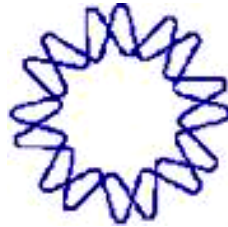




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



**“Análisis del papel de residuos del sitio activo de la
piroglutamil peptidasa II en su actividad y especificidad”**

TESIS

Para obtener el grado de maestra en Ciencias

PRESENTA

Q. Edna Patricia Matta Camacho

Director de tesis.

Jean-Louis Charli Casalonga

Cuernavaca, Mor. 2006



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.

INDICE GENERAL

	<i>Página</i>
I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	3
III. INTRODUCCION	5
III.1 La hormona liberadora de tirotropina (TRH)	5
III.1.1 Localización y distribución del TRH	6
III.1.2 Metabolismo del TRH	7
III.1.2.1 Inactivación del TRH en el espacio extracelular	7
III.2 La piroglutamil peptidasa II (PPII; E.C. 3.4.19.6)	9
III.2.1 Características bioquímicas y moleculares de la PPII	9
III.3 La PPII es una <i>omegapeptidasa</i> que pertenece a la familia M1 de las metalopeptidasas	11
III.3.1 Las metalopeptidasas	11
III.3.1.1 El clan MA de las metalopetidadasas	12
III.3.1.2 La familia M1 pertenece al Clan MA	13
III.3.2 La leucotrieno A4 hidrolasa (LTA4H; EC. 3.3.2.6)	15
III.3.3 Factor F3 que interacciona con tricorn (F3)	15
III.3.4 Dominios de las ectoregiones en la familia M1	16
III.3.5 La aminopeptidasa A (APA; EC. 3. 4.11.7)	17
III.3.6 La aminopeptidasa N (APN; EC. 3.4.11.2)	17
IV. ANTECEDENTES	19
IV.1 Generalidades en el sitio activo en la familia M1	20
IV.1.1 Mecanismo de hidrólisis	20
IV.2 Construcción de un modelo teórico para el sitio activo de la PPII y de la APN	22
IV.3 Identificación de residuos implicados en la actividad o especificidad en la familia M1	23
IV.3.1 Residuos ligando del ión metálico Zn ²⁺	24
IV.3.2 Residuos involucrados en la estabilización del estado de	

	transición	25
IV.3.3	Residuos que intervienen en el reconocimiento del amino terminal del sustrato	26
IV.3.3.1	El glutamato de la firma exopeptidasa	27
IV.3.3.2	El residuo del lazo 1 implicado en la especificidad	29
IV.3.4	Residuos específicos de la PPII con papel desconocido	34
IV.3.4.1	El residuo Y332	34
IV.3.4.2	El residuo W525	35
IV.3.4.3	El residuo H468	38
V.	OBJETIVOS	39
V.1	Objetivo general	39
V.2	Objetivos específicos	39
VI.	ESTRATEGIA	40
VI.1	Análisis experimental	40
VI.2	Análisis teórico	40
VII.	MATERIALES Y METODOS	41
VII.1	Construcción de los vectores de expresión	41
VII.1.1	Mutagénesis sitio-dirigida y construcción de los vectores de expresión para las mutantes de PPII	41
VII.1.2	Construcción del vector para expresar la región extracelular de la PPII de rata	43
VII.2	Expresión en sistemas heterólogos de las proteínas recombinantes	44
VII.2. 1	Expresión de la PPII silvestre y mutantes	44
VII.2.2	Expresión de la región extracelular activa de la PPIIr	45
VII.3	Visualización de los niveles de expresión y localización de las proteínas recombinants	45
VII.3.1	Análisis por SDS-PAGE y Western blot	45
VII.3.2	Microscopia de fluorescencia	46
VII.4	Caracterización enzimática de las proteínas recombinantes	47
VII.5	Purificación de la región extracelular de la PPII de rata	48
VII.5.1	Tecnología Ni-NTA (QIAGEN)	49

VIII.	RESULTADOS	50
VIII.1	Construcción de los vectores de expresión para la PPII nativa (y mutante) anclada a la membrana	50
VIII.1.1	Diseño de las mutantes, mutagénesis sitio-dirigida y comprobación de la expresión de las proteínas	50
VIII.2	Un panorama inicial del sitio activo de la PPII	52
VIII.3	El puente salino y el reconocimiento del amino terminal	53
VIII:3.1	Actividades frente al sustrato de las <i>omegapeptidasas</i> TRH- β NA y pGlu- β NA	53
VIII.3.2	Actividades frente al sustrato de la diferentes aminopeptidasas Lis- β NA , Arg- β NA, Phe- β NA, Ala- β NA y Glu- β NA	55
VIII.4	Otros residuos en el sitio activo de la PPII	60
VIII.4.1	El residuo W525	60
VIII.4.2	El residuo H468	64
VIII.5	Expresión de la PPII soluble	66
IX.	DISCUSION	74
X.	CONCLUSIONES	81
XI.	PERSPECTIVAS	82
XII.	BIBLIOGRAFIA	83
XIII.	ANEXOS	91

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<i>Página</i>
1.	Estructura de la hormona liberadora de tirotrópina	7
2.	Enlace peptídico hidrolizado por la tiroliberina y por la PPII en el TRH	8
3.	Esquema de la estructura primaria de la PPII de rata	11
4.	Alineamiento múltiple de secuencias de peptidasas de la familia M1	18
5.	Estructura cristalográfica de: A) F3; B) LTHA4; C) Termolisina	20
6.	Mecanismo de hidrólisis propuesto para la LTA4H de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
7.	Modelos de los sitios activos para la PPII de y para la APN de humano	23
8.	Modelos del sitio activo de peptidasas de la familia M1 e interacciones del Glu de la firma exopeptidasa	29
9.	Modelos del sitio activo de la APA silvestre y APA mutada E215Q	31
10.	Modo de unión del TRH en el sitio activo de la PPII de rata	33
11.	Actividad de mutantes en residuos con papel desconocido en el sitio activo de la PPII	34
12.	El Y332 en el sitio activo de la PPII	35
13.	Residuos con función desconocida en el sitio activo de la PPII	36
14.	La posición 525 en el sitio activo de la PPII	37
15.	Tecnología Ni-NTA (QIAGEN)	49
16.	Expresión de PPII silvestre y mutantes de PPII	52
17.	Actividad de PPII y mutantes de PPII frente a TRH- β NA	54
18.	Actividad de PPII y mutantes de PPII frente a Glu- β NA	55
19.	Actividad de PPII y mutantes de PPII frente a Ala- β NA	56
20.	Efecto de la amastatina sobre la actividad de la PPII silvestre frente al TRH- β NA	58
21.	Efecto de la actinonina y/o amastatina sobre la actividad de mutantes de PPII frente a Ala- β NA	59
22.	Efecto de la o-fenantrolina sobre la actividad lisil-peptidasa endógena	

	en células C6 intactas	61
23.	Actividad de PPII y mutantes de PPII en W525 frente a TRH- β NA como sustrato	62
24.	Actividad específica de la PPII silvestre y mutantes de PPII en W525 frente a TRH-MCA como sustrato	64
25.	Actividad de PPII y mutantes de PPII en la H468 frente a TRH- β NA como sustrato	65
26.	Actividad de PPII silvestre y mutantes de PPII en la H468 frente a TRH- β NA o TRH-Phe- β NA como sustrato	66
27.	Distribución subcelular de la PPIIr en células COS-7, C6 y HEK 293	68
28.	Actividad en células COS-7 transfectadas con vectores de expresión membranal o soluble de la PPII	69
29.	Actividad total de PPII en el medio de cultivo en diferentes líneas celulares transfectadas con el vector pSectag2B-PPIIr	70

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla</i>		<i>Página</i>
1.	Peptidasas membranales en la familia M1	14
2.	Residuos en la firma catalítica (HEXXH.. ₁₈ E) que se coordinan al zinc en la familia M1	25
3.	Residuos involucrados en la estabilización del estado de transición	26
4.	Residuos que intervienen en el reconocimiento del amino terminal Del sustrato	31
5.	Residuos que interaccionan directamente con la bestatina o con el TRH y residuos que forman una cavidad alrededor de ellos en la estructura de la LTA4H y el modelo teórico para la PPII	33
6.	Constantes cinéticas para la PPII silvestre y para la mutante PPII-S269A	54
7.	Efecto del TRH en la actividad de las PPII-alanilpeptidasas frente a Ala- β NA como sustrato	57
8.	Actividades aminopeptidasas endógenas en la fracción membranal de células C6 sin transfectar	60
9.	Constantes cinéticas para PPII silvestre y mutantes de la PPII en el W525 frente a TRH- β NA como sustrato	63
10.	Constantes cinéticas para PPII silvestre y mutantes de PPII en la H468 frente a TRH- β NA como sustrato	66
11.	Actividad de PPII en el medio extracelular en las diferentes líneas celulares empleadas; COS-7, C6 y HEK293	71

ABREVIATURAS

A-LAP	leucil aminopeptidasa derivada de adipocito
APA	aminopeptidasa A
APB	aminopeptidasa B
APN	aminopeptidasa N
APO	aminopeptidasa O
IRAP	aminopeptidasa regulada por insulina
KAP	aminopeptidasa específica para lisina
L-RAP	arginil aminopeptidasa derivada de leucocitos
LTA4H	leucotrieno A4 hidrolasa
MCA	metilcumarina
NPV	núcleo paraventricular del hipotálamo
PAM	peptidilglicina monooxigenasa amidante
PEP	prolil endopeptidasa
PPI	piroglutamil peptidasa I
PPII	piroglutamil peptidasa II
PSA	aminopeptidasa sensible a puromicina
TRH	hormona liberadora de tirotrópina
β-NA	beta-naftilamida

I. RESUMEN

La hormona liberadora de tirotrópina (TRH, pGlu-His-Pro-NH₂) es un péptido con propiedades neurohormonales y neurotransmisoras. Datos recientes sugieren que una vez liberado al espacio extracelular, el TRH es inactivado por la piroglutamil peptidasa II (PPII; E.C. 3.4.19.6), una zinc metalopeptidasa anclada a la membrana plasmática que hidroliza el enlace pGlu-His del TRH.

La PPII pertenece a la familia M1 del Clan MA de las metalopeptidasas, en la cual se incluyen enzimas como la aminopeptidasa N (APN), la leucotrieno A4 hidrolasa (LTA4H) y el factor F3 que interacciona con tricorn. La PPII se diferencia de los demás miembros de la familia M1 debido a su alta especificidad hacia su sustrato biológico (TRH). Su especificidad está restringida a tripéptidos que contienen al grupo piroglutamil en el extremo N-terminal, por lo cual se le ha catalogado como *omegapeptidasa*; además, hidroliza preferencialmente sustratos que contienen residuos medianos y no cargados en la posición P¹ y Pro o Ala o Trp en la posición P².

Los determinantes estructurales de la actividad y especificidad en la familia M1 son poco conocidos. En ausencia de la estructura tridimensional para la PPII, se construyeron modelos teóricos de los dominios catalíticos de la PPII y de la APN, basados en la estructura cristalográfica de la LTA4H. Estos modelos y datos reportados en la literatura para la estructura de las peptidasas miembros de la familia M1 generados por mutagénesis sitio-dirigida permitieron la identificación de los dos residuos S269 y K463 en el sitio activo de la PPII que parecen estar implicados en la especificidad de la enzima. Se propuso que el K463 interactúa por vía puente salino con el glutámico de la firma exopeptidasa E408; este puente salino es específico de la PPII y podría contribuir a la alta especificidad de la enzima. Se propuso además que S269 establece un puente de hidrogeno con el residuo piroglutamil.

Estas hipótesis motivaron parte del presente trabajo, en el cual se pretendió evaluar la actividad catalítica y especificidad de mutantes de PPII sobre los residuos S269 y K463,

entre otros. Cambios simultáneos de la S269 a Gln y de la K463 a Asn generaron enzimas inactivas frente a TRH- β NA pero activas frente al sustrato Ala- β NA, un sustrato con amino terminal libre; adicionalmente se realizaron ensayos frente a Glu- β NA, otro sustrato que tiene el amino terminal libre; sin embargo no se observó actividad. El análisis de estos residuos permitió demostrar que se puede cambiar la especificidad de *omegapeptidasa* a *alanil*-peptidasa con modificaciones puntuales en el sitio activo.

También se analizaron otros residuos como la H468 y el W525, residuos característicos de la *omegapeptidasa*, presentes en el modelo teórico para el sitio activo. Se determinó la actividad específica frente a TRH- β NA como sustrato. Los resultados del análisis bioquímico para estos residuos revelan que estos cumplen un papel preponderante en la actividad de la enzima.

En conclusión, hemos obtenido nuevos datos sobre la relación estructura-función en la familia M1 de metalopeptidasas.

II. ABSTRACT

Thyrotropin-releasing hormone (TRH; pGlu-His-ProNH₂) is a neuropeptide with properties of both a neurohormone and a neurotransmitter. Recent data suggest that once released into the extracellular space, TRH is inactivated by the enzyme pyroglutamate peptidase II (PPII) (E.C. 3.4.19.6). PPII is a highly specific zinc metallopeptidase that hydrolyzes the pGlu-His bond of TRH.

PPII belongs to the M1 family of the MA clan of metallopeptidases which includes aminopeptidase N (APN), leukotriene A4 hydrolase (LTA4H) and the factor F3 that interacts with tricorn. PPII differs from the other M1 family members because of its high specificity for its biological substrate (TRH). Due to a restricted specificity for tri-peptides that contain a pyroglutamyl group in the N-terminal extreme, PPII has been catalogued as an *omega*-peptidase. PPII cleaves preferentially peptides with middle, bulky and uncharged amino acids at the P'1 position and Pro, Ala or Trp in P'2 position.

The structural determinants of activity and specificity of the M1 family members are not well studied. In the absence of a three-dimensional structure for PPII, theoretical models of PPII and APN catalytic domains were constructed based on the crystallographic structure of LTA4H. These models and mutagenesis data from other M1 family members permitted the identification of two PPII active site residues, S269 and K463, which could participate in enzyme specificity. It was proposed that K463 to interact with E408, a part of the exopeptidase motif, to form a saline bridge that E408. This bridge could contribute to the high specificity of PPII. The S269 residue could establish a hydrogen bond with the pyroglutamyl residue of the substrate.

To test these hypotheses catalytic activity and specificity of PPII mutants on S269 and K463 residues were measured. Simultaneous changes of S269 to Gln and of K463 to Asn or Arg (PPII double mutants) generated enzymes without catalytic activity towards TRH-βNA (*omega*-peptidase activity) but they were able to hydrolyze Ala-βNA (*amino*-peptidase activity); additionally, these mutants were inactive with Glu-βNA as substrate. These

results demonstrate that is possible to change the PPII specificity from *omega*-peptidase to alanil *amino*-peptidase, with point modifications of PPII active site.

The role of two residues H468 and W525 present in the PPII active site and specific for PPII sequence, was also tested. The enzymatic activity was measured with TRH- β NA as substrate. The results showed that these residues have an important role in the enzyme activity.

In conclusion, we have obtained new data about the relationship between structure and function in the M1 family of metallopeptidases.

III. INTRODUCCION

La vida en los organismos multicelulares depende de una elaborada red de comunicación celular que permite coordinar el crecimiento, la diferenciación y el metabolismo de la multitud de células que forman los tejidos y órganos. Los péptidos juegan un papel importante en esta comunicación intercelular. El metabolismo de mensajeros peptídicos generalmente involucra varios pasos que incluyen la generación y secreción del péptido y su inactivación en el espacio extracelular. Se ha observado que la inactivación del péptido ocurre principalmente a través de metalopeptidasas asociadas a la membrana, las cuales tienen su sitio activo en el medio extracelular (ectopeptidasas). Estas peptidasas constituyen un punto de regulación importante ya que en el espacio extracelular producen péptidos inactivos o péptidos con diferente actividad biológica, modulando de esta manera la transmisión peptidérgica.

Uno de los sitios en los cuales la función de los péptidos ha sido estudiada extensivamente es el sistema nervioso. En el sistema nervioso, numerosos péptidos participan en la comunicación sináptica y como neurohormonas que controlan el funcionamiento de la pituitaria. Son sintetizados y liberados, tanto por neuronas como por otras células, tales como células gliales.

III.1 La hormona liberadora de tirotropina (TRH)

En 1969, después de diez años de trabajo, dos laboratorios lograron la purificación y caracterización química del factor hipofisiotrópico llamado hormona liberadora de tirotropina (**TRH**, pGlu-His-Pro NH₂; Fig. 1) (Schally *et al.*, 1969; Burgus *et al.*, 1970). Este péptido ha sido tema de investigación durante los últimos treinta años, ya que exhibe un papel dual como neurohormona y como neuropéptido.

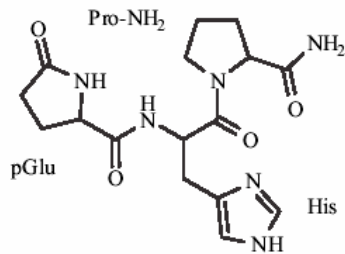


Figura 1. Estructura de la hormona liberadora de tirotropina (TRH; pGlu-His-ProNH₂)

Como hormona, el TRH estimula la liberación de tirotropina (TSH; hormona que estimula la tiroides) y prolactina desde la pituitaria anterior (Harris *et al.*, 1978); como un neuropéptido modulador en el sistema nervioso central, regula la actividad de varios sistemas de neurotransmisores y ejerce una variedad de efectos extrahipotalámicos (Yarbrough, 1983). Cuando se administra en animales a bajas dosis, el TRH estimula la liberación de hormonas de la pituitaria, mientras que en altas concentraciones, el TRH produce una variedad de efectos que son independientes de su papel endocrino, tales como termorregulación, agonismo analéptico a las drogas, aumento de la memoria y regulación del dolor (O'Leary y O'Connor, 1995), también se ha observado que tiene efectos excitatorios; la activación afecta principalmente la vigilia y el sueño, pero también se observan efectos motores y cognitivos (Horita, 1998; Nillni y Sevarino, 1999). En general, se propone al TRH como un agente neuroprotector con acciones antinarcóticas, antidepresivas y posiblemente antiepiléptogónicas (Sato *et al.*, 1986; Kubek Sattín, 1989). Estudios preclínicos muestran que el TRH exhibe una acción neuroprotectora y se ha sugerido que pudiera ser útil para tratamientos de trauma en la espina dorsal y de la enfermedad de Alzheimer (Luo *et al.*, 2002). Hay que destacar observaciones recientes que plantean al sistema TRHérgico en el sistema nervioso central (SNC) como un sistema integrador que controla la homeostasis (Gary *et al.*, 2003)

III.1.1 Localización y distribución del TRH

El conocimiento de la estructura primaria del TRH, así como su disponibilidad en forma pura, permitió el desarrollo de anticuerpos específicos, los cuales han sido una gran

herramienta para cuantificar y establecer su localización a nivel celular o subcelular así como su distribución regional. Consistente con su papel como hormona hipofisiotrópica, los estudios de inmunocitoquímica mostraron inmunoreactividad hacia el TRH en una gran cantidad de procesos neurales de la eminencia media del hipotálamo, incluyendo a la zona externa, que se yuxtapone a los capilares porta que conectan la eminencia media a la adenohipófisis. La inmunoreactividad hacia el TRH se encontró también en los finos procesos celulares del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV), en particular en la división parvocelular anterior y media en donde se encuentran algunas de las neuronas que envían sus proyecciones hacia la eminencia media (Lechan y Jackson, 1982). Otras regiones del hipotálamo incluyendo el núcleo dorsomedial, el núcleo arcuato, la región perifornical y el núcleo periventricular presentaron procesos neuronales con inmunoreactividad hacia el TRH. El TRH también se ha detectado en concentraciones significativas en algunas regiones extrahipotalámicas en el cerebro de la rata tales como el tallo cerebral, el cerebelo, el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, la amígdala y el hipocampo. De igual manera, se ha detectado en órganos como la pituitaria posterior, la próstata, el páncreas y el tracto gastrointestinal (Lechan *et al.*, 1983). La amplia distribución del TRH en las células del sistema nervioso central, confirma que el TRH tiene funciones mas allá de su papel hipofisiotrópico (estimulador de las secreciones de la pituitaria).

III.1.2 Metabolismo del TRH

El TRH es sintetizado en la vía de secreción regulada como un precursor de alto peso molecular (26000 Da) que contiene cinco (en rata) secuencias repetidas Gln-His-Pro-Gli flanqueadas por residuos dibásicos (Lechan *et al.*, 1982). Los enlaces peptídicos al nivel de los residuos dibásicos son secuencialmente hidrolizados por una convertasa y por una carboxipeptidasa para originar Gln-His-Pro-Gli. Una glutaminil ciclasa convierte a la Gln en pGlu y una peptidilglicina monooxigenasa amidante (PAM) forma al TRH. Las neuronas TRHérgicas liberan al TRH por exocitosis en respuesta a la llegada de potenciales de acción (Joseph-Bravo *et al.*, 1998).

III.1.2.1 Inactivación del TRH en el espacio extracelular

Si bien el TRH es resistente a la acción de enzimas proteolíticas como la pepsina, la papaina o la termolisina, estudios iniciales en fracciones solubles de cerebro (Browne y O'Cuinn, 1983) y de adenohipófisis (Bauer y Kleinkauf, 1980) mostraron que el TRH es degradado por dos peptidasas, una tiolpeptidasa, la piroglutamil peptidasa I (PPI; EC 3.4.21.26) que libera el pGlu y la prolil endopeptidasa (PEP; EC. 3.4.19.3) que deamida al TRH para generar TRH ácido. Sin embargo, estas dos enzimas no controlan los niveles de TRH en el espacio extracelular del cerebro (Charli *et al.*, 1987; Méndez *et al.*, 1990). La inactivación extracelular de neuropéptidos es desarrollada principalmente por ectopeptidasas y en el caso del TRH hay evidencia que señala a una neuroectopeptidasa específica como el mecanismo principal responsable de su inactivación una vez liberado al espacio extracelular.

A finales de la década de los años setenta a partir de sueros de porcino y de rata se logró la purificación (parcial), de una peptidasa que hidroliza el enlace pGlu-His del TRH (Fig. 2). Esta enzima no es inhibida por reactivos bloqueadores del sulfhidrilo, pero si es inhibida por agentes quelantes de metales lo cual la diferencia de la PPI. Estudios llevados a cabo para determinar su especificidad mostraron que esta enzima es altamente específica para el TRH y péptidos semejantes al TRH (por eso fue llamada tiroliberinasa) (Bauer *et al.*, 1981).

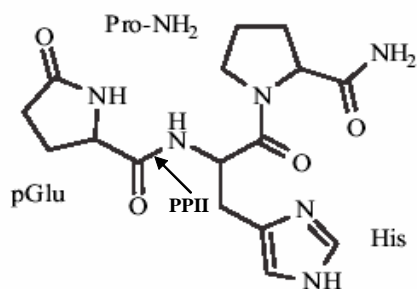


Figura 2. Enlace peptídico hidrolizado por la tiroliberinasa y por la PPII en el TRH. Estas enzimas hidrolizan el enlace pGlu-His del TRH, liberando pGlu e His-ProNH₂, dos fragmentos que no tienen afinidad por el receptor del TRH.

La alta especificidad de sustrato sugeriría que esta enzima podría estar participando en los mecanismos reguladores de la actividad del TRH; por ejemplo, la degradación del TRH durante su transporte por el sistema portal en camino hacia la pituitaria para modular los niveles disponibles para las células blanco. Si bien la tiroliberinasa cumple con algunas de

las propiedades que la hacen candidato para ser un elemento regulador de la actividad del TRH, le hace falta una característica importante: una localización adecuada en los sitios específicos de acción del TRH. Los estudios de la degradación del TRH permitieron detectar una actividad de piroglutamil peptidasa en la fracción de membranas, en diferentes tejidos de mamífero, que posteriormente fue clasificada como piroglutamil peptidasa II PPII.

III.2 La piroglutamil peptidasa II (PPII; E.C. 3.4.19.6)

III.2.1 Características bioquímicas y moleculares de la PPII

Los estudios bioquímicos sobre la degradación del TRH mostraron que el tripéptido es hidrolizado por una enzima en la fracción particulada de preparaciones sinaptosomales de corteza cerebral e hipotálamo de rata (Joseph-Bravo *et al.*, 1979) así como de cerebro de cuyo (Hayes *et al.*, 1979 y Greaney *et al.*, 1980). Estudios subsecuentes mostraron que la enzima es una piroglutamato peptidasa, con propiedades similares a la tiroliberinasa (Garat *et al.*, 1985). Fue clasificada como piroglutamato peptidasa II. **La característica de la PPII como una enzima de membrana con un sitio activo localizado hacia el espacio extracelular fue demostrada mediante un estudio en el que el tratamiento de sinaptosomas o células intactas (corticales fetales). En primera instancia se detecto actividad PPII en células intactas con un sustrato que no penetra la membrana celular, adicionalmente la actividad de la PPII no se incremento por homogenización, solubilización o permeabilización de células o sinaptosomas excepto cuando estos sinaptosomas fueron tratados con saponina; esto revela que no hay una actividad PPII intracelular y finalmente la actividad de la PPII fue totalmente disminuida cuando las células o los sinaptosomas fueron tratados con tripsina; lo que indica que la PPII fue cortada de la membrana y con ello se fue la actividad piroglutamato.** El papel de la PPII en la inactivación del TRH fue demostrado en rebanadas de cerebro de rata utilizando inhibidores específicos para las diferentes enzimas que degradan al TRH *in vitro*. La inhibición de las enzimas solubles (PPI y PEP) no cambia el contenido de TRH recuperado en el medio extracelular, mientras que la inhibición de la PPII lo incrementa considerablemente (Charli *et al.*, 1987 y 1989).

La PPII ha sido purificada, después de ser solubilizada por proteólisis suave, a partir del cerebro de cuyo (O'Connor y O'Cuinn, 1985), conejo (Wilk, 1986) y cerdo (Bauer, 1994). La actividad de la enzima es óptima a valores de pH entre 7.0 y 7.5 (O'Connor y O'Cuinn, 1984). Para la PPII de cuyo se ha reportado una K_m para el TRH de 40 μM (O'Connor y O'Cuinn, 1984, 1985), para la PPII de cerdo la K_m para el TRH es 25 μM (Bauer 1994) y para la PPII de conejo frente a TRH- βNA la K_m es 44 μM (Wilk y Friedman 1986). Inicialmente se sugirió que la PPII solo podría hidrolizar péptidos de hasta 4 aminoácidos con una estructura general pGlu-His-**X** o **Y**, en donde **X** tendría que ser Pro, Ala o Trp o **Y** Pro-NH₂, Pro-Gly, Pro- β naftilamida (Wilk y Wilk, 1989; Elmore *et al.*, 1990). Un estudio mas reciente demostró que algunos péptidos semejantes a TRH, en los cuales el residuo de His es reemplazado por aminoácidos de tamaño moderado y sin carga en la posición P'₁ también son reconocidos e hidrolizados por la PPII (Kelly *et al.*, 2000). Péptidos biológicamente activos como pGlu-Glu-ProNH₂, neurotensina, gastrina, bombesina etc, no son hidrolizados por la PPII. De manera interesante, la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LH-RH), un decapeptido hipotalámico que inicia con la secuencia pGlu-His, inhibe efectivamente la degradación del TRH pero no es hidrolizado por la PPII (Bauer *et al.*, 1981; O'Connor y O'Cuinn, 1985; Friedman y Wilk, 1986) lo cual indica que la enzima puede unir sustratos con pGlu en su extremo amino terminal pero que no puede hidrolizar péptidos largos.

El análisis por cromatografía de exclusión molecular permitió estimar el peso molecular de la PPII solubilizada con proteasa en 230 kDa; sin embargo, en el análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras se observó una sola banda de 116 kDa, lo que sugiere que la enzima se compone de dos subunidades idénticas (Bauer, 1994). El análisis de la PPII por mutagénesis sitio-dirigida de los residuos de cisteínas (Cys) revela que la Cys 68 es la responsable de la formación de dímeros de PPII por medio de un puente disulfuro y que las ocho Cys restantes son importantes para la estructura de las subunidades individuales y la actividad enzimática (Papadopoulos *et al.*, 2000).

Hasta el momento se han clonado los ADNc para la PPII de rata (Schauder *et al.*, 1994) y de humano (Schomburg *et al.*, 1999) y se conocen por análisis genómicos las secuencias de

la PPII de ratón, pollo, chimpancé, sapo, y pez (http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/make_sequence_data?mid=M01.008).

El análisis de la secuencia primaria del ADNc de la PPII de rata (Schauder *et al.*, 1994) predice una proteína integral de membrana tipo II, de 1025 aminoácidos, con un peso molecular de 117 KDa, un dominio N-terminal intracelular con un sitio potencial de fosforilación por la PKC, un dominio transmembranal seguido de una gran región extracelular con la secuencia consenso característica de las Zn^{2+} metalopeptidasas del tipo gluzincina **HEXXH₁₈E** (posición 441-464). La región extracelular presenta 12 sitios potenciales de glicosilación (Fig. 3). Las predicciones topológicas a partir de la estructura del ADNc son consistentes con los datos bioquímicos que mostraron que la PPII es una ectoenzima (Charli *et al.*, 1988). El análisis por “Northern blot” muestra que en la pituitaria y en el cerebro de rata hay varios transcritos para la PPII con un peso que va desde 6 hasta 9.5 Kb; sin embargo, estos transcritos son codificados por un gen único como lo sugiere el análisis por “Southern blot” (Schauder *et al.*, 1994).

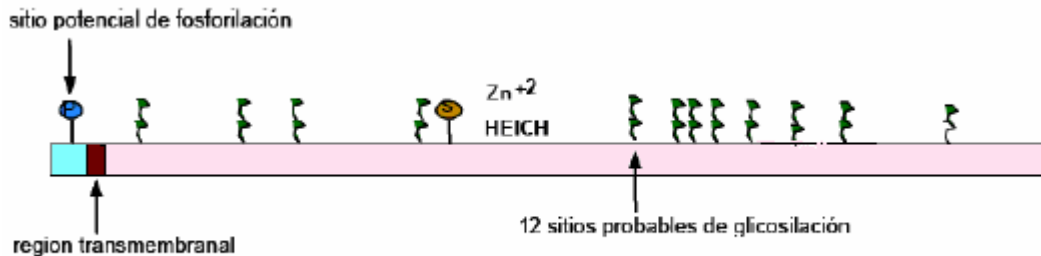


Figura 3. Esquema de la estructura primaria de la PPII de rata. La secuencia de la PPII, deducida a partir de su ADNc, predice una proteína de 1025 aminoácidos con un peso molecular de 117 kDa. El análisis de la secuencia proteica predice una región N-terminal intracelular de 39 aminoácidos con un sitio potencial de fosforilación por la PKC (P), una región transmembranal de 22 aminoácidos y una región extracelular con la secuencia consenso característica de las Zn-metalopeptidasas del tipo gluzincina, **HEXXH₁₈E** (posición 441-464). La región extracelular presenta 12 sitios potenciales de N-glicosilación (banderines verdes) y un sitio potencial de sulfatación (S).

III.3 La PPII es una *omegapeptidasa* que pertenece a la familia M1 de las metalopeptidasas

III.3.1 Las metalopeptidasas

Las metalopeptidasas están compuestas de un diverso grupo de endopeptidasas y exopeptidasas. Estas enzimas participan en muchos procesos biológicos como desarrollo embrionario, morfogénesis, procesamiento de péptidos y hormonas, liberación de citoquinas y factores de crecimiento, fusión célula-célula, adhesión y migración celular, absorción intestinal de nutrientes, procesamiento de proteínas virales, biosíntesis de pared celular en bacterias y metabolismo de antibióticos. Debido a que las metalopeptidasas juegan un papel importante en muchos procesos biológicos normales, su mal funcionamiento se ha visto implicado en enfermedades como artritis, cáncer, enfermedades cardiovasculares, nefritis, desordenes en el sistema nervioso central, fibrosis e infección entre muchas otras (Tabla A, anexo 1).

A diferencia de las serin o cistein proteasas, las metalopeptidasas no forman intermediarios covalentes durante la hidrólisis del enlace peptídico; una característica que comparten con las aspartil proteasas es que la hidrólisis del enlace peptídico por las metalopeptidasas esta mediado por el ataque nucleofílico de una molécula de agua sobre el grupo carbonilo del enlace a ser hidrolizado (Hooper, 1994).

Las metalopeptidasas contienen uno o dos iones metálicos divalentes en el sitio activo. La mayoría de las metalopeptidasas requiere de un solo ión metálico para la catálisis, pero en algunos casos la enzima posee dos iones metálicos en el sitio activo. El ión metálico catalítico está usualmente coordinado por tres aminoácidos ligando. La molécula de agua esencial para la hidrólisis del enlace peptídico interactúa con el ión metálico como un cuarto ligando en la forma activa de la metalopeptidasa. En la mayoría de las metalopeptidasas el ión metálico es el zinc; sin embargo, en algunos casos puede ser cobalto, magnesio o níquel. Se sabe que los ligandos del ión metálico en las metalopeptidasas pueden ser His, Glu, Asp o Lis; la frecuencia de estos ligandos en el sitio catalítico es His >>Glu >Asp >Lis (Hopper, 1994).

En la base de datos MEROPS (<http://www.merops.co.uk/merops/merops.htm>) se encuentran clasificadas a las metalopeptidasas en 46 familias agrupadas en 10 clanes (Tabla B,

anexo 1). La clasificación está basada en los motivos de unión al ión metálico y en similitudes en la estructura tridimensional.

III.3.1.1 El clan MA de las metalopeptidasas

La mayoría de las metalopeptidasas contienen el motivo de unión al ión metálico **HEXXH** (en negritas se resaltan a los ligandos del Zinc), donde X es cualquier aminoácido. Las enzimas en las que el tercer ligando del ión metálico es **His**, **Glu** o **Asp** están agrupadas en el clan MA (Rawlings y Barrett, 2000).

El clan MA es el clan más amplio de las metalopeptidasas, conformado hasta el momento por 25 familias (Tabla B anexo 1). Algunas de estas familias están compuestas de miembros con motivos de unión al zinc **HEXXH(X_n)E**, donde n es 14-18. Estas proteasas como la termolisina, la PPII, la leucotrieno A4 hidrolasa, la aminopeptidasa N, el factor F3 que interactúa con tricorn, entre otras, son denominadas gluzincinas debido a que poseen un residuo de Glu como tercer ligando de unión al zinc (Hopper, 1994). En particular, hay que destacar a la termolisina como el miembro más estudiado del clan MA.

La termolisina (EC 3.4.24.27) es una de las pocas metalopeptidasas con estructura tridimensional resuelta (Colman *et al.*, 1972). Se trata de una endoproteasa soluble, de origen bacteriano, con un peso aproximado de 35 kDa. Hidroliza preferencialmente enlaces peptídicos que contienen en su extremo N-terminal Leu, Phe, Ile o Val, aunque también puede hidrolizar sustratos con Met, His, Tyr, Ala, Asn, Ser, Thr, Gly, Lys, Glu o Asp en esta posición (Heinrikson, 1977). El alineamiento estructural entre la termolisina y el dominio catalítico de la LTA4H (familia M1) muestra que la estructura secundaria está conservada. La superposición de las dos estructuras muestra que los sitios activos están conformados por tres α -hélices que posicionan a los residuos que coordinan al metal, lo cual también se ha observado para la PPII. La termolisina es el miembro más estudiado dentro del clan MA y aunque la termolisina pertenece a la familia M4 y la PPII o la LTA4H pertenecen a la familia M1 la similitud en la conformación de los sitios activos constituye una base importante en el estudio del sitio activo de la PPII.

Al clan MA también pertenecen las enzimas denominadas metzincinas; pertenecen a las subfamilias A y B de la familia M10, y a las subfamilias A y B de la familia M12 (Tabla B, anexo 1). Son proteasas con motivo de unión al zinc **HEXXHXXGXXH**, también denominadas matrixinas. Los ligandos de unión al zinc son tres His; en adición, todas poseen una metionina conservada en el sitio activo en conformación “Met-turn”, la cual forma una base hidrofóbica para el zinc catalítico (Lawrence *et al.*, 1999).

III.3.1.2 La familia M1 pertenece al Clan MA

La familia M1 de las metaloproteasas dependientes de zinc comparte un patrón común en su estructura primaria (motivo catalítico y motivo exopeptidasa) y está involucrada en muchos aspectos cruciales del desarrollo y de la fisiología celular. Estas enzimas juegan un papel crítico en muchos procesos fisiológicos como maduración de proteínas y regulación de los niveles extracelulares de hormonas y péptidos. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y tienen homólogos en bacteria, hongos, plantas, invertebrados, anfibios, aves y mamíferos (Barrett *et al.*, 1998). Se expresan en tejido animal y se encuentran en muchos organelos subcelulares, en citoplasma y también como proteínas integrales de membrana. La familia M1 de las metalopeptidasas en mamíferos consiste de doce peptidasas diferentes pero homólogas, cinco de las cuales son proteínas integrales de membrana: la aminopeptidasa A (APA); la piroglutamil peptidasa II (PPII); la aminopeptidasa N (APN); la leucil aminopeptidasa derivada de adipocito (A-LAP) y la aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP) y siete que no son proteínas transmembranales: la aminopeptidasa B (APB); la aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA); la leucotrieno A4 hidrolasa (LTA4H); la arginil aminopeptidasa derivada de leucocito (L-RAP), la aminopeptidasa específica para lisina (KAP), la aminopeptidasa O (APO) y la citosol alanil peptidasa. La familia incluye también aminopeptidasas de levadura (API, APII) y de bacterias. Esta familia de enzimas exhibe un amplio rango de especificidad de sustrato: IRAP, APA y APN son capaces de hidrolizar un amplio rango de péptidos biológicos, mientras que la PPII tiene una especificidad muy restringida (Tabla 1). Las peptidasas de la familia M1 contienen dos motivos consenso en el dominio catalítico; un motivo de unión al zinc (**HEXXH-₁₈X**) y un motivo de exopeptidasa **GXMEN** (Albiston *et al.*, 2004).

Enzimas transmembranales		
De la familia M1	E.C.	Sustratos biológicos
Aminopeptidasa N	3.4.11.2	Angiotensina III, encefalina
Aminopeptidasa regulada por insulina	3.4.11.3	Vasopresina, oxitocina, encefalina
Piroglutamil peptidasa II	3.4.19.6	TRH
Aminopeptidasa A	3.4.11.7	Angiotensina II, Colecistoquinina
Leucil amino peptidasa derivada de adipocito	3.4.11.-	Angiotensina III, Angiotensina II, calidita

Tabla 1. *Peptidasas membranales en la familia M1.*

La familia M1 de las peptidasas es muy importante debido a su participación en el metabolismo de péptidos. Los determinantes estructurales y la especificidad en la familia han sido muy poco explorados. La leucotrieno A4 hidrolasa (LTA4H) es una enzima soluble, bifuncional (epoxido hidrolasa y amino peptidasa) y fue el primer miembro de la familia M1 con estructura cristalográfica resuelta (Tunnissen *et al.*, 2001). Recientemente, se resolvió la estructura cristalográfica del factor F3 que interactúa con tricorn (Kyrieleis *et al.*, 2005).

La secuencia de la PPII de rata comparte en su secuencia global un 34 % de aminoácidos idénticos con la APN de rata, 32 % con la APA de ratón, 31 % con la L-RAP de humano y 26 % con la LTA4H de humano (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2006; Fig. 4). Es importante mencionar que la similitud de secuencia primaria entre estas peptidasas y, en general en la familia, se incrementa de manera notable alrededor del sitio activo, llegando aproximadamente a un 43 % de identidad sobre 200 residuos de la región catalítica. Más allá, las secuencias reportadas para los genes codificantes para estas peptidasas se encuentran organizados de manera similar, manteniendo conservados tanto el número de exones como las fronteras intron-exon.

Es importante mencionar que todos los miembros de la familia M1 son *amino peptidasas* a excepción de la PPII, la cual ha sido catalogada como *omegapetidasa* ya que su sustrato biológico (TRH) contiene un pGlu en el extremo N-terminal (Fig. 2). **Dentro del análisis de**

residuos en el sitio activo de la PPII hemos tenido en cuenta los estudios previos realizados para las diferentes enzimas que conforman la familia M1 así como aquellas que hacen parte el clan MA (como la termolisina) con las cuales hay conservación estructural en el sitio activo. A continuación les describiré algunos de los miembros de la familia M1 que contribuyeron en nuestro análisis.

III.3.2 La leucotrieno A4 hidrolasa (LTA4H; EC. 3.3.2.6)

La leucotrieno A4 hidrolasa es una enzima soluble citosólica y bifuncional; cataliza la hidrólisis de péptidos que contienen residuos de Arg en el extremo N-terminal y tiene también actividad epóxido hidrolasa, en un centro activo común (Minami *et al.*, 1992). Como epóxido hidrolasa cataliza la biosíntesis de leucotrieno B4 (LTB4), un potente químico atrayente involucrado en procesos inflamatorios y alérgicos (Samuelsson *et al.*, 1987). Como aminopeptidasa, hidroliza preferencialmente di y tri-peptidos que presentan Arg en el amino terminal así como Ala o Arg acoplados a β NA o p-nitroanilida (Orning *et al.*, 1994). La LTA4H ha sido clonada de diferentes fuentes; su secuencia peptídica contiene las firmas características de la familia M1, codifica para una proteína de alrededor de 600 aminoácidos y contiene un átomo de zinc por mol de proteína (Funk *et al.*, 1987). La LTA4H de humano fue cristalizada en presencia de bestatina, un inhibidor competitivo de la actividad aminopeptidasa (Thunnissen *et al.*, 2001). Es importante destacar

III.3.3 Factor F3 que interacciona con tricorn (F3)

Recientemente, Kyrieleis y colaboradores (2005) resolvieron la estructura cristalográfica del factor F3 que interactúa con tricorn. En *Thermoplasma acidophilum* (arquea), la degradación de productos proteosomales es llevada a cabo por la proteasa tricorn, la cual actúa río abajo del proteosoma de una manera procesiva para producir preferencialmente di y tripeptidos. El paso final en la degradación de proteínas a aminoácidos libres en estas arqueas es llevado a cabo por los factores F1, F2 y F3 que interactúan con tricorn, trabajando río abajo de la proteasa tricorn. Mientras que F1 es una aminopeptidasa perteneciente a la superfamilia de α/β hidrolasas, F2 y F3, los cuales no están relacionados con F1, son zinc-aminopeptidasas de 89 kDa que comparten 56 % de

identidad de secuencia. Los sustratos de F2 contienen residuos hidrofóbicos en su extremo N-terminal, como alanina, prolina, fenilalanina y leucina. El F3 presenta una especificidad más estrecha hacia su sustrato comparada con F2, con una fuerte preferencia por residuos de glutamato en la posición P1. Esta proteína guarda una estrecha relación con la LTA4H de humano con la cual comparte un 25 % de aminoácidos idénticos (Kyrieleis *et al.*, 2005)

III.3.4 Dominios de las ectoregiones en la familia M1

Las ectoregiones en las peptidasas de membrana en la familia M1 tienen una organización similar, con una región no estructurada que une el segmento transmembranal al dominio catalítico y un dominio C-terminal que se encuentra después de la región catalítica; sin embargo, el dominio C-terminal no se encuentra conservado en la familia. Recientemente se mostró que el dominio C-terminal en la APA y en la APN actúa como una chaperona molecular y es requerido para el plegamiento, la expresión celular y la actividad de la enzima (Rozenfeld *et al.*, 2004).

Se han encontrado versiones truncadas en el lado C-terminal de estas enzimas, versiones que posiblemente son generadas mediante procesos de "splicing alternativo". Para la PPII, una versión truncada de la enzima, es una dominante negativa, ya que al ser co-expresada con la enzima completa, causa la inhibición de la actividad; el mecanismo que se ha propuesto para explicar esta inhibición se basa en la heterodimerización no funcional (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2005).

III.3.5 La aminopeptidasa A (APA; EC. 3. 4.11.7)

La aminopeptidasa A (glutamil aminopeptidasa) es una enzima ampliamente expresada en mamíferos y cataliza preferencialmente la hidrólisis de sustratos con residuos de aminoácidos ácidos (ácido aspártico o glutámico) en el extremo N-terminal (Wang y Cooper, 1998). Está presente con relativa abundancia en tejidos epiteliales de intestino y riñón así como en el endotelio vascular. Inhibidores específicos de la APA han evidenciado su participación en la conversión de angiotensina II a angiotensina III en el cerebro y por lo

tanto en la regulación central de la presión sanguínea en modelos de hipertensión sugiriéndola como un posible blanco terapéutico (Fournié-Zaluski *et al.*, 1984).

III.3.6 La aminopeptidasa N (APN; EC. 3.4.11.2)

La aminopeptidasa N (alanil aminopeptidasa) es una proteína integral de membrana de tipo II; consiste de 967 aminoácidos (en la APN de humano), con un pequeño dominio amino-terminal citoplasmático, una región transmembranal y una región extracelular que contiene al sitio activo con un átomo de zinc por monómero. En la membrana plasmática se encuentra como un homodímero unido covalentemente y para la mayoría de las especies se encuentra altamente glicosilada; es abundante en riñón, intestino e hígado pero se encuentra también en cerebro. Es una enzima poco específica; hidroliza preferencialmente sustratos con una alanina en el extremo N-terminal pero acepta también Phe, Tyr, Leu, Arg, Thr, Trp, Lys, Ser, Asp, His y Val, mientras que péptidos que inician con Pro o Glu no son sustrato de la enzima. Cabe mencionar que cuando el amino terminal es un residuo hidrofóbico como Leu, Tyr o Trp seguido de Pro la APN actúa de manera inusual liberando el dipéptido X-Pro (Barret, *et al.*, 1998).

A) Metalopeptidasas de la familia M1

			*			
		▼		▼		▼
PPII rata		QFSPT--YLLAW--AAMENWGLSIF--VIVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGF--IAYKKG				
APN humano		QMCAA--YLLAF--GAMENWGLVTY--VIAHELAHQWFGNLVTIEWVNDLWLNKEGF--ISYSKG				
APA raton		DHEPT--YLVCF--GAMENWGLVTY--VVAHELVAHQWFGNTVTMDWDDDLWLNKEGF--ISYSKG				
A-LAP rata		QFEPT--YLVAF--GAMENWGLTTY--TVSHELVAHQWFGNLVTMEWVNDLWLNKEGF--VSYERK				
P-LAP humano		QFEPL--YLVAF--GAMENWGLLTF--IIAHELAHQWFGNLVTMKWVNDLWLNKEGF--LSYFKG				
L-RAP humano		DFEPT--YLVAY--GAMENWGLITY--VIAHELAHQWFGNLVTMEWVNDLWLNKEGF--VSYNKG				
APE2 Levadura		QMEPT--YLVAF--GAMENWGLVTY--VVQHELAHQWFGNLVTMDWVEGLWLNKEGF--ISYSKG				
API Levadura		QMEAT--YLVAF--GAMENWGLVTY--VIQHELAHQWFGNLVTMDWVEGLWLNKEGF--ISYSKG				
PSA humano		QFEAT--YLVAF--GAMENWGLVTY--VVGHELAHQWFGNLVTMEWVTHLWLNKEGF--ISYSKG				
APB humano		QQQAV--YLIAL--GGMENPCLTFV--VIIHEISHSWFGNLVTNANWGEFWLNKEGF--TPYEKG				
LTA4H humano		QCQAI--YLIAL--GGMENPCLTFV--VIAHEISHSWTGNLVTNKTWDHFWLNKEGH--VPYEKG				
		Exopeptidasa		Firma catalítica		
PPII rata	100 %	S269	E408	E442	E464	Y528
APN humano	34 %	Q213	E355	E389	E411	Y477
APA raton	32 %	E215	E352	E386	E408	Y471
L-RAP humano	31 %	E200	E337	E371	E393	Y455
LTA4H humano	26 %	Q136	E271	E296	E318	Y383

B) Secuencias PPII

	*
Rata	QFSPT--YLLAW--YAAMENWGLSIF--VIVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGF--IAYKKG
Raton	QFSPT--YLLAW--YAAMENWGLSIF--VIVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGF--IAYKKG
Humano	QFSPT--YLLAW--YAAMENWGLSIF--VIVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGF--IAYKKG
Pajaro	QFSPT--YLLAW--YAAMENWGLSVF--VIVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGL--IAYKKG
Pes	QFSPT--YLLAW--YAAMENWGLSVF--VVVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGF--IAYKKG
Erizo	FLSPI--YLVAF--VAGMENWGLVTY--IIAHELGHQWYSNLVTQVYVDELWLKECF--ISYQKS

Figura 4. Alineamiento múltiple de estructuras primarias de **A)** peptidasas de la familia M1 alrededor del sitio activo; las flechas sobre la parte superior del alineamiento destacan los residuos S269, E408 y K463 de la PPII de rata; también se resaltan la firma exopeptidasa y la firma catalítica; en la parte inferior del alineamiento se observan los porcentajes de identidad entre la PPII y algunos miembros de la familia y residuos equivalentes a residuos de la PPII analizados en esta tesis. * destaca a la Y332-PPII, residuo presente solo en las secuencias de PPII. **B)** PPII alrededor del sitio activo en diferentes especies (tomado de Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2006).

IV. ANTECEDENTES

En la familia M1, los determinantes estructurales de la especificidad son poco conocidos. Como se mencionó anteriormente, la LTA4H es un miembro de la familia M1 y tiene su estructura cristalográfica resuelta desde hace algunos años, por cual ha sido uno de los miembros mas estudiados. Recientemente se resolvió la estructura del factor F3 que interacciona con tricorn; este factor también es miembro de la familia M1.

Las estructuras de la LTA4H y del F3 consisten en tres y cuatro dominios respectivamente. Los dominios I, II y IV de F3 son equivalentes a los tres dominios de la LTA4H, mientras que el dominio II es característico de F3 (Fig. 5). La superimposición de los tres dominios equivalentes entre la LTA4H y el F3 demuestra que estos son similares. El dominio N-terminal forma una estructura que abarca al sitio activo y el dominio catalítico de una manera similar a como es observado en la termolisina, incluyendo los residuos que son ligandos del zinc. En contraste, el dominio C-terminal está parcialmente conservado y difiere en algunas posiciones del de la LTA4H (Kyrieleis *et al.*, 2005). Es de destacar que la similaridad estructural entre los dominios catalíticos, la conservación a nivel de secuencia en el sitio activo y los estudios por mutagénesis realizados para estas dos enzimas (Rudberg *et al.*, 2002, Rozenfeld *et al.*, 2002) sugieren que ellas usan un mecanismo catalítico común y que difieren en la especificidad hacia su sustrato debido a cambios en algunos aminoácidos alrededor del sitio activo.

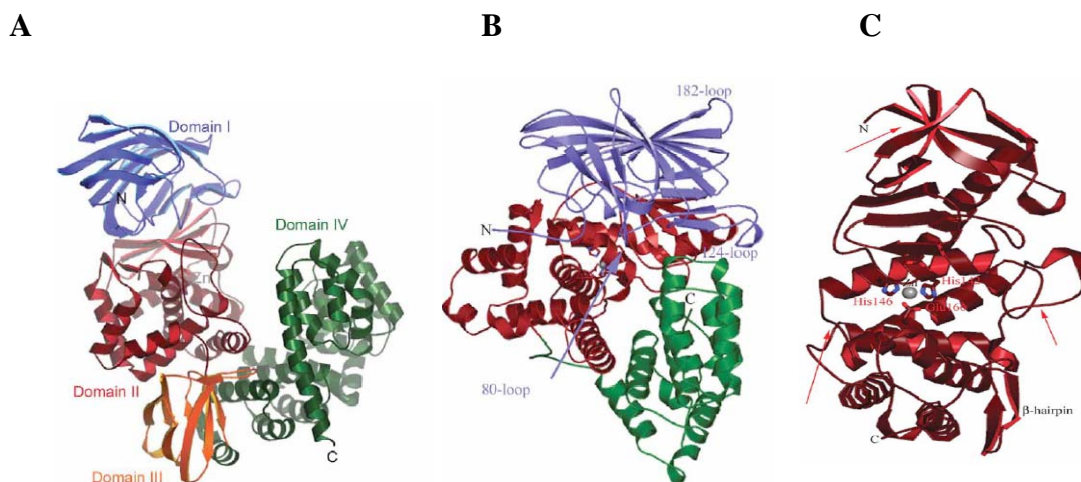


Figura 5. Estructura cristalográfica de: **A)** F3 (factor F3 que interactúa con tricorn); **B)** LTHA4 (leucotrieno A4 hidrolasa); **C)** Termolisina. En las representaciones se observan los dominios catalíticos para cada enzima en igual color (rojo), así como el dominio N-terminal (azul) y el dominio C-terminal (verde). También se observan los residuos que coordinan al zinc en el sitio activo (tomada de Kyrieleis *et al.*, 2005).

IV.1 Generalidades en el sitio activo en la familia M1

IV.1.1 Mecanismo de hidrólisis

El mecanismo catalítico propuesto para la LTA4H y otros miembros de la familia M1 es similar al mecanismo propuesto para la termolisina. Para la LTA4H y la termolisina este mecanismo ha sido ampliamente explorado mediante el análisis cristalográfico y estudios por mutagénesis sitio dirigida de las mismas. Estos estudios han permitido por homología, el análisis y la generalización de un mecanismo catalítico común a los demás miembros de la familia M1. El átomo de zinc unido al sitio activo por dos histidinas y el residuo de glutamato del extremo C-terminal de la firma catalítica actúan como un ácido de Lewis. Una molécula de agua se une al glutamato catalítico y al átomo de zinc, actuando como una base de Lewis e interaccionando con el carbono carbonílico del enlace peptídico a ser hidrolizado y generando el estado de transición. De manera similar ha sido demostrado que el glutamato en la firma catalítica de la familia M1 actúa de forma análoga al de la termolisina (Bauer *et al.*, 1994).

Recientemente se propuso un modelo en el cual se establece que la hidrólisis del péptido inicia por la LTA4H de levadura con el ataque nucleofílico que realiza la molécula de agua polarizada, la cual está coordinada por el zinc del sitio activo. Se forma un estado de transición en el cual enlazan el átomo de carbono del enlace a ser hidrolizado en el sustrato y la molécula de agua polarizada, el oxígeno del carbono carbonílico del enlace a hidrolizar queda cargado negativamente y esta carga es estabilizada inicialmente a través de dos puentes de hidrógeno con dos tirosinas (Y244 y Y429) y también por su interacción con el zinc catalítico. Esto permite que se desestabilice y rompa el estado de transición produciendo una deslocalización electrónica entre el oxígeno carbonílico y el átomo de carbono del enlace a hidrolizar. En el paso final un protón es donado desde una tirosina (Y429) a la amida del N-terminal naciente y el péptido ha sido completamente hidrolizado (Thompson *et al.*, 2006, Fig. 6A).

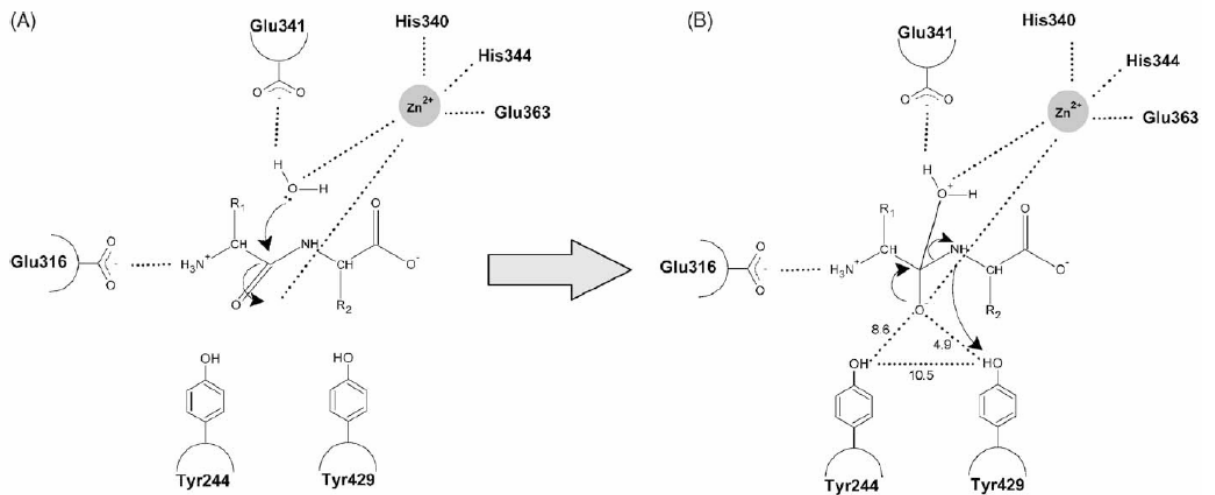


Figura 6. Mecanismo de hidrólisis de péptidos propuesto para la LTA4H de *Saccharomyces cerevisiae*. **A)** ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico del enlace a hidrolizar y formación del estado de transición. **B)** estabilización del estado de transición a través de puentes de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico cargado negativamente y las dos tirosinas (tomado de Thompson *et al.*, 2006).

IV.2 Construcción de un modelo teórico para el sitio activo de la PPII y de la APN

En ausencia de una estructura tridimensional para la PPII, se construyeron en el grupo modelos teóricos para los sitios activos de la PPII y de la APN, basado en la estructura cristalográfica de la LTA4H acomplejada al inhibidor bestatina (Thunnissen *et al.*, 2001). Se modelaron la PPII de rata desde el aminoácido 263 hasta el 623 y para la APN de humano desde el aminoácido 190 al 567, lo que corresponde al dominio catalítico, región en donde las dos enzimas se encuentran mejor conservadas y pueden realizarse estudios de estructura-función que puedan relacionar los sitios activos.

Basándose en el alineamiento múltiple para algunos miembros de la familia, en la estructura secundaria del templado (LTA4H) y empleando un método similar al que se utilizó para modelar el sitio activo de la APA (Rozenfeld *et al.*, 2002), se construyó un alineamiento secuencia-estructura entre la PPII, APN y la LTA4H. Dentro del alineamiento se definieron regiones estructuralmente conservadas, sobre las cuales se transfirieron las coordenadas de la estructura templado. Las regiones faltantes fueron modeladas de acuerdo a su longitud y tipo de aminoácidos, así como a los residuos localizados en las fronteras de las regiones estructuralmente conservadas colindantes. Se colocó el ión zinc en el sitio activo del modelo, basándose en la posición del zinc en la estructura de referencia, así como los cationes (Na^+) necesarios para asegurar la neutralidad eléctrica del sistema. Los sistemas proteína y zinc en presencia de agua fueron sometidos a ciclos de minimización de energía seguidos de dinámicas moleculares cortas (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2006).

Los modelos de los sitios activos para la PPII y la APN presentan una organización similar (Fig. 7). En la zona N-terminal predominan las láminas β y el dominio catalítico está constituido principalmente por α hélices que contienen las firmas características de la familia. Los sitios activos modelos se estructuran por tres α hélices entrecruzadas, de manera similar al sitio activo de la termolisina (Colman *et al.*, 1972). La primera de estas hélices contiene parte de la firma catalítica y presenta a dos de los ligandos del zinc; la segunda hélice presenta al Glu C-terminal de la firma catalítica, tercer ligando del metal; mientras que la tercera presenta a un residuo de tirosina que se ha involucrado en el estado

de transición. En los modelos también se aprecian dos lazos que se aproximan al conjunto de hélices del sitio activo.

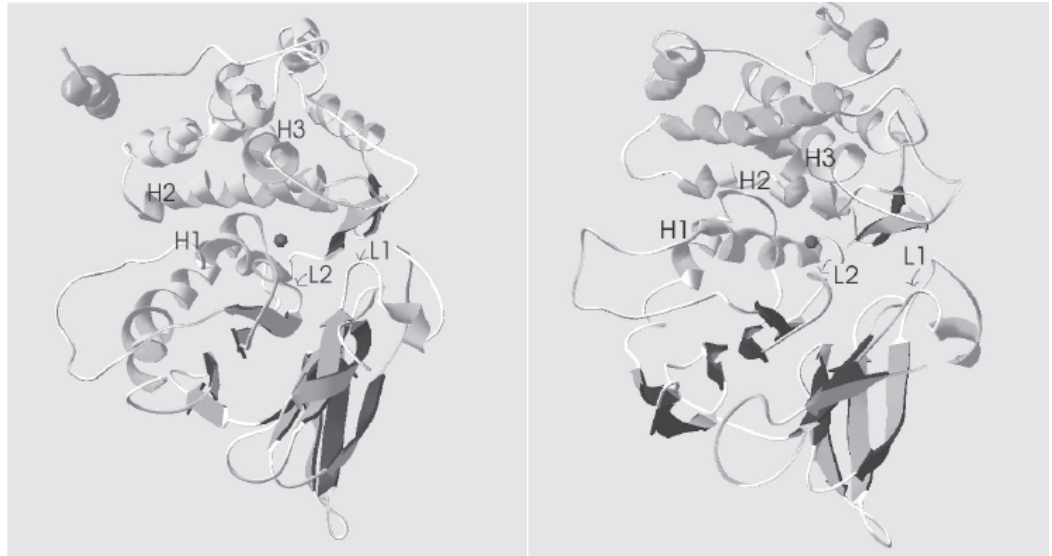


Figura 7 Modelos de los sitios activos para la PPII de rata (izquierda) y para la APN de humano (derecha). En la zona N-terminal predominan las láminas β y el dominio catalítico esta constituido principalmente por α -hélices que contienen las firmas características de la familia. H identifica las hélices y L los lazos que conforman el sitio activo (tomado de Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2006).

Para la APA Rozenfeld y colabores generaron también un modelo teórico empleando como templado a la LTA4H; en su modelo predicen que la APA está compuesta de tres dominios diferentes, un dominio N-terminal consistente principalmente de láminas β , un dominio del sitio activo globular y un dominio C-terminal de α -hélices (Rozenfeld *et al.*, 2002). Estos modelos teóricos generados para diferentes miembros de la familia y datos reportados en la literatura para la estructura de las aminopeptidasas generados por mutagénesis dirigida son una excelente herramienta para entender la organización del sitio activo de la PPII.

IV.3 Identificación de residuos implicados en la actividad o especificidad en la familia M1

Varios grupos se han dado a la tarea de analizar algunos de los residuos presentes en el sitio activo de peptidasas de la familia M1 (LTA4H, APA, APN, PPII) que podrían estar involucrados en la actividad y especificidad de estas enzimas. Encontraron que algunos residuos cumplen funciones cruciales en el sitio activo. Así se identificaron ligandos del ión metálico (Zn^{2+}), residuos que estabilizan el estado de transición durante la catálisis al interaccionar con una molécula de agua y posicionándola de una manera específica para que el ataque nucleofílico sobre el enlace a hidrolizar se efectúe. También se han encontrado algunos residuos que intervienen en el reconocimiento del sustrato. Con fines prácticos agruparemos los resultados reportados en la literatura para las diferentes funciones que cumplen estos residuos en las peptidasas.

IV.3.1 Residuos ligando del ión metálico Zn^{2+}

Estudios sobre la relación estructura-función en la LTA4H y por homología con la termolisina permitieron identificar los residuos ligantes del átomo de zinc. Destacando que éste está coordinado por los dos residuos His y el residuo Glu de la firma catalítica **295HEXXH...18E318** (Medina *et al.*, 1991). Los estudios por mutagénesis sitio dirigida sobre los residuos equivalentes en las otras peptidasas (tabla 2) fueron consistentes con este papel como ligandos del zinc.

Medina *et al.*, 1991 mostraron que hay una molécula de agua en la esfera de coordinación del zinc, con la cual este interacciona activándola y facilitando el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico a hidrolizar.

En la APN el modelo predice que el cuarto ligando es una molécula de agua que se encuentra interaccionando por puentes de hidrógeno con dos glutamatos, el de la firma exopeptidasa (E355) y el primero de la firma catalítica (E389), mientras que en el modelo de la PPII, el cuarto ligando es el primer glutamato de la firma catalítica **HEICH** (E442). El

E442 en conjunto con el E408 (firma exopeptidasa 405_AAMEN_409) posicionan a una molécula de agua en las cercanías del ión metálico (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2006).

Peptidasa	Residuos (HEXXH.. ₁₈ E)	Referencia
LTA4H (humano)	295, 299, 318	Medina <i>et al.</i> , 1991
PPII (rata)	441, 445, 464	Papadopoulos <i>et al.</i>, 2001
APN (cerdo)	383, 387, 384	Luciani <i>et al.</i> , 1998
APA (ratón)	385, 389, 408	Wang y Cooper, 1993
Factor F3 que interactúa con tricorn (<i>Thermoplasma acidophilum</i>)	265, 269, 288	Kyrieleis <i>et al.</i> , 2005
*Termolisina (<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>)	142, 146, 166	Matthews, 1988

Tabla 2. Residuos en la firma catalítica (HEXXH..₁₈E) que se coordinan al zinc en la familia M1. Se muestran residuos para las peptidasas de la familia M1 que guardan un mayor porcentaje de identidad con la PPII. *La termolisina pertenece a la familia M4 del Clan MA, tiene una estructura terciaria resuelta y también guarda una gran similitud de secuencia con la PPII alrededor del sitio activo.

IV.3.2 Residuos involucrados en la estabilización del estado de transición

Alineamientos entre las secuencias de estas peptidasas con otras hidrolasas, en particular la termolisina, ayudaron en el reconocimiento de otros residuos implicados en la catálisis. Se identificaron al E296 y la Y383 de la LTA4H como análogos del E143 y la H231 de la termolisina, participando como aceptor y donador de un protón durante la catálisis respectivamente (Blomster *et al.*, 1995, Holmes *et al.*, 1982). Una vez identificados estos residuos en la LTA4H, también se estudiaron en otros miembros de la familia M1 (Tabla 3), confirmándose los roles propuestos inicialmente.

El análisis mutagénico del E442 de la firma catalítica (HEICH en la PPII) demuestra que la carga y la longitud de este residuo juegan un papel importante en el mecanismo catalítico de la enzima; se ha propuesto que este residuo polariza a la molécula de agua y la ubica en una posición determinada para que pueda ser coordinada por el Zn²⁺ y posteriormente sea

favorecido el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico del sustrato (Papadopoulos *et al.*, 2001). Sin embargo, en el modelo teórico del sitio activo de PPII realizado por Chávez-Gutiérrez esto no se observa (no mostrado).

Peptidasa	Residuos	Referencia
LTA4H (humano)	E296, Y383	Blomster <i>et al.</i> , 1995
PPII (rata)	E442, Y528	Papadopoulos <i>et al.</i>, 2001
APN (cerdo)	E384, Y470	Luciani <i>et al.</i> , 1998
APA (ratón)	E386, Y471	Vazeux <i>et al.</i> , 1996, 1998
Termolisina (<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>)	E143, H231	Holmes <i>et al.</i> , 1982

Tabla 3. Residuos involucrados en la estabilización del estado de transición. Participan como donador (E) y como aceptor (Y) de un protón durante la catálisis en la familia M1. En la termolisina se identificó un residuo de histidina como el aceptor de un protón durante la catálisis.

El residuo Y528 de la PPII también fue analizado. Los parámetros cinéticos obtenidos para mutantes en este residuo (Y528) confirman su participación en la catálisis, probablemente a través de estabilizar el estado de transición (Papadopoulos *et al.*, 2001).

IV.3.3 Residuos que intervienen en el reconocimiento del amino terminal del sustrato

Hasta el momento hemos descrito las funciones que tienen algunos residuos en el sitio activo de las peptidasas de la familia M1. Son residuos que se encuentran conservados y su función en el sitio activo es similar.

Al hablar de los residuos que intervienen en el reconocimiento del sustrato, estamos hablando de la especificidad en la familia y como veremos más adelante, hay algunos residuos que no se encuentran conservados para algunos miembros de la familia M1 de las peptidasas. Esto es muy importante en el análisis de la PPII, ya que en la familia M1, las peptidasas reconocen sustratos que tienen el extremo NH₂-terminal libre y cuya

especificidad es muy variada, a excepción de la PPII, que es una enzima altamente específica para su sustrato y que a diferencia de los demás miembros de la familia reconoce un sustrato cuyo extremo NH₂-terminal es p-glutamato; se le clasifica actualmente como *omegapeptidasa* para distinguirla de las aminopeptidasas.

La remarcada similitud estructural entre los dominios catalíticos de la LTA4H y el factor F3, el alto nivel de secuencia conservada alrededor del dominio catalítico en la familia M1 y estudios por mutagénesis dirigida (Schomburg *et al.*, 1999; Rudberg *et al.*, 2002, Rozenfeld *et al.*, 2003) sugieren que la familia comparte un mecanismo catalítico común y que las diferencias entre la preferencia hacia su sustrato están soportadas por cambios discretos en el sitio activo o sus alrededores. En las aminopeptidasas de la familia M1, el reconocimiento del grupo N-terminal libre de sustratos e inhibidores involucra interacciones por puente de hidrógeno con dos residuos altamente conservados.

IV.3.3.1 El glutamato de la firma exopeptidasa

Los miembros de la familia M1 contienen un motivo conservado (**GXMEN**) localizado hacia el lado N-terminal de la firma catalítica (**HEICH₁₈E**). Para la LTA4H, la APA y la APN datos recientes permiten sugerir que este motivo participa en la función exopeptidasa de estas enzimas (Blomster *et al.*, 1995, Vazeux *et al.*, 1998, Luciani *et al.*, 1998).

La estructura de la LTA4H acomplejada a su inhibidor competitivo bestatina, mostró que el Glu-271 localizado en la firma exopeptidasa y la Gln-136 se encuentran en el sitio activo e interaccionan mediante un puente de hidrógeno con el grupo amino libre del inhibidor, el cuales es químicamente similar al N-terminal del sustrato peptídico, sugiriendo la participación de estos dos residuos en la unión del grupo N-terminal de sustratos (Rudberg *et al.*, 2002).

En la PPII el glutamato de la firma catalítica corresponde al E408 de la secuencia ₄₀₅AAMEN₄₀₉, por lo cual surgió el interés de analizar este residuo, especialmente en el papel que pudiese cumplir en el reconocimiento del TRH. El cambio por mutagenesis E408Q produjo una enzima completamente inactiva, mientras que el cambio E408D

produjo una enzima con una actividad específica disminuida. El efecto de esta mutación sobre la actividad fue debido a una disminución en la V_{\max} . Los valores de K_m para el TRH no se alteraron significativamente y la relación V_{\max}/K_m fue 30 veces menor que la obtenida para la enzima silvestre (Papadopoulos *et al*, 2001). Sin embargo, Papadopoulos y colaboradores no propusieron una explicación para el comportamiento de este residuo.

En los modelos teóricos para los sitios activos de la PPII y de la APN, destaca la presencia de un puente salino en la PPII, en el cual participa el carboxilato del glutamato de la firma exopeptidasa. En el modelo el E408 de la PPII establece un puente salino con el grupo amino de la K463, la cual está posicionada en la hélice 3 y es vecina de uno de los ligandos del zinc (E464). Mientras que el equivalente en la APN el E355, interacciona con el solvente y con la Y278; este residuo Y278 se encuentra conservado en la familia (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2006)

El modelo teórico que Chávez-Gutiérrez realizó para el sitio activo de la PPII llevó a la identificación de un puente salino entre el E408 y la K463 (Fig. 8A). Este residuo de lisina no se encuentra conservado en la familia. En casi todos los demás miembros se encuentra en esta posición una Asn (N), a excepción de algunas aminopeptidasas bacterianas y de la enzima humana L-RAP que presenta lisina (K392; Fig. 8C) igual que la PPII. Los datos obtenidos por el grupo de Papadopoulos sugieren que tanto la carga como la longitud del residuo E408 es importante para la actividad *omegapeptidasa*, lo cual podría ser congruente con la interacción carga-carga observada en el sitio activo del modelo teórico. Esta observación en el modelo teórico y los datos obtenidos por Papadopoulos y colaboradores sobre el E408 sugirieron la existencia de una interacción carga-carga que pudiera contribuir a la especificidad de la *omegapeptidasa*. Para validar la existencia de una interacción salina, se construyeron y analizaron mutantes en el residuo K463 de la PPII de rata. Las mutantes PPII-K463N, K463Q, y K463E, mostraron niveles de expresión similares a los de la enzima silvestre, lo cual se verificó por medio de Western blot, mediante la expresión de la PPII silvestre y PPII mutante fusionada a una etiqueta de 6xHis en células COS-7. Estos cambios produjeron enzimas inactivas cuando se evaluaron frente a TRH- β NA, el sustrato de la enzima silvestre. La mutante K463R perdió también su actividad *omegapeptidasa* a

pesar de que este residuo (R) conserva similitud bioquímica con la K, lo que sugiere que estas las longitud de la cadena lateral es importante. El modelo teórico realizado para esta mutante (PPII-K463R) muestra que la cadena lateral de la R463 no cabe en el sitio activo del modelo teórico de la PPII y por lo tanto se posicionó apuntando el solvente, alejada del carboxilato de la cadena lateral del E408 (Fig. 8B). Los resultados obtenidos para la K463 y el E408 sugieren fuertemente la existencia de un puente salino en el sitio activo de la PPII (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2006).

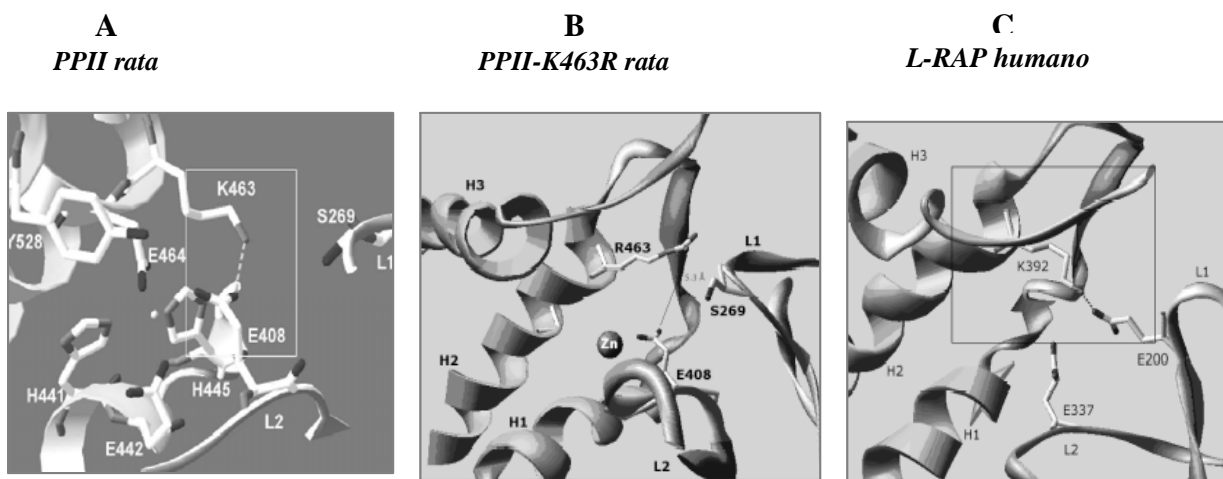


Figura 8. Modelos del sitio activo de peptidasas de la familia M1 e interacciones del Glu de la firma exopeptidasa: **A.** Interacción entre el **E408** de la firma exopeptidasa y la **K463** en el sitio activo de la PPII. Hacia la parte derecha de la figura en este panel se encuentra la **S269** sobre un lazo que se aproxima al sitio activo; este residuo es contraparte de los residuos involucrados en el reconocimiento del N-terminal de sustratos e inhibidores en los demás miembros de la familia M1. **B.** Modelo teórico para la mutante inactiva PPII-K463R. La longitud de la cadena lateral de la arginina (R) impide la generación de una interacción carga-carga con el E408. **C.** Modelo teórico para el sitio activo de la L-RAP de humano. La K392, contraparte de la PPII-K463, interactúa con el E200 (equivalente del PPII-S269) neutralizando la carga de la K y por lo tanto dejando al E337 (contraparte del PPII-E408) libre, para interactuar con sustratos que tengan el N-terminal libre (*tomado de Chávez-Gutiérrez et al.*, 2006).

IV.3.3.2 El residuo del lazo 1 implicado en la especificidad

En el modelo teórico propuesto para el sitio activo de la APA, el E215 está presente en el sitio activo, cerca del átomo de zinc e interactúa con el N-terminal de un inhibidor (ácido 4-amino-4-fosfonobutírico) por vía de un puente de hidrógeno entre el oxígeno de la

función ácido de la cadena lateral del residuo y el grupo amino libre del inhibidor (Rozenfeld *et al.*, 2003; Fig. 9). La contraparte del E215 de la APA en la LTA4H corresponde a la Q136 y en la estructura cristalográfica se observa una interacción similar entre la Q136 y el α -amino de la bestatina (Thunnissen *et al.*, 2001). Lo anterior sugiere que este residuo es parte del sitio de unión del grupo N-terminal del sustrato; el análisis mutacional revela que este residuo puede estar involucrado en la actividad epoxihidrolasa de la LTA4H y no con la actividad aminopeptidasa; sin embargo, la interpretación del papel funcional de la Q136 aun no es muy clara (Rudberg *et al.*, 2002). En la APA cambios sobre el residuo E215 por Asp o Ala disminuyen la actividad frente a su sustrato. Los valores de K_m para E215D y E215A fueron 10 y 18 veces más altos respectivamente que los de la enzima silvestre, involucrando al E215 en la unión del sustrato. Los valores de k_{cat} para E215D y E215A fueron menores al valor de la enzima silvestre por factores de 14 y 16 veces respectivamente, conllevando a una reducción en la eficiencia enzimática en un factor de 141 y 100, respectivamente. En contraste, el cambio de E215 por Gln no tuvo un efecto significativo sobre la hidrólisis del sustrato, aunque se observó una leve disminución en la K_m con respecto a la enzima silvestre, sugiriendo que persiste la interacción entre la cadena lateral de la mutante E215Q y el sustrato, lo que es consistente con el modelo de la APA mutante E215Q (Fig. 9). El grupo amida en la cadena lateral de la Gln establece una interacción adicional con el grupo carboxilo del E352 de la firma exopeptidasa (E408 en PPII), lo que lo mantiene en una posición óptima para la polarización de la molécula de agua catalítica, favoreciendo de esta manera el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico a hidrolizar. Los resultados del análisis bioquímico muestran un aumento en la eficiencia catalítica para la mutante E215Q debida a un incremento en el valor de la k_{cat} que es 6 veces mayor que el de la enzima silvestre (Rozenfeld *et al.*, 2003).

APA silvestre (E215)

APA mutante(E215Q)

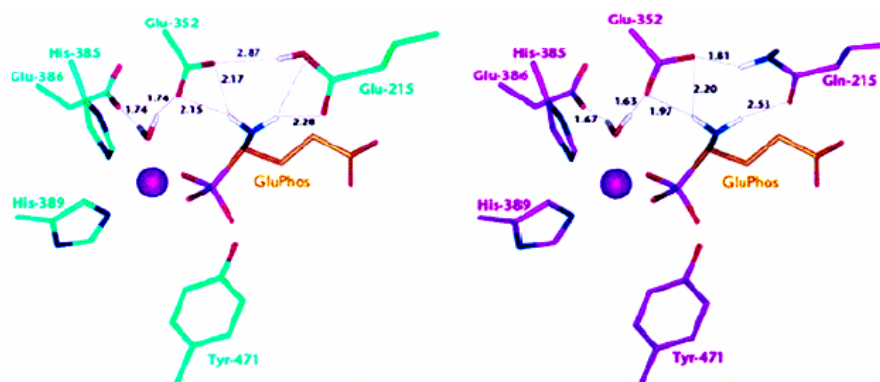


Figura 9. Modelos del sitio activo de la APA silvestre y APA mutada E215Q en presencia del inhibidor ácido 4-amino-4-fosfonobutírico. El átomo de zinc se ilustra con un círculo, los puentes de hidrógeno son indicados con una línea gris y las distancias son dadas en ángstrom (tomada de Rozenfeld *et al.*, 2003).

Peptidasa	Residuos	Referencia
LTA4H (humano)	E271	Thunnissen <i>et al.</i> , 2001
	Q136	
PPII (rata)	E408	Papadopoulos <i>et al.</i>, 2001
	S269	Chávez-Gutiérrez <i>et al.</i>, 2006
APN (cerdo)	E350	
	Q213	Luciani <i>et al.</i> , 1998
APA (ratón)	E352	Vazeux <i>et al.</i> , 1998
	E215	Rozenfeld <i>et al.</i> , 2003

Tabla 4. Residuos que intervienen en el reconocimiento del amino terminal del sustrato. Para la PPII uno de estos residuos no se encuentra conservado, dato que correlaciona con la especificidad diferente entre la PPII y los demás miembros de la familia.

En conclusión, el reconocimiento del grupo amino-terminal de sustratos o inhibidores por las aminopeptidasas de la familia M1 implica el enlace de hidrógeno y la interacción con la carga del glutamato de la firma exopeptidasa (aniónico sitio), además de otra interacción por puente de hidrógeno con el Glu o Gln como se demostró para la APA-Glu-215 y

LTA4H-Gln-136. En la PPII este último residuo no se encuentra conservado; en esta posición la PPII tiene una serina. Esto es importante pero no sorprendente debido a la alta especificidad de la enzima y considerando que esta no es una *amino*peptidasa sino una *omega*peptidasa.

Cuando el TRH se posiciona en el sitio activo del modelo teórico para la PPII, el puente salino entre K463-E408 no se ve afectado. El TRH en el sitio activo adopta la misma orientación que se observa con la bestatina en el sitio activo en la estructura de la LTA4H. El pGlu del TRH se encuentra entre la cadena alifática del E408 y la Y404 localizada en el lazo 2. La interacción entre la Y404 y el anillo pGlu es similar a la que se observa en la estructura de la LTA4H entre LTA4H-Y267 (motivo exopeptidasa) y el anillo fenólico de la bestatina. En adición, el NH del pGlu establece un puente de hidrógeno con el carbonilo del esqueleto en la A406, como ocurre con la bestatina y la LTA4H-G269 del motivo exopeptidasa. Sin embargo, el grupo cetónico del anillo pGlu se comporta como un aceptor de protones mediante un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo de la S269 en la PPII (Fig. 10). El análisis de los residuos que interaccionan directamente con el anillo de la bestatina en la estructura de la LTA4H y de los residuos que interaccionan con el pGlu en el modelo de la PPII mostró a la S269-PPII como el único residuo específico de *omega*peptidasa (tabla 5, cuadros sombreados). No se encontraron diferencias entre los residuos que constituyen las bolsas de unión para el anillo de la bestatina y el pGlu del TRH (tabla 5, cuadros claros). El modelo de la PPII con el TRH predice que el residuo del lazo 1 (S269) está involucrado en el reconocimiento del amino-terminal. En contraste, el residuo del lazo 2 (E408) es neutralizado por la K463 y no por el sustrato (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2006).

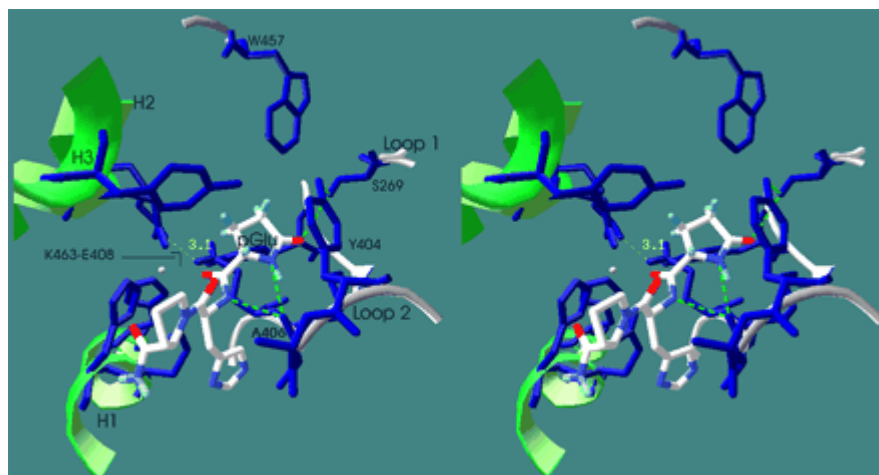


Figura 10. Modo de unión del TRH en el sitio activo de la PPII de rata. Se observan los residuos de la PPII (azul oscuro) que interaccionan con el pGlu del TRH (pGlu-His-ProNH₂; esquema de colores CPK= Corey-Pauling-Koltun). Los puentes de hidrógeno entre la PPII y el pGlu del TRH se observan como líneas punteadas de color verde iluminado y el puente salino E408-K463 se observa de color verde opaco. El zinc se observa como una esfera gris (tomada de Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2006).

	Bestatin amino terminal		Bestatin ring (stacking)	Bestatin backbone	Bestatin ring's pocket			
	LTA4H-bestatin structure	Q136	E271	Y267	G269 backbone (C=O)	Q134	M270	Y378 ¹
PPII-TRH model	<Glu (C=O)	<Glu (NH)	<Glu ring (stacking)	<Glu backbone	<Glu's pocket			
	S269	A406 ² backbone (C=O)	Y404	A406 backbone (C=O)	Q267	M407	F523	W457

Tabla 5. Residuos que interaccionan directamente con la bestatina o con el TRH y residuos que forman una cavidad alrededor de ellos en la estructura de la LTA4H y el modelo teórico para la PPII. Hacia la izquierda se encuentran los residuos que interaccionan directamente con la bestatina o con el pGlu del TRH. Los cuadros sombreados indican las partes que interaccionan en la bestatina o en el TRH. Hacia la derecha se encuentran los residuos que forman una cavidad de 6 Å alrededor del pGlu o del anillo de la bestatina (tomada de Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2006)

IV.3.4 Residuos específicos de la PPII con papel desconocido

IV.3.4.1 El Y332

El alineamiento múltiple para la familia M1 mostró que el residuo Y332 es específico de secuencias tipo PPII, el resto de las secuencias presenta de manera conservada una leucina (Fig. 4*; L279 en APN). La Y332 se localiza, en el modelo teórico para la PPII, sobre un lazo que se aproxima al lazo 2 que contiene a la firma exopeptidasa (Fig. 12A). El análisis de mutantes de PPII en este residuo muestra cambios en la actividad, en la Km y kcat para la mutante Y332L que son muy modestos (Fig. 11); sin embargo, el incremento en la kcat mostrado para la mutante Y332F (52%) con respecto de la enzima silvestre (Fig. 11), así el incremento de la actividad específica frente al sustrato TRH[Phe]-βNA (Fig. 12B) llama la atención. Tomando en cuenta que la mutante E408D afecta notablemente la kcat de la PPII, Chávez-Gutiérrez propuso que los cambios observados para las mutantes Y332L y Y332F se explican a través de su posible interacción con el E408. El incremento en la kcat de la Y332F indica que la pérdida del grupo hidroxilo de la tirosina y por ende del puente de hidrógeno que este forma, facilita la catálisis y sugiere también que la presencia del anillo fenólico es importante, probablemente por efectos sobre el empaquetamiento (stacking) (Chávez-Gutiérrez, 2005).

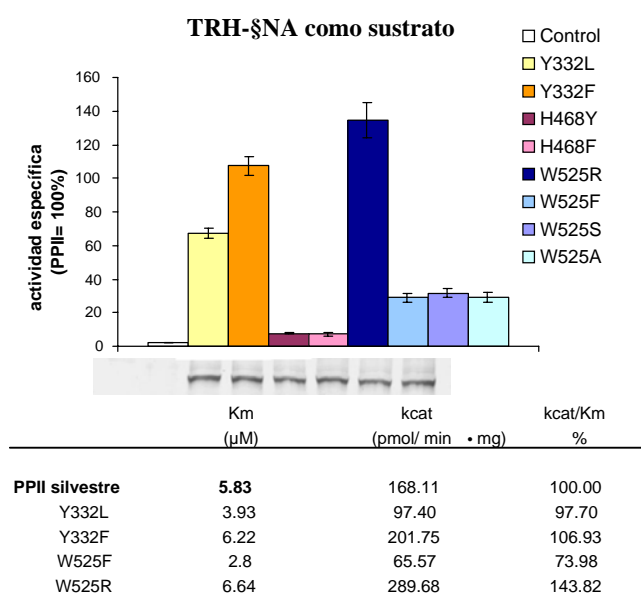


Figura 11. Actividad de mutantes en residuos con papel desconocido en el sitio activo de la PPII. La actividad fue determinada en membranas de células COS-7 transfectadas con la PPII silvestre y mutantes de PPII, empleando un vector que expresa EGFP como control. La actividad específica se midió empleando TRH-βNA 400 μM como sustrato. En la parte inferior de la gráfica se muestran datos de Western blot de membranas de células COS-7 transfectadas con la PPII silvestre y mutantes de PPII fusionadas a una secuencia de 6 histidinas. En el panel inferior se muestran las constantes catalíticas determinadas para el TRH-βNA. Las eficiencias catalíticas se indican como porcentaje del valor para la enzima silvestre (tomado Chávez-Gutiérrez 2005).

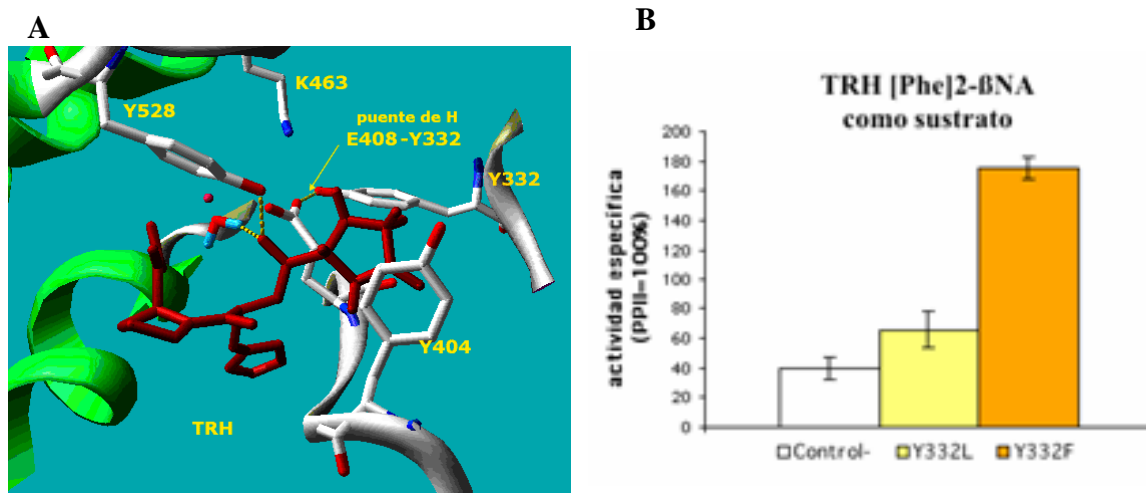


Figura 12. El Y332 en el sitio activo de la PPII. **A.** TRH en el sitio activo del modelo de PPII. Se observa que el carbonilo del enlace peptídico N-terminal establece puentes de hidrógeno con el agua catalítica y la Y528, mientras que la Y332 establece un puente de hidrógeno con el E408. **B.** Actividades específicas determinadas en membranas de células COS-7 transfectadas con vectores de expresión para EGFP (control), PPII o mutantes de PPII, usando TRH[Phe]²-βNA como sustrato. Las actividades específicas se normalizaron por proteína total (pmol/min•mg prot) y se muestran como porcentaje del valor de la enzima silvestre ± error estándar; de dos transfecciones independientes (tomado Chávez-Gutiérrez, 2005).

Otros residuos como W525 e H468 se encuentran en el sitio activo del modelo teórico y son específicos de secuencias codificantes para la PPII (Fig. 13).

IV.3.4.2 El residuo W525

En el modelo teórico para la PPII, el W525 se localiza en una zona accesible al solvente en la cual interaccionan cuatro hélices, entre las que se encuentran las tres que conforman el sitio activo. Estas hélices interaccionan a través de varios puentes salinos, entre ellos el E471-R488 (Fig 13A).

Se realizaron mutantes de la PPII en este residuo a arginina, fenilalanina, serina y alanina. Los resultados obtenidos para la mutante W525R mostraron que la arginina es el único aminoácido que puede sustituir apropiadamente a la cadena original, mientras que los cambios a Phe, Ala o Ser producen enzimas con actividades disminuidas en relación a la

enzima silvestre. Se determinaron las constantes catalíticas frente a TRH-βNA para las mutantes W525R y W525F. Los datos indican que los cambios se deben principalmente a cambios en la eficiencia catalítica. No obstante, la comparación entre las mutantes muestra una diferencia de más de ~2.5 veces en la Km (Fig. 11; Chávez-Gutiérrez, 2005).

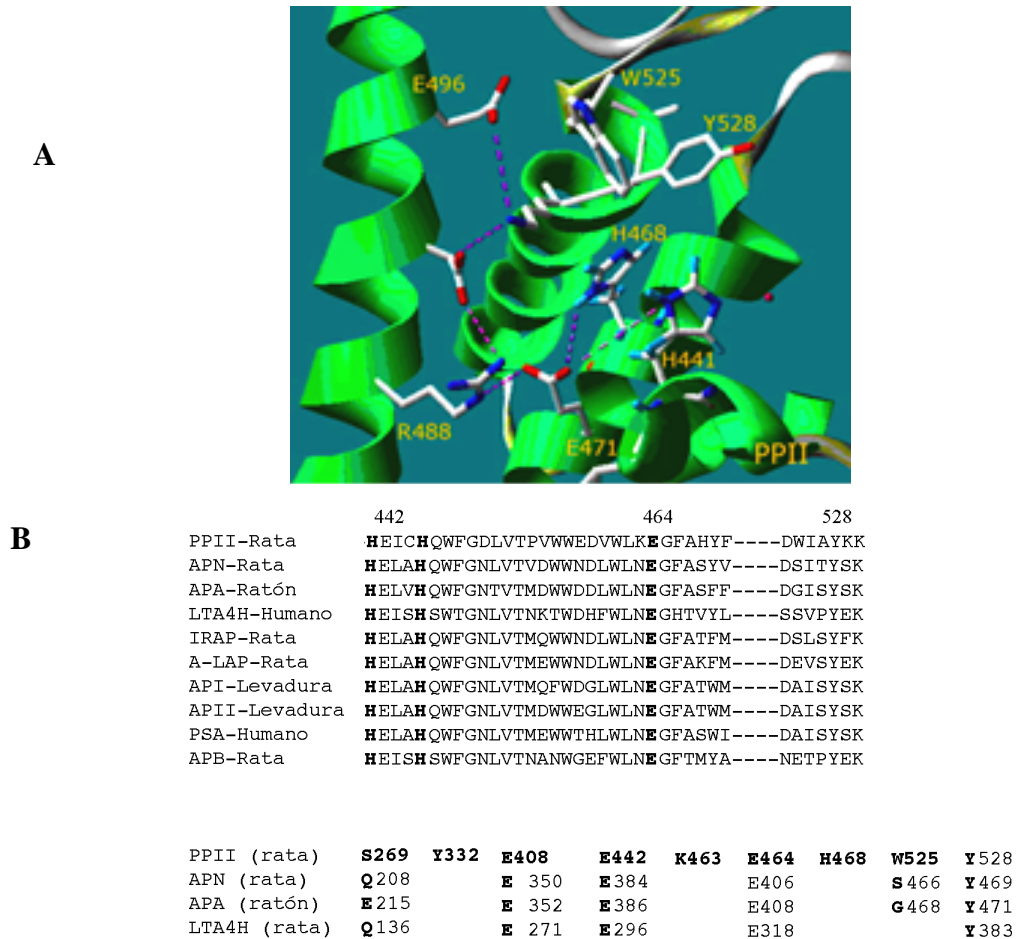
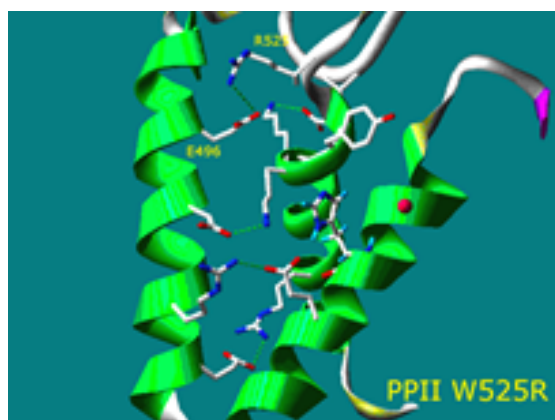


Figura 13. Residuos con función desconocida en el sitio activo de la PPII: **A.** Modelo teórico para el sitio activo de la PPII. Se observan las interacciones entre las cuatro hélices incluyendo las tres que conforman el sitio activo **B.** Alineamiento de secuencias para las diferentes peptidasas de la familia M1 alrededor del sitio activo. En el panel superior, en negritas se resaltan los residuos que conforman la firma catalítica y en el panel inferior se destacan algunos residuos de la PPII y sus contrapartes en algunos miembros de la familia (tomado de Chávez-Gutiérrez, 2005).

Como se mencionó anteriormente de la inspección en el modelo teórico para el sitio activo de la PPII, se encontró que el W525 está localizado en una zona accesible al solvente. En esta región interactúan cuatro hélices, tres de las cuales conforman el sitio activo; estas cuatro hélices interactúan a través de puentes salinos. La sustitución W525R en el modelo teórico sugiere que la R525 establece un puente salino con el E496, un residuo que en el modelo de la PPII silvestre se encontró interactuando con el solvente (Fig. 14A; Chávez-Gutiérrez, 2005).

A



B

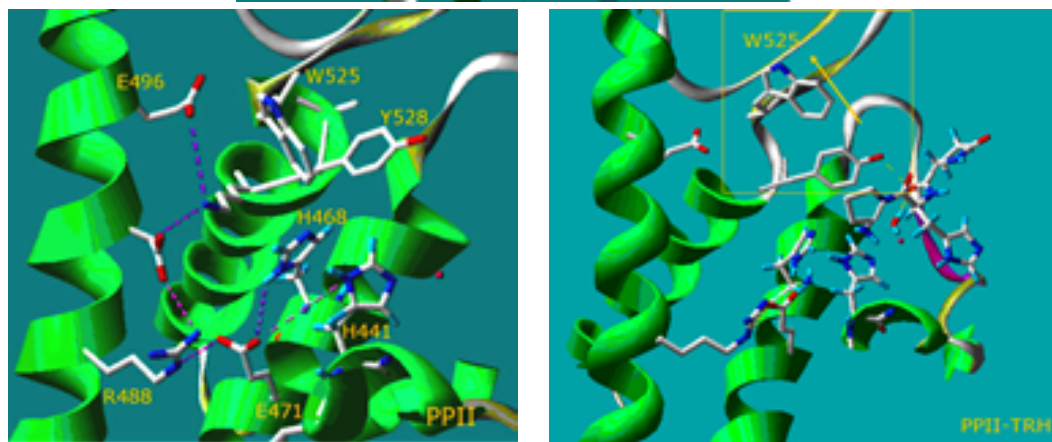


Figura 14. La posición 525 en el sitio activo de la PPII. **A.** Modelo teórico de la mutante W525R. La cadena R525 estableció durante la dinámica molecular un puente salino con el E496. **B.** El anclaje del TRH en el sitio activo del modelo de PPII desplaza la cadena lateral del W525. Derecha. Modelo de PPII. Izquierda: Modelo PPII con el sustrato TRH en el sitio activo (tomado de Chávez-Gutiérrez, 2005).

El posicionamiento del TRH en el sitio activo del modelo de la PPII, produjo el movimiento de la cadena lateral del W525, alejándolo de la Y528, que participa en el estado de transición (Fig. 14B). De la misma forma, la presencia del sustrato pGlu-His-Pro-Trp modificó la posición de este residuo (no mostrado). Tanto el docking del TRH como del sustrato pGlu-His-Pro-Trp, sugieren que el W525 interacciona con residuos hidrofóbicos localizados en la posición P3' del sustrato, apoyando la idea de que el W525 está involucrado en la conformación de un núcleo hidrofóbico de la proteína donde la mayoría de cadenas laterales puede asociarse estrechamente y se encuentran protegidas de las interacciones con el disolvente. (Chávez-Gutiérrez, 2005).

IV.3.4.3 El residuo H468

La H468 es un residuo que se encuentra en el sitio activo de la PPII y que no se encuentra conservado en la familia ya que en los otros miembros de la familia M1 se encuentra Ser, Asn, Lis, Val o Arg y no existe información en la literatura que indique alguna función relevante en las diferentes peptidasas.

La H468 se encontró localizada, en el modelo teórico, sobre la hélice 2 que conforma el sitio activo, en un extremo opuesto a la K463 (la que esta en puente salino con el glutamato de la firma exopeptidasa). La H468 interacciona por medio de un puente de hidrógeno con el E471, que a su vez, está en puente salino con la R488 (Fig. 13A). El E471 está conservado en la mayoría de los miembros de la familia M1 y corresponde al E325, E418 y E415 de la LTA4H, APN y APA respectivamente. No obstante, este E471 se encuentra en puente salino solo en la PPII, debido a que la R488 es específica de la PPII. En el modelo teórico para el sitio activo de la APN, se observó en la posición correspondiente a la H468, una Ser, la S415; esta serina la cual interactúa por puente de hidrógeno con el E418. El E418 establece un puente de hidrógeno con la primera histidina de la firma catalítica, lo que lleva a concluir que la H468 de la PPII sustituyó a la H441 de la firma catalítica (₄₄₁HEICH...E₄₆₄) en la interacción con el residuo ácido (Chávez-Gutiérrez, 2005).

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general

- Continuar la caracterización bioquímica de mutantes de residuos localizados en el modelo teórico estructural del sitio activo de la piroglutamil peptidasa II.

V.2 Objetivos específicos

- Análizar la función de los residuos S269, K463, H468, W525 en la actividad y/o especificidad de la piroglutamil peptidasa II.
- Desarrollar un método que permita expresar a la región extracelular activa de la piroglutamil peptidasa II de rata.

VI. ESTRATEGIA

VI.1 Análisis experimental

- ❏ Diseño de oligonucleotidos mutagénicos y mutagénesis sitio dirigida sobre algunos residuos del sitio activo seleccionados en base al modelo teórico para la estructura del sitio activo de la PPII para generar mutantes simples, dobles o triples.
- ❏ Expresión de la PPII y de mutantes de la PPII en células COS-7 (riñón de mono) y C6 (glioma).
- ❏ Detección de la enzima silvestre y enzimas mutantes fusionadas a una secuencia de 6xHis mediante análisis cuantitativo de los niveles de expresión por SDS-PAGE y Western blot.
- ❏ Caracterización cinética de las mutantes de la PPII con TRH-βNA como sustrato.
- ❏ Análisis de la especificidad de las mutantes expresadas empleando péptidos análogos al TRH (TRH- Phe-βNA) y sustratos de otras peptidasas de la familia M1 u otras enzimas (pGlu-βNA, Ala-βNA, Leu-βNA, Glu-βNA, Lys-βNA, Arg-βNA).
- ❏ Optimización inicial para la expresión de la región extracelular activa de la PPII.

VI.2 Análisis teórico

- Inspección del modelo teórico para la estructura terciaria de la PPII e interpretación de los resultados experimentales obtenidos para las diferentes mutantes.

VII. MATERIALES Y METODOS

VII.1 Construcción de los vectores de expresión

VII.1.1 Mutagenesis sitio-dirigida y construcción de los vectores de expresión para las mutantes de PPII

Se empleó el método “one-step overlap extensión, OE-PCR” (Urban *et al.*, 1997) para hacer las mutantes de la PPII. Como templado se empleó el fragmento *XmaI-SacI* de la PPII (del aminoácido 142 al 724) clonado en los vectores pBluescrip II KS⁺/(Stratagene, ver anexo 2); se empleó un cebador universal T3 (5´-CGC AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA ACA A-3´) y dos oligos mutagénicos que contienen una región que se sobrelapa en 19 nucleótidos.

S269Q Up: 5´-ACT CAG TTT **CAA** CCT ACG CAT GCC AGG AAG-3´

Low: 5´-ATG CGT AGG **TTG** AAA CTG AGT AAC ACC GAG-3´

S269E Up: 5´-ACT CAG TTT **GAA** CCT ACG CAT GCC AGG AAG-3´

Low: 5´-ATG CGT AGG **TTC** AAA CTG AGT AAC ACC GAG-3´

S269A Up: 5´-ACT CAG TTT **GCA** CCT ACG CAT GCC AGG AAG-3´

Low: 5´-ATG CGT AGG **TGC** AAA CTG AGT AAC ACC GAG-3´

Las dobles mutantes se obtuvieron empleando el DNA de las mutantes sencillas como DNA templado y las triples se realizaron empleando como templado a las mutantes dobles.

Mezcla de reacción (las concentraciones están referidas a la concentración final en la mezcla de reacción para una reacción de 50 μL)

- ✓ PPII-pBluescript II-KS⁺ 20 ng/L
- ✓ PPII-pBluescript II-KS⁻ 20 ng/ μL
- ✓ Oligo mutagénico Up 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- ✓ Oligo mutagénico Low 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- ✓ Oligo T3 60 pmol/ μL
- ✓ Amortiguador 10X 5 μL (ver composición del amortiguador en el anexo 3)
- ✓ dntp's 0.2 mM
- ✓ MgCl₂ 0.9 mM
- ✓ Agua 33 μL
- ✓ Enzima 0.5 μL

(taq DNA polimerasa *Thermus aquaticus*; Biotecnologías Universitarias)

Parámetros empleados en el PCR

1. 94°C, 3 min
2. 94°C, 40s (desnaturalización)
3. 60°C, 40s (alineamiento)
4. 72°C, 1 min (extensión)
5. 34 ciclos desde el paso 2
6. 72°C, 10 min
7. 4°C

El producto de PCR se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (w/v). La banda obtenida (~1700 pb) fue purificada empleando el "gel-extracción kit" (QIAGEN). Cada fragmento mutado obtenido del PCR está flanqueado por dos sitios de restricción, un sitio *Xma*I y un sitio *Sac*I. Con estas enzimas se digirió el fragmento de PCR y se subclonó en el vector de expresión que contiene a la PPII silvestre (pN3-L31) previamente digerido por

XmaI – *SacI* para remover la secuencia nativa; este vector de expresión contiene un gen que le confiere resistencia a kanamicina (ver anexo 2). Las clonas obtenidas bajo presión selectiva se sometieron a procesos de lisis y se purificó el DNA, el cual se envió a secuencia para corroborar que la mutación haya ocurrido en el sitio diseñado y que no se haya introducido una nueva. Para la secuencia se usaron los oligos: *oli1* (5'-AAC TTC ACC TTC TCT GGG-3') y *secmut* (5'-GCC ATT CAG TTT TTC AGA GGG-3') y se empleó el método "Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing". Una vez verificada la secuencia, el cDNA de la PPII mutante se digirió del vector pN3 como un fragmento con sitios de restricción únicos *XhoI-XbaI* y se clonó en el vector de expresión pCDNA 3.1/HisA (Invitrogen) o pEGFPN3 (Clontech) (ver vectores en el anexo 2) para poder monitorear su expresión.

VII.1.2 Construcción del vector para expresar la región extracelular de la PPII de rata

La región extracelular de la PPII de rata, desde el Asp-78 hasta la His-1025, fue clonada en el vector pSectag2B (Invitrogen, ver anexo 2) por medio de los sitios de restricción *KpnI-NotI*. Este vector fusiona la región extracelular de la PPII en su extremo C-terminal a un epítipo *c-myc* y a una secuencia poli-His (6xHis). El pSectag2B es un vector de expresión de 5.2 Kb diseñado para un nivel de expresión alto y estable en células de mamíferos bajo el promotor de citomegalovirus humano (CMV). Contiene la secuencia líder de la cadena κ de la inmunoglobulina G de ratón (*ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC*), la cual permite la secreción de proteínas fusionadas. Adicionalmente, el pSectag2B contiene un gen que le confiere resistencia a zeocina y otro que le da resistencia a ampicilina.

La PPII extracelular clonada en este vector fue seleccionada con zeocina, 25 mg/mL en LB bajo en sales (ver anexo 3). El DNA obtenido se envió a secuencia para verificar que tanto la región extracelular de la PPII como el péptido líder para la secreción y las secuencias fusionadas estuviesen bien. Se emplearon algunos oligos ya existentes para elucidar la

secuencia de la región extracelular de la PPII de rata y adicionalmente se diseñaron algunos oligos para poder obtener la secuencia de:

Secuencia líder de la cadena κ 5'-AGC TGG CTA GCC ACC ATG-3'

Secuencia poli-His 5'-GTG GCA CCT TCC AGG GTC AAG GAA-3'

Epitope *c-myc* 5'-ATG ATG ATG ATG ATG GTC-3'

VII.2 Expresión en sistemas heterólogos de las proteínas recombinantes

VII.2.1 Expresión de la PPII silvestre y mutantes

Se emplearon cultivos de las líneas celulares COS-7 o C6. Para las dos líneas celulares se procedió de igual manera; las condiciones del cultivo fueron: temperatura: 37 °C, gas: 5 % CO₂ - 95 % aire, en medio modificado Dulbecco's (DMEM, Life Technologies) suplementado con 19.5 mM de glucosa, 10 % de suero fetal bovino (SFB), 50 unidades/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina y 125 ng/mL de fungicida. Las células se sembraron a una densidad de 8 X 10⁵ células en platos (COSTAR) de 60 mm, se cultivaron durante 18 h (hasta alcanzar una confluencia del 95 %). Los platos que contienen las células se lavaron dos veces con 2 mL de amortiguador PBS (NaCl 0.1 M, KH₂PO₄ 1.5 M, Na₂HPO₄ 8.0 mM, KCl 2.7 mM) cada vez y se adicionaron 3 mL de DMEM-glucosa libre de SFB y antibióticos. Durante la transfección, la Lipofectamina-2000 (GIBCO) y el DNA se diluyeron separadamente; 15 µL de Lipofectamina-2000 en 500 µL de DMEM-glucosa libre de SFB y antibióticos (por plato) se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente; aparte 12 µg de DNA fueron mezclados con 500 µL de DMEM-glucosa libre de SFB y antibióticos (por plato); se unieron las preparaciones de Lipofectamina-2000 y DNA se agitaron y se incubaron por 20 min a temperatura ambiente; se adicionó 1 mL de mezcla lipofectamina-2000 y DNA (por plato) a las células a transfectar y se incubaron durante 6 h; posteriormente se lavaron los platos de las células transfectadas dos veces con PBS a 37 °C y se incubaron las células en DMEM-suplementado. Las células se cosecharon después de 48 h de la transfección y se sometieron a procesos de lisis mediante 3 ciclos de congelación-descongelación en amortiguador que contiene inhibidores de proteasas

(amortiguador fosfatos (Na_3PO_4) 50 mM, pH 7.5; 0.3 μM PMSF; 1 μM IA; 1 μM PA; 2.5 mM MgCl_2 ; 0.1 mg/mL de DNAsa-1 de Sigma). Se centrifugaron las células (90000 g durante 45 min a 4 °C); la pastilla que contiene las membranas totales se homogeneizó en amortiguador fosfatos 50 mM, pH 7.5 con NaCl 1 M para reducir la contaminación por proteínas solubles; de nuevo se centrifugaron a 90000 g durante 45 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y la pastilla membranal se resuspendió en amortiguador fosfatos 50 mM pH 7.5. Se cuantificó la proteína por medio del método de Bradford (Bradford, 1976). Las proteínas membranales en el amortiguador fosfatos se almacenaron a - 70° (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2006).

VII.2.2 Expresión de la región extracelular activa de la PPIIr

La expresión de la PPII, una proteína integral de membrana en un vector de expresión que permita su secreción al medio extracelular, nos ofrece una herramienta muy útil en la caracterización bioquímica de la enzima. Podremos avanzar en el estudio de la misma ya que podremos disponer de ella más fácilmente y en mayores cantidades así como purificarla y tener determinaciones más precisas e incluso intentar elucidar su estructura tridimensional y generar anticuerpos.

Se transfectaron células COS-7, C6 y HEK293 con el vector de expresión que contiene la región extracelular de la PPII. Las diferentes líneas celulares se cultivaron y se trataron como se describe en la sección anterior (sección VII.2.1).

A las 24, 48 y 72 se horas se recolectaron el medio y las células. El medio extracelular se sometió a procesos de centrifugación; una primera fase a 1000 rpms durante 1 min para eliminar células despegadas del plato de cultivo y una segunda fase de centrifugación del primer sobrenadante a 20000 rpms durante una hora para descartar restos celulares que pudieran haber quedado. Para recuperar las fracciones citosólicas y membranales se cosecharon las células como se describe en la sección VII.2.1; la fracción citosólica se recupero después de los procesos de lisis y primera centrifugación a 90000 rpms y la fracción membranal hasta al final de todo el proceso. La proteína presente en el medio

extracelular y en las fracciones membranales fue cuantificada empleando el método de Bradford y las preparaciones fueron conservadas a -70 °C hasta ser analizadas.

VII.3 Visualización de los niveles de expresión y localización de las proteínas recombinantes

VII.3.1 Análisis por SDS-PAGE y Western blot

Para determinar los niveles de expresión de la PPII y mutantes en la membrana celular, se transfectaron células con el vector pCDNA3.1HisA que contiene a la PPII silvestre o mutada; este vector tiene una secuencia de seis histidinas hacia el lado N-terminal de la PPII. Las proteínas membranales se separaron por electroforesis durante 2 horas a 100 voltios en un gel de poliacrilamida de acuerdo al método de Laemmli con 4 % de acrilamida-*bis*acrilamida en el gel concentrador y 7 % en el separador (Laemmli, 1970).

Una vez terminada la electroforesis de proteínas, se llevó a cabo la transferencia de las mismas a un soporte sólido (membrana de nitrocelulosa Immobilón-P (Millipore), poro de 0.45 µm). Antes de realizar la transferencia, 12 trozos de papel filtro Watman 3 MM del tamaño del gel fueron humedecidos con amortiguador de transferencia para “Western blot” (3 con solución de ánodo 1; 3 con solución de ánodo 2 y 6 con solución de cátodo (ver anexo 3, composición de las soluciones) y la membrana se trató 30 s con metanol absoluto y posteriormente con agua para activarla. La transferencia de las proteínas del gel a la membrana se llevó a cabo durante 60 min a 151 mA (corriente constante).

Antes de iniciar el proceso para la detección de la proteína de interés, se bloquearon todos los sitios de unión a la membrana para prevenir la adsorción no específica de los reactivos de detección a algunos sitios. La membrana se bloqueó con 5 % de leche descremada (Carnation) en amortiguador TBST (ver anexo 3) con agitación constante durante toda la noche a 4 °C. Se realizó la inmunodetección con anticuerpos anti-His (Clone-His, Sigma) acoplados a la fosfatasa alcalina en 5 % de leche descremada (Carnation) en TBST (solución de bloqueo; dilución 1:5000) durante 1 h a temperatura ambiente y agitación. Se lavó nuevamente la membrana dos veces con solución de lavados (ver composición en anexo 3) durante 15 min y una vez con amortiguador B (ver anexo 3) durante 15 min y se reveló la fosfatasa alcalina empleando los reactivos NBT y BCIP de Roche durante 5-10

min (ver composición en el anexo 3). La densidad óptica de la banda fue determinada con un Fluor-S MultiImager (BioRad, Hercules, CA, USA).

VII.3.2 Microscopía de fluorescencia

La distribución de la fluorescencia de la EGFP en las células se analizó en un microscopio eclipse TE300 (Nikon, Melville NY, USA) con un objetivo 60X; la fluorescencia de la EGFP fue detectada empleando el filtro EPI-FL (Nikon).

VII.4 Caracterización enzimática de las proteínas recombinantes

La actividad de la PPII frente a TRH-βNA fue medida mediante un ensayo fluorométrico acoplado; este ensayo consta de dos pasos, un primer paso en el cual la PPII hidroliza el enlace pGlu-His del TRH-βNA, liberando His-Pro-βNA y un segundo paso en el cual la dipeptidil peptidasa IV (DAP IV) hidroliza el enlace Pro-βNA, liberando a la βNA se puede detectar fluorometricamente (Bourdais *et al.*, 2000).



Las muestras (~16-25 μg de proteína por ensayo) se mezclaron con 0.2 mM de N-etilmaleimida (Sigma), 0.2 mM de bacitracina (Sigma) y dipeptidil aminopeptidasa IV (DAP IV; 4 nmol de Gli-Pro-βNA (βNA) hidrolizada por min) en amortiguador Na₃PO₄ pH 7. Se incubaron por 10 min a 37 °C. Al tiempo 0, se adicionó 400 μM de TRH-βNA a la mezcla de reacción (250 μL volumen final) y se tomaron alícuotas de 50 μL a diferentes tiempos, dependiendo de la velocidad de la reacción. Las alícuotas se mezclaron (a 4 °C) con 50 μL de metanol absoluto y 300 μL de metanol al 50 % con amortiguador fosfatos, para detener la reacción. Frente al sustrato pGlu-βNA se procedió de igual manera, la mezcla de reacción contenía amortiguador fosfatos 50 mM y N-etilmaleimida (5mM. La

β NA liberada se determinó fluorométricamente (Exc: 335; Ems: 410 nm), empleando una curva de β NA de 0 a 100 pmol.

La actividad específica se determinó dividiendo la pendiente de la cinética (pmol de β NA obtenidas por min.) por la cantidad de proteína (mg) en el ensayo. Para determinar la K_m y la V_{max} de las mutantes y de la enzima silvestre por medio de las ecuaciones planteadas por Michaelis-Mentel se emplearon concentraciones de sustrato alrededor de la K_m (~ 40 μ M para la PPII purificada después de proteólisis suave; O'Connor y O'Cuinn, 1984) desde 2.5 μ M de TRH- β NA hasta 200 β M, una concentración fija de proteína, y se ajustaron los tiempos de la cinética para obtener resultados confiables a baja velocidad inicial. Se realizaron determinaciones por duplicado en cada experimento y tres experimentos independientes, reportando nuestros datos con el error estándar correspondiente.

Los ensayos frente a los sustratos Ala- β NA, Lys- β NA y Arg- β NA se realizaron a 37 °C a una concentración de sustrato de 400 μ M en amortiguador 100 mM Tris-HCl pH 7.5. Se procedió de igual manera frente al sustrato Glu- β NA adicionando 2.5 β M de $CaCl_2$; la β NA liberada se determinó de la misma manera que con el TRH- β NA.

VII.5 Purificación de la región extracelular de la PPII de rata

Se ha intentado la purificación de la región extracelular de la PPII de rata por medio de cromatografía de afinidad con metal inmovilizado empleando una columna de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA).

VII.5.1 Tecnología Ni-NTA (QIAGEN)

La cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) se usó por primera vez para la purificación de proteínas en 1975 usando el ligando ácido iminodiacético (IDA). IDA se cargaba con iones metálicos como Zn^{2+} , Cu^{2+} o Ni^{2+} y se empleó para purificar una variedad de proteínas y de péptidos. El ácido nitrilotriacético (Fig. 15) es un adsorbente quelante tetradentado, que ocupa 4 de los 6 sitios de enlace al ligando en la esfera de coordinación del ion níquel, dejando dos sitios libres para la interacción con la secuencia

poli-His (6xHis) de una proteína. La agarosa Ni-NTA está compuesta de Ni-NTA acoplada a sepharose CL-68 y ofrece alta capacidad de enlace y un mínimo de enlaces no específicos.

El proceso de purificación se divide en tres fases: pegado de las proteínas con poli-His a la resina Ni-NTA, lavados y elución. Se empleó el protocolo para la purificación de PPII soluble bajo condiciones nativas. Todo el procedimiento de purificación se realizó a 4 °C y a pH 8.0.

Pegado de la muestra a la columna

Al medio extracelular (3 mL de medio con 3.1 µg de proteína/µL), se adicionó 1 mL de resina Ni-NTA (QIAGEN; la capacidad de la resina es de 5-10 mg/mL) y 3 mL de amortiguador 10 mM de imidazol (amortiguador de lisis, ver composición en el anexo 3). 5 mM de imidazol facilita el pegado de la proteína a la resina y evita interacciones inespecíficas con otras proteínas. La mezcla se incubo toda la noche en un tubo de 50 mL estéril y con agitación continua; posteriormente se transfirió la mezcla una columna de vidrio de 10 cm de largo y 1.5 cm de diámetro y se permitió la salida de medio extracelular mediante flujo por gravedad.

Lavados

Se realizaron dos lavados con 1 mL de amortiguador de lavados, el cual contenía imidazol 20 mM (ver anexo 3) y se colectaron las fracciones para analizarlas posteriormente.

Elución

Si la concentración de imidazol aumenta a 100-250 mM, la proteína puede ser disociada del soporte, ya que el imidazol compite con las 6xHis por los sitios de enlace de la resina de Ni-NTA. Se eluyó la proteína cuatro veces con 0.5 mL de amortiguador de elución que contenía imidazol 250 mM; se colectaron las fracciones en tubos eppendorf que contenían 0.5 mL de amortiguador fosfatos 50 mM.

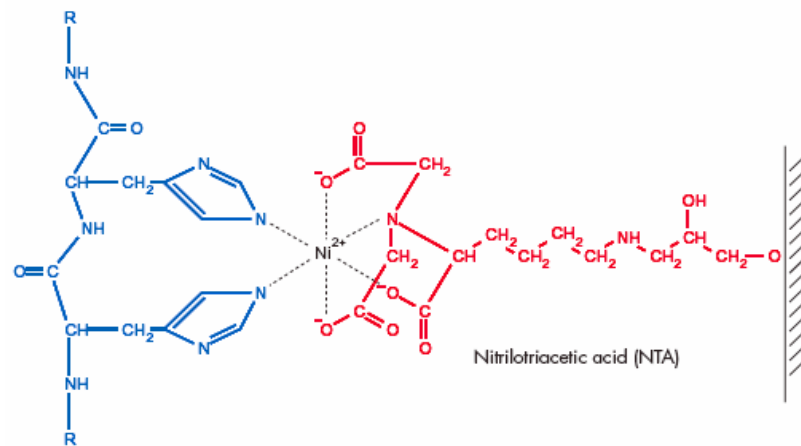


Figura 15. *Tecnología Ni-NTA (QIAGEN).* Interacción (negro) entre residuos adyacentes con 6xHis (azul) y la matriz de Ni-NTA (rojo).

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Construcción de los vectores de expresión para la PPII nativa (y mutante) anclada a la membrana

VIII.1.1 Diseño de las mutantes, mutagénesis sitio-dirigida y comprobación de la expresión de las proteínas

Continuando con el análisis que L. Chávez-Gutiérrez realizó a partir de las observaciones del modelo teórico del sitio activo de PPII de rata, se construyeron mutantes del residuo de serina en la posición 269 por mutagénesis sitio-dirigida. Se hicieron cambios a glutamina, ácido glutámico y alanina (S269Q, S269E, S269A); estos cambios se realizaron teniendo en cuenta los residuos que son contraparte a este residuo en los demás miembros de la familia M1, como es el caso de los cambios a Q o E; el cambio a alanina se realizó teniendo en cuenta la interacción observada durante el anclaje del TRH en el modelo teórico del sitio activo de la PPII, entre el pGlu del TRH y la S269 de la enzima, en la cual el hidrógeno del grupo hidroxilo en la serina interactúa vía puente de hidrógeno con el oxígeno del pGlu en el TRH. Con la S269A se pretendió probar la importancia de esta interacción. También se construyeron las mutantes dobles S269Q-K463N y S269Q-K463R, con el objetivo de crear un sitio activo que se parezca al de la aminopeptidasa N, en la cual no estuviese presente el puente salino (E408-K463). De esta manera el E408 quedaría libre y podría interactuar con un sustrato que tuviese un extremo NH₂-terminal libre; a su vez, en la posición correspondiente a S269 se encontraría el segundo residuo (Glu o Gln) involucrado en el reconocimiento del sustrato, como se ha observado en otros miembros de la familia.

Las secuencias del DNA de las mutantes nos permitieron comprobar que se había realizado el cambio correspondiente en la posición requerida y que el resto de la secuencia de la PPII no se había alterado (no mostrado).

La PPII silvestre y las mutantes se sub-clonaron en el vector de expresión pCDAN3.1/His A. Este vector fusiona la PPII a una secuencia de 6 histidinas en su extremo amino terminal, lo cual nos permitió observarla con un anticuerpo anti-His. Se expresaron las proteínas de manera transitoria en células COS-7, con la correspondiente transfección del vector pCDNA3.1/HisA intacto como control. Se verificó la expresión de las enzimas mediante análisis de tipo Western blot de las membranas celulares totales, demostrando que la PPII silvestre y las mutantes se expresan en cantidad similar y tienen el mismo peso molecular aparente (Fig. 16).

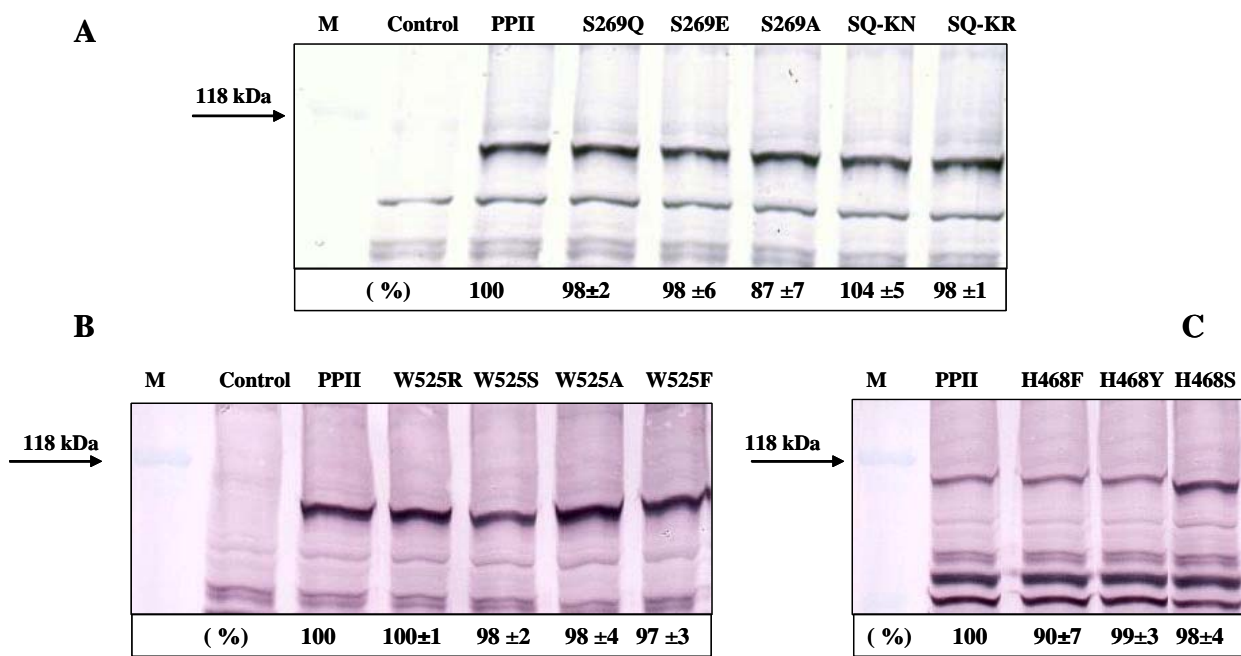


Figura 16. *Expresión de la PPII silvestre y de mutantes de la PPII.* Análisis por Western blot de la PPII silvestre o mutada en el sitio activo expresada en células COS-7. Las proteínas están fusionadas a una secuencia de 6xHis y fueron detectadas con un anticuerpo policlonal anti-His (Sigma), acoplado a la enzima fosfatasa alcalina. Mutantes: **A.** de residuos involucrados en el reconocimiento del N-terminal del sustrato en la familia M1 (50 µg de proteína total), **B.** En W525 (30 µg de proteína total), **C.** en H468 (30 µg de proteína total). Las flechas indican el peso molecular aparente del marcador empleado. Los valores debajo de cada banda corresponden a la cuantificación por densitometría de los niveles de expresión de la PPII silvestre y de las mutantes. Los datos están expresados en % de expresión de la PPII silvestre ± el error estándar para tres experimentos independientes.

VIII.2 Un panorama inicial del sitio activo de la PPII

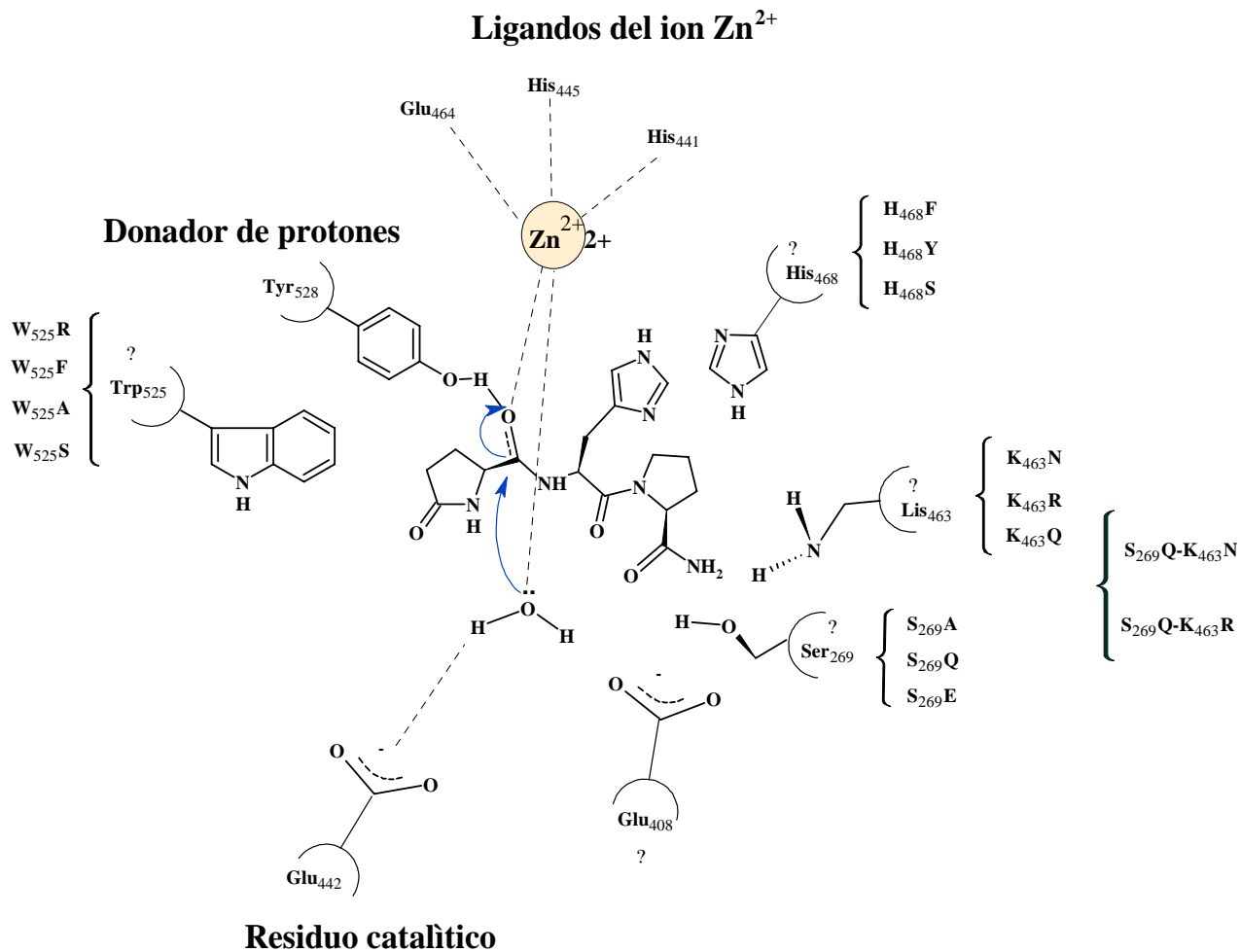


Figura 17. Representación del microambiente en el sitio activo de la PPII. Por medio del siguiente esquema queremos representar el microambiente del sitio activo en la PPII con el TRH, los residuos con funciones relevantes que han sido identificados hasta el momento, sus interacciones, además los residuos que hemos analizado en este trabajo lo cuales podrían tener potencialmente influencia en el mecanismo catalítico de la PPII.

VIII.3 El puente salino y el reconocimiento del amino terminal

La actividad específica de la PPII silvestre y de las mutantes fue determinada en fracciones membranales de células transfectadas con las construcciones en el vector pN3 (sin etiqueta), empleando TRH- β NA como sustrato y pGlu- β NA; el sustrato de la piroglutamil peptidasa I (PPI), para el análisis de la especificidad de nuestras mutantes empleamos los sustratos de algunas aminopeptidasas de la familia M1, como Lis- β NA, Arg- β NA, Leu- β NA, Phe- β NA, Ala- β NA, Glu- β NA, Parte de los datos mostrados a continuación se obtuvieron durante un trabajo conjunto dentro del doctorado de Lucia Chávez Gutiérrez y el desarrollo de esta maestría.

VIII.3.1 Actividades frente al sustrato de las *omegapeptidasas* TRH- β NA (PPII) y pGlu- β NA (PPI)

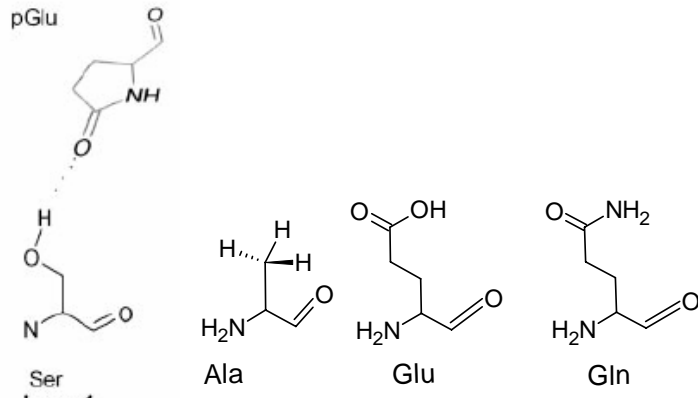
Con TRH- β NA como sustrato, las mutantes PPII-S269Q y PPII-S269E fueron inactivas, en contraste a la mutante PPII-S269A la cual conservo aproximadamente un 40% de actividad *omegapeptidasa* (Fig. 18), los parametros cinéticos se ilustran en la tabla 6.

Enzima	Km (μ M)	Vmax (pmol β NA/min*mg)
Silvestre	9.4 \pm 0.3	554 \pm 133
S269A	6.8 \pm 1.1	234 \pm 77

Tabla 6. Constantes catalíticas para la PPII silvestre y para la mutante PPII-S269A. Preparaciones membranales de células C6 transfectadas con los diferentes vectores frente a TRH- β NA.

Estos resultados indican que el el puente de hidrógeno observado en el modelo del sitio activo para la PPII entre el hidrógeno de la serina y el oxígeno del pGlu no contribuye de una manera relevante a la unión del sustrato. Aunque la disminución en la Vmax no es robusta podría sugerir que la S269 esta involucrada en el mecanismo catalítico más que en el reconocimiento del sustrato. El comportamiento de las mutantes PPII-S269 a Glu o Gln podrían explicarse mediante un impedimento estérico ya que sus cadenas laterales son mas

largas que la de la serina y esto podría evitar que el TRH pueda acomodarse bien en el sitio activo de la PPII y ser hidrolizado.



TRH- β NA como sustrato

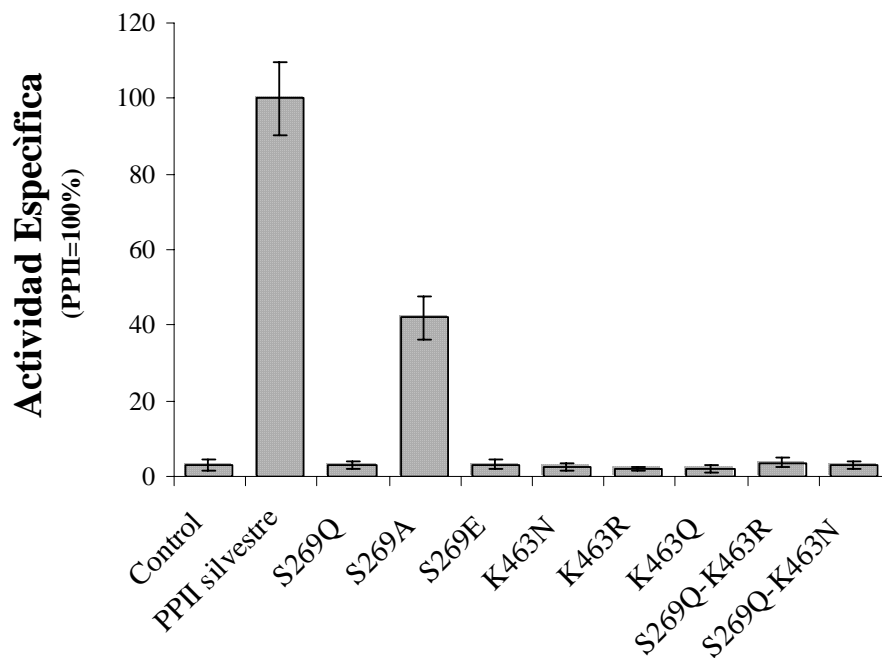


Figura 18. Actividad de la PPII y de mutantes de la PPII frente a TRH- β NA. Actividad específica de preparaciones membranales de células C6 transfectadas con los diferentes vectores frente a TRH- β NA 400 μ M. La actividad se muestra como porcentaje de la actividad específica de la PPII (PPII silvestre = 100 %). La actividad control es la actividad en membranas de células transfectadas con el vector pN₃-GFP intacto.

Como también se observa en la figura 18 ninguna de las mutantes sencillas en K463 mostró actividad *omegapeptidas* al igual que las mutantes dobles.

También se realizaron ensayos frente a pGlu- β NA como sustrato e inhibiendo la actividad de la PPI con N-etilmaleimida 5 mM, sin embargo ninguna de las mutantes mostró actividad diferente a la del control (no mostrado).

VIII.3.2 Actividades frente a sustratos de las diferentes aminopeptidasas Lis- β NA, Arg- β NA, Leu- β NA, Phe- β NA, Ala- β NA, Glu- β NA

Para evaluar la especificidad de las mutantes frente a otros sustratos se realizaron ensayos empleando como sustrato Lis- β NA, Arg- β NA, Leu- β NA, Phe- β NA, Glu- β NA y Ala- β NA. Con los sustratos Lis- β NA, Arg- β NA, Phe- β NA, y Leu- β NA la actividad endógena de las aminopeptidasas membranales que pueden hidrolizar estos sustratos en las células C6 fue muy elevada (Tabla 8).

Sustrato- β NA	TRH	Lis	Arg	Leu	Phe	Glu	Ala
Actividad Especifica	20	1750	896	949	1120	72	200
(pmol β NA/min*mg)	± 8	± 321	± 100	± 80	± 86	± 15	± 35

Tabla 8. *Actividades específicas de aminopeptidasas endógenas en la fracción membranal de células C6 sin transfectar.* No se emplearon inhibidores. Los datos son el promedio de dos experimentos \pm desviación estándar.

Lis- β NA, Arg- β NA, Phe- β NA y Leu- β NA

Para facilitar la detección de nuevas actividades en las PPII mutantes frente a Lis- β NA, Arg- β NA, Phe- β NA, y Leu- β NA requeríamos disminuir esta actividad de fondo, para esto se utilizaron algunos inhibidores como amastatina (10 y 50 μ M), actinonina (0.5 y 1 mM), bestatina (0.2 mM), pero en ninguno de los casos disminuyó la actividad basal (no mostrado). Contemplando que en nuestras preparaciones membranales podríamos encontrar

aminopeptidasa B u otras aminopeptidasas citosólicas como contaminación, realizamos un ensayo empleando DTT 0.3 mM, un inhibidor de la aminopeptidasa B, sin lograr una disminución en la actividad de las aminopeptidasas endógenas (no mostrado). Para determinar la naturaleza de la actividad aminopeptidasa interferente, se realizó un ensayo empleando preparaciones membranales de células C6 intactas frente a Lis- β NA (400 μ M) en presencia o ausencia de O-fenantrolina, un quelante de metales (Fig. 19).

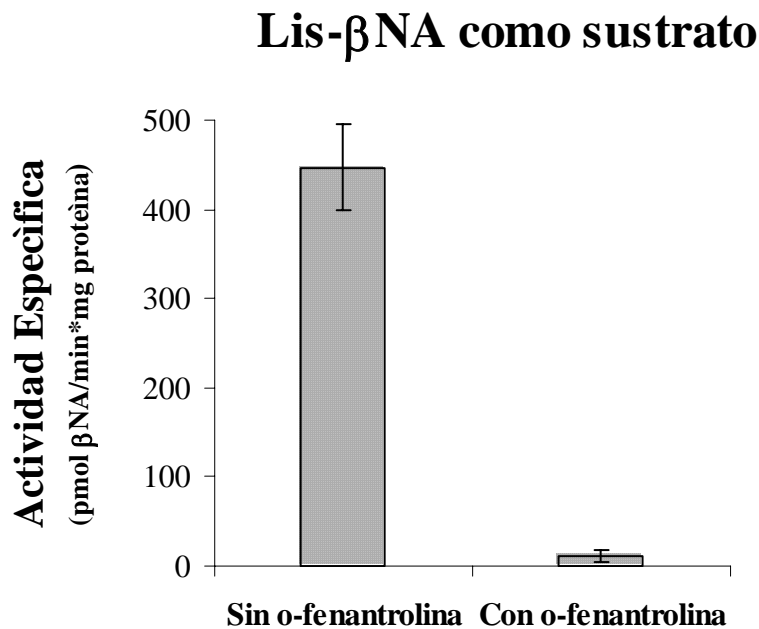


Figura 19. Efecto de la o-fenantrolina sobre la actividad lisil-peptidasa endógena en células C6 intactas. Actividad específica en pmol de β NA/min*mg de proteína total de preparaciones membranales de células C6 sin transfectar frente a Lis- β NA 400 μ M como sustrato con o sin o-fenantrolina 1 mM.

Como se observa en la figura, la drástica disminución en la actividad aminopeptidasa endógena en estas células indica que la actividad de fondo proviene de una metalopeptidasa, insensible a los inhibidores que probamos o a dichas concentraciones. Adicionalmente, al ser una metalopeptidasa, se dificulta el análisis de nuestras mutantes de

PPII. Por lo tanto, no pudimos evaluar si alguna de las PPII mutantes tuviera una actividad frente a Lis- β NA, Arg- β NA, Leu- β NA o Phe- β NA

Una solución a este inconveniente sería idealmente encontrar una línea celular que exprese bajos o mínimos niveles de *aminopeptidasas*, ya que como las *aminopeptidasas* son muy poco específicas, resulta complicado inhibirlas a todas. Otra idea sería intentar expresarlas de otra manera por ejemplo una forma soluble por medio de la cual pueda eliminar toda la actividad endógena de las *aminopeptidasas* membranales y citosòlicas.

Como se observa en la tabla 8, la actividad endógena para los sustratos Glu- β NA y Ala- β NA es baja comparada con la de los otros sustratos, además son sustratos preferenciales de dos *aminopeptidasas* para las cuales inhibidores específicos, así que decidimos hacer pruebas con muestras mutantes frente a estos sustratos.

Glu- β NA

Ninguna de las mutantes mostró actividad *aminopeptidasas* que se pudiera diferenciar de los controles tanto de *aminopeptidasas* endógenas como de la PPII silvestre (Fig. 20). Aunque los valores varían respecto al a enzima silvestre no son significativos, esto no implica que nuestras mutantes sean inactivas, pero su actividad no pudo ser determinada mediante este experimento.

Teniendo en cuenta estos resultados nos propusimos disminuir la actividad basal de la APA, facilitando la detección de una actividad tipo APA en los mutantes de la PPII. Realizamos ensayos con nuestras mutantes frente a Glu- β NA en presencia de actinonina (0.5 y 1 mM), un inhibidor de la APN o de amastatina (100 μ M), un inhibidor de APA; en ninguno de los casos observamos actividad *glutamilaminopeptidasa* diferente a los controles (no mostrado).

Glu- β NA como sustrato

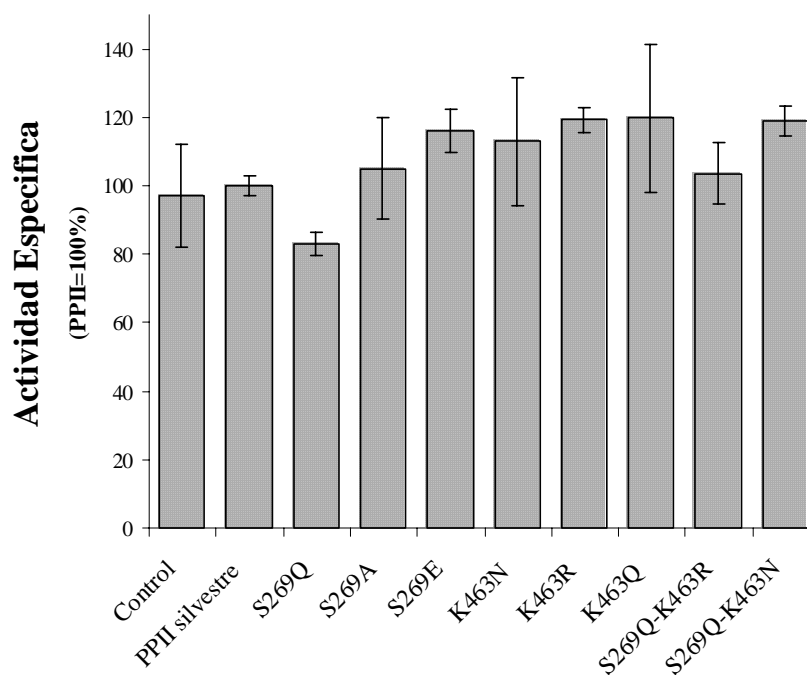


Figura 20. Actividad de la PPII y de mutantes de la PPII frente a Glu- β NA. Actividad específica de preparaciones membranales de células C6 transfectadas con los diferentes vectores. La actividad se muestra como porcentaje de la actividad específica de la PPII silvestre (= 100 %). La actividad control es la actividad en membranas de células transfectadas con el vector pN₃-GFP.

Ala- β NA

Ninguna de las mutantes sencillas en K463 o en S269 mostró actividad indistinguible de los controles cuando se empleó Ala- β NA como sustrato a diferencia de las dobles mutantes S269Q-K463N y S269Q-K463R las cuales mostraron actividad *alanil*peptidasas mayor con respecto a los controles (Fig 21); indicando de esta manera que estos dos residuos participan en la especificidad hacia sustratos con amino terminal libre.

Teniendo en cuenta que aun había un valor considerable de actividad basal en los controles, decidimos emplear un inhibidor de APN para diferenciar nuestra señal de la actividad *amino*peptidasa endógena. Se realizaron ensayos con todas nuestras mutantes en presencia de actinonina; se emplearon dos concentraciones de actinonina (0.5 y 1 mM); estudios previos realizados en el laboratorio demostraron que a estas concentraciones de inhibidor la

actividad de la PPII silvestre no se ve afectada (Cruz, R., *en revisión*). La actividad endógena de la APN se vio disminuida proporcionalmente a la concentración del inhibidor y de manera concomitante la actividad relativa de *alanil*-aminopeptidasa de las PPII doble mutantes se vio claramente acentuada al comparar con la PPII silvestre o el control (Fig. 21 A y B). Estos resultados nos dejan ver una actividad *alanil*aminopeptidasa específica de las PPII dobles mutantes.

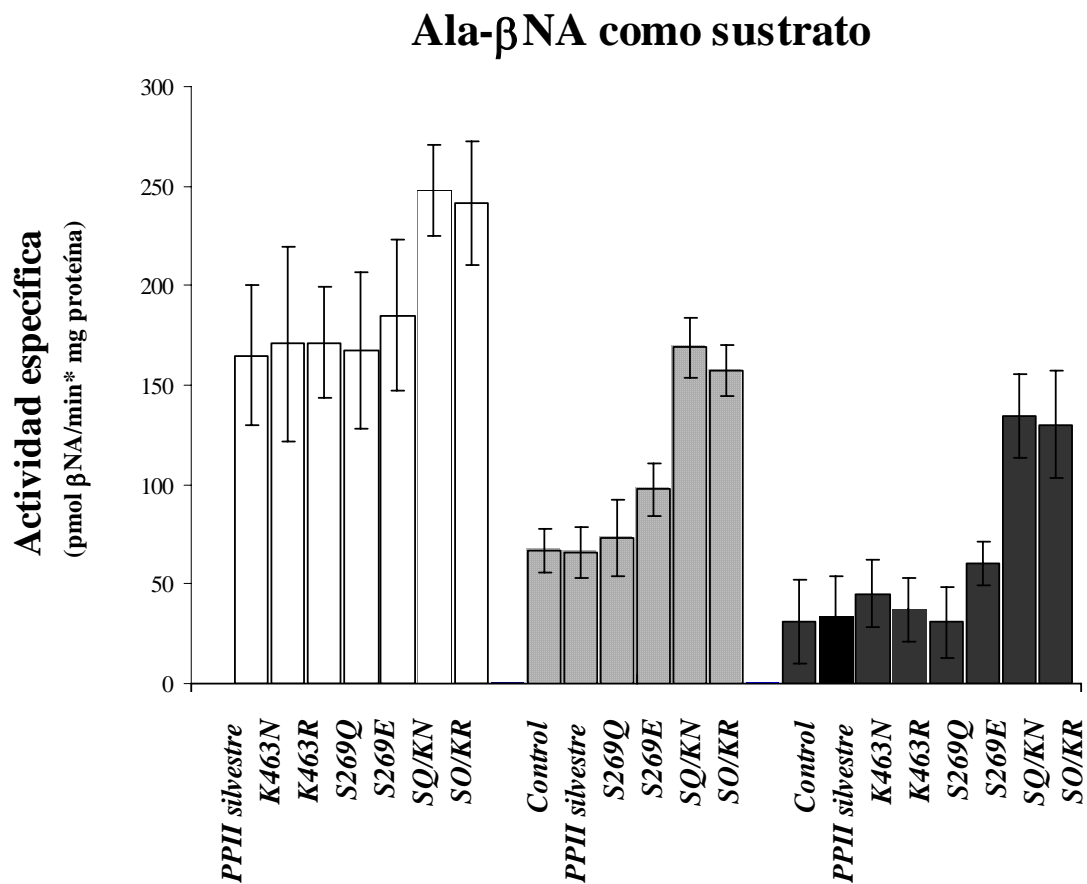


Figura 21. Actividad Específica de la PPII y de mutantes de la PPII frente a Ala-βNA como sustrato a diferentes concentraciones de actinonina. Actividad de preparaciones membranales de células C6 transfectadas con los diferentes vectores, frente a Ala-βNA 400 μM como sustrato en ausencia y presencia de actinonina. La actividad control es la actividad en membranas de células transfectadas con el vector pN₃-GFP intacto.

De manera sorprendente al disminuir la actividad basal con la actinonina logramos detectar actividad *alanil*peptidasa en la mutante sencilla S269E; su comportamiento también fue proporcional a la concentración del inhibidor. Este resultado nos ubica en un contexto similar al de la APN de *E. coli*, la cual contiene el puente salino homólogo al de la PPII (E408-K463), sugiriendo de esta manera que este residuo es fundamental en la especificidad aminopeptidasa y en nuestro caso *alanil*peptidasa.

Estas mutantes de PPII con actividad *alanil*peptidasa son inactivas frente al TRH- β NA (Fig. 18). Su incapacidad para hidrolizarlo podría deberse a que las PPII *alanil*peptidasas no pueden unir al TRH- β NA o a que lo unen pero no pueden hidrolizarlo. Para intentar elucidar una explicación correcta se realizaron ensayos de competencias con TRH en los cuales se analizaron fracciones membranales de células C6 transfectadas con el ADNc de las PPII *alanil*peptidasas frente a Ala- β NA como sustrato. Para ello se incubó la mezcla de reacción 10 min en presencia de actinonina 1 mM y TRH 100 μ M a 37 °C y posteriormente se agregó Ala- β NA 400 μ M. Los resultados obtenidos en tres experimentos independientes se resumen en la tabla 7.

Enzima	Disminución en la actividad específica (%)
PPII-S269E	13.7
PPII-S269Q-K463N	13.0
PPII-S269Q-K463R	9.0

Tabla 7. Efecto del TRH en la actividad de las PPII-*alanil*peptidasas frente a Ala- β NA como sustrato. Porcentaje de disminución en la actividad específica de la PPII-*alanil*peptidasa frente al sustrato Ala- β NA 400 μ M en presencia de actinonina 1 mM y TRH 100 μ M.

Las actividades de las PPII *alanil*peptidasas disminuyeron entre 9 y 14 % debido a la adición del TRH. Estudios previos de competencia frente a la PPII silvestre realizados en el laboratorio indicaron que con la misma concentración de TRH hay un 37 % de inhibición en la actividad frente a TRH- β NA 400 μ M (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2006). De una manera preliminar, nuestros resultados sugieren que las doble mutantes podrían estar uniéndose al TRH con muy baja afinidad sin embargo debemos tener en cuenta que la cantidad de TRH en el ensayo no es óptima o por lo menos no lo sabemos, esto quiere decir que es posible que 100 μ M (TRH) no sea suficiente para tener el 100% de los sitios activos ocupados tal vez solo se han ocupado aproximadamente el 10% de los sitios. Para resolver estas variables se podrían realizar ensayos a diferentes concentraciones de TRH y de acuerdo al avance de la reacción determinar de una manera más precisa la concentración a la cual podríamos tener una condición saturante de TRH, sin embargo aun teniendo condiciones de TRH saturante se requeriría evaluar constantes de cada mutante como la constante de asociación (pegado), la constante de disociación (despegado) del complejo enzima sustrato frente a cada sustrato (TRH y Ala- β NA) así como la eficiencia de cada mutante frente a Ala- β NA, para tener una idea más aproximada de lo que realmente está sucediendo.

De manera adicional, realizamos un ensayo en el cual se emplearon membranas de células transfectadas con S269E y S269Q-K463N y se evaluaron frente a Ala- β NA como sustrato en presencia de actinonina y en presencia de amastatina, un inhibidor descrito como inhibidor de la aminopeptidasa A. Los ensayos se realizaron solo con una de las dos doble mutantes (S269Q-K463N); ya que esta presenta la mayor actividad *alanil*-aminopeptidasa. Para evitar que la concentración de amastatina generara un artefacto en la determinación de la actividad enzimática, se evaluó la PPII silvestre a diferentes concentraciones del inhibidor, encontrando que hasta 10 μ M de amastatina, no hay ningún efecto en la hidrólisis del TRH- β NA (Fig. 22). Por lo tanto escogimos esta concentración para realizar nuestros ensayos. Observamos que la doble mutante S269Q-K463N parece tener una sensibilidad diferente frente a los dos inhibidores (Fig. 23).

TRH-βNA como sustrato

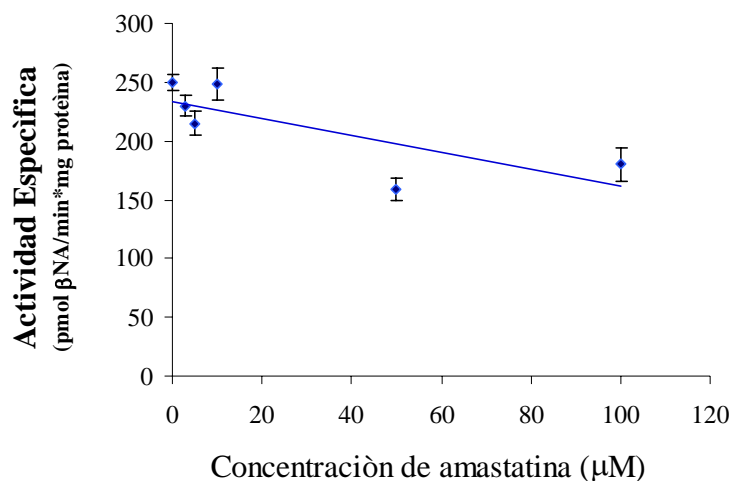


Figura 22. Efecto de la amastatina sobre la actividad de la PPII silvestre frente al TRH-βNA. Actividad específica en unidades de pmol de βNA/min*mg de proteína total, en preparaciones membranales de células C6 transfectadas con el vector que contiene a la PPII silvestre (PPII-pN₃). Los datos son el promedio de dos determinaciones.

Ala-βNA como sustrato

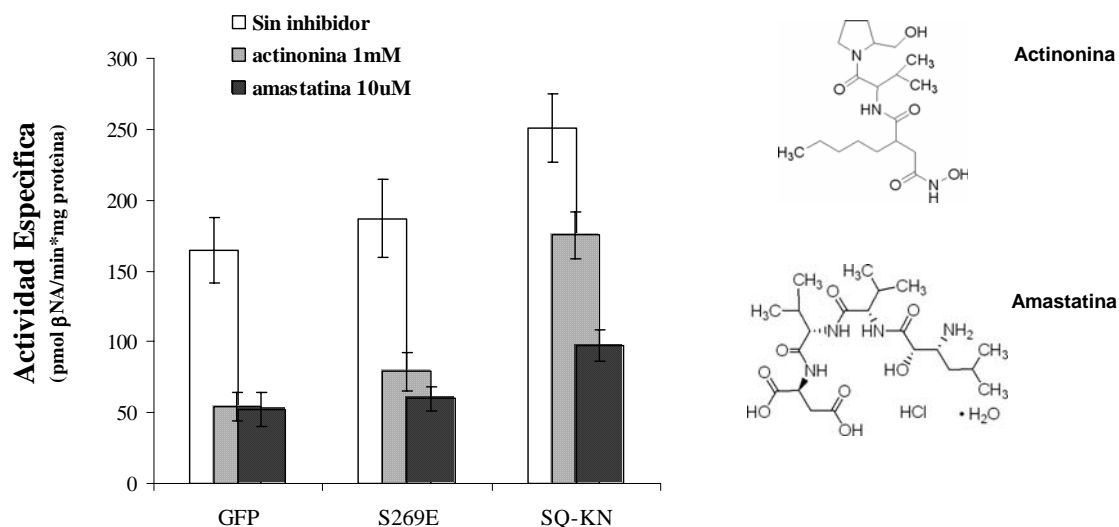


Figura 23. Efecto de la actinonina y/o amastatina sobre la actividad de mutantes de LA PPII frente a Ala-βNA. Actividad específica de preparaciones membranales de células C6 transfectadas con diferentes vectores. Las tres primeras barras corresponden a la actividad del control (células transfectadas con el vector pN₃-GFP) y de las mutantes en ausencia de inhibidor (n=3), las siguientes tres barras pertenecen a la actividad de las mutantes y el

control en presencia de actinonina 1 mM (n=2) y las tres últimas barras pertenecen a la actividad de las mutantes y del control en presencia de amastatina 10 μ M (n=2). Los datos corresponden al promedio de los datos para 3 y 2 experimentos independientes (según el caso), las barras indican el error estándar y la desviación estándar respectivamente.

VIII.3.4 Otros residuos en el sitio activo de la PPII

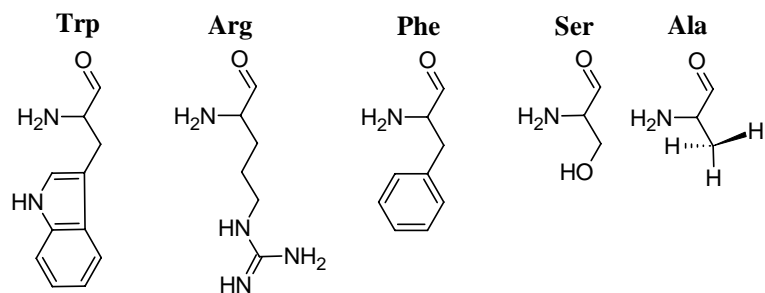
Como se mencionó en los antecedentes, se han encontrado otros residuos en el sitio activo de la PPII que solo se encuentran conservados en secuencias tipo PPII y que pudieran estar cumpliendo un papel importante en la actividad de la enzima. Los cambios por mutagénesis dirigida en el W525 y en la H468 se realizaron teniendo en cuenta las observaciones del modelo teórico para el sitio activo. Estos residuos se encuentran en el sitio activo de la PPII, no se encuentran conservados en la familia y son cercanos al TRH durante el anclaje de éste en el sitio activo.

VIII.3.4.1 El W525

Estudios previos sobre mutantes en este residuo del sitio activo de la PPII (W525R, W525F, W525A, W525S) señalan que éste residuo es importante (ver antecedentes). Como se observa en la figura 24 las mutantes en el residuo W525 tiene una actividad específica casi 5 veces menor a la actividad de la enzima silvestre. Esta disminución se debe principalmente a una caída de 3 y 4 veces la V_{max} para las mutantes PPII-W525A y PPII-W525S respectivamente en relación a la PPII silvestre (Tabla 9).

Enzima	K_m (μ M)	V_{max} (pmol/min*mg)
Silvestre	23 \pm 5	341 \pm 18
W525A	51 \pm 9	75 \pm 16
W525S	31 \pm 4	107 \pm 22

Tabla 9 Constantes catalíticas para la PPII silvestre y mutantes de la PPII en el W525. frente a TRH- β NA como sustrato. TRH- β NA 400 μ M.



TRH-βNA como sustrato

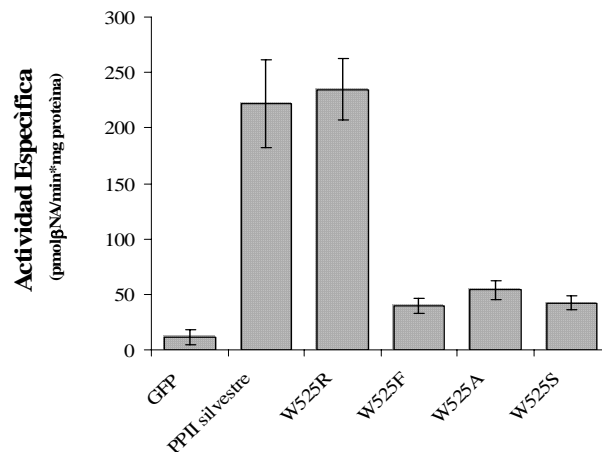


Figura 24. Actividad de la PPII y de mutantes de la PPII en W525 frente a TRH-βNA como sustrato. Actividad específica en pmol de βNA/min*mg de proteína total de preparaciones membranales de células C6 transfectadas con los diferentes vectores. La actividad de células transfectadas con pN₃EGFP es la actividad control.

Estos resultados posicionan al residuo W525 en el contexto del mecanismo catalítico de la enzima más que en la afinidad de la enzima por el sustrato ya que la K_m no se observa significativamente diferente con respecto a la enzima silvestre.

Para determinar si el W525 forma parte de un núcleo hidrofóbico involucrado en la afinidad de la enzima hacia inhibidores con residuos hidrofóbicos en su extremo C-terminal, se evaluó la actividad frente a TRH-βNA de todas las mutantes en el W525 y de la PPII silvestre frente a un inhibidor competitivo con un grupo hidrofóbico en el carboxilo terminal TRH-2[Asn]MCA. Debido a que el TRH-2[Asn]MCA puede interferir con la detección de la fluorescencia de la βNA, se decidió cambiar de sustrato y determinar la

actividad de la enzima silvestre y de las mutantes frente al sustrato TRH-MCA (pGlu-His-Pro-7-amido-metilcumarina; Fig 25, panel superior).

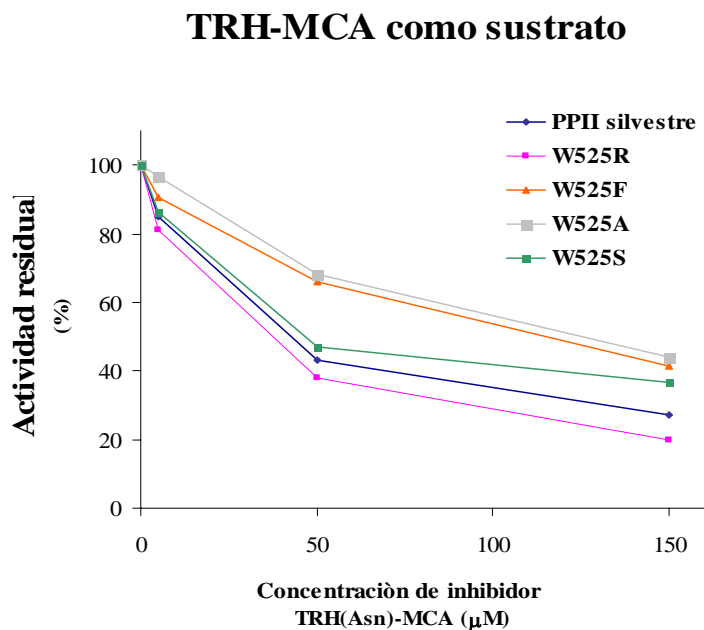
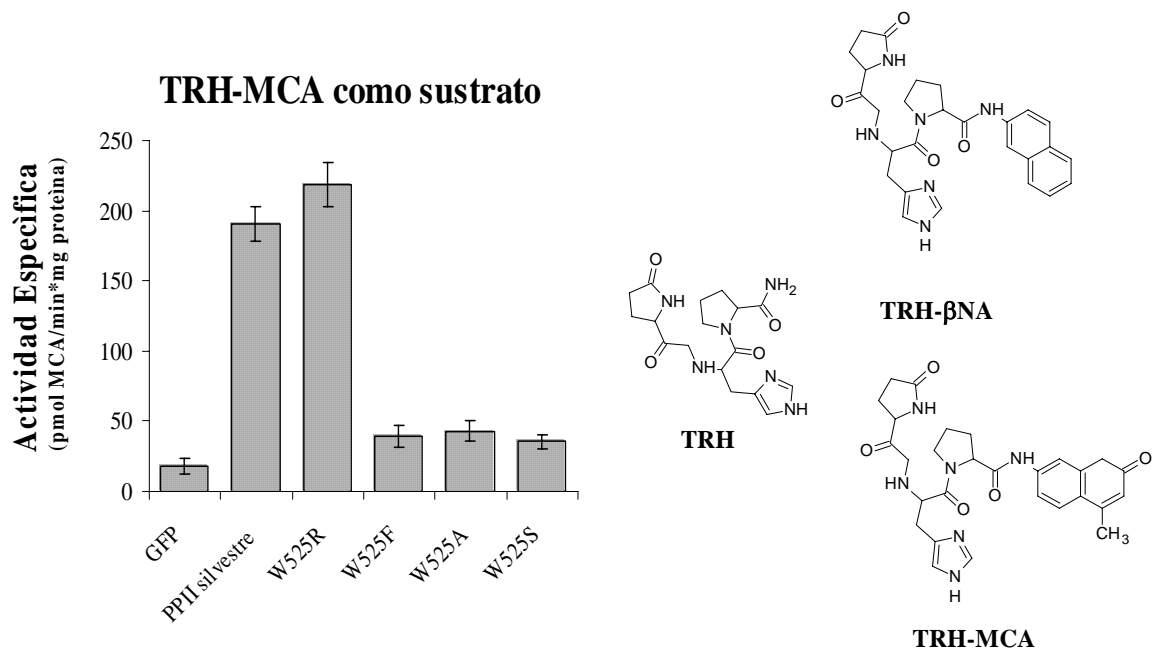


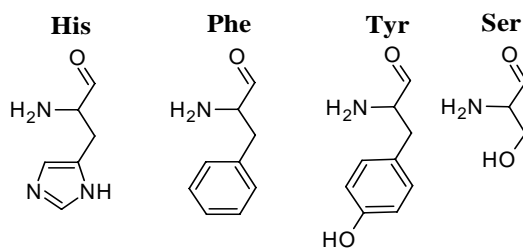
Figura 25. Actividad específica de la PPII silvestre y de mutantes de la PPII en W525 frente a TRH-MCA como sustrato. Efecto del inhibidor TRH[Asn (2)]MCA **Panel superior:** Actividad enzimática (actividad de PPII= 100%) frente a TRH-MCA 400 μM como

sustrato. **Panel inferior:** Actividad residual de PPII silvestre y mutantes de PPII en W525 a 0, 5, 50 y 150 μM del inhibidor TRH[Asn₂]MCA, empleando como sustrato 400 μM de TRH-MCA. Las mutantes que tienen una actividad específica muy pequeña se dejaron mayor tiempo de reacción; se manejaron para todas las preparaciones membranales las mismas concentraciones de proteína.

El resultado relativo fue similar al observado frente a TRH- β NA (pGlu-His-Pro- β -naftilamida). En el panel inferior de la misma figura podemos ver el efecto del inhibidor sobre la enzima silvestre y sobre las mutantes. Podemos observar que la enzima silvestre, la mutante W525S y la mutante W525F tuvieron un comportamiento similar. Trazamos una línea recta a una inhibición del 50 % para determinar una dosis media efectiva (ED_{50}) tentativa. Para las tres enzimas el valor fue cercano a 45 o 48 μM de inhibidor. La mutante W525A tuvo una ED_{50} de 100 μM , por lo que es la menos sensible al inhibidor y la mutante W525R tuvo una ED_{50} de 38 μM aproximadamente.

VIII.3.4.2 La H468

La H468 se encuentra en el sitio activo de la PPII y no está conservada en la familia. Datos experimentales obtenidos previamente para mutantes en este residuo indican que este residuo juega un papel importante en la actividad de la PPII, ya que mutantes a serina, tirosina o fenilalanina generan enzimas disminuidas drásticamente en su capacidad por hidrolizar al TRH (Chávez-Gutiérrez, 2005; Fig. 26). La poca actividad residual de las mutantes frente al TRH- β NA impedía la determinación de las constantes catalíticas, por lo que se adecuaron condiciones experimentales para determinarlas. Los datos están resumidos en la tabla 10 y muestran que la disminución de la actividad específica de la enzima se debe principalmente a una disminución en la eficiencia catalítica de las mutantes, de 12 a 17 veces con respecto a la enzima silvestre. La K_m para las mutantes H468Y e H468F no se ve afectada al compararla con la PPII silvestre; la K_m para la H468S se ve ligeramente incrementada pero no parece que éste residuo cumpla un papel preponderante en la afinidad de la enzima por el sustrato.



TRH- β NA como sustrato

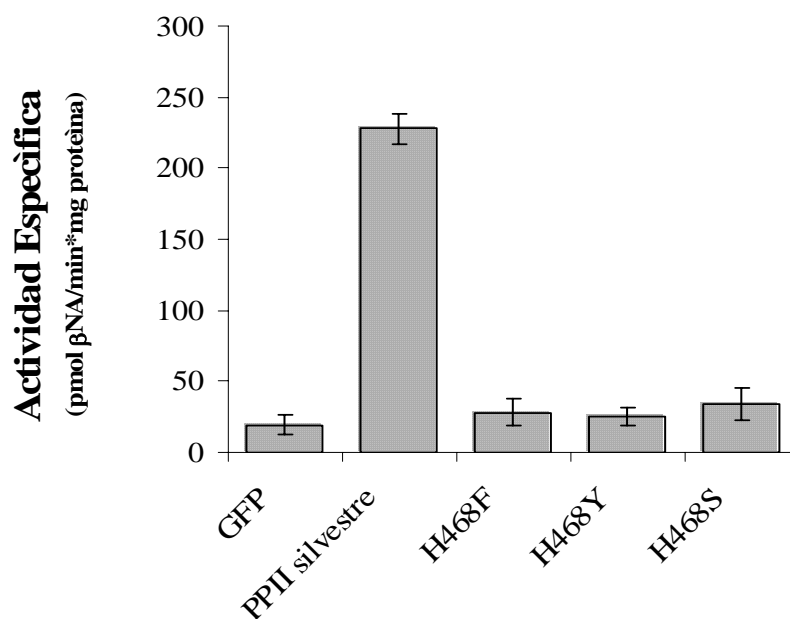


Figura 26. Actividad de PPII y mutantes de PPII en la H468 frente a TRH- β NA como sustrato. Actividad específica en pmol de β NA/min*mg de proteína total de preparaciones membranales de células C6 transfectadas. La actividad control es la actividad en membranas de células transfectadas con el vector pN₃-GFP.

	Km	Vmax
Enzima	(μM)	($\text{pmol}/\text{min} \cdot \text{mg}$)
silvestre	23 \pm 5	341 \pm 18
H468F	32 \pm 13	28 \pm 8
H468S	53 \pm 9	41 \pm 8
H468Y	20 \pm 8	20 \pm 1

Tabla 10. Constantes catalíticas para la PPII silvestre y mutantes de la PPII en la H468 frente a TRH- β NA como sustrato. TRH- β NA 400 μM .

La PPII de cerebro de porcino puede hidrolizar al tripéptido pGlu-Phe-ProNH₂ de una manera menos eficiente que el pGlu-His-ProNH₂; la Km reportada para el TRH-Phe es de aproximadamente 50 μM . Estos datos sugieren que el subsitio S1' en la enzima es capaz de aceptar residuos aromáticos durante la catálisis (Kelly *et al.*, 2000). Por lo tanto decidimos probar este sustrato frente a las mutantes de PPII en el residuo H468 con el fin de evaluar si forma parte del subsitio S1' en la enzima. Se observó que con TRH-Phe- β NA como sustrato, el comportamiento relativo de las mutantes es similar a su comportamiento con TRH- β NA como sustrato (Fig. 27).

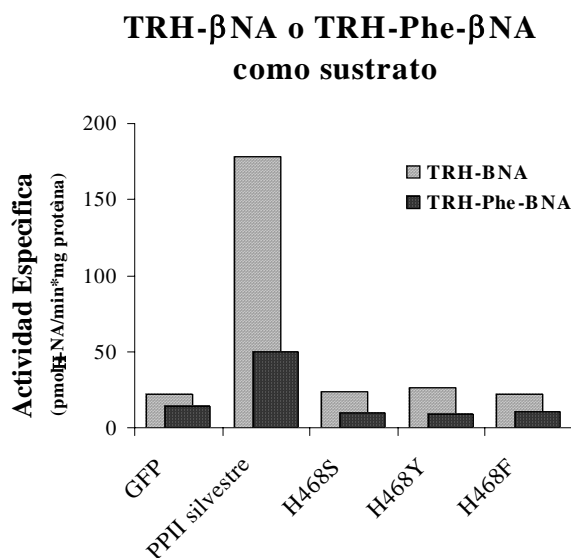


Figura 27. Actividad de la PPII silvestre y de mutantes de la PPII en la H468 frente a TRH- β NA o TRH-Phe- β NA como sustrato. Actividad específica frente a TRH- β NA 400 μM o TRH-Phe- β NA 400 μM . Los datos provienen de un solo experimento.

Al generar un cambio sobre éste residuo que no pueda ser compensado, la capacidad de la enzima por hidrolizar cualquiera de los dos sustratos se ve afectada. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la actividad específica de las mutantes frente al TRH- β NA es muy baja y que la enzima silvestre hidroliza con menos eficiencia al sustrato modificado (TRH-Phe), lo cual genera incertidumbre en las determinaciones. En conclusión podríamos sugerir que este residuo H468 es indispensable para que sustratos como TRH- β NA o TRH-Phe- β NA puedan ser hidrolizados.

VIII.3 Expresión de la PPII soluble

La PPII de rata fue clonada en el vector de expresión pSectag2B (pSectag2B-PPIIr/7973 pb) desde el Asp 78 hasta las His 1025; es decir abarca casi toda la secuencia de la PPIIr a excepción de la región N-terminal y transmembranal. Sin embargo, se espera que esto no cause efecto sobre la actividad ya que estudios previos demostraron que es posible recuperar la actividad de la PPII al rasurarla de la membrana plasmática por digestión enzimática suave (Bauer, 1994). Se verificó que la secuencia de la PPII permaneciera inalterada y que el plásmido contuviera la secuencia del péptido líder en su extremo N-terminal y el epítoto *c-myc* así como 6xHis del lado C-terminal.

Se transfectaron las diferentes líneas celulares con la construcción que contiene a la PPII silvestre fusionada a GFP para observar su distribución. En las células COS-7 y C6 la fluorescencia se localizó principalmente en la membrana plasmática, a diferencia de las células HEK293 en las cuales se observó la fluorescencia distribuida probablemente perinuclear aunque también se extendió hasta la membrana plasmática (Fig. 28).

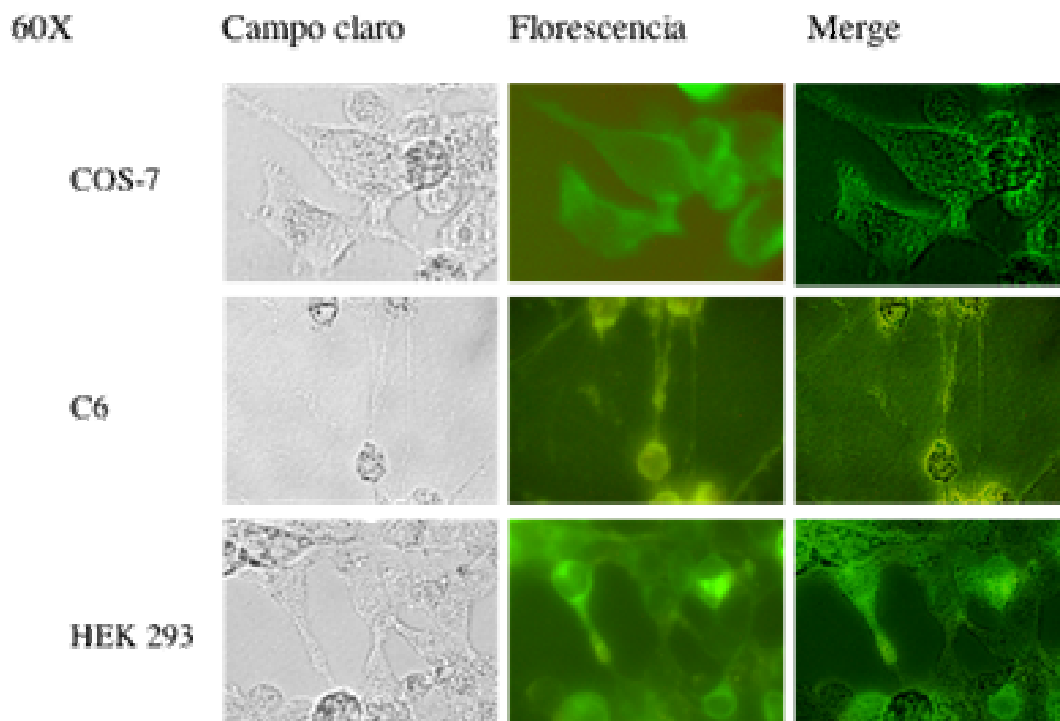


Figura 28. Distribución subcelular de la PPII_r en células COS-7, C6 y HEK 293. Las células fueron transfectadas con el vector pN₃-GFP-PPII_r, el cual contiene a la PPII silvestre fusionada a la GFP. Las fotos fueron adquiridas 48 horas postransfección, con un objetivo de inmersión 60x.

Recuperamos el medio y las diferentes fracciones de las células transfectadas y las evaluamos empleando TRH-βNA como sustrato. De acuerdo a lo que esperábamos, encontramos actividad de PPII en el medio de cultivo de las células transfectadas con el vector de expresión soluble, tanto de las células COS-7 (Fig. 29 y 30) como C6 y HEK 293 (Fig.30). La actividad se encuentra mayoritariamente en el medio de cultivo, con valores mínimos en la membranal y en el citosol (Fig. 29). Los valores detectados en el medio crecen con el tiempo, como era de esperarse (Fig. 29 y 30). La expresión en el medio es mayor en células COS-7 y HEK 293 que en células C6 (Fig. 30). Los otros vectores de expresión no producen o producen solo una pequeña cantidad de PPII en el medio extracelular (Fig. 29 y tabla 11).

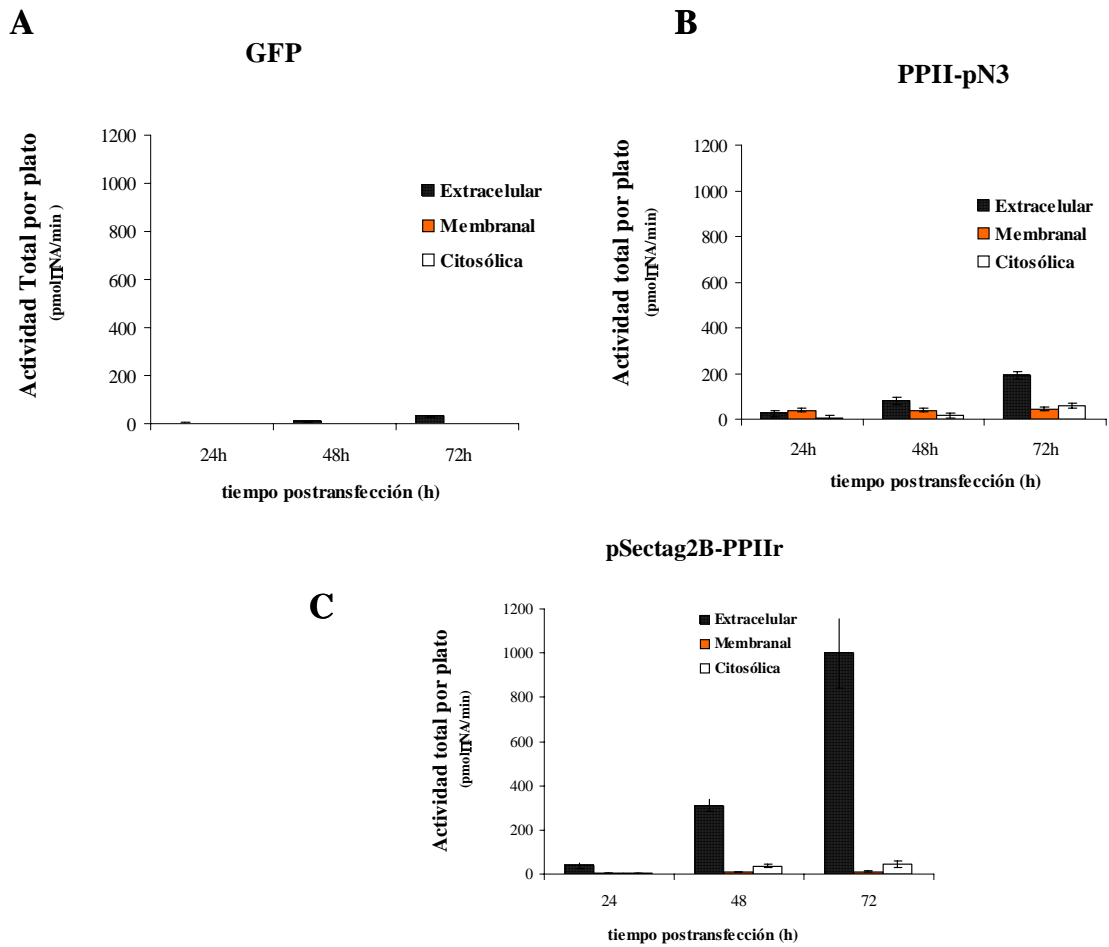


Figura 29. Actividad en células COS-7 transfectadas con vectores de expresión membranal o soluble de la PPII. Actividad total (pmol β NA/min) frente a TRH- β NA 400 μ M. **(A)** pN₃-GFP nos sirve para observar la eficiencia de transfección y determinar la actividad de fondo. **(B)** pN₃-PPII nos permite monitorear la actividad de PPII en la membrana y así mismo la eficiencia de la transfección con respecto a los datos anteriormente obtenidos para la PPII silvestre. **(C)** pSectag2B-PPIIr. La actividad específica esta corregida por la cantidad de proteína total en cada fracción. Los datos mostrados son el promedio de tres experimentos independientes por triplicado y su error estándar.

TRH- β NA como sustrato

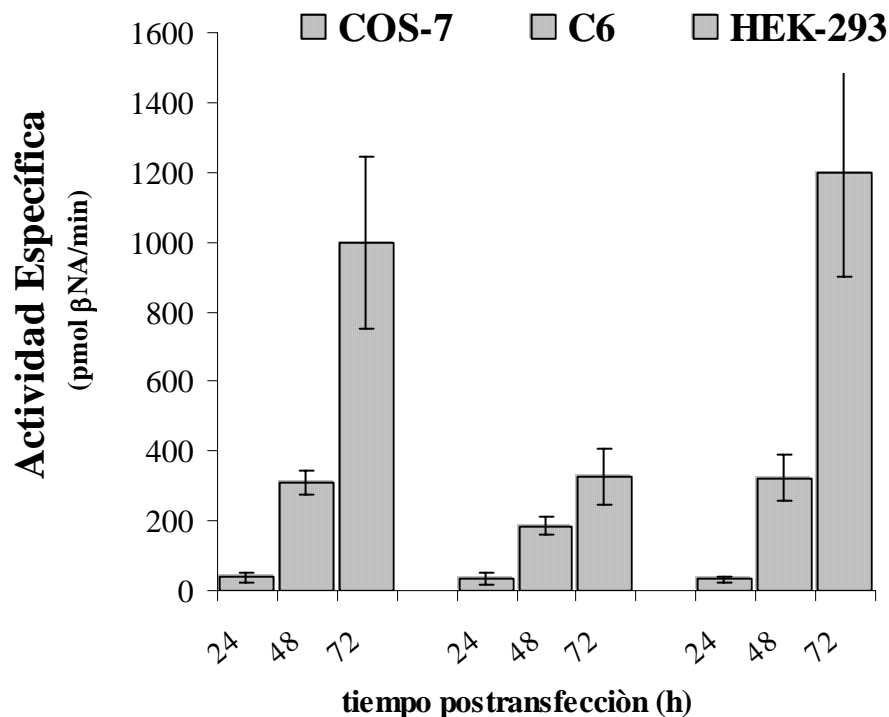


Figura 30. Actividad total de PPII en el medio de cultivo en diferentes líneas celulares transfectadas con el vector *pSectag2B-PPIIr*. Actividad en pmol de β NA liberada/min, en el medio de cultivo frente a TRH- β NA 400 μ M. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos por triplicado con desviación estándar (C6 y HEK293) y tres experimentos con error estándar (COS-7).

Hasta el momento, la detección de hidrólisis del TRH- β NA en el medio de cultivo de las células COS-7 y HEK 293 nos muestra un panorama alentador. Es un avance importante poder encontrar actividad de PPII en el compartimiento extracelular. Lo que sigue es intentar purificar la proteína; para ello, nos valdremos de la secuencia 6xHis que contiene la proteína para purificarla por cromatografía de afinidad mediante una resina de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA). Sin embargo, aun no ha sido posible visualizarla por azul de coomassie ni tampoco hemos podido detectarla por Western blot con un anticuerpo anti-

His. Teniendo en cuenta que el ensayo de actividad enzimática es muy sensible, es posible que los niveles de proteína sean insuficientes para ser detectados por tinción con azul de coomassie.

Línea celular	Actividad Específica (pmol β NA/min*mg proteína total)		
	PN₃-GFP	PN₃-PPIIr	Psectag2B-PPIIr
COS-7	2±2	32±3	123±5
C6	2±2	20.5±2	81.7±3
HEK-293	4±1	43.2±2	222±2

Tabla 11. *Actividad de la PPII en el medio extracelular en las diferentes líneas celulares empleadas; COS-7, C6 y HEK293. Datos de actividad específica \pm error estándar (COS-7) y desviación estándar (C6 y HEK-293) frente a TRH- β NA 400 μ M a 72 h postransfección en el medio de cultivo recuperado.*

IX. DISCUSION

Expresión de la PPII de rata (PPIIr) silvestre y de mutantes de la PPII.

La detección del nivel de expresión de las PPII (rata) silvestre y mutantes se realizó mediante dos técnicas diferentes. La primera mediante análisis tipo Western blot de las fracciones membranales de células COS-7 transfectadas con los vectores que contienen a las diferentes proteínas fusionadas a una etiqueta de 6 His. Por este método observamos la banda correspondiente a la PPIIr silvestre y a las diferentes mutantes (monómeros) a ~117 kDa. La intensidad de las bandas en todos los casos fue la misma (desviaciones menores al 10 % con respecto a la PPII silvestre, al cuantificarlas). Esto indica que la expresión de todas las mutantes es la misma que la de la PPII.

La segunda técnica fue el análisis por microscopia de fluorescencia de las proteínas fusionadas a la proteína verde fluorescente. Esta técnica nos permitió observar la distribución subcelular de la PPII silvestre y de las diferentes mutantes en las células C6 transfectadas. En este caso tampoco observamos diferencias en la distribución de las fluorescencias entre las mutantes y la PPII silvestre, con una expresión principalmente sobre la membrana plasmática.

Estos resultados nos permiten concluir que nuestras determinaciones están referidas a los cambios bioquímicos realizados y no a un problema en el nivel de expresión de las enzimas mutantes frente a la PPII silvestre.

Actividad de la PPII silvestre y PPII mutada frente a TRH-βNA y otros sustratos de aminopeptidasas

El puente salino y el reconocimiento del amino terminal

Estudios recientes de la estructura cristalográfica de la PepN de *E. Coli* (Ito *et al.*, 2006) ratificaron el papel del E121 (contraparte de S269 en PPIIr) como uno de los residuos que interacciona con el grupo amino terminal de sustratos o inhibidores como Chávez-Gutiérrez (2005) había observado en el modelo teórico del sitio activo de la APN de humano.

Adicional a esta interacción, en la estructura cristalográfica para la PepN se observa que el E121 interacciona con el E264 de la firma exopeptidasa (E408 en PPIIr), el cual a su vez se encuentra en puente salino con la K319 (contraparte de K463 en PPIIr). Este puente salino es equivalente al observado anteriormente por Chávez-Gutiérrez en el modelo teórico para el sitio activo de la PPIIr (K463-E408), indicando que este puente salino no es estrictamente característico de la PPII. La principal diferencia entre los sitios activos que contienen este tipo de puente salino radica en la S269, la cual es específica de secuencias PPII y se ubica en una posición preponderante en el mecanismo de hidrólisis común entre las peptidasas.

Nuestros resultados apuntan a que el residuo S269 cumple un papel importante en la actividad de la PPII y podría estar involucrado en la alta especificidad de la *omegapeptidasa*. Cambios en la S269 a Gln o Glu produjeron enzimas completamente inactivas frente a TRH-βNA como sustrato a diferencia de cuando se cambia S269 por Ala, lo cual produjo una enzima con una actividad disminuida ~ 40 % respecto a la enzima silvestre. Adicionalmente, las constantes catalíticas determinadas para la mutante S269A-PPIIr sugieren que este residuo está involucrado en el mecanismo catalítico más que en el reconocimiento del sustrato, ya que su V_{max} se ve afectada más que su K_m con respecto a la enzima silvestre. Lo anterior puede explicarse de dos maneras; una es que el tamaño de la S269 es importante, ya que residuos más grandes en esta posición pueden ocasionar un impedimento estérico para la interacción del TRH en el sitio activo, lo cual no sucede con la Ala, por ser un residuo pequeño. La segunda explicación es que los residuos Glu o Gln en esta posición podrían establecer una interacción con la K463, y generar un contexto semejante al que se observa en la estructura cristalográfica de la PepN de *E.coli* entre los residuos que son contraparte (K319-E121). Esta nueva interacción en el sitio activo de la PPII mutante podría generar una cavidad inapropiada para que el TRH sea posicionado e hidrolizado. Lo anterior nos permite concluir que un residuo más largo que la serina y cargado en la posición 269 del sitio activo de la PPII impide que el TRH sea hidrolizado.

Por otro lado, los datos obtenidos durante la competencia del TRH frente a Ala-βNA para las dobles mutantes nos permiten sugerir que las PPII *alanilpeptidasas* aun pueden unir al

TRH, pero no de una manera eficiente, debido a que la influencia del TRH sobre la actividad *aminopeptidasa* es baja. Esto podría indicar que aún con los cambios realizados, el sitio activo de la *omegapeptidasa* conserva parte de la maquinaria de unión del TRH reiterando la idea que en estas mutantes se está afectando probablemente el mecanismo catalítico.

Los resultados obtenidos en el análisis de las PPII-mutantes (sencillas y dobles) frente a Ala- β NA como sustrato indican que el sitio activo no es destruido con los cambios realizados. Esto se basa en que las PPII dobles mutantes y la mutante sencilla S269E-PPIIr tiene actividad *aminopeptidasa*. El cambio realizado en la mutante sencilla S269E-PPIIr la transforma en un sitio activo similar al de las enzimas PepN de *E coli* y L-RAP de humano, las cuales hidrolizan sustratos con residuos de Arg, Ala o Lis en su extremo N-terminal. Desafortunadamente nuestros intentos por evaluar a las enzimas doble mutantes frente a Arg o Lis- β NA fueron en vano, ya que no logramos disminuir el ruido de fondo producido por aminopeptidasas endógenas de las células C6. Sin embargo, la actividad observada frente a Ala- β NA sugiere que la neutralización de la carga debido a la presencia del Glu en esta posición favorece la hidrólisis de sustratos con amino terminal libre. Esto indica que residuos de lisina en la contraparte a la K463 de la PPII requieren que la carga sobre la Lis sea neutralizada por la presencia de un residuo de Glu en la posición contraparte a la 269 en la PPII, como ya lo había sugerido Chávez-Gutiérrez (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2006). Es importante mencionar que esto no ocurre cuando se cambia la S269 por Gln; en este caso la enzima resultó inactiva frente a Ala- β NA enfatizando en que cuando hay un residuo de Lis en la posición contraparte a la K463 de la PPII necesariamente hay un residuo de Glu en la posición equivalente a la S269.

Lo anterior unido a los resultados obtenidos para las doble mutantes S269Q-K463N y S269Q-K463R en las cuales se tiene un sitio activo semejante al de las aminopeptidasas que no contienen Lis en la posición equivalente a la K463 de la PPII sugiere que cuando esta lisina no está presente en la posición equivalente a la S269 de la PPII puede estar presente una Gln y la actividad *alanilpeptidasa* se conserva.

Nuestros resultados nos permiten ir un paso adelante dentro de posibles explicaciones sobre la especificidad en la familia ya que ninguna de nuestras mutantes hidrolizo sustratos con amino-terminal ácido, sugiriendo que este residuo S269-PPII (y su contraparte en los demás miembros) cumple un papel preponderante en el reconocimiento de residuos neutros y posiblemente básicos en el extremo N-terminal. Probablemente en las aminopeptidas que tienen afinidad por aminoácidos ácidos en el extremo N-terminal, hay otro u otros residuos que les confieren dicha especificidad como el caso de la APN y la APA las cuales tiene Gln y Glu respectivamente en la posición equivalente a la S269-PPII. Esta pequeña y discreta diferencia podría marcar la diferencia en la especificidad de estas dos enzimas.

El análisis de la PPII doble mutante S269Q-K463N-PPIIr frente a diferentes inhibidores (amastatina y actinonina) nos permite observar una diferencia en la sensibilidad de la enzima. Esto sugiere que estos residuos podrían estar participando en el mecanismo de inhibición de la amastatina; sin embargo, el mecanismo de acción de estos inhibidores en las aminopeptidasas sensibles a ellos es desconocido y no podemos concluir a que nivel esta ocurriendo dicha influencia sobre la actividad de las dobles mutantes. La amastatina es una molécula mas voluminosa que la actinonina y posee grupos reactivos que podrían generar interferencia o generar interacciones intra o inter moleculares en el sitio activo provocando la disminución en la actividad de la PPII doble mutante frente al sustrato con amino terminal libre. En base a los resultados obtenidos podemos sugerir que así como este inhibidor (amastatina) puede afectar la actividad aminopeptidasa de la PPII mutante, la actividad que observamos frente al otro inhibidor (actinonina), también podría estar disminuida.

Los resultados que generaron las doble mutantes y la mutante sencilla S269E resultan interesantes en el análisis del sitio activo de la PPII. Se valida el modelo teórico obtenido por Chávez-Gutiérrez (2005), ya que los datos bioquímicos generados con estas mutantes se ajustan a las interacciones que se observan en el modelo, apoyando de esta manera la existencia de un puente salino en el sitio activo (K463-E408) y que esta interacción carga-carga es necesaria para la actividad de la enzima. Además, se muestra que en las enzimas

que contienen un residuo de Lis en la posición equivalente a la K463 en la PPII, esta carga requiere ser neutralizada para que se conserve la actividad aminopeptidasa.

Otros residuos en el sitio activo de la PPII

W525

En la Fig. 23, se observa que la actividad específica de las mutantes W525R y W525F frente al TRH tiene un comportamiento similar al anteriormente observado por Chávez-Gutiérrez en sus análisis y adicionalmente podemos ver que cambios en el W525 a alanina o fenilalanina producen enzimas con actividad piroglutamil peptidasa II disminuida, lo cual se debe principalmente a una disminución en la eficiencia catalítica entre 5 y 3 veces para las mutantes W525A y W525S respectivamente, con respecto a la PPII silvestre. Los valores de Km nos dejan ver que el W525 no está participando en el reconocimiento o unión del sustrato aun cuando la mutante W525A tiene una Km dos veces mayor a la de la PPII silvestre. Sin embargo, la disminución en la eficiencia catalítica sugiere una participación en el mecanismo catalítico, probablemente a través de la estabilización del estado de transición.

Intentando resolver el comportamiento de la mutante PPII-W525R, Chávez-Gutiérrez realizó el modelo teórico para el sitio activo de esta mutante y encontró que éste residuo de Arg establece una interacción por puente salino con el E496. Dicha interacción podría estar compensando la ausencia del residuo hidrofóbico en esta posición. Lo interesante de su observación es que el E496 de la PPII es contraparte del E348 en la LTA4H. El E348 en la LTA4H interacciona con las cadenas laterales de los residuos R563 y K565, dos residuos que se han propuesto como sitios de reconocimiento del carboxilo terminal en los sustratos (Rudberg *et al.*, 2002).

Estas evidencias y nuestros resultados apoyan la idea de que el W525 es un residuo importante en el sitio activo; su tamaño y sus propiedades bioquímicas contribuyen en la actividad enzimática de la PPII, mediante un efecto directo o indirecto sobre la catálisis. La

sustitución del triptofano por la alanina, un aminoácido hidrofóbico y pequeño lleva a la disminución de la actividad y a una reducción de la sensibilidad al inhibidor TRH[Asn P2]MCA, por otro lado se sabe que el entorno de este residuo es hidrofóbico (Chávez-Gutiérrez 2005). Estos resultados sugieren que en esta posición es importante el tamaño del residuo ya que un residuo pequeño no puede compensar este entorno, probablemente porque se desestabilice la estructura de la proteína repercutiendo en una pérdida de la afinidad de la enzima hacia su sustrato o hacia el inhibidor con extremo C-terminal hidrofóbico. Lo contrario se observó cuando la arginina ocupa la posición 525 en el sitio activo; este residuo puede compensar al triptofano tanto en su actividad frente al sustrato como en la afinidad hacia este inhibidor; incluso resulta en un incremento de estos dos parámetros para la mutante. La interacción por puente salino observada para el modelo teórico del sitio activo mutado podría justificar la estabilidad del núcleo hidrofóbico por lo cual no se ve afectada la conformación local de la enzima.

La sensibilidad al inhibidor de la mutante a fenilalanina es similar a la de la enzima silvestre; esto no sorprende ya que es un residuo voluminoso e hidrofóbico con características fisicoquímicas similares a las del triptofano y su participación en el sitio activo contribuye a mantener el núcleo hidrofóbico permitiendo que se mantenga su afinidad hacia el inhibidor. La sensibilidad de la mutante a serina similar a la enzima silvestre es sorprendente, ya que este es un residuo pequeño y polar; a diferencia de la alanina, la carga negativa de la serina podría generar interacciones compensatorias.

Algunos estudios realizados por Kelly y colaboradores destacan la importancia de la Asn en la posición 2 del inhibidor (TRH[Asn P2]MCA), ya que esta confiere resistencia a la hidrólisis y actúa como un efectivo inhibidor de la enzima. Adicionalmente estos autores realizaron estudios con inhibidores extendidos en el C-terminal con residuos hidrofóbicos, los cuales resultaron potentes inhibidores de la enzima (Kelly *et al.*, 2005). Sería interesante evaluar dicho inhibidor frente a nuestras mutantes en W525 para obtener datos adicionales que apoyen la idea de la participación de este residuo en el núcleo hidrofóbico.

H468

Las tres mutantes en este residuo se comportan de manera similar. En el modelo teórico del sitio activo se observa que este residuo de histidina interactúa vía puente de hidrógeno con el E497, el cual a su vez establece una interacción vía puente salino con la R488 (Chávez-Gutiérrez, 2005). El residuo E497 está conservado en la familia, pero solo en la PPII se encuentra en puente salino con la R488 (la R488 no está conservada en la familia). En la estructura cristalográfica del factor F3 que interactúa con tricorn, los autores identificaron que una treonina (Trn 292) podría estar participando en el mecanismo catalítico de la enzima (Kyrieleis *et al.*, 2005). Esta treonina es equivalente a la H468 de la PPII. En la termolisina, el residuo que es contraparte a la PPII-H468 es un aspártico (D170). Este residuo está involucrado en una serie de interacciones por puente de hidrógeno que involucran a la Arg203, la cual participa en la unión del sustrato mediante una interacción por puente de hidrógeno con el grupo carbonil P1' del sustrato, y a la His142 de la firma catalítica cuya coordinación es favorecida por el grupo ácido del Asp, ya que la posiciona correctamente y genera un ambiente electrónico que favorece dicha coordinación (Marie-Claire *et al.*, 1997; Matthews, 1988). En nuestros resultados la actividad de las mutantes en H468-PPII se ve afectada principalmente por una disminución en la V_{max} , lo que sugiere que su papel en el sitio activo no se da en la unión del sustrato sino durante su catálisis. En el modelo teórico que Chávez-Gutiérrez diseñó para el sitio activo de la PPII con el TRH, pareciera que el TRH en el sitio activo no cambia la posición de la H468 y esta conserva su interacción con el E471, el cual a su vez interacciona con la H441 del motivo catalítico (Fig. 14B). Es posible suponer que esta interacción se mantiene y facilita la hidrólisis del TRH, lo que parece que no sucede si tenemos otro residuo allí, como alanina, tirosina o fenilalanina. Al parecer estos residuos no compensan la falta de la H468; el entorno se desestabiliza, incluyendo a la H441 la cual es ligando del zinc y afectando de esta manera la catálisis del TRH.

X. CONCLUSIONES

En conclusión en análisis por mutagenésis sitio-dirigida de residuos en el sitio activo de la PPII validan el modelo teórico propuesto por Chávez-Gutiérrez, confirmando que el modelo 3D realizado constituye una herramienta útil en la investigación de la organización del sitio activo y en el estudio del mecanismo catalítico de la PPII y de la familia M1.

Nuestros resultados confirman el papel esencial del residuo Glu de la firma exopeptidasa para la actividad *amino*peptidasa y en la PPII sugieren que esta carga requiere ser neutralizada por la K463 para la actividad *omega*peptidasa. Adicionalmente otro residuo en la PPII S269 parece cumplir un papel preponderante en la restringida especificidad de la PPII. Estos tres residuos S269, K463 y E408 ejercen una acción conjunta en el sitio activo estableciendo la especificidad *omega*peptidasa de la PPII

Si bien aun no es claro el papel de los residuos W525 e H468 en el sitio activo de la PPII, nuestros resultados sugieren que el W525 forma parte de un núcleo hidrofóbico implicado en la afinidad de la enzima por inhibidores con residuos hidrofóbicos en el C-terminal, aunado a esto es importante que la conformación de este núcleo hidrofóbico se mantenga para que la enzima pueda hidrolizar al sustrato y unir a los inhibidores. Al igual que para el W525 la H468 parece estar ejerciendo principalmente un papel en la catálisis de la enzima, la cual se ve mayormente afectada en las mutantes de la H468 posiblemente debido a la interacción (indirecta) de este residuo con la H441 de la firma catalítica.

XI. PERSPECTIVAS

Seria interesante continuar con el análisis del residuo W525 con otros inhibidores que contengan residuos hidrofóbicos en el extremo C-terminal como el pGlu-Asn-Pro-Tyr-Trp-Trp-MCA en orden a confirmar la afinidad de este núcleo hidrofóbico hacia este tipo de inhibidores. También sería interesante evaluar las mutantes en W525 e incluso las de la H468 con péptidos fosfónicos análogos al estado de transición para observar si estos residuos podrían estar involucrados en el estado de transición, usualmente se verían desplazados los valores de K_i cuando estos residuos están mutados.

La purificación de la PPII soluble la cual constituye una herramienta importante para el estudio de la misma; un paso siguiente sería realizar cultivos a mayor escala en orden a obtener mayor cantidad de proteína; intentar observarla mediante tinción con nitrato de plata las cuales es más sensible que el azul de coomassie e intentar obtenerla en forma pura.

XII. BIBLIOGRAFIA

- Albiston** AL, Ye S, Chai SY. Membrane bound members of the M1 family: more than aminopeptidases. *Protein Pept Lett.* 2004 Oct;11(5):491-500. Review.
- Barrett** A, Rawlings D, and Woessner, J. F. (1998) *Handbook of Proteolytic Enzymes*, pp. 994–1032, *Academic Press, Inc.*, San Diego, CA
- Bauer** K, Kleinkauf H. Catabolism of thyroliberin by rat adenohypophyseal tissue extracts. *Eur J Biochem.* 1980 May;106(1):107-17.
- Bauer** K, Nowak P, Kleinkauf H. Specificity of a serum peptidase hydrolyzing thyroliberin at pyroglutamyl-histidine bone. *Eur J Biochem.* 1981 Aug;118(1):173-6.
- Bauer** K. Purification and characterization of the thyrotropin-releasing-hormone-degrading ectoenzyme. *Eur J Biochem.* 1994 Sep 1;224(2):387-96.
- Blomster** M, Wetterholm A, Mueller MJ, Haeggstrom JZ. Evidence for a catalytic role of tyrosine 383 in the peptidase reaction of leukotriene A4 hydrolase. *Eur J Biochem.* 1995 Aug 1;231(3):528-34
- Blomster** M, Wetterholm A, Mueller MJ, Haeggstrom JZ. Evidence for a catalytic role of tyrosine 383 in the peptidase reaction of leukotriene A4 hydrolase. *Eur J Biochem.* 1995 Aug 1;231(3):528-34
- Bradford** MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54
- Browne** P, O'Cuinn G. An evaluation of the role of a pyroglutamyl peptidase, a post-proline cleaving enzyme and a post-proline dipeptidyl amino peptidase, each purified from the soluble fraction of guinea-pig brain, in the degradation of thyroliberin in vitro. *Eur J Biochem.* 1983 Dec 1;137(1-2):75-87.

Burgus R, Dunn TF, Desiderio D, Ward DN, Vale W, Guillemin R. Characterization of ovine hypothalamic hypophysiotropic TSH-releasing factor. *Nature*. 1970 Apr 25;226(5243):321-5.

Charli JL, Cruz C, Vargas MA, and Joseph-Bravo P. The narrow specificity pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochemistry International* 1988 13: 237-242.

Charli JL, Mendez M, Joseph-Bravo P, Wilk S. Specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase do not change the in vitro release of TRH or its content in rodent brain. *Neuropeptides*. 1987 May-Jun;9(4):373-8.

Charli JL, Méndez M, Vargas MA, Cisneros M, Assai M, Joseph-Bravo P, Wilk S. Pyroglutamyl peptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH released from rat brain slices. *Neuropeptides*. 1989 Oct;14(3):191-6.

Chávez-Gutiérrez L, Bourdais J, Aranda G, Vargas MA, Matta-Camacho E, Ducancel F, Segovia L, Joseph-Bravo P, Charli JL. A truncated isoform of pyroglutamyl aminopeptidase II produced by exon extension has dominant-negative activity. *J Neurochem*. 2005 Feb;92(4):807-17.

Chávez-Gutiérrez L, Matta-Camacho E, Osuna J, Horjales E, Joseph-Bravo P, Maigret B, Charli JL. Homology modeling and site-directed mutagenesis of pyroglutamyl peptidase II. Insights into omega-versus aminopeptidase specificity in the M1 family. *J Biol Chem*. 2006 Jul 7;281(27):18581-90.

Chávez-Gutiérrez L. Estudio de la relación estructura-función en la piroglutamil peptidasa II. Tesis doctoral. Programa de maestría y doctorado en ciencias. Instituto de biotecnología UNAM. 2005

Colman PM, Jansonius JN, Matthews BW. The structure of thermolysin: an electron density map at 2-3 Å resolution. *J Mol Biol*. 1972 Oct 14;70(3):701-24

Donlon J, Hayes DJ, O'Cuinn G. Partial purification and characterization of a thyroliberin deamidase from guinea-pig brain. *Biochem Soc Trans*. 1980 Aug;8(4):424

Elmore MA, Griffiths EC, O'Connor B, O'Cuinn G. Further characterization of the substrate specificity of a TRH hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Neuropeptides* 1990; 15: 31-36.

- Fournie-Zaluski** MC, Chaillet P, Bouboutou R, Coulaud A, Cherot P, Waksman G, Costentin J, Roques BP. Analgesic effects of kelatorphan, a new highly potent inhibitor of multiple enkephalin degrading enzymes. *Eur J Pharmacol.* 1984 Jul 20;102(3-4):525-8
- Friedman** TC, Wilk S. Delineation of a particulate thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in rat brain by the use of specific inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase. *J Neurochem.* 1986 Apr;46(4):1231-9.
- Funk** CD, Radman O, Fu JY, Matsumoto T, Jornvall H, Shimizu T, Samuelsson B. Molecular cloning and amino acid sequence of leukotriene A4 hidrolase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987 Oct; 84 (19):6677-81.
- Garat** B, Miranda J, Charli JL, Joseph-Bravo P. Presence of a membrane bound pyroglutamyl amino peptidase degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Neuropeptides.* 1985 Mar;6(1):27-40.
- Greaney** A, Phelan J, O'Cuinn G. Localization of thyroliberin pyroglutamyl peptidase on synaptosomal-membrane preparations of guinea-pig brain tissue. *Biochem Soc Trans.* 1980 Aug;8(4):423.
- Hayes** DJ, Phelan JJ, O'Cuinn G. The metabolism of thyrotropin-releasing hormone by guinea-pig brain. *Biochem Soc Trans.* 1979 feb;7 (1): 59-62
- Heinrikson** RL. Applications of thermolysin in protein structural analysis. *Methods Enzymol.* 1977;47:175-89
- Holmes** MA, Matthews BW. Structure of thermolysin refined at 1.6 A resolution. *J Mol Biol.* 1982 Oct 5;160(4):623-39.
- Hooper** NM. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* 1994 Oct 31;354(1):1-6. Review
- Ito** K, Nakajima Y, Onohara Y, Takeo M, Nakashima K, Matsubara F, Ito T, Yoshimoto T. Aminopeptidase N (proteobacteria alanyl aminopeptidase) from Escherichia coli: Crystal structure and conformational change of the methionine 260 residue involved in substrate recognition. *J Biol Chem.* 2006 Aug 2.
- Iturrioz** X, Rozenfeld R, Michaud A, Corvol P, Llorens-Cortes C. Study of asparagine 353 in aminopeptidase A: characterization of a novel motif (GXMEN) implicated in

exopeptidase specificity of monozinc aminopeptidases. *Biochemistry*. 2001 Dec 4;40(48):14440-8

Iturrioz X, Vazeux G, Celerier J, Corvol P, Llorens-Cortes C. Histidine 450 plays a critical role in catalysis and, with Ca^{2+} , contributes to the substrate specificity of aminopeptidase A. *Biochemistry*. 2000 Mar 21;39(11):3061-8

Joseph-Bravo P, Loudes C, Charli JL, Kordon C. Subcellular distribution of brain peptidases degrading luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) and thyrotropin releasing hormone (TRH). *Brain Res*. 1979 Apr 27;166(2):321-9.

Joseph-Bravo P, Uribe RM, Vargas MA, Perez-Martinez L, Zoeller T, Charli JL. Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol Neurobiol*. 1998 Apr;18(2):231-47. Review.

Kelly JA, Scalabrino GA, Slator GR, Cullen AA, Gilmer JF, Lloyd DG, Bennett GW, Bauer K, Tipton KF, Williams CH. Structure-activity studies with high-affinity inhibitors of pyroglutamyl-peptidase II. *Biochem J*. 2005 Jul 15;389(Pt 2):569-76

Kelly JA, Slator GR, Tipton KF, Williams CH, Bauer K. Kinetic investigation of the specificity of porcine brain thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme for thyrotropin-releasing hormone-like peptides. *J Biol Chem*. 2000 Jun 2;275(22):16746-51

Kyrieleis OJ, Goettig P, Kiefersauer R, Huber R, Brandstetter H. Crystal structures of the tricorn interacting factor F3 from *Thermoplasma acidophilum*, a zinc aminopeptidase in three different conformations. *J Mol Biol*. 2005 Jun 17;349(4):787-800. Epub 2005 Apr 26.

Lawrence J.B, Oxvig C, Overgaard M.T, Sottrup-Jensen L, Gleich G.J, Hays L.G, Yates J.R. III, and Conover, C.A. 1999. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:3149-3153

Lechan RM and **Jackson IM**. Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*. 1982 Jul;111(1):55-65.

Lechan RM, Molitch ME, Jackson IM. Distribution of immunoreactive human growth hormone-like material and thyrotropin-releasing hormone in the rat central nervous system: evidence for their coexistence in the same neurons. *Endocrinology*. 1983 Mar;112(3):877-84.

Lechan, RM., Snapper, SB., Jackson, IM. Evidence that spinal cord thyrotropin-releasing hormone is independent of the paraventricular nucleus. *Neurosci Lett*. 1983 Dec 23;43(1):61-5.

Luciani N, Marie-Claire C, Ruffet E, Beaumont A, Roques BP, Fournie-Zaluski MC. Characterization of Glu350 as a critical residue involved in the N-terminal amine-binding site of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2): insights into its mechanism of action. *Biochemistry*. 1998 Jan 13;37(2):686-92

Luo, L., Yano, N., Mao, Q., Jackson, IM., Stopa, EG., Thyrotropin releasing hormone (TRH) in the hippocampus of Alzheimer patients. *J Alzheimers Dis*. 2002 Apr;4(2):97-103.

Malfroy B, Kado-Fong H, Gros C, Giros B, Schwartz JC, Hellmiss R. Molecular cloning and amino acid sequence of rat kidney aminopeptidase M: a member of a super family of zinc-metallohydrolases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 May 30;161(1):236-41

Marie-Claire C, Ruffet E, Antonczak S, Beaumont A, O'Donohue M, Roques BP, Fournie-Zaluski MC. Evidence by site-directed mutagenesis that arginine 203 of thermolysin and arginine 717 of neprilysin (neutral endopeptidase) play equivalent critical roles in substrate hydrolysis and inhibitor binding. *Biochemistry*. 1997 Nov 11;36(45):13938-45

Matthews BW. Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases. *Acc Chem Res*. 1988 (21) 333-340.

Medina JF, Wetterholm A, Radmark O, Shapiro R, Haeggstrom JZ, Vallee BL, Samuelsson B. Leukotriene A4 hydrolase: determination of the three zinc-binding ligands by site-directed mutagenesis and zinc analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Sep 1; 88(17):7620-4

Mendez M, Cruz C, Joseph-Bravo P, Wilk S, Charli JL. Evaluation of the role of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I in the metabolism of LHRH and TRH in brain. *Neuropeptides*. 1990 Oct;17(2):55-62.

Minami M, Bito H, Ohishi N, Tsuge H, Miyano M, Mori M, Wada H, Mutoh H, Shimada S, Izumi T, et al. Leukotriene A4 hydrolase, a bifunctional enzyme. Distinction of leukotriene A4 hydrolase and aminopeptidase activities by site-directed mutagenesis at Glu-297. *FEBS Lett*. 1992 Sep 14;309(3):353-7.

- O'Connor B, O'Cuinn G.** Localization of a narrow-specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain. *Eur J Biochem.* 1984 Oct 15;144(2):271-8.
- O'Connor B, O'Cuinn G.** Purification of and kinetic studies on a narrow specificity synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Eur J Biochem.* 1985 Jul 1;150(1):47-52
- O'Leary R, O'Connor B.** A study of a synaptosomal thyrotropin releasing hormone-inactivating pyroglutamate aminopeptidase from bovine brain. *Int J Biochem Cell Biol.* 1995 Sep;27(9):881-90.
- O'Leary R, O'Connor B.** Identification and localisation of a synaptosomal membrane prolyl endopeptidase from bovine brain. *Eur J Biochem.* 1995 Jan 15;227(1-2):277-83.
- O'Leary R, O'Connor B.** Thyrotropin-releasing hormone. *J Neurochem.* 1995 Sep;65(3):953-63. Review.
- Orning L, Gierse JK, Fitzpatrick FA.** The bifunctional enzyme leukotriene-A4 hydrolase is an arginine aminopeptidase of high efficiency and specificity. *J Biol Chem.* 1994 Apr 15;269(15):11269-73.
- Papadopoulos T, Heuer H, Bauer K.** Analysis of the thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme by site-directed mutagenesis of cysteine residues. Cys68 is involved in disulfide-linked dimerization. *Eur J Biochem.* 2000 May;267(9):2617-23
- Papadopoulos T, Kelly JA, Bauer K.** Mutational analysis of the thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme. similarities and differences with other members of the M1 family of aminopeptidases and thermolysin. *Biochemistry.* 2001 Aug 7;40(31):9347-5
- Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM.** Isolation and characterization of two distinct low-density, Triton-insoluble, complexes from porcine lung membranes. *Biochem J.* 1996 Nov 1;319 (Pt 3):887-96
- Rawlings ND, Barrett AJ.** MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1;28(1):323-5
- Rozenfeld R, Iturrioz X, Maigret B, Llorens-Cortes C.** Contribution of molecular modeling and site-directed mutagenesis to the identification of two structural residues, Arg-220 and

Asp-227, in aminopeptidase A. *J Biol Chem*. 2002 Aug 9;277(32):29242-52. Epub 2002 May 31.

Rozenfeld R, Iturrioz X, Okada M, Maigret B, Llorens-Cortes C. Contribution of molecular modeling and site-directed mutagenesis to the identification of a new residue, glutamate 215, involved in the exopeptidase specificity of aminopeptidase A. *Biochemistry*. 2003 Dec 23;42(50):14785-93.

Rozenfeld R, Muller L, Messari SE, Llorens-Cortes C. The C-terminal domain of aminopeptidase A is an intramolecular chaperone required for the correct folding, cell surface expression, and activity of this monozinc aminopeptidase. *J Biol Chem*. 2004 Oct 8;279(41):43285-95.

Rudberg PC, Tholander F, Thunnissen MM, Haeggstrom JZ. Leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase. Glutamate 271 is a catalytic residue with specific roles in two distinct enzyme mechanisms. *J Biol Chem*. 2002 Jan 11;277(2):1398-404.

Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*. 1987 Sep 4;237(4819):1171-6. Review

Schally AV, Redding TW, Bowers CY, Barrett JF. Isolation and properties of porcine thyrotropin-releasing hormone. *J Biol Chem*. 1969 Aug 10;244(15):4077-88.

Schauder B, Schomburg L, Kohrle J, Bauer K. Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Sep 27;91(20):9534-8.

Schomburg L, Turwitt S, Prescher G, Lohmann D, Horsthemke B, Bauer K. Human TRH-degrading ectoenzyme cDNA cloning, functional expression, genomic structure and chromosomal assignment. *Eur J Biochem*. 1999 Oct 1;265(1):415-22.

Schroder H, Giacobini E, Struble RG, Luiten PG, van der Zee EA, Zilles K, Strosberg AD. Muscarinic cholinergic neurons in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*. 1991 Nov;27(5):631-6.

Thompson MW, Archer ED, Romer CE, Seipelt RL. A conserved tyrosine residue of *Saccharomyces cerevisiae* leukotriene A4 hydrolase stabilizes the transition state of the peptidase activity. *Peptides*. 2006 Jul;27(7):1701-9.

- Thunnissen** MM, Nordlund P, Haeggstrom JZ. Crystal structure of human leukotriene A(4) hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nat Struct Biol.* 2001 Feb;8(2):131-5.
- Urban** A, Neukirchen S, Jaeger KE. A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jun 1;25(11):2227-8
- Vazeux** G, Iturrioz X, Corvol P, Llorens-Cortes C. A glutamate residue contributes to the exopeptidase specificity in aminopeptidase A. *Biochem J.* 1998 Sep 1;334 (Pt 2):407-13
- Vazeux** G, Wang J, Corvol P, Llorens-Cortes C. Identification of glutamate residues essential for catalytic activity and zinc coordination in aminopeptidase A. *J Biol Chem.* 1996 Apr 12;271(15):9069-74
- Wang** J, Lin Q, Wu Q, Cooper MD. The enigmatic role of glutamyl aminopeptidase (BP-1/6C3 antigen) in immune system development. *Immunol Rev.* 1998 Feb;161:71-7. Review
- Wilk** S, Wilk EK. Pyroglutamyl peptidase II, a thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme: Purification and specificity studies of the rabbit brain enzyme. *Neurochem Int* 1989; 15: 81-90
- Wilk** S. Neuropeptide-specific peptidases: does brain contain a specific TRH-degrading enzyme? *Life Sci.* 1986 Oct 27;39(17):1487-92
- Yarbrough** GG. Minireview. Thyrotropin releasing hormone and CNS cholinergic neurons. *Life Sci.* 1983 Jul 11;33(2):111-8. Review.

ANEXOS

ANEXO 1

DE LAS METALLOPEPTIDASAS...

Tabla A

Table 21.4.1 Biological Functions of Metallopeptidases

Biological processes	Enzyme [family]
<i>Antibiotic resistance</i>	
β-Lactamase activity	Membrane dipeptidase [M19]
Vancomycin resistance	VanX D-Ala-D-Ala-dipeptidase (vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecalis</i> host) [M45]
<i>Bacteriolytic activity</i>	
Resolution of peptidoglycan	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (not peptidase) [M15]
Resolution of peptidoglycan (<i>Staphylococcus aureus</i>)	β-lytic metalloendopeptidase (<i>Lysobacter enzymogenes</i>) [M23], staphylolysin [M23], lysostaphin [M37]
<i>Biosynthesis</i>	
Biosynthesis of bacterial cell walls	Zinc D-Ala-D-Ala carboxypeptidase [M15]
Sporulation (<i>Bacillus</i>)	γ-D-glutamyl-meso-(L)-diaminopimelate peptidase [M14]
<i>Development</i>	
Cell-cell fusion	ADAMs [M12]
Cell migration	MMPs [M12]
Morphogenesis	ADAMs [M12], bone morphogenetic protein 1 (BMP-1) [M12], MMPs [M10], tolkin (<i>Drosophila</i>) [M12], tolloid [M12]
Release of cytokines and growth factors	ADAMs [M12], MMPs [M10]
<i>Effects on immune systems</i>	
Disruption of insect immune system	Immune inhibitor A [M6]
IgA, IgG degradation	IgA specific metalloendopeptidase [M26], mirabilysin [M10]
<i>Infection</i>	
Diarrhea	Fragilysin (<i>Bacteriodes fragilis</i>) [M10]
Opportunistic bacterial infection	Coccolysin (<i>Enterococcus faecalis</i>) [M4], pseudolysin (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) [M4], aeruginolysin (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) [M10]
Protozoan infection	Leishmanolysin (<i>Leishmania</i>) [M8]
Viral polyprotein processing	Hepatitis C virus endopeptidase 2 [M44], vaccinia virus proteinase [M44]
Virulence factor activation of toxins of <i>Vibrio cholerae</i>	Hemagglutinin/protease 9 (<i>Vibrio cholerae</i>) [M4]
<i>Nutrition</i>	
Intestinal absorption of folic acid	Glutamate carboxypeptidase II [M28]
<i>Peptide and protein processing</i>	
Alzheimer's precursor protein processing (α-secretase activity)	ADAM 17 (TACE) [M12]
Cell signaling/release of a transcription factor	S2P protease [M50], SpoIVFB (<i>Bacillus subtilis</i>) [M51], ADAM-10 [M12]

continued

Tabla A

Table 21.4.1 Biological Functions of Metallopeptidases, *continued*

Biological processes	Enzyme [family]
Inactivation of leukotriene D4 to leukotriene E4	Membrane dipeptidase [M19]
Mitochondrial/chloroplast protein processing and trafficking	Chloroplast stromal processing peptide [M16], mitochondrial processing peptidase [M16], mitochondrial intermediate peptidase [M3]
Peptide hormone and neurotransmitter processing	Carboxypeptidase E (removal of C-terminal basic residues) [M14], metallocarboxypeptidase D [M14]
Processing of peptide hormone	Endothelin-converting enzyme [M13], peptidyl dipeptidase A (angiotensin I-converting enzyme) [M2]
Processing of precursor proteins	Chloroplast stromal processing peptidase [M16], mitochondrial processing peptidase [M16]
Procollagen processing and fibril formation	Procollagen N-endopeptidase (ADAM-TS2) [M12]
Removal of N-terminal methionine	Methionyl aminopeptidase I and II [M24]
Shedding of cell surface molecule	ADAM 10, ADAM 17 (TACE) [M12]
Yeast mating α -factor maturation	Ste 24 protease [M48]
<i>Reproduction</i>	
Blastocyst implantation	MMPs [M10]
Embryo hatching	Choriolysins (teleost fish, the medaka) [M12], envelysin (sea urchin MMP) [M10]
Fertilization	ADAM1 [M12]
Ovulation	MMPs [M10]
Removal of cell walls during green algae gamete mating	Gametolysin (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>) [M11]
<i>Tissue remodeling</i>	
Bone remodeling	ADAMs [M12], MMPs [M10]
Extracellular matrix turnover/breakdown	MMPs [M10]
Wound/fracture healing	MMPs [M10]
<i>Toxins</i>	
Anthrax	Anthrax toxin lethal factor (<i>Bacillus anthracis</i>) [M34]
Cytotoxicity and hemolytic Hemorrhagic toxin	Legionella metalloendopeptidase [M4] Snake venom metalloproteinase reprotolysins (e.g., atrolysin A, ruberlysin, mutalysins, janarhagin) [M12]
Tetanus and botulism	Tentoxilysin (<i>Clostridium tetani</i>), bontoxilysin (<i>Clostridium botulinum</i>) [M27]

Tabla B

Table 21.4.2 Clans and Families of Metallopeptidases^a

Family	Subfamily	Example (organism)
<i>Clan MA: Water nucleophile; water bound by single zinc ion ligated to two His (within the motif HEXXH) and Glu, His or Asp</i>		
M1		Membrane alanyl aminopeptidase (<i>Homo sapiens</i>)
M2		Peptidyl-dipeptidase A (angiotensin I converting enzyme; <i>Homo sapiens</i>)
M4		Thermolysin (<i>Bacillus stearothermophilus</i>)
M5		Mycolysin (<i>Streptomyces cacaoi</i>)
M6		Immune inhibitor A (<i>Bacillus thuringiensis</i>)
M7		Snopalysin (<i>Streptomyces lividans</i>)
M8		Leishmanolysin (<i>Leishmania major</i>)
M9	A	<i>Vibrio</i> collagenase (<i>Vibrio alginolyticus</i>)
	B	<i>Clostridium</i> collagenase (<i>Clostridium perfringens</i>)
M10	A	Collagenase 1 (<i>Homo sapiens</i>)
	B	Serralysin (<i>Serratia marcescens</i>)
	C	Fragilysin (<i>Bacteroides fragilis</i>)
M11		Gametolysin (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)
M12	A	Astacin (<i>Astacus fluviatilis</i>)
	B	Adamalysin (<i>Crotalus adamanteus</i>)
	C	ADAM 17 (<i>Homo sapiens</i>)
M13		Nepriylisin (<i>Homo sapiens</i>)
M30		Hyicolysin (<i>Staphylococcus hyicus</i>)
M36		Fungalysin (<i>Aspergillus fumigatus</i>)
M48		Ste24 endopeptidase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>Clan MX: Other metallopeptidases with HEXXH motif</i>		
M3	A	Thimet oligopeptidase (<i>Rattus norvegicus</i>)
	B	Oligopeptidase F (<i>Lactococcus lactis</i>)
M26		IgA1-specific metalloendopeptidase (<i>Streptococcus sanguis</i>)
M27		Tentoxylisin (<i>Clostridium tetani</i>)
M32		Carboxypeptidase Taq (<i>Thermus aquaticus</i>)
M34		Anthrax lethal factor (<i>Bacillus anthracis</i>)
M35		Penicillolysin (<i>Penicillium citrinum</i>)
M41		FtsH endopeptidase (<i>Escherichia coli</i>)
M43		Cytophagolysin (<i>Cytophaga</i> sp.)
<i>Clan MC: Water nucleophile; water bound by single zinc ion ligated to His, Glu (within the motif HXXE) and His</i>		
M14	A	Carboxypeptidase A (<i>Homo sapiens</i>)
	B	Carboxypeptidase E (<i>Bos taurus</i>)
	C	γ -D-glutamyl-(L)-meso-diaminopimelate peptidase I (<i>Bacillus sphaericus</i>)
<i>Clan MD: Water nucleophile; water bound by single zinc ion ligated to His, Asp and His</i>		
M15	A	Zinc D-Ala-D-Ala carboxypeptidase (<i>Streptomyces albus</i>)
	B	Van Y D-Ala-D-Ala carboxypeptidase (<i>Enterococcus faecium</i>)
	C	Endolysin (bacteriophage A118)

Tabla B

Table 21.4.2 Clans and Families of Metallopeptidases^a, *continued*

Family	Subfamily	Example (organism)
M45		Van X D-Ala-D-Ala dipeptidase (<i>Enterococcus faecium</i>) <i>Clan ME: Water nucleophile; water bound by single zinc ion ligated to two His (within the motif HXXEH) and Glu</i>
M16	A	Pitriylisin (<i>Escherichia coli</i>)
	B	Mitochondrial processing peptidase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
M44		Metalloendopeptidase (<i>Vaccinia virus</i>) <i>Clan MF: Water nucleophile; water bound by two zinc ions ligated by Lys, Asp, Asp, Asp, Glu</i>
M17		Leucyl aminopeptidase (<i>Bos taurus</i>) <i>Clan MG: Water nucleophile; water bound by two cobalt or manganese ions ligated by Asp, Asp, His, Glu, Glu</i>
M24	A	Methionine aminopeptidase I (<i>Escherichia coli</i>)
	B	X-proaminopeptidase (<i>Escherichia coli</i>) <i>Clan MH: Water nucleophile; water bound by two zinc ions ligated by His (or Asp), Asp, Glu, Asp (or Glu), His</i>
M18		Aminopeptidase I (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
M20	A	Glutamate carboxypeptidase (<i>Pseudomonas</i> sp.)
	B	Gly-X carboxypeptidase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
M25		X-His dipeptidase (<i>Escherichia coli</i>)
M28	A	Leucyl aminopeptidase (<i>Vibrio proteolyticus</i>)
	B	Aminopeptidase (<i>Streptomyces griseus</i>)
	C	IAP aminopeptidase (<i>Escherichia coli</i>)
M40		<i>Sulfolobus</i> carboxypeptidase (<i>Sulfolobus solfataricus</i>)
M42		Glutamyl aminopeptidase (<i>Lactococcus lactis</i>) <i>Clan MJ: Water nucleophile; water bound by two nickel ions ligated by His, His, Lys, His, His, Asp or a single zinc ion ligated by two His (within the motif HXH) and a third, as yet unidentified, residue</i>
M38		β-aspartyl dipeptidase (<i>Escherichia coli</i>) <i>Clan MK: Water nucleophile; water bound by single zinc ion probably ligated to two His (within the motif HXEXH) and an as yet unidentified third ligand; probable actin-like fold</i>
M22		O-sialoglycoprotein endopeptidase (<i>Pasteurella haemolytica</i>) <i>Clan ML: Water nucleophile; water bound by single nickel ion ligated by Glu, Asp, His</i>
M52		HybD endopeptidase (<i>Escherichia coli</i>) <i>Clan MM: Water nucleophile; water bound by single zinc ion ligated to two His (within the motif HEXXH) and Asp; membrane proteins with intramembrane active site</i>
M50		S2P protease (<i>Homo sapiens</i>)
M51		Sporulation factor SpoIVFB (<i>Bacillus subtilis</i>)

continued

Table 21.4.2 Clans and Families of Metallopeptidases^a, *continued*

Family	Subfamily	Example (organism)
<i>Metallopeptidase families not yet assigned to clan</i>		
M19		Membrane dipeptidase (<i>Homo sapiens</i>)
M23		β-lytic metalloendopeptidase (<i>Achromobacter lyticus</i>)
M29		Aminopeptidase T (<i>Thermus aquaticus</i>)
M37		Lysostaphin (<i>Staphylococcus simulans</i>)
M44		Dipeptidyl-peptidase III (metallo-form) (<i>Rattus norvegicus</i>)

^aAdopted from Rawlings and Barrett (2000).

lysin (family M36), and Ste 24p protease (family M48).

Metalloproteases with the HEXXHXXGXXH motif are called “metzincins.” This term was coined by Bode et al. (1993) for the matrix metalloproteinases (MMPs) also called “matrixins” (subfamily A of family M10), the bacterial serralysins (subfamily B of family M10), astacins (subfamily A of family M12), and reprolysins (subfamily B of family M12), based on the crystal structures of representative members of those subfamilies. The zinc binding ligands of metzincins are three histidines of the HEXXHXXGXXH motif. In addition, they all possess a conserved Met-containing 1,4-turn in a similar conformation, called a “Met-turn,” which forms a hydrophobic base for the catalytic zinc. Pregnancy-associated plasma protein A, which has been characterized as a protease that cleaves insulin-like growth factor binding protein 4, is considered to be a new family belonging to metzincins (Lawrence et al., 1999). Because subfamilies of the matrixins (MMPs), the astacins, and the reprolysins consist of a large number of related metalloproteases, these subfamilies are commonly referred to as the matrixin (or MMP) family, the astacin family, and the reprolysin family, respectively.

The matrixins have been characterized as key proteases that degrade extracellular matrix components such as collagens, proteoglycans, and glycoproteins, and they consist of more than thirty members of plant, insect, nematode, and vertebrate origin (Woessner and Nagase, 2000). The astacins include astacin, meprin, and procollagen C-endopeptidase. The reprolysins include snake venom metalloproteinases (e.g., adamalysins, atrolsins) and ADAMs

(i.e., a disintegrin and metalloprotease domain). ADAMs are type 1 transmembrane proteins, but only about half of the members have proteolytic activity, while the rest have an incomplete zinc binding motif and/or lack the glutamic acid essential for catalysis (Black and White, 1998). The members, often referred to as the ADAM family in the literature, include metalloproteases that shed cell surface molecules (e.g., ADAM-9, ADAM-10, tumor necrosis factor converting enzyme/ADAM-17) and soluble forms of the enzymes, the ADAM-TS metalloproteases (i.e., ADAM with thrombospondin domain). ADAM-TSs lack the transmembrane and a cytoplasmic domain, but instead have one or more thrombospondin type I motifs. These include procollagen N-endopeptidase (ADAM-TS3), aggrecanase 1 (ADAM-TS4), and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). Not all ADAM metalloproteinases have been characterized for their proteolytic activities.

Other enzymes that contain the HEXXHXXGXXH zinc binding motif are leishmanolysin (family M8), a membrane bound metalloprotease expressed at the surface of the protozoan parasite *Leishmania*, and gametolysin, which digests cell walls during green algae gamete mating (family M11).

Clan MA also contains the enzymes with the zinc binding motif of HEXXHXXGXXD. This includes immune inhibitor A (*Bacillus thuringiensis*; family M6) and synapalysin (*Streptomyces* neutral proteinase A; family M7). Immune inhibitor A degrades antibacterial proteins, cecropins, and attacins from several species of insect, inhibiting the ability of the insect immune system to kill invading bacteria.

There are ten metallopeptidase families with the HEXXH motif that are not classified as Clan MA, because of structural dissimilarities. They

ANEXO 2

DE LOS VECTORES DE

EXPRESION...

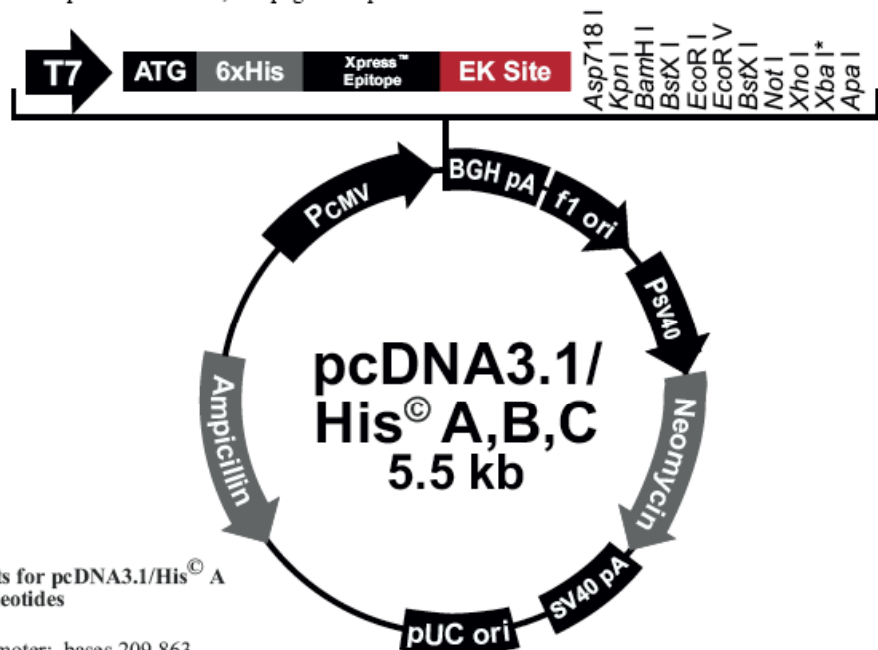
pCDNA3.1-HisA

http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pcdna3.1his_man.pdf

pcDNA3.1/His[®] A, B, and C Vectors

Map of pcDNA3.1/His[®]

The figure below summarizes the features of the pcDNA3.1/His vectors. The sequences for pcDNA3.1/His A, B, and C are available for downloading from our Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (see page 10). Details of the multiple cloning sites are shown on page 2 for pcDNA3.1/His A, page 3 for pcDNA3.1/His B, and page 4 for pcDNA3.1/His C.

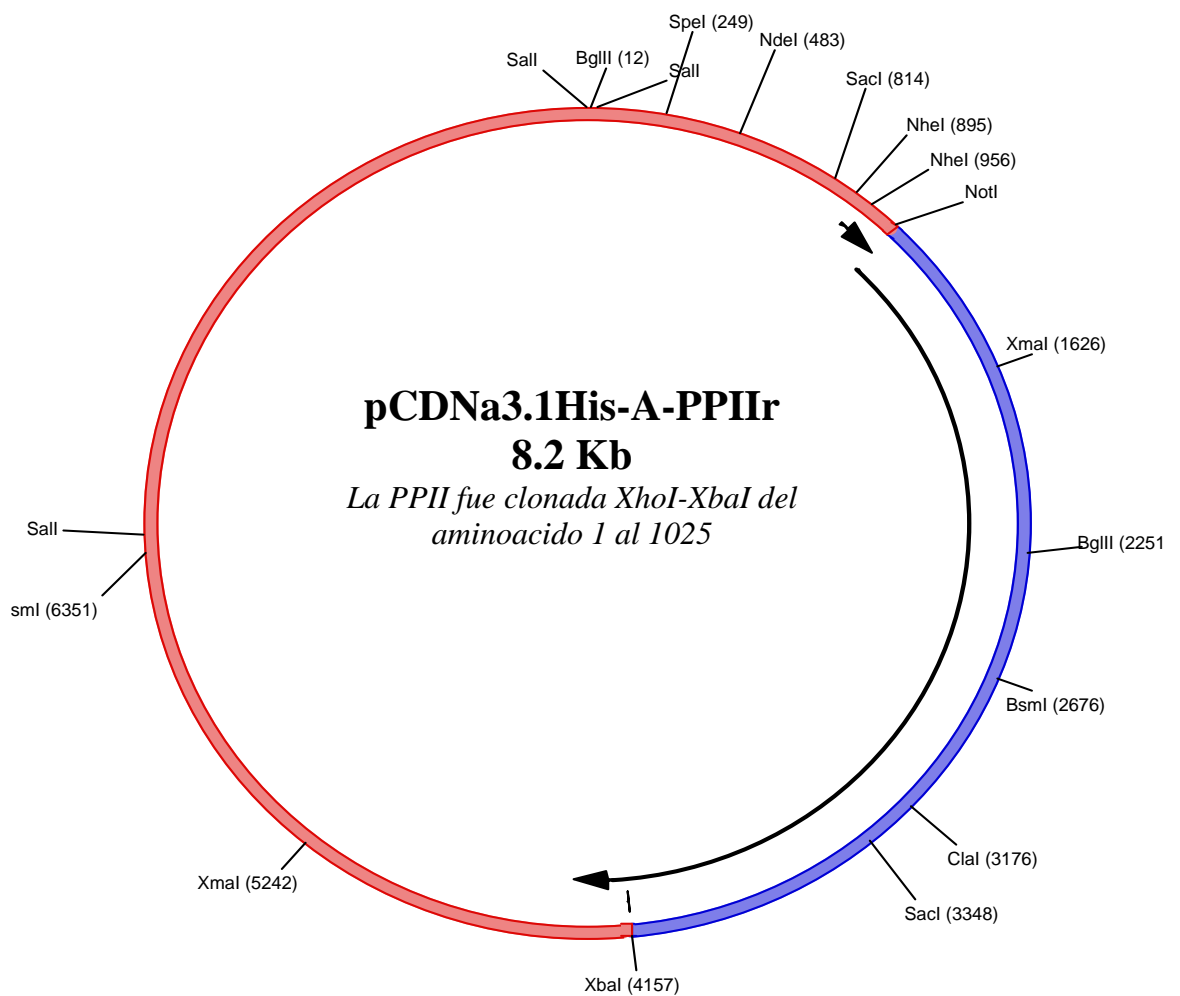


Comments for pcDNA3.1/His[®] A 5514 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863
 T7 promoter/priming site: bases 863-882
 ATG initiation codon: bases 920-922
 Polyhistidine region: bases 932-949
 Xpress™ epitope: bases 989-1012
 Enterokinase recognition site: bases 998-1012
 Multiple cloning site: bases 1012-1085
 BGH reverse priming site: bases 1105-1122
 BGH polyadenylation signal: bases 1104-1318
 f1 origin: bases 1381-1794
 SV40 early promoter and origin: bases 1859-2183
 Neomycin resistance gene: bases 2219-3013
 SV40 polyadenylation signal: bases 3029-3268
 pUC origin: bases 3700-4373 (Complementary strand)
 Ampicillin resistance gene: bases 4518-5379 (Complementary strand)

*There is a stop codon following the Xba I site in version A.

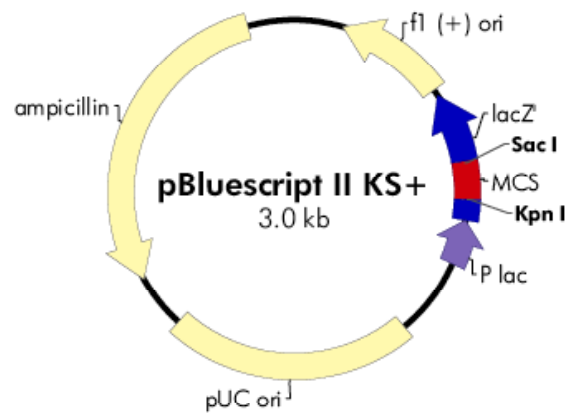
Todas las construcciones de la PPII fueron realizadas por Lucia Chávez-Gutiérrez durante su doctorado en ciencias; empleando el programa **Gene Construction kit** Textco, Inc.



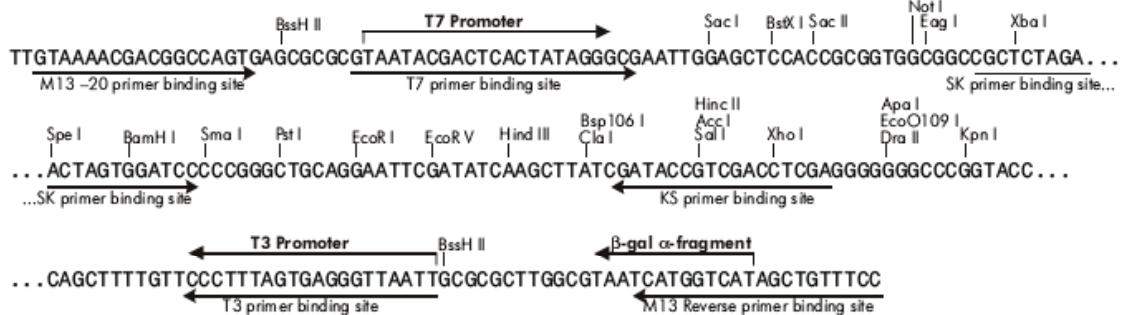
Pbluescript KS+/-

<http://www.angenetik.fu-berlin.de/pbluescriptmap.pdf>

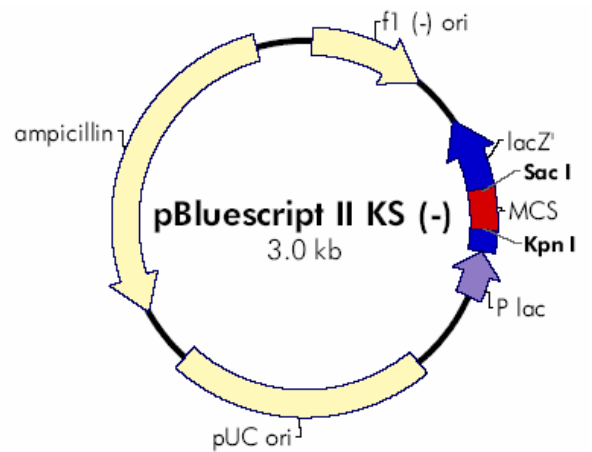
f1 (+) origin 135–441
 β -galactosidase α -fragment 460–816
multiple cloning site 653–760
lac promoter 817–938
pUC origin 1158–1825
ampicillin resistance (*bla*) ORF 1976–2833



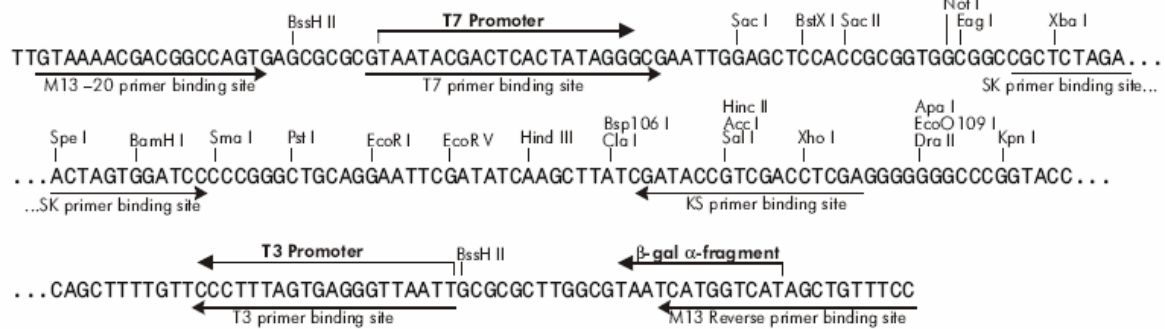
pBluescript II KS (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)

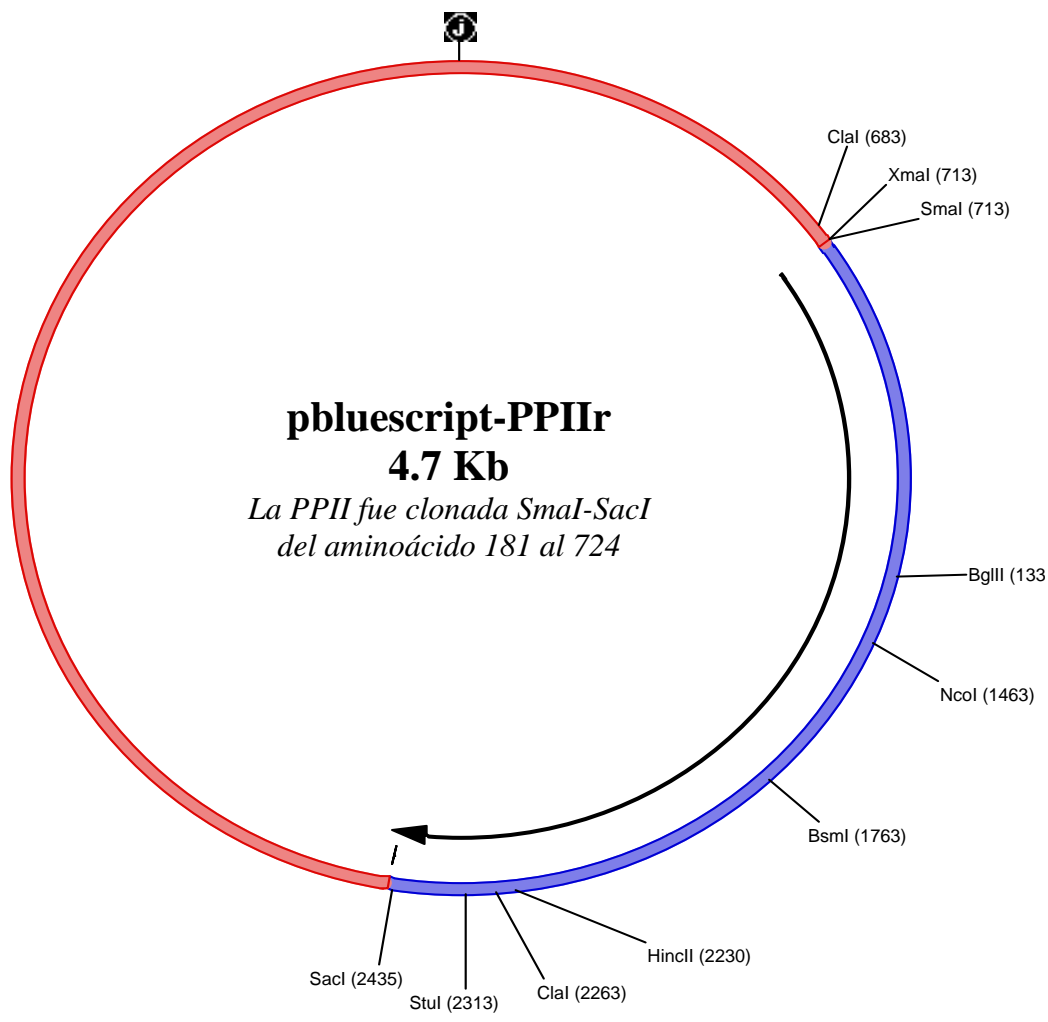


f1 (-) origin 21–327
 β -galactosidase α -fragment 460–816
multiple cloning site 653–760
lac promoter 817–938
pUC origin 1158–1825
ampicillin resistance (*bla*) ORF 1976–2833



pBluescript II KS (+/-) Multiple Cloning Site Region
 (sequence shown 598–826)





pEGFP-N3

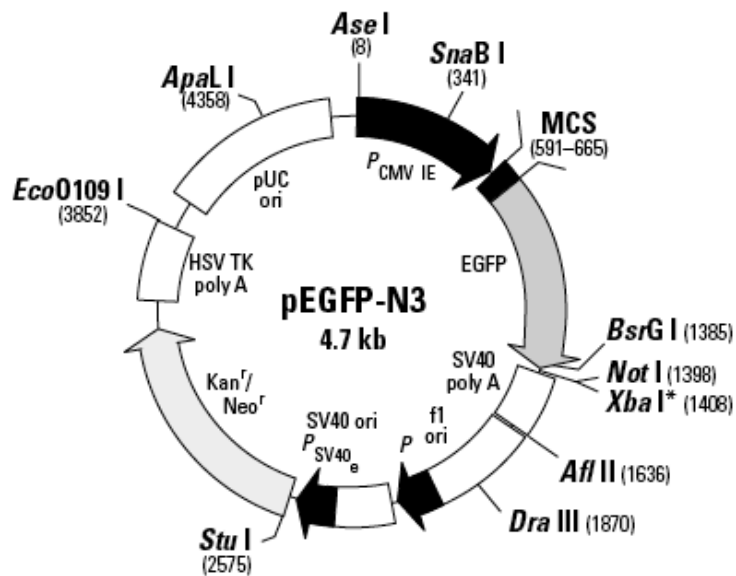
http://www.clontech.com/clontech/techinfo/vectors_dis/images/pEGFP-N3.gif

pEGFP-N3 Vector Information

GenBank Accession #: U57609

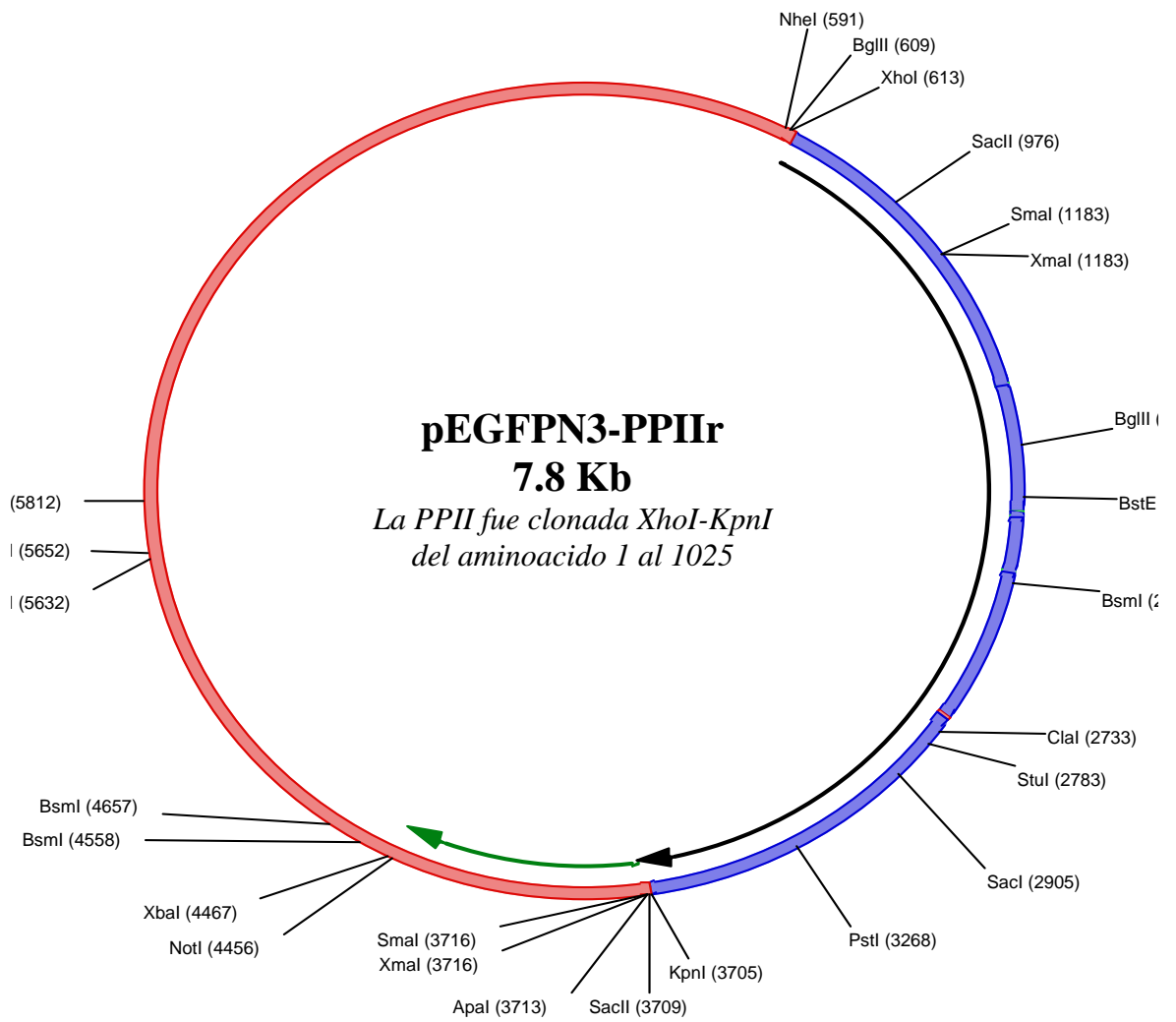
PT3054-5

Catalog #6080-1

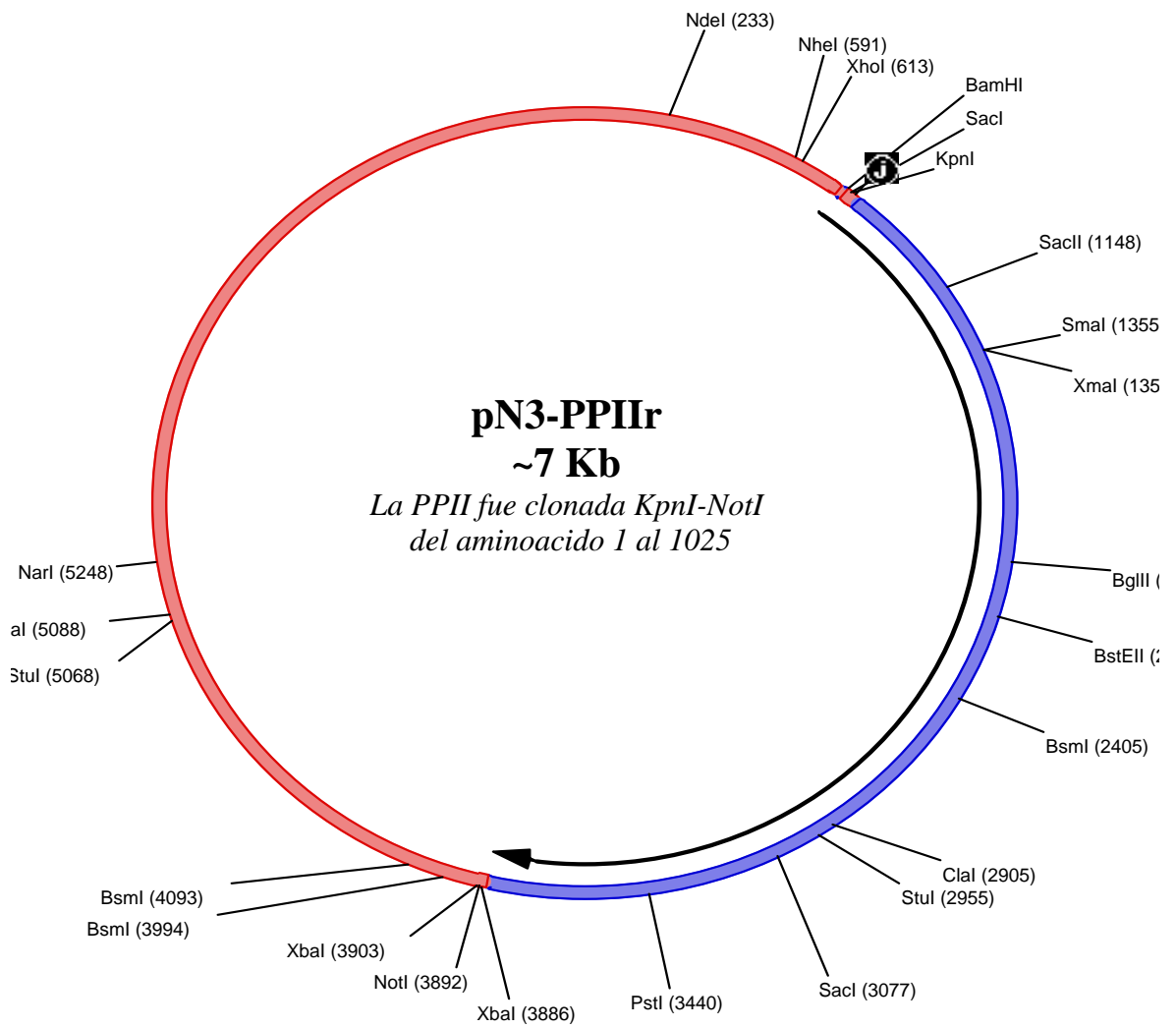


591 601 611 621 631 641 651 661 671 **EGFP**
 GCT AGC GCT ACC GGA CTC AGA TCT CGA GCT CAA GCT TCG AAT TCT GCA GTC GAC GGT ACC GCG GGC CCG GGA TCC ATC GCC ACC ATG GTG
Nhe I Eco47 III Bgl II Xho I Sac I Hind III EcoR I Pst I Sal I Acc I Kpn I Asp718 I Sac II Apa I Bsp120 I Xma I BamH I Xcm I Sma I

Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of pEGFP-N3 (Unique restriction sites are in bold). The *Not I* site follows the EGFP stop codon. The *Xba I* site (*) is methylated in the DNA provided by BD Biosciences Clontech. If you wish to digest the vector with this enzyme, you will need to transform the vector into a *dam⁻* host and make fresh DNA.



Esta ilustración representa al vector que contiene el cDNA de la PPII completa y fue donado por el Dr. Karl Bauer.



ANEXO 3

DE LA COMPOSICIÓN

de los amortiguadores...

Amortiguador 10X para la enzima taq DNA polimerasa (PCR)

600 mM Tris-HCl (pH 9.25)
15 mM MgSO₄
300 mM NaCl
0.1 mg/ml
bovine serum albumin (BSA)
0.1% Triton® X-100
Otros componentes del propietario

Medio LB (Luria Bertani) bajo en sales

Ingredientes para un litro (cantidad en gr)

Bacto-triptona 10
Extracto de levadura 5
Cloruro de sodio (NaCl) 5
Bacto-agar (en caso de ser medio sólido) 15

Solución stock de ampicilina

100 mg/ml en agua, filtrar y almacenar en alícuotas a -20 ° C

Soluciones para transferencia de proteínas

Ánodo 1:

0.3 M Tris-Cl pH 10.4
20 % metanol

Ánodo 2:

0.025 M Tris-Cl pH 10.4
20 % metanol

Cátodo:

0.025 M Tri-Cl pH 9.4
40 mM ácido
6-amino-n-hexanoico
20 % metanol

Amortiguador TBS 10X 0.25 M Tris-Cl, pH 8.0
150 mM NaCl; 0.027 M KCl.

Solución de bloqueo TBS 1X
5% Leche
0.2 % Tween 20

Solución de lavado TBS 1X
0.5 % Leche
0.1 % Tween 20

Solución de incubación de anticuerpos TBS 1X
0.5 % Leche
0.1 % Tween 20

Soluciones de revelado para fosfatasa alcalina

Amortiguador de revelado (B) 100 mM Tris.Cl, pH 9.5
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂

Solución stock de NTB 5% NTB (nitro blue tetrazolium chloride, sigma N5514) en 70 % de dimetilformamida (almacenar en alícuotas a -20° C)

Solución stock de BCIP 5% BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, sigma B0274) en 100% de dimetilformamida (almacenar en alícuotas a -20° C)

Solución de tñido preparar minutos antes de utilizarla.
66 µl NTB y 33 µl BCIP de las soluciones stock en 10 ml de amortiguador de revelado.
(Concentración final 0.33 mg/ml)

NTB; 0.165 mg/ml BCIP)

Amortiguadores para purificación de proteínas 6xHis bajo condiciones nativas

Amortiguador de lisis

50 mM NaH_2PO_4

300 mM NaCl

10 mM imidazol

0.05 % Tween 20

ajustar pH a 8.0 usando NaOH

Amortiguador de lavado

50 mM NaH_2PO_4

300 mM NaCl

20 mM imidazol

0.05 % Tween 20

ajustar pH a 8.0 usando NaOH

Amortiguador de elución

50 mM NaH_2PO_4

300 mM NaCl

250 mM imidazol

0.05 % Tween 20

Ajustar pH a 8.0 usando NaOH