKITLL-----*
3CPA_A CTERGAATAVKITLL-----*
1AS4_A CTEASRATAVKITLL-----*
4CLP_A CTEASAATAVKITLL-----*
1PS1_A CTEAAGAMFLEAIPMSIP---PEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK---*
1QLP_A CTEAAGAMFLEAIPMSIP---PEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK---*
7AP1_A CTEAAGAMFLEAIPM-----*
9AP1_A CTEAAGAMFLEAIPM-----*
1KCT_A CTEAAGAMFLEAIPMSIP---PEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK---*
1QMB_A CTEAAGAMF-----*
1ATU_C CTEAAGAMFLEAIPMSIP---PEVKFNKPFVFLIIEQNTKAPLFMGRVVNPTQK---*
1CS6_A CTVASSSTAVIVSARMAP---EEIIMDRPFVVRHNPTGTVLFMGQVMPE-----*
9PA1_A CTVBSSSTAVIVSARMAP---EEIIMDRPFVVRHNPTGTVLFMGQVMPE-----*
1ATC_A CTVSSSSTAVIVSARMAP---EEIIMDRPFVVRHNPTGTVLFMGQVMPE-----*
1BBX_A CTVASSSTAVIVSARMAP---EEIIMDRPFVVRHNPTGTVLFMGQVMPE-----*
1DE2_A CTVASSSTAVIVSARMAP---EEIIMDRPFVVRHNPTGTVLFMGQVMPE-----*
1CVF_A CREVVG-----VS---EEFRADHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSP-----*
1SEF__ CAAAAANAFKITTSFH-FVPKVEINKPFFSLKYN--RNSMFSQVCVQP-----*

```

ALINEAMIENTO 2. Incluye los dominios proteicos α y β así como las asas con el centro activo (P1), indicando el sitio de corte. El alineamiento completo consta de 400 (a partir del primer aminoácido consenso, en este caso la Fenilalanina #1) residuos con un escore de similitud de 20 aminoácidos (*) idénticos y 87 similares (.), dándonos una identidad total del 26.7%. En Color negro. se muestran los aminoácidos consenso ácido glutámico (E) y glicina (G), que se encuentra en la posición P17, y P15, respectivamente, esto utilizando la nomenclatura de Schechter y Berger. (Schechter y Berger., 1967). Estos son importantes para el movimiento del asa con el centro reactivo, en color gris se muestran los otros aminoácidos consenso.

Cladogramas de los cristales.

A partir los alineamientos, se generaron los cladogramas correspondientes con la ayuda del programa Clustalw 1.7 (Thompson *et al.*, 1994), la confiabilidad de los mismos se ensayó sometiéndolos a 100 ciclos de Bootstrap con el mismo programa. (Ver **Cladograma 1** y **Cladograma 2**).

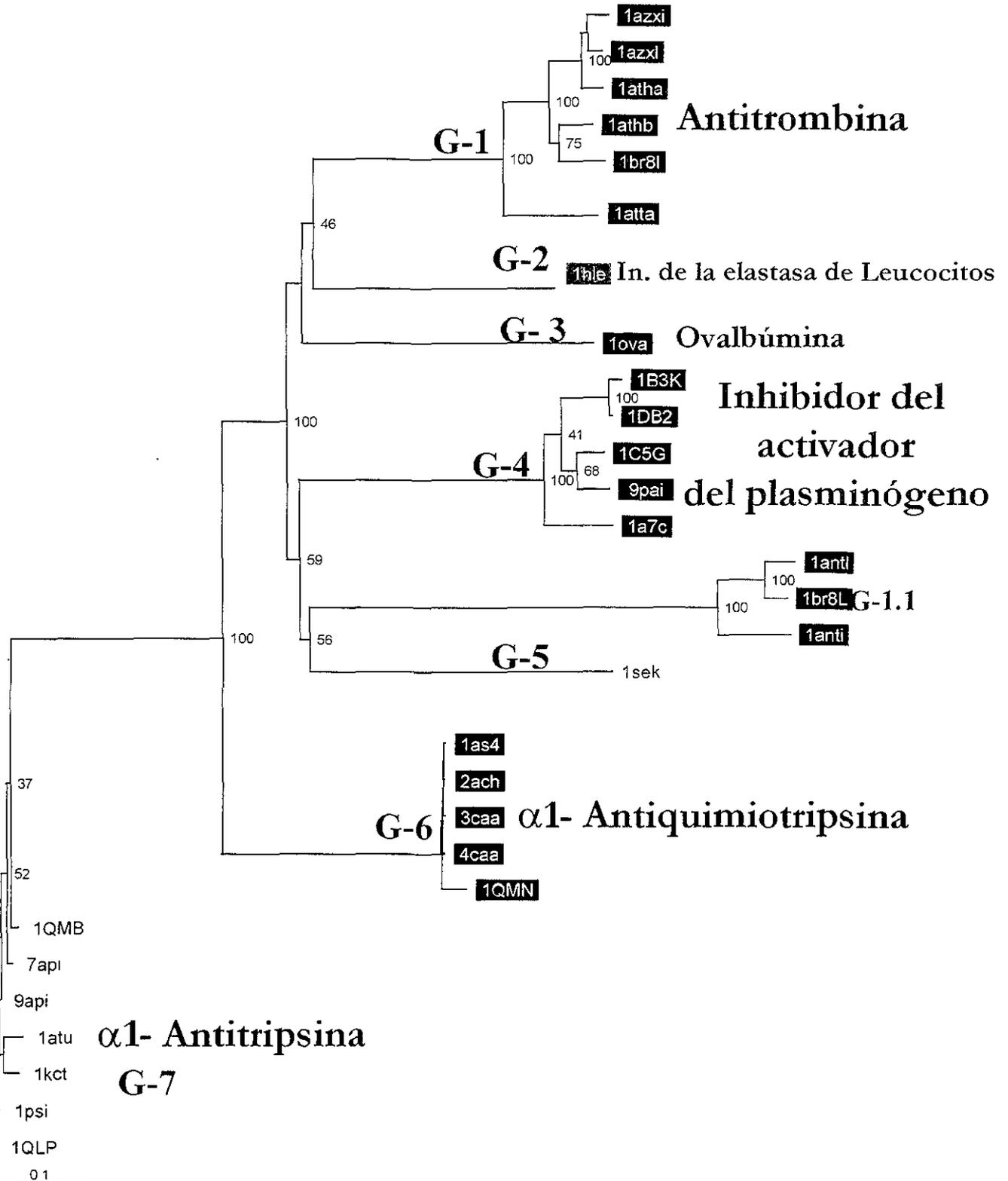
Cladograma de las secuencias.

El Cladograma 3 se obtuvo a partir del mejor alineamiento estructural que se hizo a partir de la proteína con número de acceso al PDB 1as4, el cual se utilizó como un patrón para comparar todas las secuencias contra este con la ayuda del programa Clustalw 1.7 (Thompson *et al.*, 1994). Posteriormente, se ensayó su confiabilidad sometiéndolo a 100 ciclos de Bootstrap en el mismo programa.

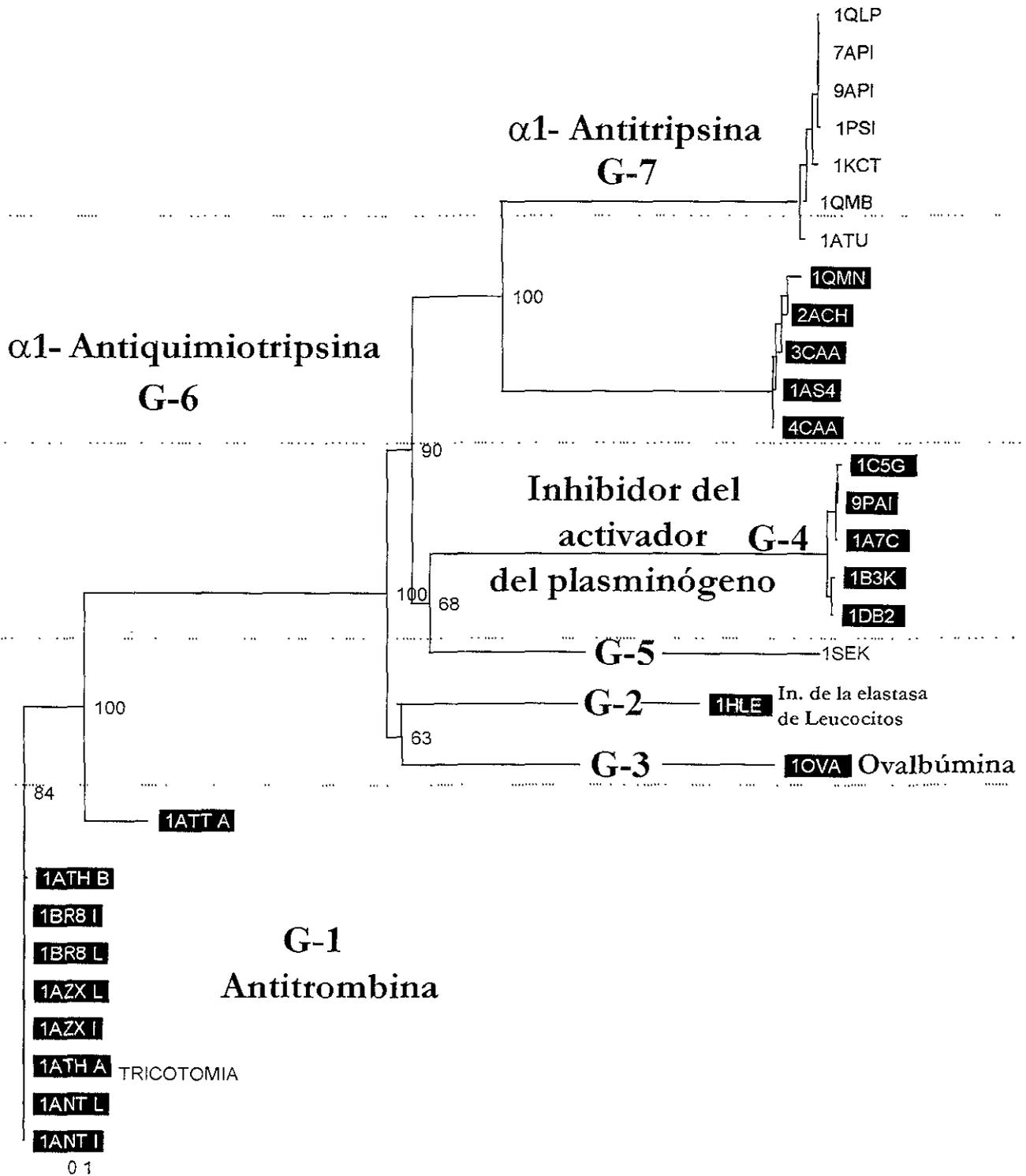
Mapas de isopotencial electrostático (MIPes).

Los MIPes se llevaron a cabo con la ayuda del programa Swisspdb Viewer 3.7 (Guex y Peitsch., 1999), con las coordenadas cristalográficas de las diferentes serpinas, calculando primero la Superficie Molecular con un radio de 1.4 Å y posteriormente el Potencial electrostático con la ecuación lineal de Poisson-Boltzmann. Estos cálculos se llevaron a cabo para determinar si existía similitud electrostática entre las proteínas.

Cladograma 1, de los cristales de serpinas (SWISS_PDB)



Cladograma 2, de las secuencias de serpinas (CLUSTAL W)



Análisis Filogenético

(cristales)

En el análisis filogenético de ambos alineamientos (Cladograma 1 y Cladograma 2), ambos árboles respetaron la formación de los siguientes 7 grupos; α 1-Antitripsinas, α 1-Antiquimiotripsinas, Inhibidores del Activador del Plasminógeno y Antitrombinas, 1HLE, 1OVA, 1SEK.

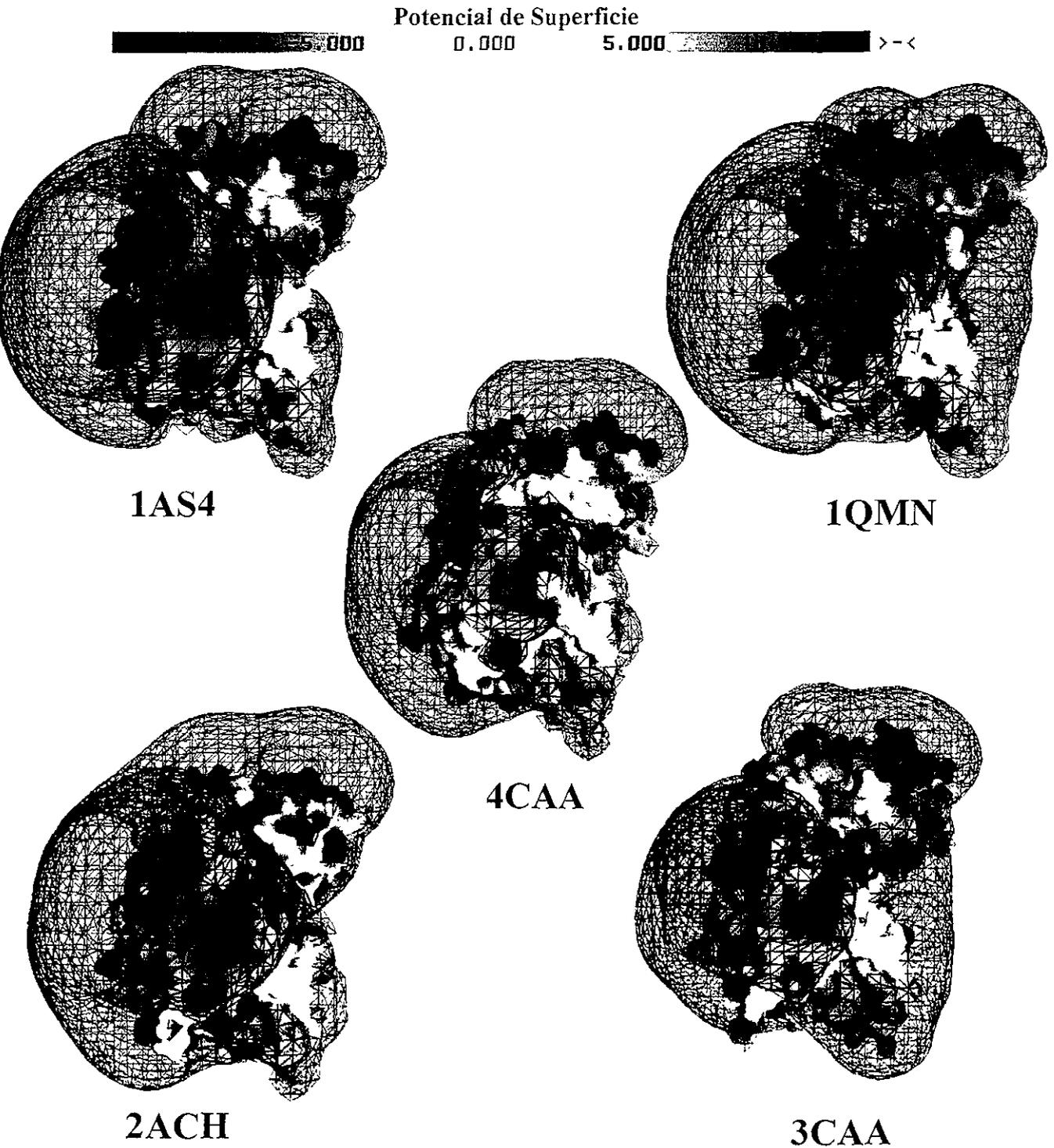
Al analizar el árbol filogenético hecho a partir de las secuencias (Cladograma 2), no se observaron diferencias significativas dentro de los mismos grupos, esto se pudo comprobar con el tamaño de las ramas de cada uno, en donde las distancias evolutivas presentes fueron muy bajas, siendo muy similares entre sí, es decir, se hicieron mas homogéneos.

Al comparar los grupos del árbol filogenético proveniente del alineamiento estructural (Cladograma 1), observamos que a pesar de que estos se conservaron, no fueron tan homogéneos entre sí ya que las distancias evolutivas fueron mayores. Los grupos con menor distancia evolutiva y por lo tanto más homogéneos fueron el de las α 1-antiquimiotripsinas y el de las α 1-Antitripsinas; mientras que los grupos que presentaron mayor distancia evolutiva fueron el PAI y la antitrombina con 49 y 9 aminoácidos idénticos respectivamente. Los resultados anteriores son congruentes con el patrón de firmas de los grupos (Tabla 6), en donde se presentaron 316 y 198 aminoácidos idénticos respectivamente.

Mapas de Isopotencial Electrostático (MIPE).

Los MIPÉs fueron una herramienta útil para poder visualizar diferencias entre los grupos, los cuales se identificaron mediante código de color, utilizando el color rojo para las regiones con potencial negativo y azul para las regiones con un potencial positivo. Esta superficie se indicó dibujando contornos equipotenciales alrededor de la proteína. El cálculo de los MIPES, se llevó a cabo tomando en cuenta toda la molécula, no obstante la visualización de los mismos se orientó en la zona con el asa del centro reactivo (RCL), ya que es la región de interacción con su proteasa afín. Al analizar los MIPES, observamos que presentaron una similitud electrostática muy elevada y con base en esto se generaron diferentes grupos; uno de estos fue el de las Antitrombinas, en el cual se aprecia una clara similitud electrostática pudiéndose diferenciar, por un lado, el subgrupo conformado por las antitrombinas cortadas (C; Figura 16) y por el otro el de las antitrombinas no cortadas (NC; Figura 15). La identidad en cargas fue considerable dentro del grupo aún cuyo en el alineamiento estructural este solo presentó 9 aminoácidos idénticos (Tabla 6). El segundo grupo fue el del Inhibidor del Activador del Plasminógeno (PAI), el cual se subdividió en el grupo de PAIs no cortados (NC; Figura 13), y en el de Inhibidores cortados (Figura 14). En el tercer grupo encontramos a las α 1-Antitripsinas, el cual presentó una mayor definición tanto en las serpinas no cortadas (Figura 11), como en las serpinas cortadas (Figura 12), aquí la identidad fue más elevada que en los grupos anteriores con 316 aminoácidos idénticos (Ver Tabla 7).

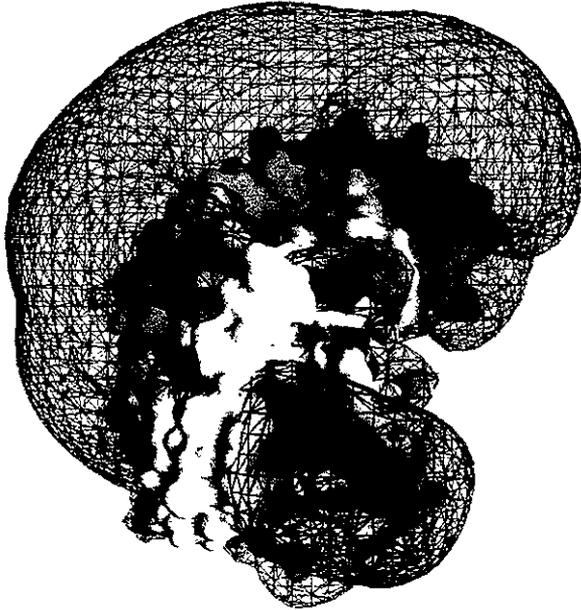
Figura 10. α 1-Antiquimiotripsinas (C)



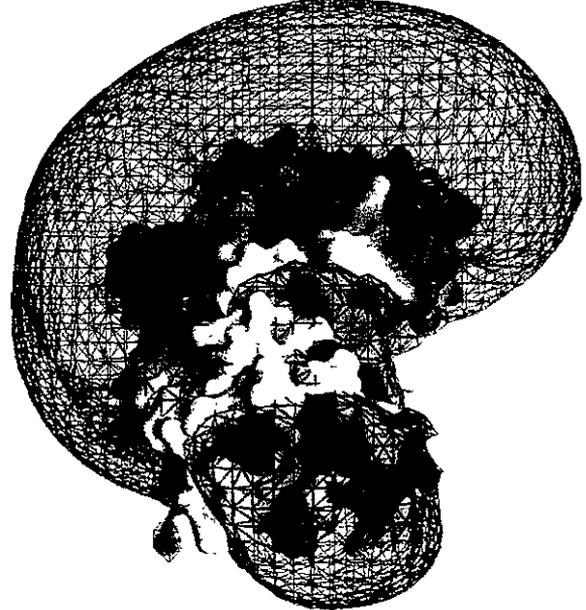
Mapas de isopotencial electrostático, la vista se orientó en la región del asa con el centro reactivo. La escala de potenciales se encuentra en los valores de +10, 0, -10 kT/e; en donde las zonas azules representan las regiones positivas y las rojas las regiones negativas. (Calculados con GRASP V 2.11)

Figura 11. α 1-Antitripsinas (NC)

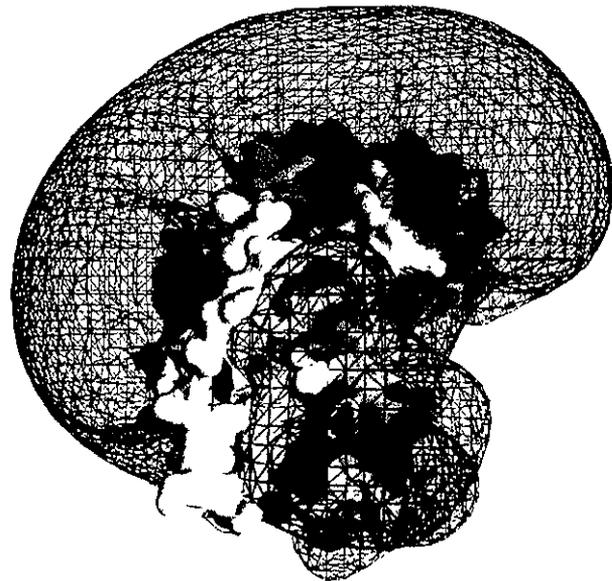
Potencial de Superficie



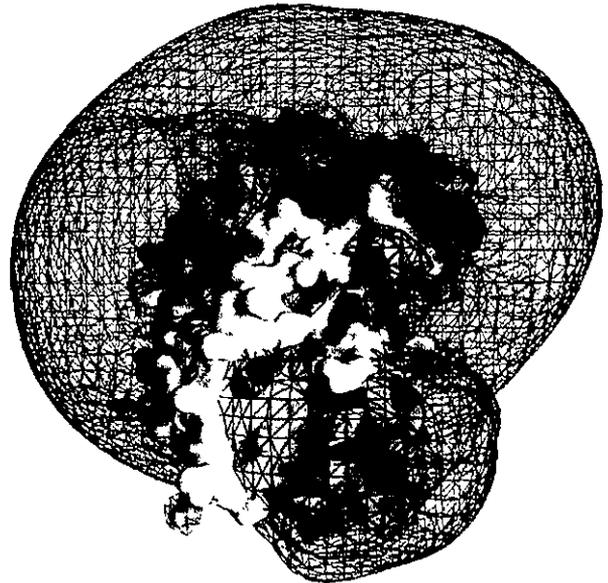
1ATU



1KCT



1PSI

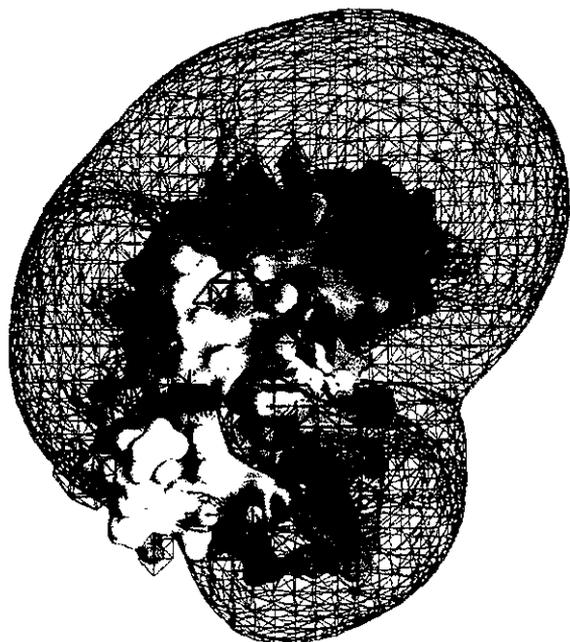
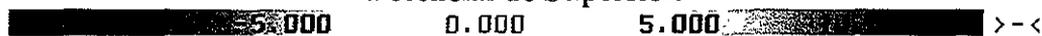


1QLP

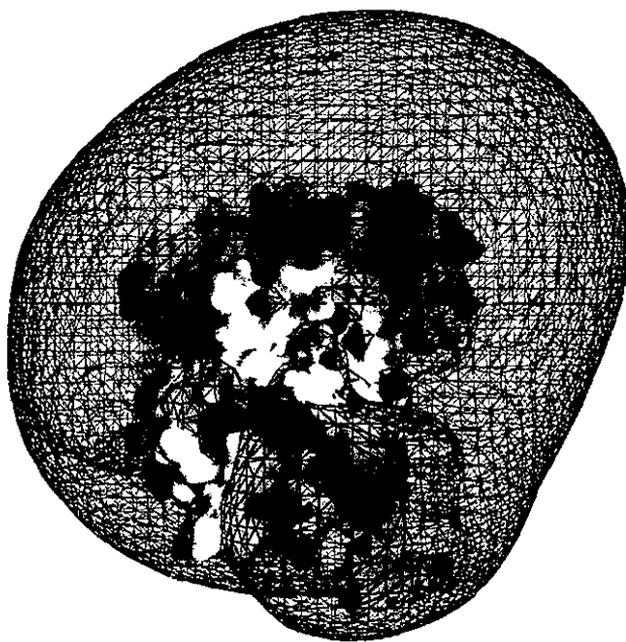
Mapas de isopotencial electrostático, la vista se orientó en la región del asa con el centro reactivo. La escala de potenciales se encuentra en los valores de +10, 0, -10 kT/e; en donde las zonas azules representan las regiones positivas y las rojas las regiones negativas. (Calculados con GRASP V 2.11)

Figura 12. α 1-Antitripsinas (C)

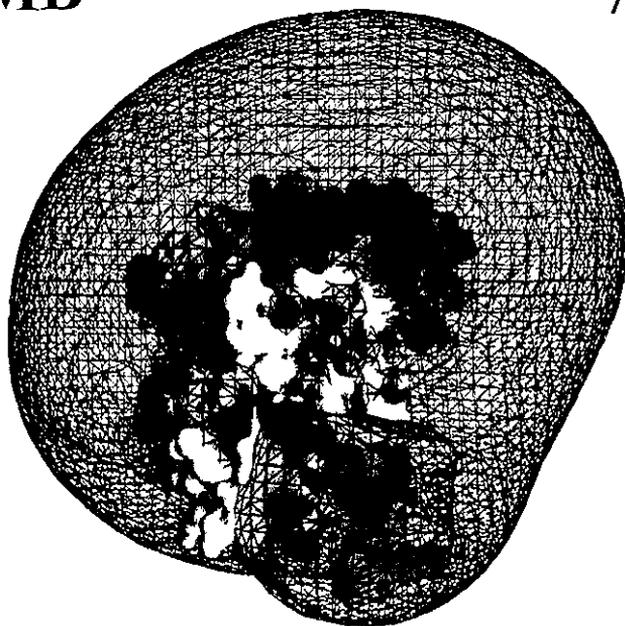
Potencial de Superficie



1QMB



7API

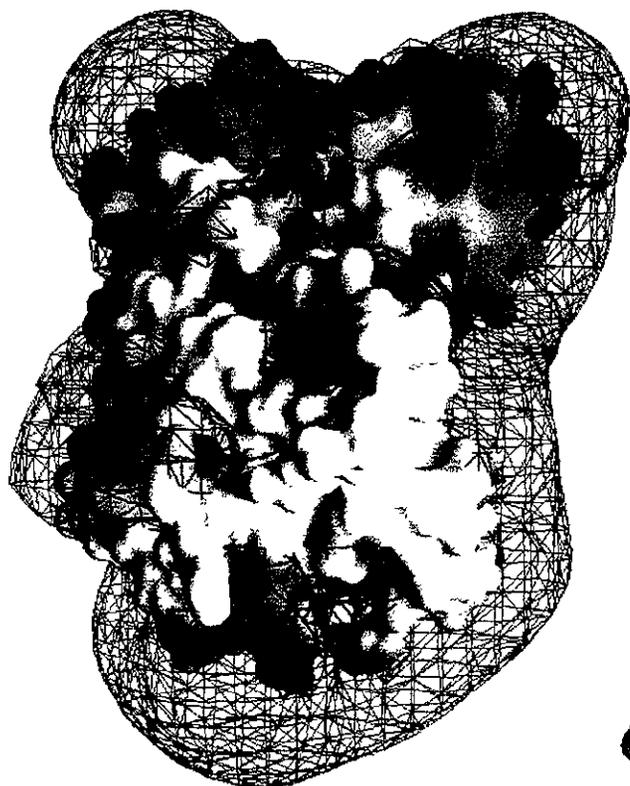


9API

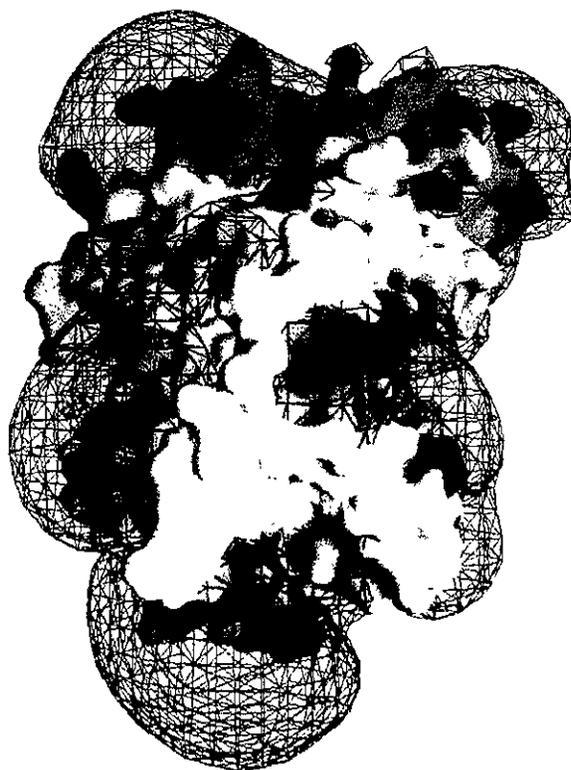
Mapas de isopotencial electrostático, la vista se orientó en la región del asa con el centro reactivo. La escala de potenciales se encuentra en los valores de +10, 0, -10 kT/e; en donde las zonas azules representan las regiones positivas y las rojas las regiones negativas. (Calculados con GRASP V 2.11)

Figura 13. Inhibidores del Activador del Plasminógeno (NC)

Potencial de Superficie



1B3K



1DB2

Mapas de isopotencial electrostático, la vista se orientó en la región del asa con el centro reactivo. La escala de potenciales se encuentra en los valores de +10, 0, -10 kT/e; en donde las zonas azules representan las regiones positivas y las rojas las regiones negativas (Calculados con GRASP V 2.11)

El cuarto grupo, lo conformaron los miembros que pertenecen a las α 1-antiquimiotripsinas, (Figura14), dentro del cual encontramos únicamente serpinas no cortadas, en las cuales el patrón de distribución en las cargas fue muy similar.

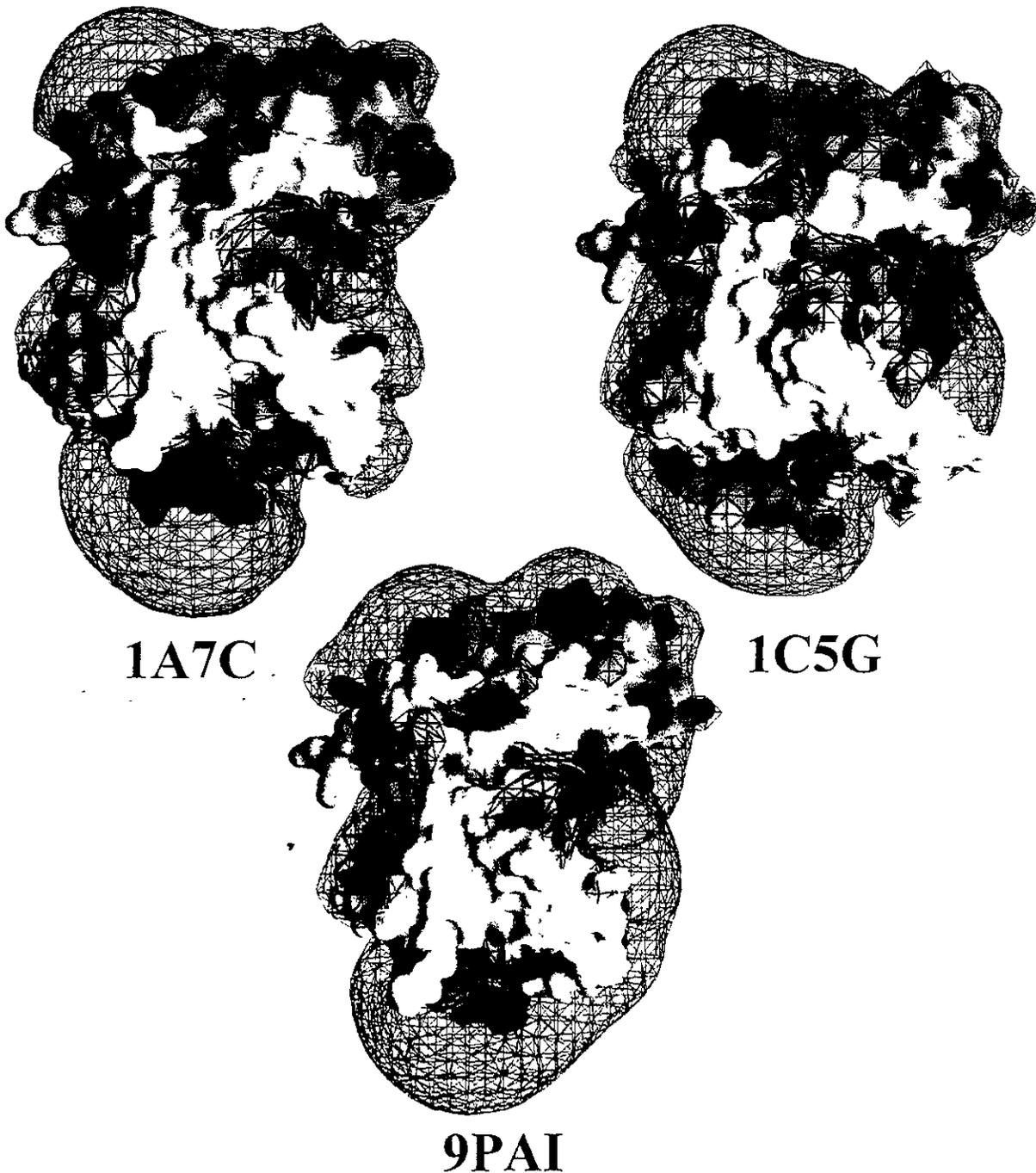
Los otros tres MIPes se definieron como grupos estructurales independientes (1HLE, 1OVA, 1SEK), ya que solo contenían un representante (Figura 17).

Los MIPes, ponderaron el análisis estructural de las serpinas, ya que de esta manera pudimos evaluar las interacciones electrostáticas de las diferentes proteínas con su entorno ya que estos patrones no son el resultado de interacciones al azar, siendo importantes en la determinación de la especificidad y la afinidad con que las serpinas reconocen y se unen a la proteasa afín respectiva.

Figura 14. Inhibidores del Activador del Plasminógeno (C)

Potencial de Superficie

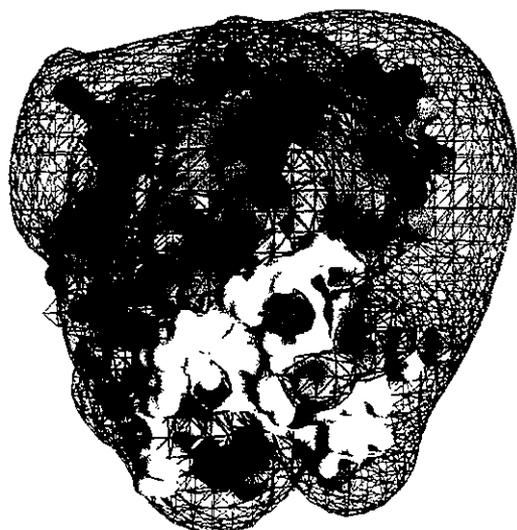
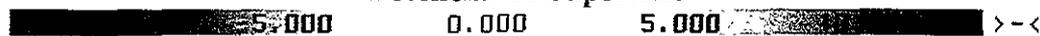
0.000 0.000 5.000 ><



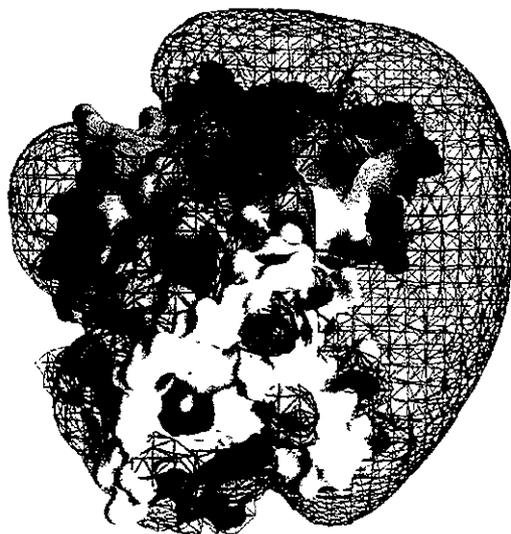
Mapas de isopotencial electrostático, la vista se orientó en la región del asa con el centro reactivo. La escala de potenciales se encuentra en los valores de +10, 0, -10 kT/e; en donde las zonas azules representan las regiones positivas y las rojas las regiones negativas. (Calculados con GRASP V 2.11)

Figura 15. Antitrombinas (NC)

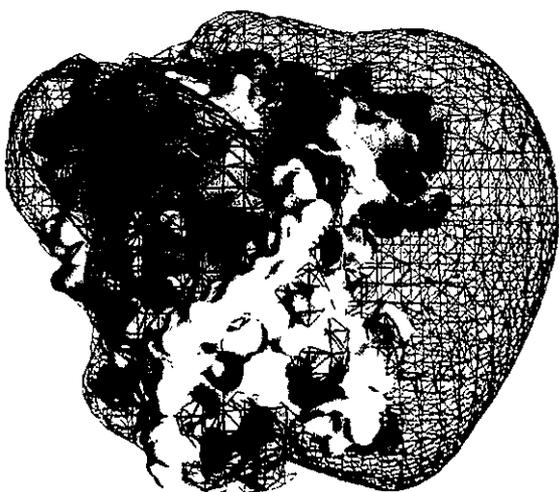
Potencial de Superficie



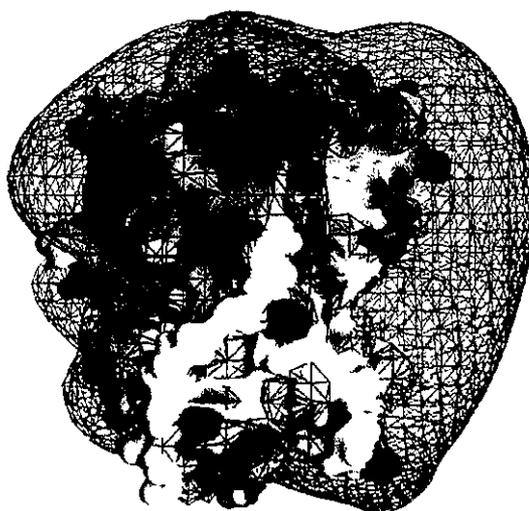
1ANT-I



1ATH-A



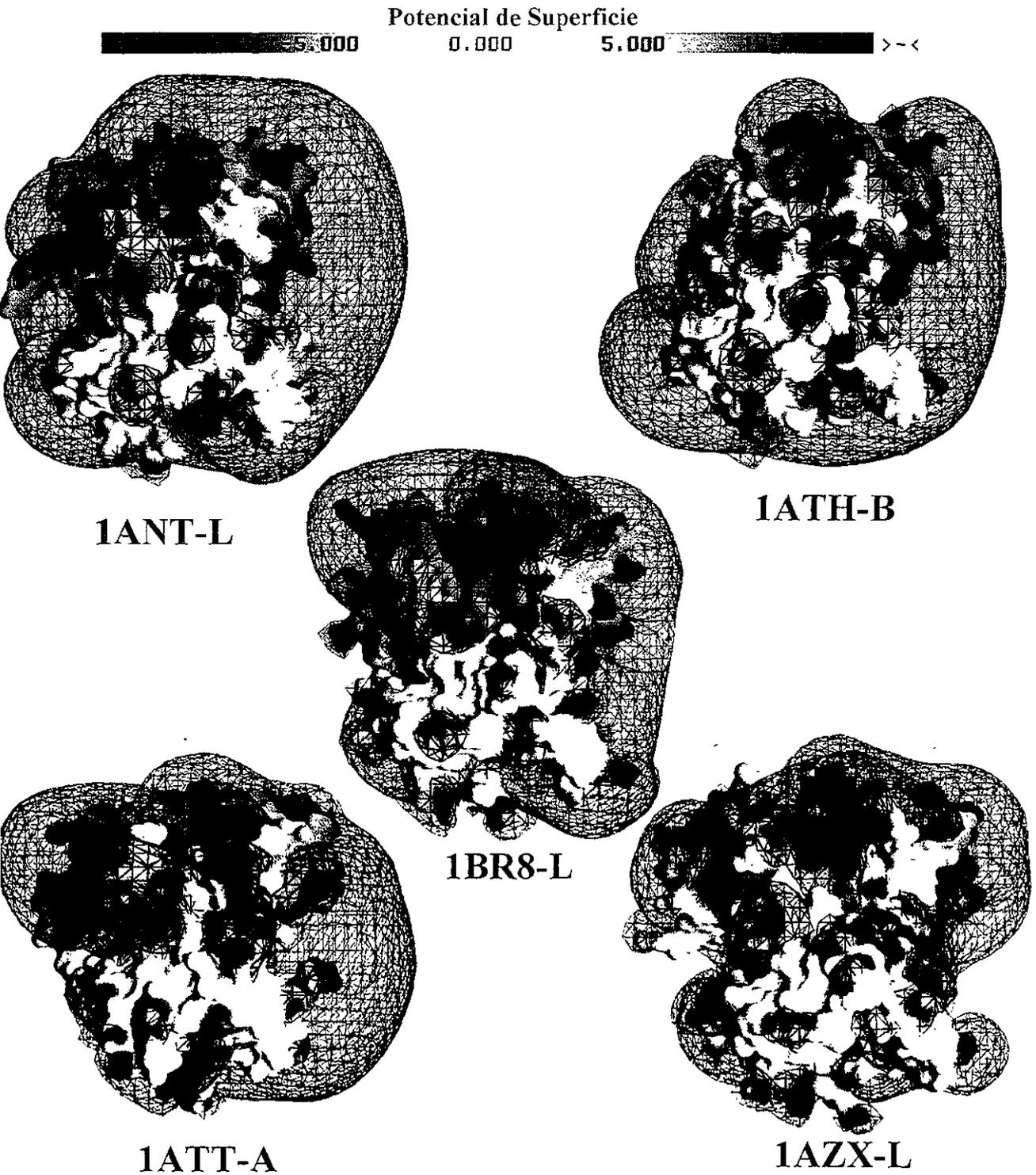
1AZX-I



1BR8-I

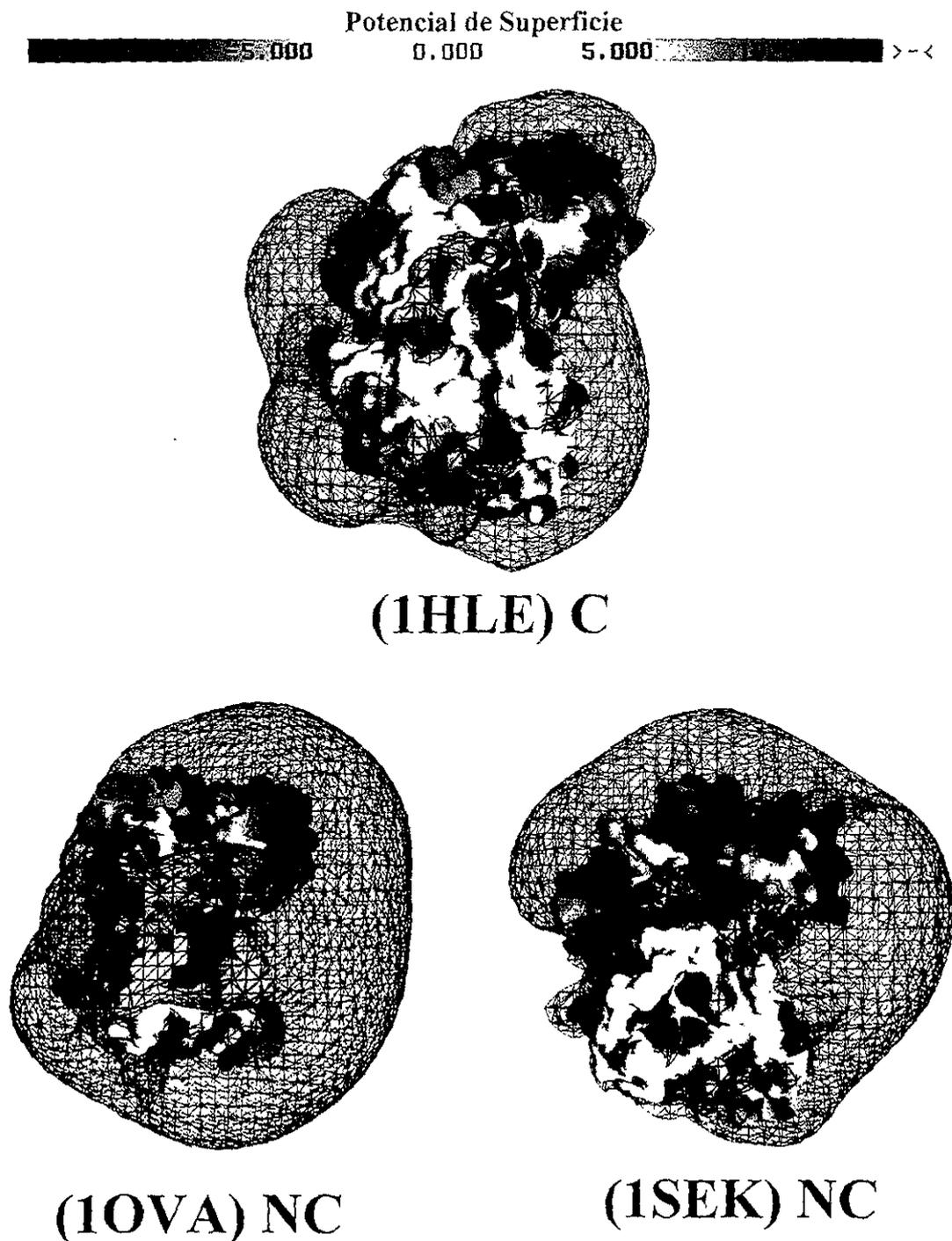
Mapas de isopotencial electrostático, la vista se orientó en la región del asa con el centro reactivo. La escala de potenciales se encuentra en los valores de +10, 0, -10 kT/e; en donde las zonas azules representan las regiones positivas y las rojas las regiones negativas. (Calculados con GRASP V 2.11)

Figura 16. Antitrombinas (C)



Mapas de isopotencial electrostático, la vista se orientó en la región del asa con el centro reactivo. La escala de potenciales se encuentra en los valores de +10, 0, -10 kT/e; en donde las zonas azules representan las regiones positivas y las rojas las regiones negativas. (Calculados con GRASP V 2.11)

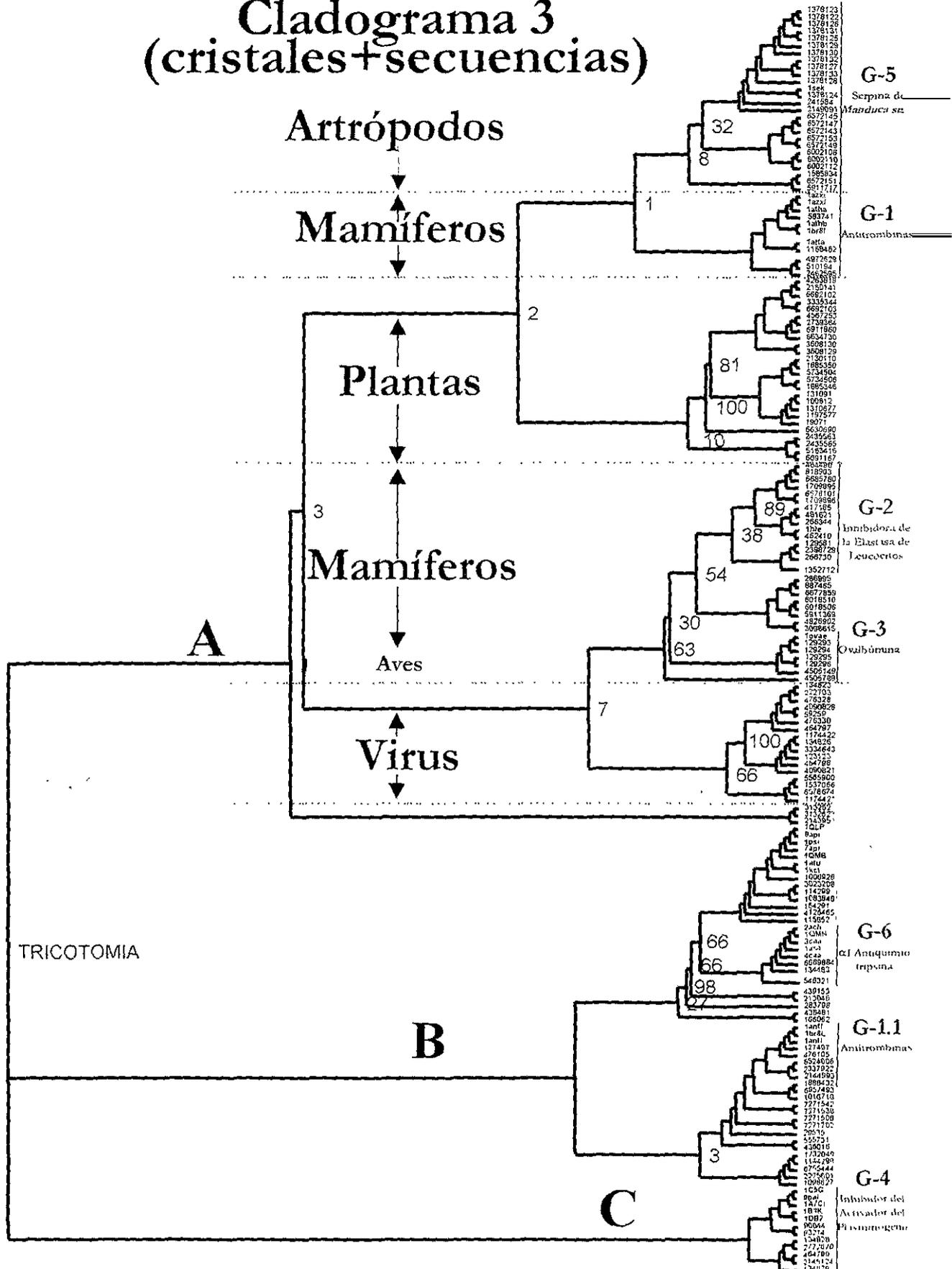
Figura 17. Serpinas Únicas



Mapas de isopotencial electrostático, la vista se orientó en la región del asa con el centro reactivo. La escala de potenciales se encuentra en los valores de +10, 0, -10 kT/e; en donde las zonas azules representan las regiones positivas y las rojas las regiones negativas. (Calculados con GRASP V 2.11)

NOTA: Todos los Mapas de Isopotencial Electrostática, poseen la misma orientación, de manera que el asa con el centro reactivo se pueda apreciar en la misma posición para todos.

Cladograma 3 (cristales+secuencias)



Muestra la distribución de las serpinas cristalizadas (azul), en las ramas del cladograma, en negro aparecen las secuencias de serpinas de las cuales se conoce su estructura primaria

Análisis Filogenético

(Cristales +Secuencias)

Utilizando el alineamiento estructural como patrón se alinearon las secuencias para obtener el cladograma con un enfoque estructural. (Cladograma 3). Una de las características sobresalientes en el cladograma fue la presencia de una tricotomía a partir de la cual se formaron las ramas principales en donde las proteínas se organizaron de acuerdo a su función.

La rama **A**, es la que presentó el mayor número de secuencias, las cuales se agruparon de manera general por especies. En esta rama encontramos 4 de los grupos estructurales definidos con anterioridad; el Grupo-5 (1SEk), el Grupo-2 (2HLE), el Grupo-3 (1OVA) y el Grupo-1, que representa la rama principal de las antitrombinas (1AZX-I, 1AZX-L, 1 BR8-I, 1 ATH-A, 1ATH-B, 1ATTA, 1 ATTB).

La rama **B** del cladograma a pesar de que contiene menos secuencias es muy representativa, ya que estas tienden a agruparse de acuerdo a su función más que por la especie (Tabla 4). En esta se encontraron los siguientes 3 grupos conformacionales; el Grupo- 7 de las α 1 Antitripsinas ; el Grupo-6 de las α 1 Antiquimiotripsinas y el segundo grupo G-1-1 de las Antitrombinas. Los grupos G-6 y G-7 fueron los más conservados tanto en estructura como en secuencia, por lo que se pudieron llevar a cabo inferencias estructurales con respecto a las secuencias mas cercanas. Por ejemplo, en el caso de las secuencias relacionadas al grupo estructural de las α 1-Antitripsinas, (las que incluyen desde la α 1-Antitripsina de conejo (con

número de acceso 1008920) hasta la globulina que une corticosteroides de conejo (CBG, con número de acceso 115852)), es probable que estas proteínas presenten una similitud estructural y electrostática considerable dentro del grupo. (Ver Tabla 4).

Otras secuencias relacionadas estructuralmente, en este caso con el grupo de las antitrombinas, son las comprendidas desde la del protozoario *Toxoplasma gondii* (con número de acceso 0957493), hasta la del nematodo *Schistosoma mansoni* (con número de acceso 436016) en la Tabla 4.

La rama C, a pesar de ser la que presentó menos secuencias, en su mayoría contuvo serpinas provenientes de virus. En esta se pudo ubicar al grupo estructural 4, de los Inhibidores del activador del Plasminógeno o PAIs.

Un punto importante es que el alineamiento estructural se pudo utilizar como patrón para poder llevar a cabo estudios filogenéticos, entender las relaciones evolutivas y evaluar las relaciones existentes, primero de los miembros con coordenadas cristalográficas conocidas y segundo como un patrón de referencia para los miembros de la familia de los cuales se desconoce su estructura y solo se cuenta con las secuencias. Esto es importante ya que existen varias razones para utilizar la información estructural en modelos evolutivos. Primero, las presiones de selección (en este caso el microambiente que rodea a la proteína) actúan sobre la función, la cual se encuentra íntimamente relacionada con la estructura. De esta manera, incorporando información estructural en los análisis evolutivos, posiblemente estaríamos incorporando la información de las características selectivas que actúan en el grupo.

Por otro lado, Chotia y Rosell proponen que (Chotia y Lask 1986; Rosell et al., 1997) es posible conservar la organización tridimensional en proteínas homólogas aún después de que la similitud en estructura primaria estadísticamente significativa (25% de similitud total) ha desaparecido.

En la superfamilia de las serpinas, se observó que el 25% de similitud propuesto por Chotia, puede ser aún menor tanto como un 13.57% (encontrado en esta familia), sin que se pierda la conformación estructural y/o la función.

De acuerdo a Miziguchi (Miziguchi y Go, 1995), desde el punto de vista estructural, es más informativa la estructura secundaria que la estructura terciaria, ya que los elementos de esta, se encuentran más conservados que la estructura atómica precisa en el espacio. En el grupo de las serpinas aquí analizadas observamos que tanto la estructura secundaria como la estructura tridimensional están muy conservadas (el valor de correlación entre los cristales de serpinas no fue mayor a 0.5 de Å), los mapas de similitud electrostática presentes en los grupos corroboraron sus características estructurales.

CONCLUSIONES

1. De acuerdo al enfoque estructural, pudimos clasificar a la superfamilia de las serpinas en 7 diferentes grupos (α 1-Antitripsinas, α 1-Antiquimiotripsinas, Inhibidores del Activador del Plasminógeno y Antitrombinas, 1HLE, 1OVA, 1SEK), cuya topología en el cladograma se explica en términos de su diversificación funcional.
2. Tanto el cladograma construido con base en la estructura primaria de las serpinas como el cladograma llevado a cabo con las coordenadas cristalográficas de las mismas, respetaron los 7 grupos funcionales, sin embargo, el alineamiento estructural nos permitió definir mejor los grupos.
3. El cladograma basado en la estructura tridimensional, nos permitió llevar a cabo inferencias deductivas estructurales dentro de los grupos cercanos.
4. Al evaluar los mapas de isopotencial electrostático llevados a cabo con las coordenadas cristalográficas de las serpinas, observamos diferentes grupos con un potencial de carga similar, los cuales fueron coherentes con aquellos definidos estructuralmente.

PERSPECTIVAS.

1. Para un mejor entendimiento de la evolución y de las relaciones estructurales y funcionales de cada grupo propuesto que encontramos, se pretende llevar a cabo la construcción de cladogramas con un enfoque estructural de cada uno de estos.

2. Un punto importante es que con la información que se tiene de cada uno de los grupos estructurales presentes en los diferentes cladogramas, se puede llevar a cabo el modelaje molecular de las secuencias relacionadas con alguno de estos grupos.

REFERENCIAS

- Abraham, C.R., Kanemaru, K., and Mucke, L. (1993). Expression of cathepsin G-like and alpha (1)-antichymotrypsin-like proteins in reactive astrocytes. *Brain Res.* **621**, 222-232.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
- Aertgeerts, K., De Bondt, H. L., De Ranter, C. J., Declerck, P. J. (1995). Mechanisms contributing to the conformational and functional flexibility of plasminogen activator inhibitor-1. *Nat Struct Biol.* **2**:891.
- Bao JJ, Sifers RN, Kidd VJ, Ledley FD, Woo SL. (1987). Molecular evolution of serpins: homologous structure of the human α 1-antichymotrypsin and α 1-antitrypsin genes. *Biochem.* **26**:7755-7759.
- Baumann, U., Huber, R., Bode, W., Grosse, D., Lesjak, M., Laurell, C. B. (1991). Crystal structure of cleaved α 1-antichymotrypsin at 2.7 Å resolution and its comparison with other serpins. *J. Mol. Biol.* **218**:595-606.
- Baumann, U., Bode, W., Huber, R., Travis, J., Potempa, J. (1992). Crystal structure of cleaved equine leucocyte elastase inhibitor determined at 1.95 Å resolution. *J Mol Biol.* **226** : 1207.
- Bock, S.C., Skriver, K., Nielsen, E., Thogersen, H.C., Wiman, B., Donaldson, V.H., Eddy, R.L., Marrinan, J., Radziejewska, E., Huber, R., et al. (1986). Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization. *Biochem.* **25**:4292-4301.
- Brandt, A., Svendsen, I. and Hejgaard, J. (1990). A plant serpin gene; structure, organization, and expression of the gene coding berley protein Z₄. *Eur. J. Biochem.* **194**: 499-505.
- Carl, B., & John, T. Introduction to protein Structure. 2^a ed. GARLAND. UK. 1999. P. 111.
- Carrell, R.W., and Owen, M. (1986). Plakalbumin, α 1-antitrypsin, antithrombin mechanism of inflammatory thrombosis. *Nature.* **317**: 730-732.
- Carrell, R.W., Stein, P.E., Fermi, G., Wardell, M. R.. (1994). Biological implications of a 3 Å structure of dimeric antithrombin. *Structure.* **2**:257-270.
- Carrell, R.W., and Travis J. (1985). α ₁-Antitrypsina and the serpins. Variation and countervariation. *Trends. Biol. Sci.* **10**: 20-24.
- Chang, W.-S.W. & Lomas, D. (1998). Latent α 1-antichymotrypsin. A molecular explanation for the inactivation of α 1-antichymotrypsin in chronic bronchitis and emphysema. *J. Biol. Chem.* **273**, 3695-3701.
- Church, C.F., Cunningham, D.D., Ginsburg, D., Hoffman, M., Stone, R.S., and Tollefsen, M.D. Chemistry and Biology of Serpins. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol 425. Plenum Press. New York and London. 1997.
- Cooperman, B.S., Stavridi, E., Nickbarg, E., rescorla, E., Chechter., N.M. and Rubin, H. (1993). Antichymotrypsin interaction with chymotrypsin—partitioning of the complex. *J. Biol. Chem.* **268**: 23616-23625.
- Creighton, T.E. (1992). Up the kinetic pathway. *Nature.* **356**, 194-195.
- Doolittle, R.F. (1983). Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antitrombin-ovalbumin family. *Science*, **222**, 417-419.

- Elliott, P. R., Lomas, D. A., Carrell, R. W., Abrahams, J. P. (1996). Inhibitory conformation of the reactive loop of α 1-antitrypsin. *Nat Struct Biol.* **3**:676 .
- Engh, R., Lobermann, H., Schneider, M., Wiegand, G., Huber, R., Laurell, C. B. (1989). The S variant of human alpha 1-antitrypsin, structure and implications for function and metabolism. *Protein Eng* **2** pp. 407 .
- Fa. M, et al. (2000). The structure of a serpin-proteinase complex revealed by intramolecular distance measurements using donor-donor energy migration and mapping of interaction sites. *Structure.* **8**: 397-405.
- Gettins, P., Patston, P.A., Olson, T.S. Serpins: Structure, Function and Biology. Chapman & Hill. Chicago Illinois, USA.1996.
- Gettins, P., Patston, P.A., and Schapira, M. (1993). The role of conformational change in serpin structure and function. *BioEssays.* **15**, 461-467.
- Goodwin, L.R., Baumann, H., Berger, G.F. (1996). Patterns of Divergence During Evolution of α 1-Proteinase Inhibitors in Mammals. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 346-358.
- Gooptu, B., Hazes, B., Chang, W.-S. W., Dafforn, T. R., Carrell, R. W., Read, R. J., Lomas, D. A. (2000). Inactive Conformation of the Serpin α 1-Antichymotrypsin Indicates Two-Stage Insertion of the Reactive Loop: Implications for Inhibitory Function and Conformational Disease. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.* **97** : 67
- Guex, N.D.A., and Peitsch, M.C.(1999).Protein modelling for all.*TiBS* **24**:364-367.
- Helig, R., Muraskowsky, R., Kloepper, C., Mandel J.L.(1982). The ovalbumin gene family: complete sequence and structure of the Y gene. *Nucl Acids Res.* **10**: 4363-4382.
- Herve, M. & Ghelis, C. Conformational stability of the covalent complex between elastase and alpha 1-proteinase inhibitor. *Arch. Biochem. Biophys.* **285**, 142-146 (1991).
- Hill, R.E., Shaw, P.H., Boyd, P.A., ETAL. (1984). Plasma protease inhibitors in mouse and man: divergence within the reactive center regions. *Nature*, **311**, 175-177.
- Hill, E.R., and Hastie, D.N. (1987). Accelerated evolution in the reactive centre regions of serine protease inhibitors. *Nature. Letters to Nature.* **326**: (5) 96-99.
- Hiroswawa, S., Nakamura. Y., Miura, O., Sumi Y., Aoki N. (1988). Organization of the Hopkins, P.C.R., Carrell, R.W. and Stone, S.R. (1993). Effects of mutations in the hinge region of serpins. *Biochemistry* **32**: 7650-7657.
- Hopkins, P.C.R., and Stone, S.R. (1995). The contribution of the conserved hinge region residues of α 1-antitrypsin to its reaction with elastase. *Biochemistry.* **34**: 15872-15879.
- Hood, D.B., Huntington, J.A. and Gettins, P.G.W. (1994) α 1-Antitrypsin inhibitor variant T3+5R. Influence of P14 residue on substrate and inhibitory pathways. *Biochemistry.* **33**: 8533-8547.
- Horton, G., Tollefsen., D.M. and Strauss., A.W. (1986). Identification of two sites of sulfation of human heparin cofactor II. *J Biol Chem.* **261**: 115827-115830.
- Hunt, L.T., and Dayhoff, M.O. (1980). A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antitrombin III and α 1-proteinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res.Commun* **95**: 864-871.
- Huber, R., and Carrell, R.W. (1989). Implications of the three dimensional structure of α -1antitrypsin for structure and function of serpins . *Biochemistry.* **28**. 8951-8966.
- Huntington, J.A., Read, J.R. & Carrell W.R. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature.* **407**: 923-926.

- Huntington, J. A., Pannu, N. S., Hazes, B., Read, R. J., Lomas, D. A., Carrell, R. W. (1999). A 2.6 Å Structure of a Serpin Polymer and Implications for Conformational Disease *J.Mol.Biol.* **293**:449.
- Irving, A.J., Pike, N.R., Lesk, M.A., and Whisstock, J.A. (2000). Phylogeny of the Serpin Superfamily: Implications of Patterns of Amino Acid Conservation for Structure and Function. *Gen. Res.* **10**: 1845-1864.
- Jensen, P.J., Wu, Q., Janowitz, P., ETAL (1995). Plasminogen activator inhibitor type 2: an intracellular keratinocyte differentiation product that is incorporated into the cornified envelope. *Exp Cell Res.* **217**, 65-71.
- Jeunemaitre, X., Soubrier, F., Kotelevtsev, Y.V., Lifton, R.P., Williams, C.S., Charru, A., Hunt, S.C., Hopkins, P.N., Williams, R.R., Lalouel, J.M., et al.(1992). Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell.* **71**: 169-180.
- Jin, L., Abrahams, J. P., Skinner, R., Petitou, M., Pike, R. N., Carrell, R. W. (1997). The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:14683.
- Kanost, M.R., Prasad, S.V., and Wells, M.A. (1989). Primary structure of a member of the serpin superfamily of proteinase inhibitors from an insect. *Manduca sexta*. *J.biol.Chem.* **264**: 965-972.
- Kaslik, G., Patthy, A., Balint, M. & Graf, L. Trypsin complexed with alpha-1 proteinase inhibitor has an increased structural flexibility. *FEBS Lett.* **370**, 179-183 (1995)
- Leicht, M., Long, G.L., Chandra, T., Kurachi, K., Kidd, V.J., Mace, M. Jr., Davie, E.W., Woo, S.L.(1982). Sequence homology and structural comparison between the chromosomal human α 1-antitrypsin and chicken ovalbumin genes. *Nature.* **297**: 655-659.
- Li, J., Wang, Z., Canagarajah, B., Jiang, H., Kanost, M., Goldsmith, E. J. (1999).The structure of active setpin 1K from *Manduca sexta*. *Structure Fold Des.* **7** : 103.
- Lomas, D.A., Elliot, P.R., Chang, W-S W., Wardell, M. R. & Carrell, R.W. (1995), Preparation and characterisation of latent α 1-antitrypsin. *J. Biol. Chem.* **270**, 5282-5288.
- Loskutoff, D.J., Linders, M., Keijer, J., Veerman, H., van Heerikhuizen, H., Pannekoek, H..(1987). Structure of the human plasminogen activator inhibitor 1 gene: nonrandom distribution of introns. *Biochem.* **26**: 3763-3768.
- Löebermann, H., Tokuoka, R., Deisenhofer, J., Huber, R.(1984).Human α 1-proteinase inhibitor. Crystal structure analysis of two crystal modifications and preliminary analysis of the implications for function. *J Mol. Biol.* **177**:731-757.
- Lukacs, C. M., Rubin, H., Christianson, D. W. (1998).Engineering an anion-binding cavity in antichymotrypsin modulates the "spring-loaded" serpin-protease interaction. *Biochemistry* **37**:3297
- Lukacs, C. M., Zhong, J. Q., Plotnick, M. I., Rubin, H., Cooperman, B. S., Christianson, D. W. (1996). Arginine substitutions in the hinge region of antichymotrypsin affect serpin β -sheet rearrangement. *Nat Struct Biol.* **3** : 888
- MacCoy, J.A., Epa, Ch.V., and Colman, M.P.(1997). Electrostatic Complementary at Protein/Protein Interfaces.*J.Mol.Biol.* **268**: 570-584.
- Mottonen, J., Strand, A., Symersky, J., Sweet, R.M., Danley, D.E., Geoghegan, K.F., Gerar, R.D. & Goldsmith, E.J. (1992). Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature*, **335**, 270-273.
- Mourey, L., Samama, J.P, Delarue, M., Choay, J., Lormeau, J.C., Petitou, M., Moras, D. (1990).Antithrombin III: structural and functional aspects. *Biochimie.* **72**(8):599-608. Review.

- Mourey, L., Samama, J.P., Delarue, M., Petitou, M., Choay, J., Moras, D. (1993). Crystal structure of cleaved bovine antitrombin-III at 3.2 Angstrom resolution. *J. Mol. Biol.* **232**:223-241.
- Nar, H., Bauer, M., Stassen, J. M., Lang, D., Gils, A., Declerck, P. J. (2000). Plasminogen Activator Inhibitor 1. Structure of the Native Serpin, Comparison to its Other Conformers and Implications for Serpin Inactivation. *J.Mol.Biol.* **297**:683.
- Nisbet, A.D., Saundry, R.H., Moir, A.J., Fothergill, L.A., Fothergill, J.E. (1981). The complete amino acid sequence of hen ovalbumin. *Eur J. Biochem.* **115**: 335-345.
- Olson, S.T. ETAL. Role of the catalytic serine in the interactions of serine proteinases with protein inhibitors of serpin family. Contribution of a covalent interaction to the binding energy of serpin-proteinase complexes. *J.Biol.Chem.* **270**: 30007-30017 (1995)
- Page, R. D. M. (1996). Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences.* **12**: 357-358.
- Pasternack, J.M., Abraham, C.R., Van Dyke, B.J., ETAL. (1989). Astrocytes in Alzheimer's disease gray matter express a1-antichymotrypsin mRNA. *Am J. Pathol.* **135**, 827-834.
- Patston, P.A., Gettins, P., Beechem J. and Schapira, M. (1991). Mechanism of serpin action – evidence that C1 inhibitor functions as a suicide substrate. *Biochemistry.* **30**: 8876-8882.
- Perriere. G. & Gouy. M. (1996). WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie.* **78**(5):364-9.
- Picard, V., Marque, P.E., Paolucci, F., Alach, M & Le Bonniec, B.F. (1999). Topology of the stable serpin-protease complexes revealed by an autoantibody that fails to react with the monomeric conformers of antithrombin. *J.Biol. Chem.* **274**, 4586-4593.
- Prochownik, E.V., Bock, S.C., and Orkin, S.H. (1985). Intron structure of the human antithrombin III gene differs from that of other members of the serine protease inhibitor superfamily. *J Biol Chem.* **260**: 9608-9612.
- Ray, C.A., Black, R.A, Kronheim, S.R., Greenstreet, T.A, Sleath, P.R., Salvesen., G.S., Pickup, D.J. (1992). Viral inhibition of inflammation. Cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 β converting enzyme. *Cell.* **69**; 579-604.
- Ryu, S. E., Choi, H. J., Kwon, K. S., Lee, K. N., Yu, M. H. (1996). The native strains in the hydrophobic core and flexible reactive loop of a serine protease inhibitor: crystal structure of an uncleaved α 1-antitrypsin at 2.7 Å. *Structure.* **4**:1181.
- Salzet, M., Vieau, D., and Stefano, G.B. (1999). Serpins: an evolutionary conserved survival strategy. *Trends Immunol. Today.* **20**:(12) 541-544.
- Scarsdale, J.N., Wright, H.T. (1995) Structural basis for serpin inhibitor activity. *Proteins.* **22**(3):210-25.
- Schechter, I., & Berger, A. (1967). On the size of the active site of proteases. *Biochem Biophys Res Commun.* **27**, 157-162.
- Schneider, S.S., Schick, C., Fish, K.E., Miller, E., Pena, J.C., Treter, S.D., Hui, S.M., Silverman, G.A. (1995). A serine proteinase inhibitor luciferin at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 3147-3151.
- Schreuder, H.A., de Boer, B., Dijkema, R., Mulders, J., Theunissen, H. J., Grootenhuys, P. D., Hol, W. G. (1994). The intact and cleaved human antithrombin III complex as a model for serpin proteinase interactions. *Nature Struct. Biol.* **1**: 48-54.

- Sharp, A. M., Stein, P. E., Pannu, N. S., Carrell, R. W., Berkenpas, M. B., Ginsburg, D., Lawrence, D. A., Read, R. J. (1999). The Active Conformation of Plasminogen Activator Inhibitor 1, a Target for Drugs to Control Fibrinolysis and Cell Adhesion. *Structure (London)* **7**:111.
- Skinner, R., Chang, W. S., Jin, L., Pei, X., Huntington, J. A., Abrahams, J. P., Carrell, R. W., Lomas, D. A. (1998). Implications for function and therapy of a 2.9 Å structure of binary-complexed antithrombin. *J Mol Biol* **283** : 9.
- Skriver, K., Wikoff, W.R., Patston, P.A., Tausk, F., Schapira, M., Kaplan, A.P. & Bocks, S.C. (1991). Substrate properties of C1 inhibitor Ma (alanine 434-glutamic acid). Genetic and structural evidence suggesting that the P12 region contains critical determinants of serine protease inhibitor/substrate status. *J.Biol.Chem.* **226**: 9216-9221.
- Song, H. K., Lee, K. N., Kwon, K. S., Yu, M. H., Suh, S. W. (1995). Crystal structure of an uncleaved α 1-antitrypsin reveals the conformation of its inhibitory reactive loop. *FEBS Lett.* **377**:150.
- Sun, J., Rose, J.B. and Bird, P. (1995). Gene structure, chromosomal localization, and expression of the murine homologue of human proteinase inhibitor 6 (PI-6) suggests divergence of PI-6 from the ovalbumin serpins. *J. Biol. Chem.* **270**: 16089-16096.
- Stavridi, E.S. et al. (1996). Structural Change in alpha-Chymotrypsin induced by complexation with alpha 1- antichymotrypsin as seen by enhanced sensitivity to proteolysis. *Biochemistry*. **35**: 10608-10615
- Stein, P.E., Leslie, A.G.W., Finch, J.T. Turnell, W.G., McLaughlin, P.J. and Carrell, R.W. (1990). Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of the serpins. *Nature. Lond.* **347**: 99-102.
- Stein, P.E and Chothia. C. (1991). Serpins tertiary structure transformation. *J Mol Biol.* **221**, 615-621.
- Stein, P.E., Leslie, A.G.W., Finch, J.T. Carrell, R. W..(1991). Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution. *J.Mol.Biol.* **221**:941-959.
- Stein, P.E., and Carrell, R.W. (1995). What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease?. *Nature Struct. Biol.* **2**: 96-113.
- Steele, F.R., Chader, G.J., Johnson, L.V., Tombran-Tink, J.(1993).Pigment epithelium-derived factor: Neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 1526-1530.
- Stratikos, E. and Getins, P.G:W. (1999). Formation of the covalent sepin-protenase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å.. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **27**:4808-13.
- Takagi, H., Naruma, H., Nakamura, K., and Sasaki, T. (1990). Amino acid sequence of silkworm *Bombyx mori* hemolymph antitrypsin deduced from its cDNA nucleotide sequence: confirmation of its homology with serpins. *J. biochem.* **108**: 372-378.
- Takeda, A., Yamamoto, T., Nakamura, Y., Takahashi, T., Hibino, T. (1995). Squamus cell carcinoma antigen is a potent inhibitor of cysteine proteinase cathepsin L. *Feebs. Lett.* **315**:105-108.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**:4673-4680.

- Tucker, H. M., Mottenen, J., Goldsmith, E. J., Gerard, R. D. (1995). Engineering of Plasminogen Activator Inhibitor-1 to Reduce the Rate of Latency Transition. *Nat.Struct.Biol.* **2** :442.
- Underhill, D.A., and Hammond, G.L. (1989). Organization of the human corticosteroid binding globulin gene and analysis of its 5' flanking region. *Mol Endocrinol.* **3**: 1448-1454.
- Wei, A., Rubin, H., Cooperman, B.S., ETAL. (1994). Crystal structure of an uncleaved serpin reveals the conformation of an inhibitory reactive loop. *Nature Struct. Biol.* **1**: 251-258.
- Whisstock, J.C., Skinner, R. and Lesk, A.M. (1998). An atlas of serpin conformations. *Trends Biochem. Sci.* **23**:63-67.
- Woo, S.L.C., Beattie, W.G., Catterall, J.F., Dugaiczky, A., Staden, R., Brownlee, G.G., O'Malley, B.W. (1981). Complete nucleotide sequence of the chicken chromosomal ovalbumin gene and its biological significance. *Biochemistry.* **20**: 6437-6446.
- Wright, H.T., Qian, H.X., and Huber, R. (1990). Crystal structure of plakalbumin, a proteolytically nicked form of ovalbumin. Its relationship to the structure of cleaved a1-proteinase inhibitor. *J. Mol. Biol.* **213**:513-528.
- Ye, R.D. Ahern, S.M., Le, Beu, N.M., Lebo R.V., Sadler J.E.(1989). Structure of the gene for human plasminogen activator inhibitor-2. The nearest mammalian homologue of chicken ovalbumin. *J Biol Chem.* **264**: 5495-5502.
- Zou, Z., Anisowicz, A., Hendrix, M.J., Thor, A., Neveu ,M., Sheng, S., Rafidi, K., Seftor, E., Sager, R. (1994). Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science.* **263**: 526-529.