



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL DOMINIO CATALÍTICO DE LA  
METALOPROTEASA DE MATRIZ 16 (MT3-MMP)**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**EDNA PAULINA SANTIAGO RUBIO**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. JUAN PABLO REYES GRAJEDA**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: J. ELEAZAR MARTINEZ BARAJAS**

**VOCAL:**               **Profesor: LUCIANO HERNANDEZ GOMEZ**

**SECRETARIO:**       **DR. JUAN PABLO REYES GRAJEDA**

**1er. SUPLENTE:**     **Profesor : JAVIER AXOSCO MARIN**

**2° SUPLENTE:**       **Profesora: TANYA PLETT TORRES**

**INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA (INMEGEN)**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DR. JUAN PABLO REYES GRAJEDA**

**SUPERVISOR TÉCNICO :**

**M. EN C. ARMANDO CRUZ RANGEL**

**SUSTENTANTE :**

**EDNA PAULINA SANTIAGO RUBIO**

## CONTENIDO

## Página

Índice de tablas .....	5
Índice de figuras .....	6
Abreviaturas .....	9
Resumen .....	11
Introducción	
Metaloproteasas de Matriz .....	12
Estructura .....	12
Clasificación .....	14
Función biológica de las Metaloproteasas: procesos naturales y patológicos .....	20
Regulación de la actividad .....	25
Regulación de la transcripción .....	25
Activación de las pro-MMP .....	25
Inhibidores endógenos .....	26
Inhibidores exógenos .....	27
Regiones de especificidad para el reconocimiento de sustratos .....	28
Mecanismo catalítico .....	30
Metaloproteasa de matriz 3 (MT3-MMP)	
Estructura .....	31
Antecedentes directos .....	34
Hipótesis .....	37
Objetivo general .....	37
Objetivos particulares .....	37
Materiales y métodos .....	38
Diseño y construcción del plásmido pET27b(+)-cdMT3-MMP .....	38
Preparación de células competentes y transformación de la cepa E. coli BL21(DE3) .....	39

Propagación e inducción	40
Pre-inoculo .....	41
Propagación .....	41
Extracción de ADN plasmidico .....	41
Inducción de expresión de cdMT3-MMP .....	41
Recuperación de células bacterias .....	
Purificación	42
Lisis bacteriana por sonicación .....	
Separación por Afinidad con resina de níquel.....	42
Cromatografía en fase reversa (Sistema C <sub>18</sub> -HPLC) .....	43
Identificación y caracterización de la cdMT3-MMP	
Identificación de péptidos mediante espectrometría de masas .....	44
Identificación de péptidos mediante Western Blot.	44
Electroforesis nativa simple ( <i>CN-PAGE</i> ) .....	45
Dicroísmo circular .....	46
Actividad autoproteolítica del cdMT3-MMP en presencia de sus cofactores .....	46
Inhibición con <i>Batimastat</i> de la actividad autoproteolítica del <i>cdMT3-MMP</i> en presencia de sus cofactores .....	47
Fluorescencia intrínseca .....	47
Resultados .....	50
Discusión .....	70
Conclusiones y perspectivas .....	79
Bibliografía .....	80

## Índice de tablas

## Página

Tabla 1.	Clasificación de las MMP basada en la especificidad de sus sustratos, localización y expresión específica en células y tejidos .....	15
Tabla 2.	Clasificación de MMP asociadas a membrana .....	18
Tabla 3.	Procesos biológicos naturales y patológicos asociados a la función de las MMP .....	22
Tabla 4.	Dominios, motivos y posiciones características de la MT3-MMP dentro de su secuencia .....	32
Tabla 5.	Programa del gradiente de purificación mediante cromatografía en fase reversa C <sub>18</sub> -HPLC .....	43
Tabla 6.	Condiciones utilizadas para la comprobación de la capacidad autoproteolítica del dcMT3-MMP .....	46
Tabla 7.	Condiciones de cada muestra para el ensayo de inhibición de actividad de la MT3-MMP en presencia de Batimastat .....	47
Tabla 8.	Condiciones experimentales de cada muestra analizada para el ensayo de fluorescencia intrínseca .....	48

<b>Índice de figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Clasificación de las metaloproteasas de acuerdo a su estructura .....	14
Figura 2. Estructura general de mas metaloproteasas asociadas a membrana .....	19
Figura 3. Representación de la posición de las secuencias IS-1, IS-2 e IS-3 en relación a los dominios funcionales conocidos de las MMP .....	19
Figura 4. Nomenclatura de los residuos de aminoácidos de los sustratos y/o moléculas inhibidoras y sus correspondientes sitios de unión en la enzima .....	29
Figura 5. Mecanismo catalítico propuesto de las MMP .....	30
Figura 6. Estructura general del dominio catalítico de las MMP .....	34
Figura 7. Representación e información general del vector de expresión pET-27b (+) .....	38
Figura 8. Representación de la construcción insertada dentro de los sitios de restricción señalados .....	39
Figura 9. Proceso general de transformación bacteriana .....	40
Figura 10. Diagrama general del proceso de propagación de <i>E. coli</i> BL21 e inducción de la expresión con IPTG	
Figura 11. Esquema general del ensayo de fluorescencia intrínseca para las tres condiciones analizadas .....	49
Figura 12. Electroferograma .....	51
Figura 13. Producto de la "Traducción" de la secuencia de ADN plasmidico .....	52
Figura 14. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos para la búsqueda de coincidencias ( <i>BLASTp</i> ) .....	52
Figura 15. SDS-PAGE de la sobreexpresión de cdMT3-MMP ...	53

Figura 16. SDS-PAGE del paso 1 de purificación. Separación de cdMT3-MMP por afinidad con resina de níquel...	54
Figura 17. Cromatograma y SDS-PAGE del paso 2 de purificación de cdMT3-MMP .....	55
Figura 18. Identificación de péptidos mediante espectrometría de masas .....	56
Figura 19. Identificación de la proteína recombinante mediante Western Blot .....	58
Figura 20. Electroforesis nativa simple del cdMT3-MMP .....	59
Figura 21. Espectro de Dicroísmo circular en DichroWeb del cdMT3-MMP a 25°C .....	60
Figura 22. SDS-PAGE de la actividad autoproteolítica del dcMT3-MMP .....	61
Figura 23. SDS-PAGE del monitoreo de la actividad autoproteolítica del MT3-MMP durante 24 hrs .....	62
Figura 24. SDS-PAGE de la capacidad inhibitoria de Batimastat sobre la actividad autoproteolítica del cdMT3-MMP .....	63
Figura 25. Graficas comparativas de los espectros de emisión de una muestra de enzima en buffer C excitada a una $\lambda=280$ nm .....	64
Figura 26. Graficas comparativas de los espectros de emisión de una muestra de enzima en buffer C en presencia de sus cofactores excitada a una $\lambda=280$ nm .....	65
Figura 27. Graficas comparativas de los espectros de emisión de una muestra de enzima en presencia de sus cofactores y Batimastat excitada a una $\lambda=280$ nm .....	66

Figura 28. Graficas comparativas de los espectro de emisión de una muestra de enzima en presencia de sus cofactores excitada a una $\lambda=280$ nm. 6 días posteriores a su preparación ... ..	67
Figura 29. Grafica comparativa del comportamiento de las máximas longitudes de onda de emisión de cada condición analizada en función de la temperatura.	68
Figura 30. SDS-PAGE de la enzima bajo 3 condiciones diferentes 24 horas y 6 días posteriores a su preparación .....	69

## Abreviaturas

aa.	aminoácido
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
pb.	Pares de bases
C-terminal	Carboxilo terminal
CVML.	Células vasculares de musculo liso
dc	Dominio catalítico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
FR	Fase reversa
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
hB	Hélice beta
HPLC	<i>(high performance liquid chromatography)</i> Cromatografía líquida de alta eficacia
I-MMP	Inhibidor de Metaloproteasa.
IPTG.	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
KDa	Kilodalton.
LB (agar)	Luria-Bertani
LDL <sub>ox</sub> .	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
M	Concentración molar
MALDI TOF/TOF	<i>(Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight). Desorción/ Ionización laser asistida por matriz con detección por tiempo de vuelo.</i>
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MEC	Matriz extracelular
ml.	Mililitros
MMP.	Metaloproteasas de matriz
MT	<i>(Membrane Type)</i>

	Tipo membrana
N- terminal	Amino terminal
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
rpm.	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	<i>(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)</i> Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
TFA	Acido trifluoroacético
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante
TIMP	Inhibidor tisular de Metaloproteasa.
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
UV	Ultravioleta
Zn <sub>cat.</sub>	Zinc del dominio catalítico
$\mu$ g.	microgramos
$\mu$ l.	Microlitros

## RESUMEN

Las Metaloproteasas de Matriz (MMP) son un grupo de enzimas proteolíticas dependientes de Zinc que participan en la degradación de los componentes de la matriz extracelular (MEC), su función radica en la remodelación de tejidos durante diversos eventos fisiológicos y patológicos tales como: desarrollo embrionario, angiogénesis, ovulación, respuesta inmune, reparación de tejidos, enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, Alzheimer, entre otros.<sup>(3)</sup>

La Metaloproteasa de matriz 16, pertenece al subgrupo de las MMP asociadas a la membrana celular cuya actividad es promover la activación de la forma zimógena de la MMP-2 y la MMP-9, así como la degradación de colágeno tipo III, fibronectina y laminina. <sup>(14)</sup>

En diversos tipos de cáncer (melanoma, vejiga, glioblastoma, astrocitoma y mama) se ha descrito el incremento en los niveles de expresión de esta proteína, el cual se ha asociado con la promoción de metástasis. <sup>(54)</sup> Por otro lado, se le ha relacionado con algunas enfermedades del sistema cardiovascular, como aterosclerosis, contribuyendo activamente en el proceso de formación de la placa aterosclerótica por deslocalización de células del musculo liso vascular. Su participación en estos eventos esta relacionada a su sobreexpresión en respuesta al estímulo con lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas. Estos antecedentes la hacen un blanco farmacológico para el desarrollo de moléculas con capacidad inhibitoria.<sup>(62)</sup> Dada la homología estructural que comparten las diferentes metaloproteasas en su dominio catalítico ha sido difícil generar moléculas con suficiente especificidad para cada una de ellas.<sup>(16)</sup>

El objetivo del presente trabajo es la sobreexpresión, purificación y caracterización del dominio catalítico de la MT3-MMP (MMP-16) para sentar las bases en la búsqueda racional de moléculas específicas inhibitorias.

# INTRODUCCIÓN

## METALOPROTEASAS DE MATRIZ

### Estructura

Las metaloproteasas de matriz (MMP), descritas por primera vez en 1972, también denominadas matrixinas, son miembros de un grupo de proteasas denominado metzincinas (dependientes de zinc) <sup>(1)</sup>, que están involucradas en la remodelación de la Matriz Extracelular (MEC), mediante la degradación de diferentes componentes de ésta, incluyendo colágeno, caseína y laminina entre otros. La MEC además de cumplir un papel de soporte de órganos y tejidos, ayuda a mantener la integridad vascular, aumenta la flexibilidad e interviene activamente en algunos eventos celulares como la regulación del ciclo celular, diferenciación, adhesión, migración, motilidad, proliferación, supervivencia y/o apoptosis, ya que es, además, un reservorio de moléculas biológicamente activas. <sup>(1, 2)</sup>.

Hasta el momento se han identificado 23 MMP encontradas en humanos, las cuales desempeñan un rol muy importante en la remodelación de tejidos, asociado con varios procesos fisiológicos y patológicos como morfogénesis, angiogénesis, reparación de tejido, artritis e invasión tumoral. <sup>(3,4)</sup>

Entre los miembros de esta familia se comparte cierta similitud estructural y de secuencia, con una homología entre ellas alrededor del 50% (Figura 1): <sup>(3, 5)</sup>

- 1) Péptido señal o predominio necesario para el desplazamiento intracelular de la enzima hasta la membrana que es eliminado después de la secreción de la proteasa. Esta señal dirige a las MMP a la vía secretora o de inserción a la membrana plasmática.
- 2) Dominio propéptido o prodominio de alrededor de 80 aminoácidos. Confiere capacidad enzimática latente por ocupación del Zinc del sitio activo, haciendo a los sustratos inaccesibles. Está formado por una secuencia peptídica con un residuo de cisteína que interactuar con el sitio catalítico PRCG[V/N]PD.

- 3) Dominio catalítico de cerca de 170 aa. que contiene una secuencia consenso (**HEXXHXXGXXH**) que resguarda un átomo de zinc (el cual es esencial para la actividad proteolítica de todas las MMP), y otros dominios variables.

La estructura general del dominio catalítico de las MMP comparte una estructura compuesta por dos o tres  $\alpha$ -hélices, 5  $\beta$ -plegadas y giros (bucles) variables. La unión al átomo de Zinc resulta de la coordinación de éste por 3 residuos conservados de Histidina de la secuencia consenso.

Dependiendo de la enzima, el cuarto ligando de  $Zn^{2+}$  del sitio catalítico es una molécula de agua/hidróxido en la forma catalíticamente activa de la enzima o un grupo tiol o sulfhidrilo (-SH) de un residuo de cisteína en el dominio propéptido en el zimógeno pro-MMP catalíticamente inactivo.

El segundo sitio de unión al Zn(II) llamado sitio estructural, se encuentra coordinado por 3 residuos conservados de Histidina y un enlace monodentado de residuo de Acido Aspártico.

Los 2 o 3 iones de Ca(II) presentes tienen uno rol de estabilidad estructural y están coordinados por residuos de ácido aspártico y ácido glutámico. (5, 6)

El dominio catalítico también contienen un residuo conservado de metionina, el cual forma el denominado "met-turn" ocho residuos después del motivo de unión al Zn, el cual forma una base de soporte alrededor del dominio catalítico. (1, 63)

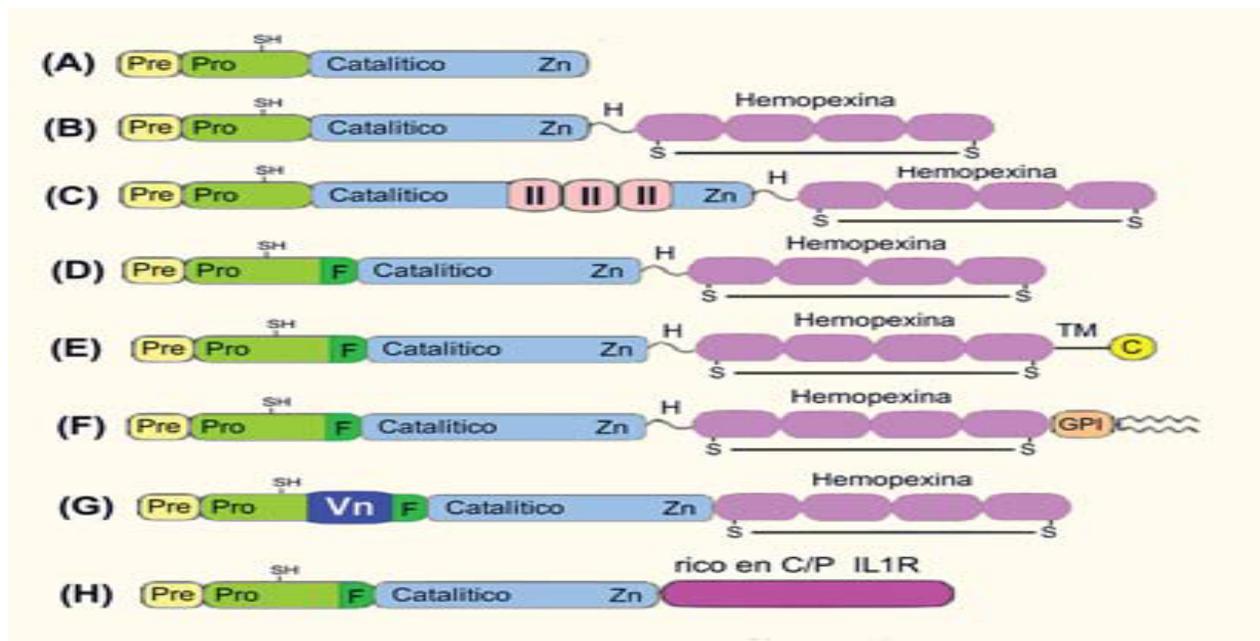
*Región bisagra (enlazador-1) de longitud variable que une al dominio catalítico con el dominio tipo hemopexina. (a excepción de MMP-7, 26 y 23)*

- 4) Dominio tipo hemopexina carboxilo terminal de alrededor de 200 aminoácidos, que contribuye a las interacciones proteína-sustrato, (confiriéndole especificidad a la enzima), a la "dimerización" proteína-proteína o a la unión con los inhibidores endógenos.
- 5) Dominio transmembrana, característico de aquellas MMP que se encuentra ancladas a la membrana plasmáticas (MT-MMP/membrane type-MMP) o

asociación mediante un dominio glicosilfosfatidilinositol (GPI) que ancla a las MMP a la membrana celular y que contribuye a la señalización y comunicación célula/MEC mediante interacciones con proteínas intracelulares.

### **Clasificación**

De acuerdo a estas similitudes estructurales, pueden ser divididas en 8 grupos, cinco de ellos son MMP secretadas y tres de estos grupos son MMP asociadas a la membrana (figura 1) (4, 7, 8)



**Figura 1.** Clasificación de las Metaloproteasas de acuerdo a su estructura. A, B, C, D y G son MMP secretadas y E, F y H MMP asociadas a la membrana. Pre: Secuencia señalizadora (predominio), Pro: propéptido (prodominio) con un grupo tiol (-SH) que se une al ion Zn de sitio catalítico, F: sitio susceptible de la furina, Zn: sitio catalítico de unión al zinc, II: insertos de fibronectina que se unen al colágeno, H: región bisagra, TM: Dominio transmembrana, C: Cola citoplasmática, GPI: dominio de anclaje del glicosilfosfatidilinositol, C/P: cisteína/prolina, IL-1R: receptor de la IL-1, Vn: dominio similar a la vitronectina. El dominio hemopexina contiene cuatro repeticiones con un enlace disulfuro entre la primer y la última repetición. (8)

Por otro lado, la clasificación mas ampliamente utilizada se basa en la especificidad de sus sustratos y en su localización celular (tabla) (4) :

<b>Clasificación</b>	<b>Numero de MMP y denominación</b>	<b>Principales sustrato</b> <sup>(3,5, 7, 10, 11)</sup>	<b>Expresión específica en células y tejidos.</b> <sup>(9)</sup>
<b>Colagenasas</b>	MMP-1 <sup>B</sup> (Colagenasa 1)	Colágeno tipo I, II, III, VII, VIII, X y XI, gelatina, Entactina, tenascina, agregano, fibronectina, vitronectina, IL-1b, pro-TNF $\alpha$ , caseína.	Piel (fibroblastos y queratinocitos), células endoteliales, osteoblastos, macrófagos, hepatocitos.
	MMP-8 <sup>B</sup> Colagenasa-2	Colágeno I, II y III, agregano, serpinas, Pro-TNF-a, IGFBP, MCP-1, IP-10, $\alpha$ 2-microglobulina	Neutrófilos
	MMP-13 <sup>B</sup> Colagenasa-3	Colágeno I, II y III, IV, IX, X y XIV, gelatina, fibronectina, laminina, tenascina, agregano, fibrilina, osteonectina, perlecano,	Piel (fibroblastos y queratinocitos), osteoblastos, osteocitos.
<b>Gelatinasas</b>	MMP-2 <sup>C</sup> Gelatinasa A	Gelatina, colágeno I, IV, V, VII y X; agregano, fibronectina, tenascina, condroitín sulfato, osteonectina, IL-1b, proteína quimioatrayente de monocitos 3, decorina, adrenomedulina.	Piel (Fibroblastos y queratinocitos), condrocitos, osteoblastos, osteocitos, monocitos, macrófagos alveolares, leucocitos PMN, glándula mamaria
	MMP-9 <sup>C</sup> Gelatinasa B	Gelatina, colágeno I, III, IV, V y VII, agregano, elastina, fibrilina, plasminogeno, osteonectina, galactina-1, KiSS-1/metasina,	Piel (Fibroblastos y queratinocitos), condrocitos, osteoblastos, osteocitos, monocitos, macrófagos alveolares, leucocitos PMN
<b>Estromelisinias</b>	MMP-3 <sup>B</sup> Estromelisinina-1	Colágeno IV, V IX y X. Fibronectina, elastina, gelatina, agregano, nidógeno, E-cadherina, plasminogeno, osteonectina, perlecano, proteína quimioatrayente de monocitos 3, decorina, pro-TNF $\alpha$ , antitrombina	Piel (fibroblastos y queratinocitos), células epiteliales, glándula mamaria
	MMP-10 <sup>B</sup> Estromelisinina-2	Colágeno IV, V, IX y X; fibronectina, elastina, gelatina, laminina, agregano, E-cadherina.	Piel (fibroblastos y queratinocitos), células epiteliales.

	MMP-11 <sup>D</sup> Estromelisin-3	Inhibidores de serinproteasa, Inhibidor de proteinasa 1, IGFBP- 1, a2-macroglobulina	Útero, placenta y glándula mamaria en involución.
<b>MT-MMP</b>	MMP-14 <sup>E</sup> MT1-MMP	Colágeno I, II y III, gelatina, fibronectina, laminina, vitronectina, agregano, tenascina, nidógeno, perlecano, fibrilina, , alfa 2 macroglobulina, fibrina, mucina transmembranal, KiSS/metastina	Piel (fibroblastos y queratinocitos), osteoblastos, osteocitos, cartílago articulado.
	MMP-15 <sup>E</sup> MT2-MMP	Transglutaminasa tisular de superficie, fibronectina, Laminina, gelatina, agregano, tenascina, nidógeno, perlecano, pro-TNF $\alpha$	Placenta, cerebro, corazón.
	MMP-16 <sup>E</sup> MT3-MMP	ProMMP-2, gelatina, colágeno tipo III, laminina-1, caseína, fibronectina, agregano, vitronectina, fibrina, KiSS-1, alfa 2- macroglobulina, pro-TNF $\alpha$	Pulmón, riñón, bazo, musculo esquelético, condrocitos, tejido reproductivo (ovario y próstata).
	MMP-17 <sup>F</sup> MT4-MMP	Fibrina, fibrinógeno, fibrilina, fibronectina, gelatina, precursor del factor de necrosis tumoral. pro-TNF $\alpha$	Cerebro, tejido reproductivo (ovario y testículos), colon, leucocitos.
	MMP-24 <sup>E</sup> MT5-MMP	Pro-gelatinasa A. KiSS- 1/metastina	Cerebro, riñón, pulmón,, páncreas.
	MMP-25 <sup>F</sup> MT6-MMP	Gelatina, inhibidor a1 proteasa	Músculos esquelético, pulmón, bazo, testículos, riñón.
	MMP-23 <sup>H</sup> CA-MMP	Gelatina	ovario, testículos, próstata
	<b>Matrilisinas</b>	MMP-7 <sup>A</sup> Matrilisina 1	Elastina, fibronectina, laminina, nidógeno, colágeno IV, tenascina, inhibidor de proteinasa 1, E- cadherina, factor de necrosis tumoral, plasminogeno, osteonectina, decorina, Ligando Fas (Apo-1) , pro-TNF $\alpha$ ,

	MMP-26 <sup>A</sup> Endometasa Matrilisina-2	IGFBP-1, inhibidor de proteinasa a1.	Riñón, útero, placenta
<b>Metaloelastasas</b>	MMP-12 <sup>B</sup> Macrófago metaloelastasa	Colágeno IV, gelatina, elastina, fibronectina, laminina, vitronectina, elastina, fibrilina, inhibidor de proteinasa 1, apolipoproteína A, plasminogeno, pro-TNF $\alpha$ , endostatina	Macrófagos, placenta
<b>Otras</b>	MMP-19 <sup>B</sup> RASI-1	Gelatina, agregano, proteína de matriz cartílago oligomérica, colágeno IV, laminina, nidógeno, tenascina larga, IGFBP-3	Piel (queratinocitos), musculo esquelético, hígado, pulmón, riñón, timo, bazo, cerebro, corazón, tejido reproductivo (ovario, testículos, próstata), glándula mamaria, placenta, colon, intestino delgado, pancreas, leucocitos.
	MMP-20 <sup>B</sup> Enamelisina	Amelogenina, agregano.	Tejido dental
	MMP-21 <sup>G</sup> SMMP (Xenopus)	Gelatina.	Cerebro, riñón e hígado fetal. En adultos: ovario, riñón, pulmón, hígado, cerebro, leucocitos periféricos.
	MMP-27 <sup>B</sup> -	Indefinido	Endometrio, hígado, cartílago.
	MMP-28 <sup>D</sup> Epilisina	Caseína	Piel (queratinocitos), cerebro, pulmón, corazón, riñón, testículos, colon, intestino, páncreas.

**Tabla 1.** Clasificación de las MMP basada en la especificidad de sus sustratos/localización y expresión específica en células y tejidos. <sup>A</sup> Dominio mínimo de las MMP. <sup>B</sup> MMP con dominio simple de hemopexina. <sup>C</sup> MMP de unión a gelatina. <sup>D</sup> MMP activadas por furinas. <sup>E</sup> MMP transmembrana. <sup>F</sup> MMP ligadas a GPI (glicosilfosfatidilinositol). <sup>G</sup> MMP con un dominio similar a la vitronectina. <sup>H</sup> MMP con un dominio rico en cisteína/prolina receptor IL-1.

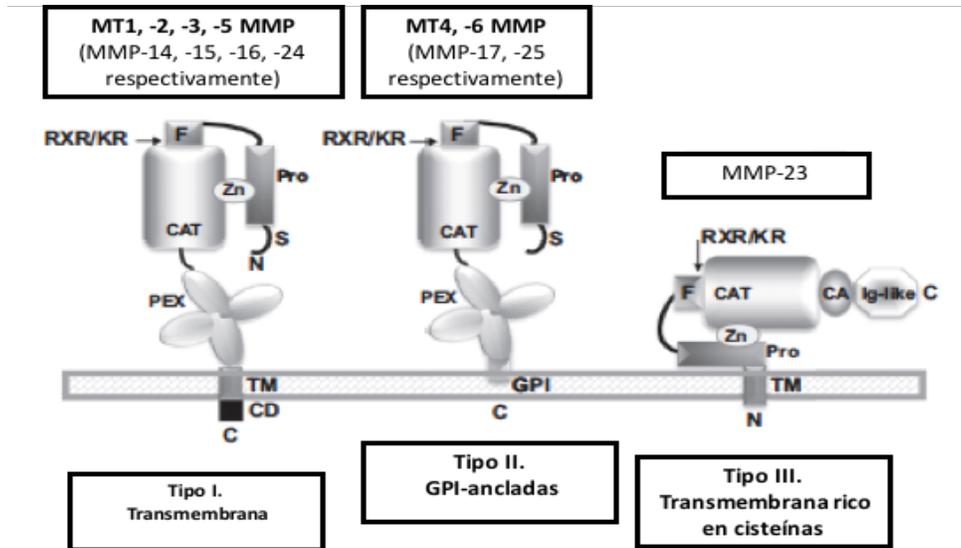
Así mismo, las MT-MMP, se han subdividido en tres clases basándose en la asociación de la enzima con la membrana. (4) Las MMP tipo I se encuentran asociadas a la membrana mediante un tallo hidrofóbico transmembrana de aproximadamente 20 aminoácidos y un dominio corto citoplasmático C-terminal. Las tipo II se encuentran ligadas mediante un dominio glicosilfosfatidilinositol (GPI) C-terminal, y finalmente las tipo III cuentan con dominio transmembrana N-terminal. En su región C-terminal carece de dominios hemopexina, los cuales se encuentran reemplazados por un dominio rico en cisteínas (Cs) y un dominio de adhesión celular tipo Inmunoglobulina (IgCAM) (6, 9, 14).

Debido a su localización sobre la superficie celular, las MT-MMP están perfectamente situadas para mediar efectos biológicos que requieren proteólisis regulada y localizada.

<b>Clasificación</b>	<b>Tipo de asociación a la membrana celular</b>	<b>MMP</b>
<b>Tipo I.</b>	Tallo hidrofóbico transmembrana /citoplásmico	MT1-MMP
		MT2-MMP
		MT3-MMP
		MT5-MMP
<b>Tipo II</b>	Dominio GPI C-terminal	MT4-MMP
		MT6-MMP
<b>Tipo III</b>	Arreglo transmembrana N-terminal.	MMP23 A
		MMP23 B

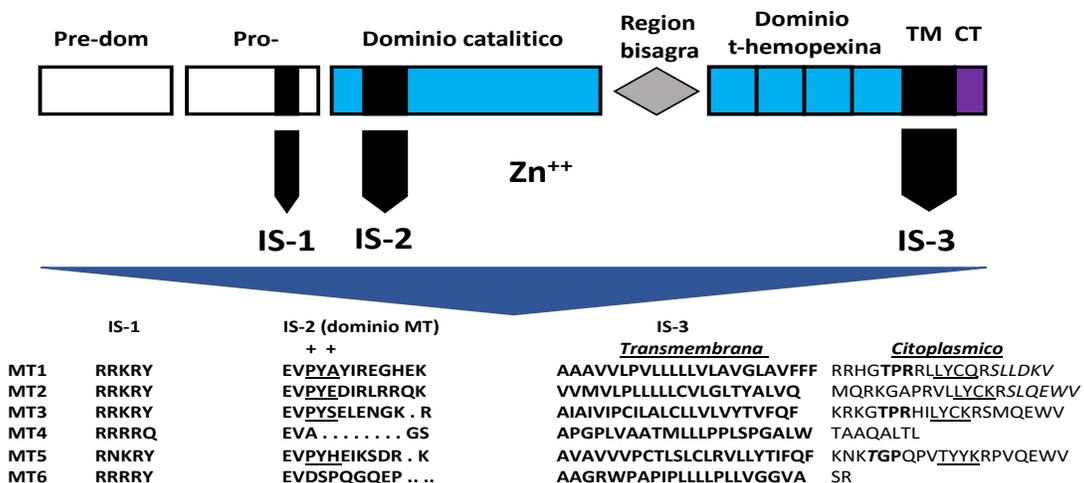
**Tabla 2.** Clasificación de Metaloproteasas de matriz asociadas a membrana. MT-MMP (*membrane type-MMP*).

En estructura, la mayoría de las MT-MMP son similares a las MMP secretadas, comparten dominios estructurales comunes que consisten en un péptido señal, un dominio propéptido, dominio catalítico con un sitio de unión a Zinc, un dominio bisagra, un dominio tipo hemopexina y una segunda región enlazadora, su asociación a la membrana celular se muestra en la siguiente figura . (4, 13)



**Figura 2.** Estructura general de las Metaloproteasas asociadas a membrana. (15)

Además de la asociación a la membrana plasmática, una de las diferencias estructurales destacables radica en la presencia de 3 secuencias homologas conservadas conocidas como IS-1, IS-2 e IS-3. (13)



**Figura 3.** Representación de la posición de las secuencias IS-1, IS-2 e IS-3 en relación a los dominios funcionales conocidos de las MMP . (13)

**IS-1** es una inserción de alrededor de 11 aminoácidos dentro del dominio propéptido aporta un rol funcional único. Esta secuencia conservada de escisión, RR(K/R)R, entre el C-terminal del dominio propéptido y el dominio catalítico, es reconocida por proteinasas convertasas, como furinas, a través de su paso por el aparato de Golgi, lo que origina la remoción del prodominio resultando en la activación de la proteína, en consecuencia, todas las MT-MMP son expresadas como enzimas activas sobre la superficie celular, ya que son sintetizadas como pre-pro enzimas y el procesamiento de la péptido señal y prodominio ocurre antes de que estas sean secretadas.

Además de esta función, algunos reportes muestran que IS-1 puede desempeñar un papel en la activación y procesamiento de MT1-MMP y la activación de proMMP2. La segunda región homóloga de 5 aminoácidos que todas las MT-MMP comparten, localizada dentro del dominio propéptido parece ser esencial para el funcionamiento de la enzima, se ha sugerido además, que esta secuencia funciona como una chaperona intramolecular que mantiene la conformación de la proteína.

**IS-2** Esta segunda secuencia insertada y localizada dentro del dominio catalítico de alrededor de 8 aminoácidos (MT-loop) que difiere entre todas las MT-MMP, parece desempeñar un rol importante en la activación de proMMP2 por MT-MMP. *Miyamori y cols.* sugieren que el dominio IS-2 podría tener un papel potencial en la activación de MT2-MMPs sobre la superficie celular. (83, 84)

**IS-3** con una longitud de aproximadamente 75 aminoácidos y localizada cerca de la región C- terminal contiene los dominios transmembrana y citoplásmico, los cuales también presentan diferencias entre todas las MT-MMP y que parece participar en la correcta localización sobre la membrana celular de las MT-MMP. (13)

### **Función biológica de las MMP: procesos naturales y patológicos**

Las MMP son proteasas multifuncionales que procesan componentes de las MEC con subsecuente liberación de fragmentos bioactivos y remodelación de membrana. Desempeñan además, un notable papel en la activación y procesamiento de quimiocinas (79) y mas recientemente se ha demostrado que escinden otros tipos

de proteínas y sustratos no proteicos que asocian a estas proteasas a la regulación de algunas actividades fisiológicas como remodelación y reparación de tejidos, organogénesis, angiogénesis, desarrollo embrionario, ovulación, cicatrización, involución uterina, respuesta inmune, inflamación y apoptosis. (4,11, 23). Adicional a su habilidad para escindir proteínas de MEC, las MMP, también escinden el prodominio de otras MMP promoviendo su activación desde su forma zimógena a activa, de esta manera, no solo ejercen control sobre la activación de MMP, sino que también son capaces de iniciar un efecto biológico en cascada. (9) Ésta última característica, en particular, hacen a las MT-MMP candidatos atractivos como potenciales objetivos terapéuticos.

La expresión fisiológica de las MMP en tejido es normalmente baja con grados transitoriamente mas altos debido a la remodelación de matriz ligada a homeostasis o eventos específicos del desarrollo, por lo que se ha observado un aumento en la expresión de MMP durante diferentes estados del desarrollo en mamíferos, desde la implantación embrionaria hasta la morfogénesis de diferentes tejidos, incluyendo pulmones, huesos y glándulas mamarias.

Las mayoría de estas proteasas son expresadas diferencialmente en distintos tejidos y tipos celulares (tabla 1) en base a un patrón de factores de transcripción específicos el cual es independiente de la similitud de especificidad de sustrato que pudieran compartir dos o mas MMP. (7,9)

El análisis en modelos animales de mutantes nulos individuales de MMP demostraron fenotipos no alterados de los ratones *knockout* con un supervivencia de al menos las tres primeras semanas postnatales, lo cual demuestra redundancia proteolítica, compensación enzimática y desarrollo adaptativo. (9)

Por otro lado, el papel de las MMP como remodeladoras de tejido las ha asociado con varios procesos patológicos favorecidos por el desbalance entre MMP y sus inhibidores naturales que promueven una sobreactividad de las MMP's, lo cual conduce a una degradación excesiva de los componentes de MEC, parece ser además, que la expresión de solo algunas MMP esta restringida a tejidos y tipos celulares específicos bajo condiciones patológicas tales como diabetes mellitus, enfermedades periodontales, osteogénesis imperfecta, enfermedades del sistema

cardiovascular como aterosclerosis, enfermedad coronaria arterial, hipertensión, falla cardiaca, enfermedades pulmonares como hipertensión arterial pulmonar, enfermedad crónica obstructiva pulmonar, asma bronquial, fibrosis pulmonar, enfermedades reumáticas como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, en procesos oncogénicos como metástasis en invasión de células tumorales, angiogénesis, enfermedades del sistema nervioso central como Alzheimer, isquemia cerebral, Parkinson, esclerosis múltiple; entre otras, en las cuales las MMP's han generado estrategias para evadir los mecanismos reguladores lo cual conduce a la actividad proteolítica incontrolada que las acompaña. (4, 11) En la siguiente tabla se describe de manera general la participación de las MMP en procesos biológicos naturales y patológicos:

<b>Proceso</b>	
<b>Normal</b>	<b>Patológico</b>
<b><i>Actividad en el endometrio</i></b> (17)	<b><i>Aterosclerosis</i></b> (12, 24, 25, 26 )
Se ha observado un aumento de colagenasas y estromelisininas durante la fase menstrual en el endometrio humano.	La habilidad de algunas MMP's de promover la migración y proliferación de CVML sugiere que ellas promueven el crecimiento de la placa aterosclerótica y en estadios tardíos, su desestabilización, debido a que ambos procesos dependen de una excesiva degradación de MEC.
<b><i>Cicatrización de heridas</i></b> (8)	<b><i>Hipertensión</i></b> (4, 27)
Proceso de remodelación de tejido que involucra la migración de queratinocitos a la herida para reepitalizar la superficie dañada mediante la participación de MMP. Este evento no solo requiere la degradación de la MEC como barrera para permitir la migración de células, sino de la disociación de queratinocitos mediante moléculas integrinas con colágeno tipo I de la MEC. (8)	La hipertensión esta asociada con remodelado vascular caracterizado por el reordenamiento de proteínas de MEC. La composición de colágeno en el corazón y vasculatura es alterada durante la hipertensión, favoreciendo la presencia de colágeno tipo I sobre otros subtipos. El aumento de TIMP-1 durante la hipertensión inhibe la actividad de degradación de colágeno tipo 1 de MMP-1
<b><i>Actividad fibronilitica celular</i></b> (18)	<b><i>Falla cardiaca</i></b> (4, 11, 24, 28)
La interacción entre algunas MMP's y el sistema plaminogenico/plasmina afectan la fibrinólisis	La transición de hipertrofia del miocardio a falla cardiaca esta asociado con un numero de

<p>celular, mediante la formación por hidrólisis de moléculas activadores del plasminogeno (urocinasa) e inhibidoras fisiológicas de la plasmina (a2-antiplasmina) y plasminogeno 1 (PAI-1) que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la fibrinólisis celular.</p>	<p>cambios patofisiológicos que incluyen necrosis miocítica y alteraciones en los componentes de la MEC, lo cual compromete funciones cardíacas. Un incremento en la actividad de MMP's promueve un aumento en la degradación de MEC que puede causar remodelación ventricular, dilatación y falla cardíaca.</p>
<p><b>Sistema inmune</b> (9,15)</p>	<p><b>Asma bronquial</b> (4, 34, 35)</p>
<p>Activación de defensas sintetizadas de forma inactiva. Esenciales para el reclutamiento quimiotáctico de neutrófilos en epitelio pulmonar dañado Escisión de IgG, que previene el inicio de la cascada del complemento. Actividad pro y antiinflamatoria en base al patrón de expresión de MMP a partir de células del sistema inmune innato.</p>	<p>Cambios estructurales en las vías respiratorias que incluye deposición de colágeno subepitelial, descamación epitelial, hiperplasia de células caliciformes, hiperplasia de células de músculo liso e hipertrofia en pacientes con asma promueven una respuesta bronquial exacerbada y obstrucción del aire.</p>
<p><b>Angiogénesis</b> (19)</p>	<p><b>Artritis reumatoide</b> (4, 37)</p>
<p>Proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos y que requiere degradación de la membrana basal vascular y remodelación de MEC (principalmente degradación de colágeno tipo I) para permitir a las células endoteliales migrar al tejido circundante. Además, algunas MMP potencian la angiogénesis mediante la liberación de factores de crecimiento angiogénicos asociados a la MEC y degradación de las interacciones entre células endoteliales y células-MEC. La ausencia de algunas MMP resulta en desarrollo vascular defectuoso y muerte posnatal.</p>	<p>Los cinoviocitos tipo fibroblastos parecen desempeñar el rol principal en la patogénesis de la artritis reumatoide como principales promotores de la destrucción articular ya sea a través de la liberación de MMP o indirectamente de la estimulación de osteoclastogénesis. MMP contribuyen a la destrucción de articulaciones mediante la degradación directa de cartílago y hueso y durante su participación en angiogénesis.</p>
<p><b>Desarrollo óseo y remodelación</b> (20)</p>	<p><b>Oncogénesis</b> (4, 7, 40, 41, 42).</p>
<p>La formación del esqueleto depende de procesos de osificación que requieren una extensa remodelación de la matriz. Además, algunos estudios han demostrado que algunas MMP son necesarias para la transición de cartílago a hueso</p>	<p>Muchos estudios han implicado a las MMP's en múltiples tipos de cáncer, incluyendo pulmón, mama, piel, colon, entre otros. La expresión y actividad de MMP's está elevada en y alrededor de los tumores. Su excesiva expresión ha sido</p>

<p>en las placas de crecimiento de hueso largos. (20)</p>	<p>correlacionado con susceptibilidad a cáncer y mortalidad, implicándolas en estadios tempranos y tardíos de la enfermedad. La invasión y metástasis de células tumorales depende en gran medida de la degradación de la membrana basal y MEC. Por otro lado, entre las múltiples proteínas que son sustratos de las MMP, además los componentes de la MEC, algunas parecen tener una importante actividad antitumoral en el hospedero.</p> <p>Las MT-MMP tienen un impacto significativo en cáncer debido a su localización en la interface de la matriz tumoral.</p>
<p><b><i>Embarazo (4,21)</i></b></p>	<p><b><i>Diabetes mellitus (4, 43, 44)</i></b></p>
<p>Durante el embarazo hay un marcado cambio hemodinámico y uterino que permite un adecuado flujo sanguíneo uteroplacentario y expansión uterina para el crecimiento del embrión, que implica un marcado remodelación vascular y uteroplacentario donde las MMP son importante reguladoras del remodelación uterino y vascular. Algunas modificaciones en el fino balance entre MMP e I-MMP puede desempeñar un rol en cambios vasculares asociados con complicaciones en el embarazo como preeclampsia.</p>	<p>Algunos cambios en la estructura de las paredes vasculares ocurren en diabetes y contribuyen a complicaciones micro y macrovasculares. Algunas MMP son las principales especies encontradas en la vasculatura. Algunos estudios han demostrado la estimulación de la expresión génica de MMP en muestra de aorta y mesentéricas en respuesta a un aumento de glucosa en circulación, por otro lado se ha observado un incremento en niveles de MMP en tejido diabético.</p>
<p><b><i>Crecimiento embrionario y morfogénesis tisular (22)</i></b></p>	<p><b><i>Fibrosis pulmonar (4, 36)</i></b></p>
<p>Ambos eventos requieren el rompimiento de la MEC que permita la migración celular, remodelación del microambiente y organización celular. Algunos estudios han demostrado que las colagenasas son las principales responsables de estos eventos.</p>	<p>Es una enfermedad crónica del pulmón caracterizada por grados variables de inflamación y fibrosis en el parenquema pulmonar, caracterizada por una pérdida de células epiteliales pulmonares, las cuales son reemplazadas por miofibroblastos y deposición de proteínas de MEC en el intersticio pulmonar, provocando un remodelación estructural</p>

	pulmonar. La presencia de una variedad de MMP depende del estadio de la enfermedad.
--	-------------------------------------------------------------------------------------

**Tabla 3.** Procesos biológicos naturales y patológicos asociados a la función de las MMP.

### **Regulación de la actividad**

La actividad proteolítica de las MMP es regulada mediante tres principales niveles de control endógeno a través de la regulación de la transcripción (estimulación o inhibición de la expresión génica), activación de la pro-enzima e inhibición de la actividad enzimática mediante la interacción con inhibidores específicos endógenos. Estos mecanismos operan coordinadamente para asegurar que la expresión y actividad de las MMP se circunscriban a aquellos sitios y condiciones en los que es necesaria su actividad. (4, 7)

#### ***Regulación de la transcripción.***

El análisis estructural y funcional de las regiones promotoras de los genes de las MMP han proporcionado un mejor y mayor entendimiento de los mecanismos que regulan su expresión, siendo este el principal mecanismo de regulación de las mismas, se sabe que cada célula muestra un fenotipo proteolítico en respuesta a estímulos a una amplia variedad de agentes, incluyendo citosinas, factores de crecimiento, agentes químicos, estrés físico, transformación celular oncogénica así como interacciones célula-célula, y célula-MEC regulan el proceso. (7)

#### ***Activación de las pro-MMP***

La activación extracelular de zimógenos latente (Pro-MMP) representa el segundo nivel de regulación.

En 1971, se demostró que las MMP se sintetizaban como zimógenos inactivos en estado latente que requerían ser activados mediante la remoción de su prodominio

en un proceso conocido como “*cysteine switch*” que se lleva a cabo por la eliminación proteolítica del prodominio. <sup>(1)</sup>

La activación involucra la ruptura del enlace formado entre un grupo tiol (-SH) perteneciente a una cisteína desapareada cercana al extremo C-terminal del prodominio PRCG[V/N]PD y el ion  $Zn^{2+}$  en el sitio activo debido a que este grupo tiol actúa como cuarto ligando para el ion  $Zn^{2+}$  “enmascarando” así el sitio activo al prevenir la hidratación del ion  $Zn^{2+}$ .

Posterior a la ruptura de la interacción cisteína-Zn, el grupo tiol de la cisteína es reemplazado por una molécula de agua, permitiendo así la interacción con su sustrato.

Este evento puede ser mediado por tres mecanismos. 1) remoción del prodominio por escisión directa de otra endopeptidasa, donde los principales activadores fisiológico son la plasmina, trombina, el factor Xa y otras MMP; 2) reacomodo alosterico del pro-dominio; 3) modificaciones químicas por especies reactivas del oxígeno o agentes no fisiológicos que promueven ruptura del enlace cisteína-Zn.

La unión a un ligando o sustrato puede también conducir a la separación del propéptido y activación de la proteasa. <sup>(5,7)</sup>

### ***Inhibidores endógenos***

Debido a la capacidad que tienen las MMP de intervenir en procesos fisiológicos y patológicos, éstas proteasas están sujetas a un estricto control por inhibidores endógenos generales como  $\alpha$ 1-proteínasa y  $\alpha$ 2-macroglobulin (presentes en plasma y fluidos celulares),  $\alpha$ 1-antitripsina y por inhibidores más específicos tales como los inhibidores tisulares de metaloproteasas (*TIMP*) descritos por *Harper y Bloch* en 1971, los cuales se unen a las MMP de manera no covalente en complejos estequiometricos (1:1), formando un complejo reversible y de alta afinidad con dichas enzimas. <sup>(45, 46)</sup>

En la actualidad, han sido identificado en vertebrados cuatro *TIMP*’s, los cuales son proteínas con un tamaño de entre 20 a 39 kDa. *TIMP*-1, -3 y -4 son inhibidores secretados, mientras que *TIMP*-3 se encuentra anclada en la MEC. Estas proteínas

a pesar de ser capaces de inhibir todas las formas activas de MMP identificadas hasta el momento, en algunas MMP ejerce mayor actividad inhibitoria que en otras. (3, 4, 47)

Estas proteínas además se encuentran involucradas en varios procesos biológicas tales como proliferación y migración celular, inhibición de la apoptosis, invasión y angiogénesis, además de su participación en la activación de algunas pro-MMP (4)

### ***Inhibidores exógenos.***

Durante las ultimas décadas, tanto inhibidores naturales como sintéticos han sido utilizados con propósitos terapéuticos. Los inhibidores naturales (TIMP) a pesar de tener un amplio espectro de acción, su uso ha sido limitado debido a su baja biodisponibilidad oral y escasa penetración al tejido debido a su tamaño (4), por lo que el desarrollo de inhibidores sintéticos que comenzó en 1980, se basó en el proceso de degradación de la MEC, es decir, la primera generación de inhibidores consistieron en moléculas de bajo peso molecular que emulan los sustratos naturales de las MMP (peptidomimeticos) acompañados de un grupo quelante capaz de unirse al ion  $Zn^{2+}$  inhibiendo así su actividad. Un ejemplo de éstos ampliamente utilizado es el Batimastat (46, 48), el cual a pesar de poseer un amplio espectro de actividad sobre casi todas las MMP y mostrar una reducción del crecimiento de tumor en cáncer de mama, pancreático y melanoma, mostró fallas en la fase clínica III debido a su baja biodisponibilidad oral y poca solubilidad. Sus subsecuentes análogos, marimastat, prinomastat y tanomastat y algunos derivados de tetraciclinas, aunque presentaron una mayor biodisponibilidad oral y selectividad en relación a los diferentes tipos de MMP, su uso clínico se vio limitado debido a la presencia de efectos colaterales severos como síndrome musculoesquelético, fototoxicidad y anemia sideroblastica. (4, 40, 49)

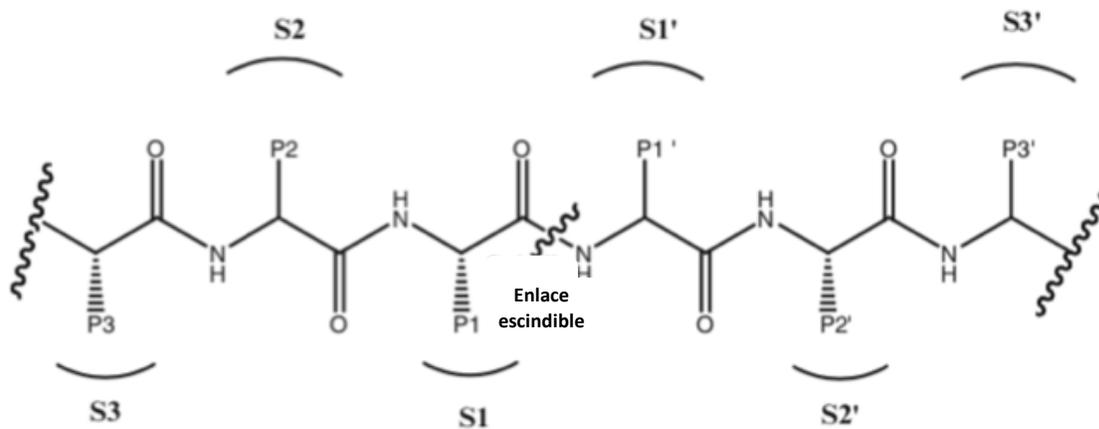
En base a lo anterior, se entiende que las fallas terapéuticas y resultados insatisfactorios de los inhibidores se debe a varias razones tales como: toxicidad, biodisponibilidad oral deficiente, uso terapéutico antitumoral desatendiendo la participación de MMP en procesos biológicos normales, baja eficacia del inhibidor

debido al uso en estados tardío de la enfermedad y baja selectividad, factor que complica el aspecto terapéutico debido a la dualidad de acción de las MMP y otras proteinasas Zn dependiente no relacionadas.<sup>(40, 47)</sup> La detección de diferentes patrones de MMP expresados en condiciones patológicas, podría facilitar el uso racional de una terapéutica basada en inhibidores de MMP, contribuyendo a disminuir los efectos colaterales.

### **Regiones de especificidad para el reconocimiento de sustratos**

Adicional al sitio catalítico, se han descrito dentro de la estructura de las MMP algunos otros sitios activos conocidos como *subsitos* (*S*), los cuales interactúan con sustratos y moléculas inhibitoras debido a que se encuentran flanqueando el ion Zn del sitio catalítico. <sup>(16)</sup>

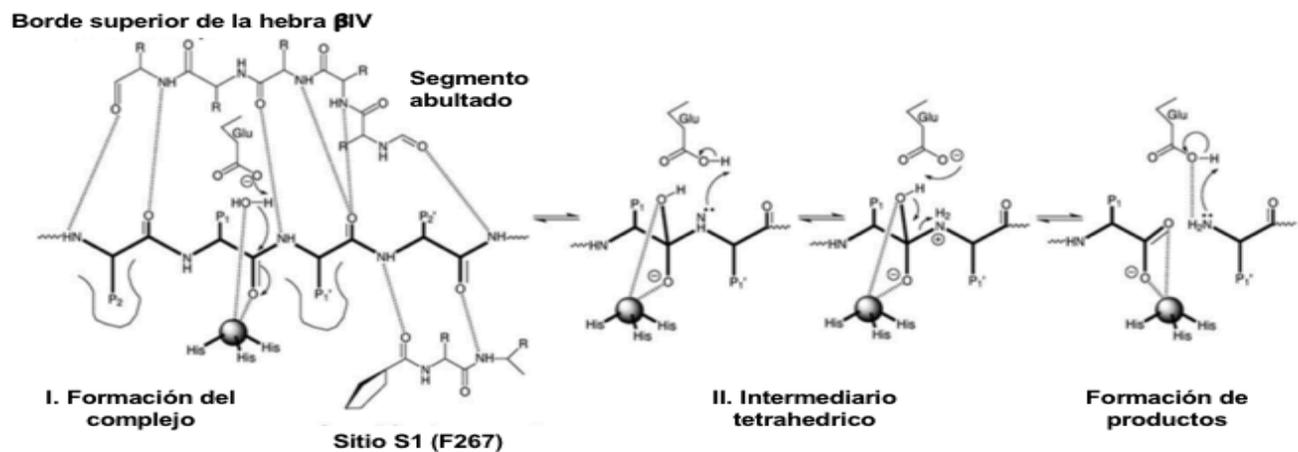
Estos subsitos que aportan especificidad de sustrato son designados como "S" según la nomenclatura *Schechter y Berger*; aquellos *subsitos* que se encuentran del lado izquierdo respecto al ion Zn del sitio catalítico (N-terminal) son denominados S1, S2, S3, ... Sn, y S1', S2', S3', ... Sn' a aquellos que se encuentren del lado derecho respecto al ion Zn (C-terminal). Así mismo, los correspondientes residuos de los sustratos o inhibidores que interactúan con S1, S2, S3, Sn (*de la enzima*) son denominados P1, P2, P3, Pn, y P1', P2', P3' con S1', S2', S3' respectivamente (**Figura 4**). La variedad de residuos presentes en estos subsitos proporcionan la especificidad de sustratos a las diferentes MMP, siendo el subsitio S1' de gran utilidad para el diseño de moléculas inhibitoras.



**Figura 4.** Nomenclatura de los residuos de aminoácidos de los sustratos o moléculas inhibitoras y sus correspondientes sitios de unión en la enzima.  $P_n$  y  $P_n'$  ( $n=1, 2, 3, \dots$ ) hace referencia a los residuos del sustrato,  $S_n$  y  $S_n'$  se refieren a los correspondientes sitios de unión en la enzima. <sup>(4)</sup>

El subsitio de especificidad  $S1'$  con propiedades hidrofóbicas se encuentra inmediatamente a la derecha del  $Zn^{2+}$  del sitio catalítico formando principalmente por la parte inicial de la hélice beta (*hB*) del sitio activo, proporciona a las MMP inhibición selectiva debido a la variación en longitud (de 9 a 37 residuos de aminoácidos) <sup>(1)</sup> y profundidad. En base a esta última propiedad, se ha clasificado a las MMP mediante técnicas como cristalografía de rayos X, espectrografía de resonancia magnética, y estudios de modelado de homología en tres clases, aquellas con una amplia profundidad de  $S1'$  (MMP-3, MMP-11, MMP-12, MMP-13 y MMP-14) aquellas con una profundidad intermedia (MMP-2, MMP-8 y MMP-9), y aquellas con un  $S1'$  con poca profundidad (MMP-1, MMP-7), las cuales en términos generales son denominadas como MMP clase 1 y clase 2 respectivamente. <sup>(4,9)</sup>

## Mecanismo catalítico.



**Figura 5.** Mecanismo catalítico propuesto de las Metaloproteasas. I. Formación del complejo entre el ion Zn del sitio catalítico unido a tres histidinas, una molécula de agua del solvente y el sustrato. II. Formación de complejo tetrahédrico (*gem-diol*) y transferencia de un protón al grupo amino. III. La transferencia del protón promueve hipotéticamente la formación de dos productos.

Se ha sugerido un mecanismo catalítico de un solo paso que sigue una cinética simple que comprende el ataque nucleofílico de una molécula del solvente, polarizada por un glutamato ácido/base general y el ion  $Zn_{cat}^{2+}$ , sobre el enlace péptido a escindir en un valor de pH cercano a neutro. Para que esto suceda, una molécula sustrato debe estar unido y formar un complejo. La unión ocurre en una conformación extendida a través del segmento que forma una pared de  $S1'$  y el segmento de borde abultado y sobre el borde superior de la hebra  $\beta IV$ .

El grupo carbonilo escindible coordina el ion  $Zn_{cat}$ , el cual a su vez se encuentra ligado a tres histidinas de la secuencia conservada, y una molécula de agua a modo pentámero. Esta esfera pentamérica de unión a  $Zn_{cat}$  se mantiene durante toda la reacción, aunque puede haber transiciones de carga locales durante el proceso. El solvente se encuentra unido al glutamato, el cual actúa primero como una base general y después como un ácido durante la catálisis. Además, el ion Zinc ejerce actividad ácida sobre el oxígeno del grupo carbonilo escindible, lo que potencia la electrofilicidad del carbono. El glutamato como base sustrae un protón de una molécula de agua (del solvente), dando lugar a un grupo hidróxido que ataca el

carbono del grupo carbonilo formando un complejo tetrahédrico intermedio con carga negativa (*gem-diol*) estabilizado por otros residuos de aminoácidos como histidinas, argininas y tirosinas vecinales. Este *gem-diol* interactúa de manera bidentada con el ion Zinc, con uno de sus hidroxilos ocupando la posición del solvente en la enzima sin sustrato. El glutamato actúa subsecuentemente como un ácido general, donando el protón capturado del solvente al nitrógeno escindible (amonio secundario), posteriormente el glutamato acepta el último protón del intermediario tetrahédrico (*gem-diol*) de manera directa o a través del glutamato. Este último paso resulta en la formación de dos nuevos productos que contienen un nuevo grupo carboxilato y amino respectivamente. Estos dos nuevos productos permanecen en principio unidos a la enzima en forma de un complejo de doble producto, donde el nuevo C-terminal formado interactúa con el Zn del dominio catalítico, posiblemente de manera monodentada, y el nuevo N-terminal se une al hidrogeno del glutamato. Subsecuentemente, una nueva molécula de agua se une al ion Zinc y separa al producto formado dejando el sitio activo libre listo para una nueva reacción de catálisis. (1,4,6)

## **METALOPROTEASA DE MATRIZ 3 (MT3-MMP)**

### **Estructura**

La Metaloproteasa de matriz 3, pertenece al subgrupo de las metaloproteasas de matriz tipo I, con una longitud de 607 residuos de aminoácidos (*aa.*) y un peso molecular de 69 521 Da. El gen de la MT3-MMP se encuentra ubicado en el cromosoma humano 8 (8q21.3). Estructuralmente está compuesta por una péptido señal de 31 *aa.* (1-31 ), un dominio propéptido de 88 *aa.* (32-119) dentro del cual se encuentra la secuencia de reconocimiento por proteínas convertasas (*RRKRY* ) que va de la posición 116 a la 120 y el motivo que interactúa con el sitio catalítico (*PRCGVPDQ*) y promueve el denominado "cysteine switch" que va de la posición 99

a la 106, un dominio extracelular de 445 aa. (120-564), un dominio transmembrana de 21 aa. (565-585) y dominio citoplásmico de 22 aa. ( 586-607).

Dentro de la región extracelular se encuentra el dominio catalítico y la secuencia consenso (**HELGHALGLEH**) que va de la posición 246 a la 256 y los dominios tipo hemopexina.

<b>Dominio</b>	<b>Posición</b>	<b>Descripción</b>	
<b>Péptido señal</b>	1-31	Escindida	
<b>Propéptido</b>	32-119	Motivo "cysteine switch"	99 -106 (PRC <sup>101</sup> GVPDQ) <b>Unido a Zinc 2 (inactiva)</b>
		Sitio de corte por furina	116 -120 (RRKRY)
<b>Dominio extracelular</b>	120-564	Secuencia consenso	246 - 256 ( <b>H</b> <sup>246</sup> ELGH <sup>250</sup> ALGLEH <sup>256</sup> ) <b>Unido a Zinc 2 (catalítico)</b>
		Unión a Zinc 1 (estructural)	<b>His</b> <sup>193</sup> / <b>Asp</b> <sup>195</sup> / <b>His</b> <sup>208</sup> / <b>His</b> <sup>221</sup>
		Unión a Ca 1	<b>Asp</b> <sup>183</sup> / <b>Gly</b> <sup>215</sup> / <b>Gly</b> <sup>217</sup> / <b>Asp</b> <sup>219</sup>
		Unión a Ca 2	<b>Asp</b> <sup>200</sup> / <b>Gly</b> <sup>201</sup> / <b>Gly</b> <sup>203</sup> / <b>Phe</b> <sup>205</sup>
		Hemopexina 1	340-388
		Hemopexina 2	389-434
		Hemopexina 3	436-484
		Hemopexina 4	485-432
<b>Dominio transmembrana</b>	565-585	---	
<b>Dominio citoplásmico</b>	586-607	---	

**Tabla 4.** Dominios, motivos y posiciones características de la MT3-MMP dentro de su secuencia<sup>(78)</sup>.

La estructura cristalina del dominio catalítico de MT3-MMP (dcMT3-MMP) ha sido reportada en coordinación con Batimastat (PDB 1RM8). Estructuralmente es comparable con otras MMP ya reportadas, una forma esférica con un diámetro de alrededor de 40 Å. Su conformación estructural a nivel secundario cuenta con 3

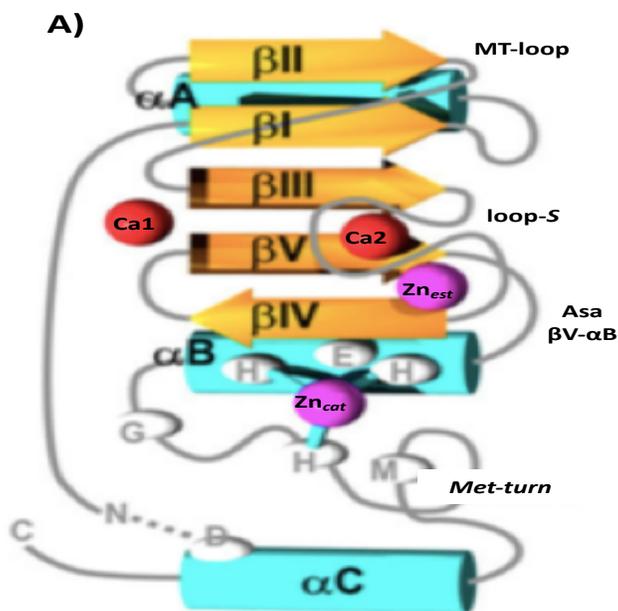
hélices alfa ( $\alpha A$ ,  $\alpha B$  y  $\alpha C$ ) y 5 hebras beta,  $\beta I$ ,  $\beta II$ ,  $\beta III$ ,  $\beta IV$  y  $\beta V$ , con solo la hebra  $\beta IV$  en sentido opuesto a las otras, la cual se encuentra ligada a la hebra central  $\beta III$  mediante el característico bucle en forma de "S" (*loop-S*) dentro del cual se encuentran los residuos de aminoácidos que interaccionan con el ion Zn estructural y el ion Ca a la hebra beta adyacente ( $\beta IV$ ). El loop-S continua sobre la hebra  $\beta IV$  antiparalela formando el segmento para la unión de sustratos peptídicos e inhibidores.

Entre el segmento que conecta la hebra  $\beta II$  y  $\beta III$  denominado MT-loop (Tyr171 a Lys178) y el loop que conecta las hebras  $\beta IV$  y  $\beta V$ , se intercala el segundo ion de calcio. Entre la hebra  $\beta V$  y la alfa hélice B ( $\alpha B$ ) se encuentra otro segmento de alta variabilidad que es fuente de especificidad (asa  $\beta V$ - $\alpha B$ ).

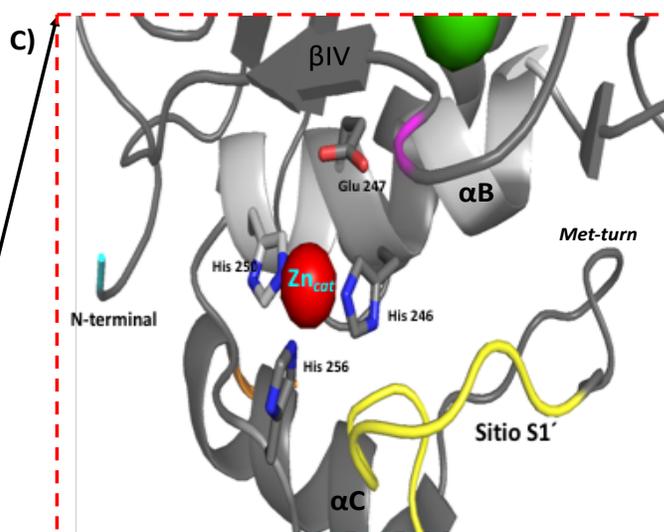
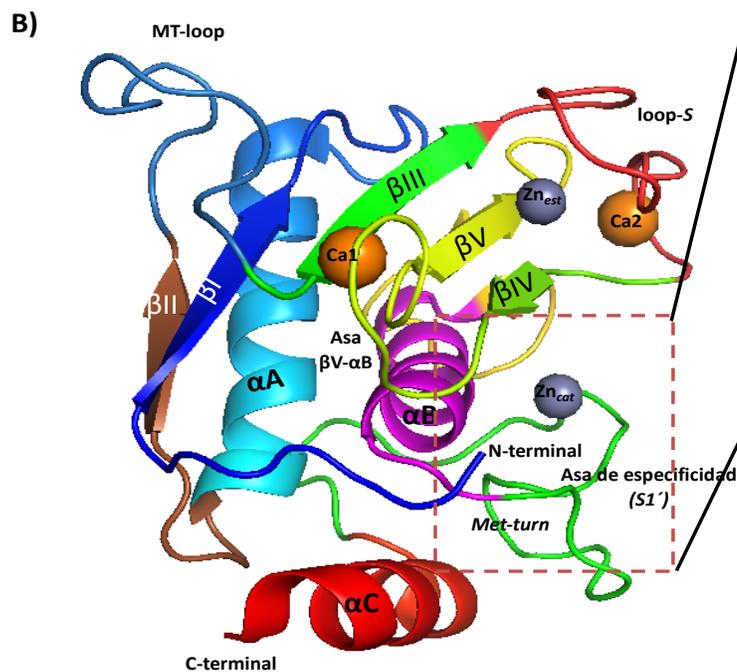
Dentro de la secuencia de la  $\alpha B$  se encuentran dos de los tres residuos de His de unión al ion  $Zn_{cat}$  (*His246* e *His250*), la continuación de la cadena proporciona el tercer residuo de Histidina (His 256) dando lugar en seguida al *Met-turn* hacia la hélice alfa C ( $\alpha C$ ).

Los sitios de unión a sustrato S1, S2, S2' y S3 muestra similitud con otras MMP y una ligera aunque importante diferencia del sitio S1', el cual es mas estrecho y menos profundo que en las mayoría de MMP.

La unión al Batimastat fue definida mediante densidad electrónica mostrando la coordinación del ion  $Zn_{cat}$  de forma bidentada mediante el oxígeno del grupo hidroxilo y el oxígeno del grupo carbonilo pertenecientes al grupo hidroxámico del Batimastat. Ambos átomos de oxígeno, junto con los 3 átomos de nitrógeno de las histidinas ligantes forman una esfera de coordinación alrededor del ion Zinc. El anillo tiofeno, se localiza sobre el ion  $Zn_{cat}$  a una distancia aproximada de 4.5 Å. El grupo isopropilo simula la cadena lateral de una leucina (P1') que se extiende dentro del dentro de la región S1'. El anillo fenilo (P2') forma interacciones intra e intermoleculares con el anillo tiofeno y con Phe205/Phe267 respectivamente. (50, 64)



**Figura 6.** Estructura general del dominio catalítico de las MMP. A) Esquema de la topología de dominio catalítico de las MMP que muestra los elementos regulares de su estructura secundaria y los 4 cationes ( $2 Zn^{2+}$  y  $2 Ca^{2+}$  (6). B) Vista tridimensional de la estructura cristalina del dcMT3-MMP. Las hojas beta son representadas como flechas y las hélices alfa como cintas en espiral. C) Acercamiento y cambio de orientación del sitio catalítico que muestra la interacción de las histidinas con el ion  $Zn_{cat}$ .



### Antecedentes directos

La MT3-MMP es una endopeptidasa que degrada, de manera general, algunos componentes de matriz extracelular tales como colágeno tipo III, fibronectina,

gelatina, laminina, vitronectina, y fibrina; con poca o nula actividad sobre colágeno tipo I, II, IV y V.<sup>(9, 11, 50)</sup> Se encuentra expresada principalmente en melanocitos, células microgliales, endoteliales, fibroblastos estromales, células de musculo liso y células de cresta neural, asociando su expresión en éstas ultimas con la transición epitelio mesenquimo durante el proceso de migración, <sup>(51)</sup> se ha demostrado que su deficiencia provoca alteraciones en el crecimiento de debido a la disminución de la viabilidad de celulas mesenquimales en el tejido esquelético, causada por inhibición de la proliferación y migración de éstas celulas debido a la deficiencia de la degradación de colágeno fibrilar de alta densidad. <sup>(22,9)</sup>

En condiciones patológicas se ha demostrado su participación principalmente durante el proceso de invasión en distintos tipos de cáncer como glioblastoma, fibrosarcoma, carcinoma renal, glioma, cáncer astrocítico, melanoma <sup>(54, 55)</sup> , cerebro, vejiga, gástrico y de colon <sup>(56, 57)</sup>; se ha asociado también como uno de los factores claves para la invasión de meningiomas a tejido cerebral y neuronal <sup>(58)</sup>; en artritis reumatoide también se ha observado su participación mediada por la sobreexpresión de MT3-MMP de macrófagos infiltrados a la membrana sinovial <sup>(59)</sup>, por otro lado, se ha demostrado su intervención en la evolución de los pacientes con aterosclerosis al promover la desestabilización de la placa aterosclerótica mediante la degradación de la capa fibrosa o erosión endotelial favoreciendo así, trombosis y formación de aneurismas. Experimentalmente se ha observado que MT3-MMP se encuentra expresada por macrófagos y células vasculares de musculo liso presentes en la placa aterosclerótica. Además, hay un aumento progresivo tiempo y dosis dependiente en la expresión de MT3-MMP en cultivos de macrófagos en presencia de moléculas proinflamatorias como  $TNF\alpha$ , LDLox y factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Además se observó una inducción y redistribución espacial de MT3-MMP y MMP2 de espacio intracelular a membrana plasmática de macrófagos y espacio extracelular respectivamente, lo cual sugiere un mecanismo en el cual moléculas inflamatorias podrían influenciar remodelación de la MEC y promover su degradación mediante la regulación positiva de MT-MMP en leucocitos infiltrados y contribuir así a la desestabilización y ruptura de la placa.

(15, 60, 61) De manera similar, Zamacona D. y cols., mediante el análisis transcriptómico de células vasculares de musculo liso humano observaron la sobreexpresión de MT3-MMP al ser expuestas durante diferentes periodos de tiempo a lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas emulado un ambiente aterosclerótico. Lo cual apoya su contribución en el proceso de desestabilización de la placa aterosclerótica. (62)

Considerando el papel de la MT3-MMP en los proceso patológicos antes mencionados, resulta casi evidente que su inhibición pueda representar una estrategia terapéutica potencial encaminada al desarrollo de agentes inhibidores con una alta selectividad, los cuales requieren para su diseño la identificación de las características y conformación estructural especifica de cada MMP y de los denominados "*subsitios*" de alta especificidad en el reconocimiento de sustratos e inhibidores dentro del dominio catalítico para obtener la eficacia y selectividad deseada debido a la homología compartida entre las MMP.

## **HIPOTESIS**

La obtención del dcMT3-MMP, purificación y posterior caracterización fisicoquímica brinda la posibilidad del desarrollo futuro de una molécula específica capaz de inhibir su actividad como posible estrategia terapéutica en los procesos patológicos en los cuales se encuentra involucrada.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Caracterizar a nivel estructural del dominio catalítico de la Metaloproteasa de matriz 16 (MT3-MMP).

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Sobreexpresión en un sistema heterólogo del dominio catalítico de la Metaloproteasa de Matriz 16 (dcMT3-MMP)
- Establecimiento un protocolo de purificación del cdMT3-MMP
- Caracterización fisicoquímica del cdMT3-MMP.

## MATERIALES Y METODOS

### ➤ Diseño y construcción del plásmido *pET27b(+)*dcMT3-MMP

El plásmido que contiene el gen de la región catalítica de la Metaloproteasa 16 fue diseñado y sintetizado por la empresa GenScript.

#### Descripción del plásmido

cADN que codifica para el dominio catalítico de MT3-MMP (residuos de aminoácidos del 124 al 295) Ligado al vector pET-27b(+)

Longitud de la construcción: 576 pb.

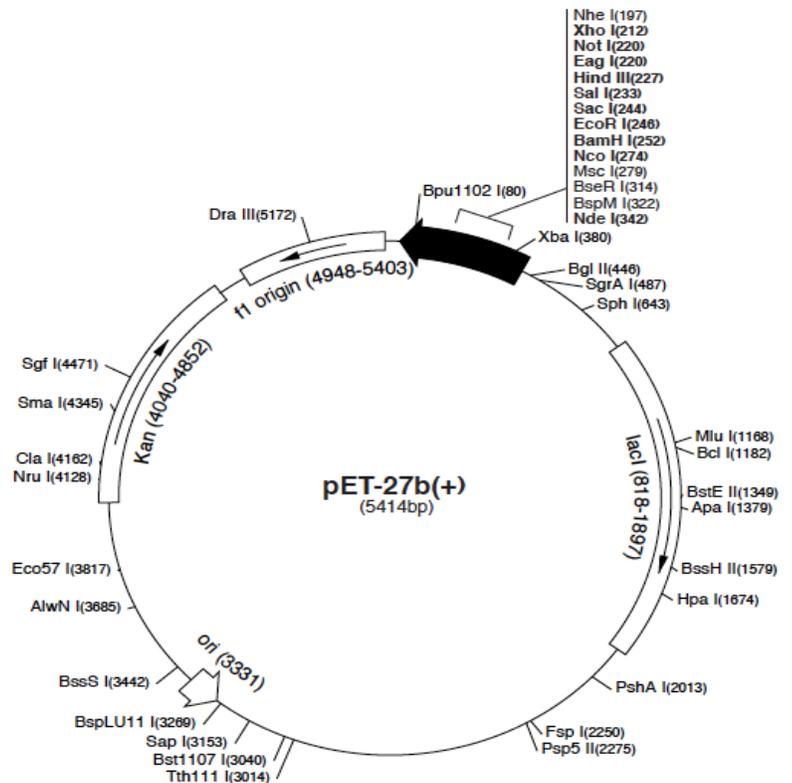
Peso molecular: ~21 KDa

Estrategia de clonación: NdeI y XhoI.

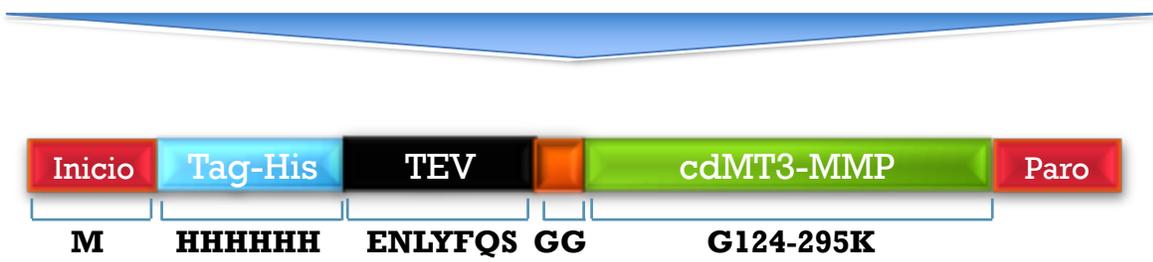
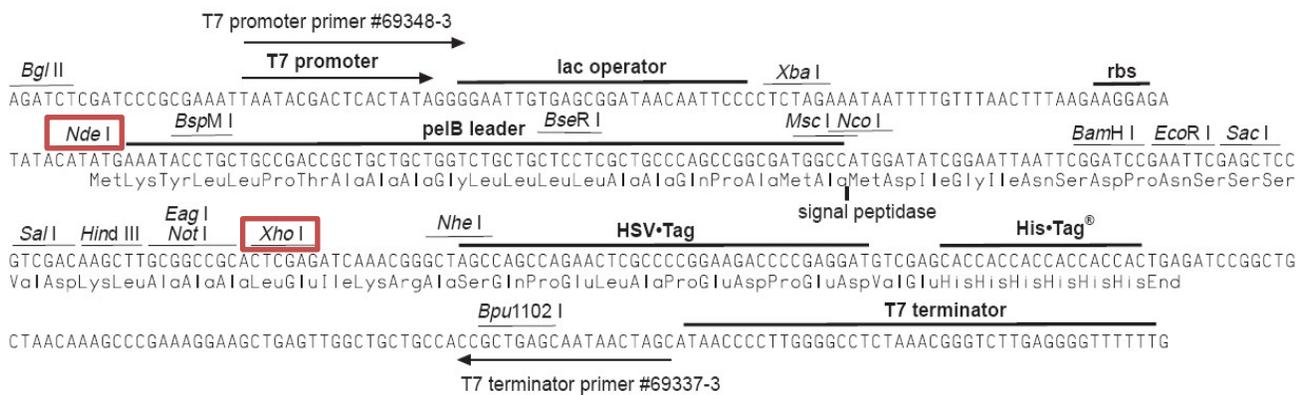
Resistencia: Kanamicina

#### pET-27b(+) sequence landmarks

T7 promoter	415-431
T7 transcription start	414
<i>pelB</i> coding sequence	278-343
Multiple cloning sites ( <i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	212-279
HSV• Tag coding sequence	164-199
His• Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	818-1897
pBR322 origin	3331
Kan coding sequence	4040-4852
<i>f1</i> origin	4948-5403



**Figura 7.** Representación e información general del vector de expresión pET-27b (+)



**Figura 8.** Esquema de la construcción insertada dentro de los sitios de restricción señalados.

➤ **Preparación de células competentes y transformación de la cepa *E. coli* BL21(DE3)**

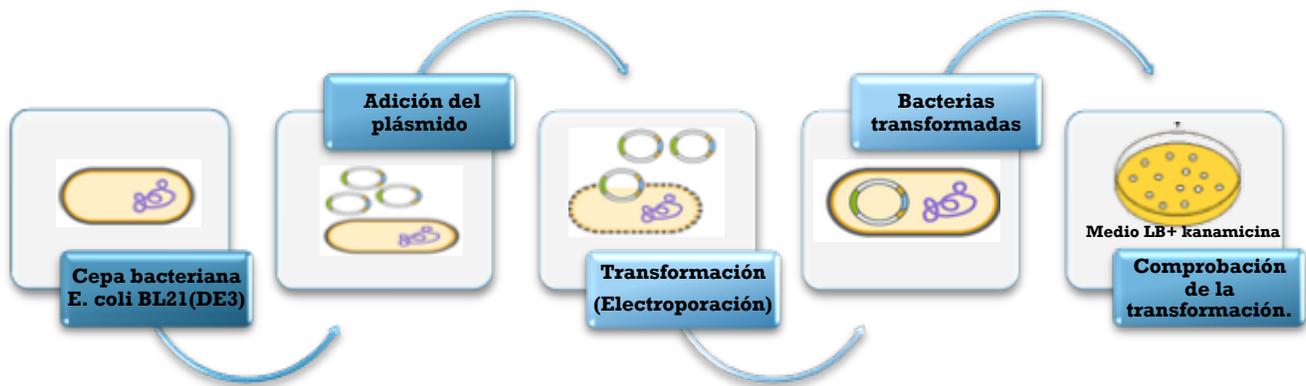
Se realizó la transformación bacteriana de la cepa *E. Coli* BL21 (DE3) la cual fue proporcionada por el Instituto Nacional de Medicina Genómica, con el plásmido *pET27b(+)*cdMT3-MMP mediante electroporación.

A partir de una vial de células BL21 (DE3) se realizó un pre-inoculo en medio líquido 2xYT (Triptona, extracto de levadura, NaCl) e incubadas en agitación a 37°C durante aproximadamente 8h. A partir de este pre-inoculo se transfieren 50 ul de bacterias a 50 mL de medio 2xYT y se incubaron en agitación a 37°C hasta llegar a una densidad óptica entre 0.3 y 0.4. Se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min. en refrigeración y se retiró el sobrenadante. Se realizaron 3 lavados consecutivos con agua Milli Q y posterior al último lavado, se resuspendió el botón de bacterias en 5 mL de agua Milli Q.

Se transfirió un volumen de 500 ul se colocaron en una cubeta de electroporación de 1 mm (Electroporation cuvettes plus™) y se adicionó el plásmido *pET27b(+)*cdMT3-MMP a una concentración de 50 ng. La cubeta fue colocada en el

electroporador (ECM 399 Electroporation System, BTX Harvard apparatus) y se realizó un pulso de 1800 v. Posteriormente, las bacterias de la cubeta fueron resuspendidas en medio líquido 2xYT con Kanamicina [25 µg/ml] durante 3 hrs a 37°C en agitación moderada para su recuperación.

Posterior al tiempo de recuperación, se realizó plaqueo de la suspensión bacteriana en medio agar LB (*Sigma-Aldrich*) + Kanamicina [25 µg/ml] para la comprobación del proceso de transformación. Se incubó la placa durante toda la noche a 37°C.



**Figura 9.** Proceso general de transformación bacteriana mediante electroporación.

### ➤ Propagación e inducción.

#### ***Pre-inoculo***

Después de las 24 h de incubación, se tomó una de las colonias formadas con un asa estéril para su propagación, se inoculó en 50 mL de medio líquido 2xYT (*Sigma-Aldrich*) / kanamicina (25 µg/mL) previamente esterilizado. Se incubó a 37°C/ 8-10 h en agitación constante.

## ***Propagación***

A partir del pre-inoculo y pasado el tiempo de incubación, se transfirieron 500 µl del pre-inóculo a 500 mL de medio liquido 2xYT / kanamicina (25 µg/mL) previamente esterilizado.

## ***Extracción de ADN plasmidico***

Como medio de verificación de la secuencia clonada y de que la colona seleccionada contaba con la información genética apropiada para la expresión de la proteína, se realizó la extracción y purificación del material genético del plásmido (*QIAprep® Spin Miniprep kit*) para su posterior secuenciación por electroforesis capilar en la *Unidad de Secuenciación del Inmegen (AB 3730xl DNA analyzer)* .

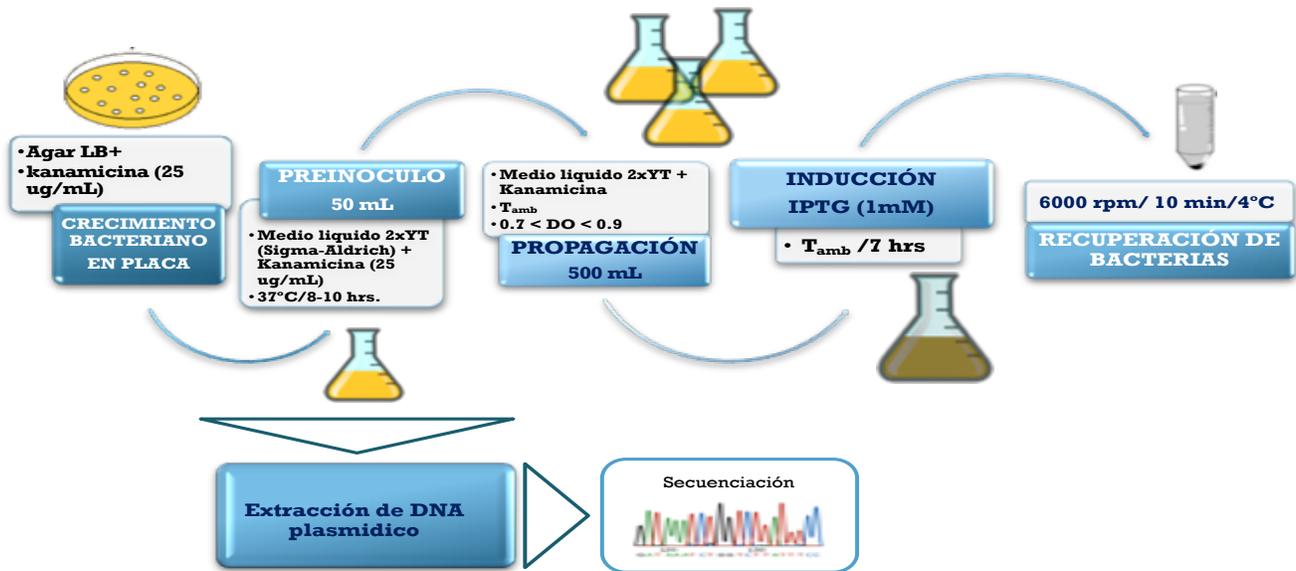
## ***Inducción de expresión del cdMT3-MMP***

Se incubó a temperatura ambiente en agitación constante hasta que el medio alcanzó una densidad óptica  $0.7 < DO < 0.9$  (Ultrospec2100 *pro*, UV/Visible Spectrophotometer) y se adicionaron\* 500 µl de IPTG 1M (*concentración final 1mM*) y se incubó alrededor de 7 h en agitación constante a temperatura ambiente.

\* *Antes de agregar el IPTG, se tomó tomar una alícuota de 50 mL que se utilizó como control negativo de inducción.*

## ***Recuperación de células bacterianas.***

Una vez pasado el tiempo de inducción, se colocó el medio en frascos de centrifuga y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el botón se almacenó a -70°C hasta su uso.



**Figura 10.** Diagrama general del proceso de propagación de *E. coli* BL21 e inducción de la expresión con IPTG.

## ➤ Purificación

### ***Lisis bacteriana por sonicación.***

Al botón celular obtenido, se le adicionaron de 5 a 8 mL (por cada litro de medio) de *Buffer A* (Tris HCl 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, pH= 7.5)/ Coctel inhibidor de proteasas (Calbiochem® Protease Inhibitor Cockatail Set I, Animal-Free) 1:100, se sonicó la muestra a una amplitud de 40, se realizaron pulsos de 30 s y 1 min entre cada pulso (después de los 10 pulsos, se permitió transcurrir 2 minutos entre cada pulso). Todo el proceso de lisis se realizó en hielo. Una vez que la muestra se observó lisada, se centrifugó a una velocidad de 14,000 rpm/30 min (se repitió el paso de centrifugación hasta que el sobrenadante se observara sin restos bacterianos) y se recuperó el sobrenadante.

### ***Separación por afinidad con resina de níquel***

Al sobrenadante obtenido después de la lisis y centrifugación, se le añadieron 600 ul de Resina de Níquel (Qiagen® Ni-NTA agarose) por litro de medió, se incubó

durante 1 h/ 4°C en agitación constante. Una vez pasado el tiempo de incubación, se centrifugó la muestra durante 10 minutos / 6000 rpm/4°C y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con *Buffer A* (Tris HCl 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, pH= 7.5), y después del último lavado, se agregaron 5 mL de *Buffer B* (Tris HCl 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM, pH= 7.5). Se centrifugó a 6000 rpm/10 minutos/4°C y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante se almacenó a 4°C hasta su uso.

### ***Cromatografía en fase reversa (Sistema C<sub>18</sub>-HPLC).***

Equipo: Waters-Alliance

Modulo de separación : waters 2695

Detector de matriz de fotodiodos, waters 2996

Columna Xterra RP18. 5um, 4.6 x 250 mm

Diámetro interno (id) : 4.6 mm

Longitud 250: mm

Tamaño de partícula :5 um

Tamaño de poro : 125Å

Rango de pH: 2-12

Después del acondicionamiento del equipo, se realizaron inyecciones consecutivas de 100 µl cada una, de la muestra obtenida mediante afinidad con resina de níquel con el siguiente programa:

<b>Tiempo</b>	<b>Flujo</b>	<b>%A (H<sub>2</sub>O, 0.1% TFA)</b>	<b>%B (ACN, 0.1% TFA)</b>
<b>0</b>	0.50	100	0.0
<b>2.00</b>	0.50	100	0.0
<b>10.00</b>	0.30	55	45.0
<b>70.00</b>	0.30	20	80.0
<b>75</b>	1.0	0	100
<b>80</b>	1.0	100	0

**Tabla 5.** Programa del gradiente de purificación mediante cromatografía en fase reversa C<sub>18</sub>-HPLC.

Las fracciones fueron colectados en tubos de 1.5 mL, se eliminó completamente el agua, TFA y ACN por evaporación (*Eppendorf Concentrator 5301*), y las fracciones fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

Cada paso de purificación fue comprobado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 15% (*Mini-PROTEAN® Electrophoresis System*).

## **IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL dcMT3-MMP**

### ***Identificación de la proteína recombinante mediante espectrometría de masas***

Con el objetivo de identificar los péptidos observados en la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de una fracción obtenida de cromatografía en fase reversa que corresponde al cdMT3-MMP se realizó el análisis por espectrometría de masas para la obtención de mapas de masa del péptido y posterior búsqueda en una base de datos mediante el protocolo establecidos por la Unidad de Proteómica Medica del INMEGEN.

Se cortaron manualmente algunas de las bandas de mayor intensidad del SDS-PAGE (**figura 18A**), las cuales fueron procesadas de la siguiente manera:

Las bandas fueron reducidas con DTT 10 mM, alquiladas con Iodoacetamida 100 mM y desteñidas con ACN: NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM (50:50 v/v); la digestión proteica se llevó a cabo durante 18 horas a 37°C con tripsina grado masas (Promega V528A). Se extrajeron los péptidos obtenidos de la digestión (ACN:H<sub>2</sub>O: ácido fórmico 50:45:5 v/v), se concentró la muestra y se desaló utilizando una punta ZipTip C18 para cada muestra. La muestra se colocó en la placa utilizando como matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (*Sigma-Aldrich*®) y se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight*) 4800 (*AB Sciex*).

Con los espectros MS/MS obtenidos se realizó una búsqueda con el algoritmo Paragon del software ProteinPilot, con un porcentaje de confianza del 66%.

## ***Identificación de la proteína recombinante mediante Western Blot***

Posterior al análisis de la muestra purificada mediante espectrometría de masas, se procedió a la comprobación de la identidad de las proteínas observadas en el SDS-PAGE mediante western blot.

Se preparó una muestra de enzima de las fracciones obtenidas por FR-HPLC a una concentración de 0.5 mg/mL en *Buffer C* (Tris HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH=7.5). Se realizó una SDS-PAGE y una posterior transferencia durante 2 h/100 V. en membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) previamente activada con metanol y lavada con buffer de transferencia (Tris-Glicina c/10% MeOH). Posterior a la transferencias se realizó el bloqueo con una solución de albumina/leche (3 y 4% respectivamente) durante 1 hora. Después del tiempo de bloqueo, se realizaron 3 lavados consecutivos de 8 minutos cada uno con solución TBST 1X (TBS-Tween). Después del ultimo lavado, se adicionó el anticuerpo primario  $\alpha$ -MMP16 (GeneTex, Rabbit polyclonal) 1:10 000 en solución TBST/leche 1%, durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Pasado el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados consecutivos de 8 minutos cada uno con solución TBST 1X. Posterior al ultimo lavado, se agregó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano ( $\alpha$ -Rabbit IgG (H+L) Jackson immunoResearch) 1:20,000 en solución TBST/leche 1%, durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Después del tiempo de incubación se realizaron 3 lavados consecutivos de 8 minutos cada uno con solución TBST 1X. Se reveló la membrana mediante una reacción quimioluminiscente por la oxidación catalizada por la peroxidasa de rábano en presencia de peróxido de hidrogeno (*Immobilon<sup>TM</sup> Western, Millipore*) y un tiempo de exposición de 30 s – 1 min (*UVITEC HD6*).

## ***Electroforesis nativa simple (CN-PAGE)***

Con el objetivo de evidenciar posibles interacciones y/o formación de multímeros de la proteína recombinante en solución obtenida después del proceso de purificación, se preparó una muestra de enzima purificada a una concentración de 0.5 mg/mL en

buffer C (Tris HCl 25 mM/NaCl 50 mM pH=7.5) y se realizó una electroforesis nativa simple (*Mini-PROTEAN® Electrophoresis System*) y tinción con azul de Coomassie.

### **Dicroísmo circular**

Una vez asegurada la identidad de la proteína obtenida después del proceso de purificación, se procedió al análisis estructural a nivel secundaria mediante dicroísmo circular. La muestra fue enviada al *Laboratorio de especialidades inmunológicas S.A. de C.V.* y siguiendo su protocolo se analizó una muestra de enzima llevada a una concentración de 0.5 mg/mL en buffer C (Tris HCl 25 mM/NaCl 50 mM pH=7.5). El espectropolarímetro empleado se ajustó a una longitud de onda en el UV lejano de 190 a 240 nm a 25°C. Se realizó el análisis de datos por *DichroWeb*.

### **Actividad autoproteolítica del cdMT3-MMP en presencia de sus cofactores**

Con el propósito de comprobar la capacidad de autoproteólisis en presencia de sus cofactores y como indicio indirecto de su actividad enzimática se preparó una muestra de enzima a una concentración de 0.5 mg/mL en buffer C (Tris HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH=7.5) y fue dividida en dos fracciones, a la fracción 2 se agregó el volumen necesario a partir de un stock de ZnSO<sub>4</sub> 1mM / CaCl<sub>2</sub> 625mM para cumplir con las siguientes condiciones:

<b>Fracción/ Condición</b>	<b>Concentración</b>	<b>Buffer C</b>	<b>ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM</b>	<b>Batimastat 50 uM</b>
<b>1</b>	0.5 mg/mL	X	-	-
<b>2</b>	0.5 mg/mL	X	X	-

**Tabla 6.** Condiciones utilizadas para la comprobación de la capacidad autoproteolítica del dcMT3-MMP.

Para determinar el tiempo en el que el cdMT3-MMP comienza a mostrar dicha actividad se monitoreo dicha acción durante 24 h posteriores a la adición de sus cofactores.

Se preparó una muestra de enzima a una concentración de 0.1 mg/mL en *Buffer C* (Tris HCl 25 mM/NaCl 50mM pH=7.5) + ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM. y se incubó a 4°C sin agitación durante diferentes tiempos (tiempo "cero", 30 min, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 hrs.)

Posterior a los tiempos de incubación se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con Azul de Coomassie.

***Inhibición con Batimastat de la actividad autoproteolítica del cdMT3-MMP en presencia de sus cofactores.***

Para determinar la capacidad de inhibición y concentración del Batimastat de la actividad autoproteolítica de la cdMT3-MMP, una muestra de enzima fue llevada a una concentración de 0.1 mg/mL en buffer Tris HCl 25 mM/NaCl 50mM/ ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, pH=7.5 fue dividida en fracciones y puesta en presencia de concentraciones crecientes (10, 30, 50, 80, 100, 150 y 200 uM) de Batimastat (*Sigma-Aldrich*) resuspendido en DMSO absoluto [3mM].

La condición de cada muestra se resumen en la siguiente tabla:

<b>Muestra</b>	<b>Buffer Tris HCl25mM/NaCl 50 mM pH=7.5</b>	<b>ZnSO<sub>4</sub> 4<math>\mu</math>M / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM</b>	<b>Batimastat</b>	<b>DMSO</b>
1	X	X	10 uM	X
2	X	X	30 uM	X
3	X	X	50 uM	X
4	X	X	80 uM	X
5	X	X	100 uM	X
6	X	X	150 uM	X

7	X	X	200 uM	X
<b>Control 1</b>	X	-	-	-
<b>Control 2</b>	X	X	-	X
<b>Control 3</b>	X	X	-	X

**Tabla 7.** Condiciones de cada muestra para el ensayo de inhibición de actividad de la MT3-MMP en presencia de Batimastat.

Después de 24 horas de incubación a 4°C sin agitación, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio y tinción con Azul de Coomassie.

### **Fluorescencia intrínseca**

Con la finalidad de obtener información acerca de los posibles cambios conformacionales que pudiera sufrir la proteína con modificaciones ambientales como variaciones en el solvente y temperatura se realizaron ensayos de fluorescencia intrínseca.

Se preparó una muestra de enzima de las fracciones obtenidas por FR-HPLC a una concentración de 0.5 mg/mL en *Buffer C* (Tris HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH=7.5), se separó en 3 fracciones y a cada fracción se agregó el volumen necesario a partir de un stock de ZnSO<sub>4</sub> 1mM / CaCl<sub>2</sub> 625mM y un stock de *Batimastat* (3mM) para cumplir con las siguientes condiciones:

<b>Fracción/ Condición</b>	<b>Concentración</b>	<b>Buffer C</b>	<b>ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM</b>	<b>Batimastat 50 uM</b>
<b>1</b>	0.5 mg/mL	X	-	-
<b>2</b>	0.5 mg/mL	X	X	-
<b>3</b>	0.5 mg/mL	X	X	X

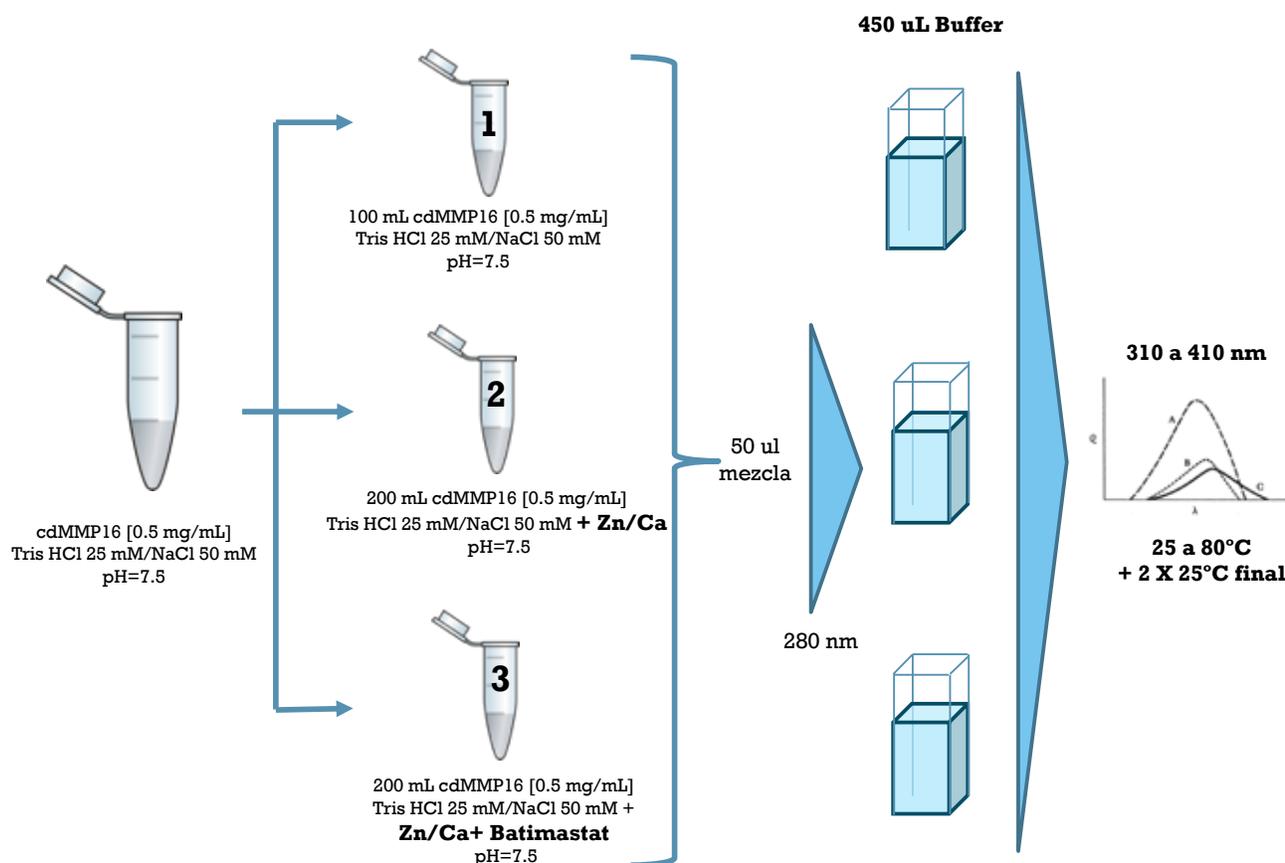
**Tabla 8.** Condiciones experimentales de cada muestra analizada para el ensayo de fluorescencia intrínseca.

Para cada condición se preparó una muestra blanco, la cual fue leída en el fluorímetro (*Fluorolog Horiba Jobin Yvon*) a 25°C/  $\lambda_{ex}$  =280 nm / $\lambda_{em}$ =310-410 nm previo al análisis de cada condición.

De cada una de estas condiciones, se tomaron 50  $\mu$ l y fueron resuspendidos en 450  $\mu$ L de buffer blanco para cada condición en una celda de cuarzo.

Se realizó un monitoreo de la emisión de fluorescencia ( $\lambda_{em}$ =310 a 410 nm) a una  $\lambda_{ex}$ =280 nm en un rango de temperatura de 25 a 80°C (25, 30, 40, 50, 60, 70 y 80°C).

Posteriormente, para evaluar la capacidad de la proteína de regresar a su estado conformacional inicial después de ser expuesta a 80°C, se regresó a la temperatura inicial (25°C) y se realizaron nuevamente dos lecturas de la misma muestra contenida en la celda.



**Figura 11.** Esquema general del ensayo de fluorescencia intrínseca para las tres condiciones analizadas.

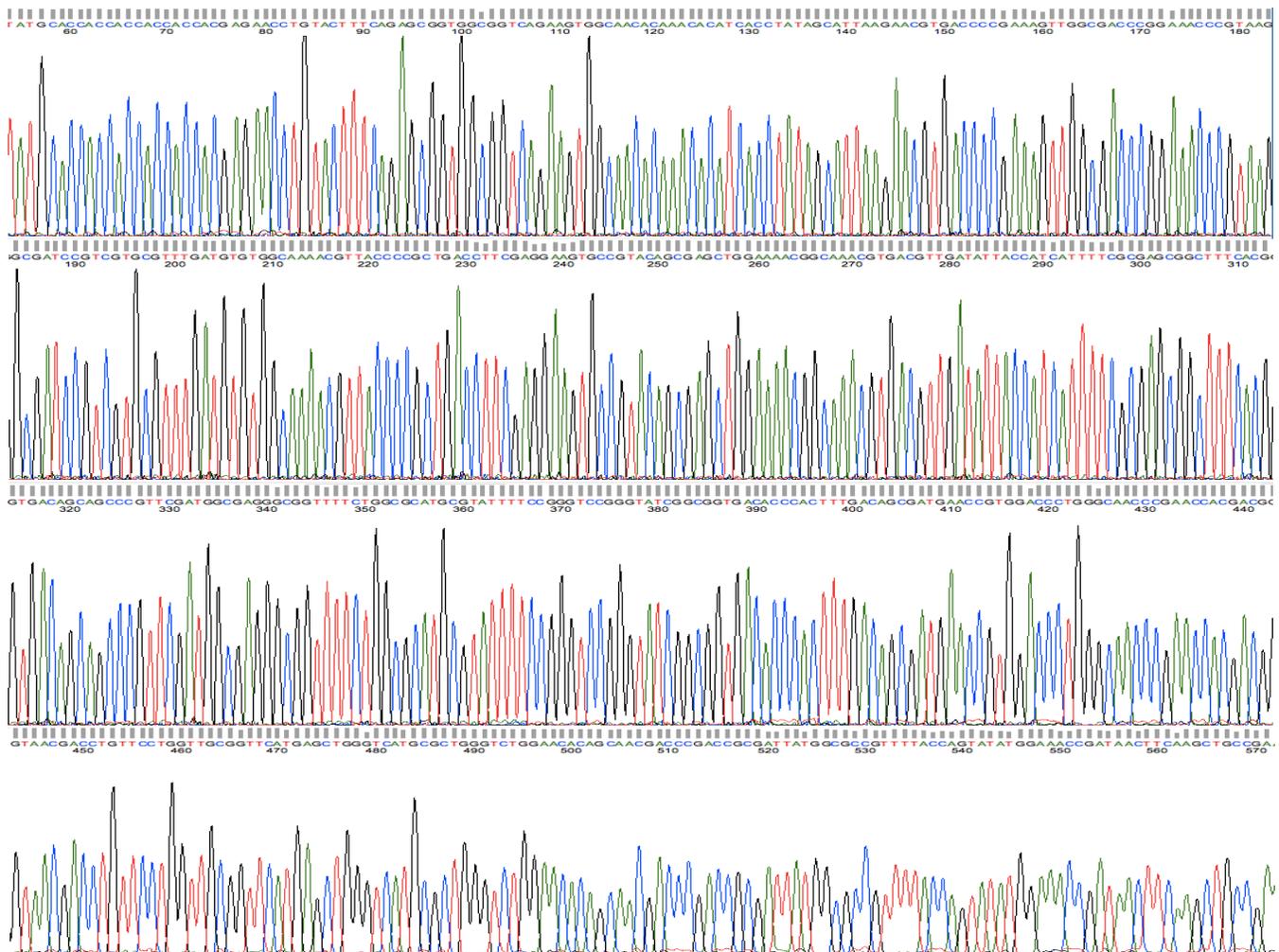
Finalmente, como evidencia adicional del comportamiento de la enzimas bajo estas condiciones se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y tinción con Azul de Coomassie de las muestras 1,2 y 3 del ensayo de fluorescencia 24 h y 6 días posteriores a su preparación. Las muestras fueron almacenadas durante este tiempo a 4°C sin agitación.

**Nota.** La **fracción 2** fue nuevamente analizada mediante **Fluorescencia intrínseca** con el mismo procedimiento antes descrito a los 6 días posteriores a la preparación de la muestra.

## RESULTADOS

### ➤ Diseño de la construcción

Después de la transformación, como proceso de verificación de que la colonia seleccionada era optima para la expresión de la proteína de interés (MT3-MMP), con el material genético plasmidico extraído y purificado se realizó su secuenciación por el método de Sanger y se obtuvo el siguiente Electroferograma:



**Figura 12.** Electroferograma. Secuencia obtenida por el método de Sanger del ADN plasmidico.

Como siguiente paso de verificación, la secuencia obtenida fue “*traducida*” mediante una herramienta informática (*Expasy Bioinformatics Resource Portal*), la cual muestra la secuencia de aminoácidos (en color rojo) en código de una letra y en la cual se observa la metionina (**Met**) como inicio de la secuencia de la MT3-MMP y una señal de *paro* o “**stop**” al final de la misma.



**Figura 13.** Producto de la “*traducción*” de la secuencia del ADN plasmídico.

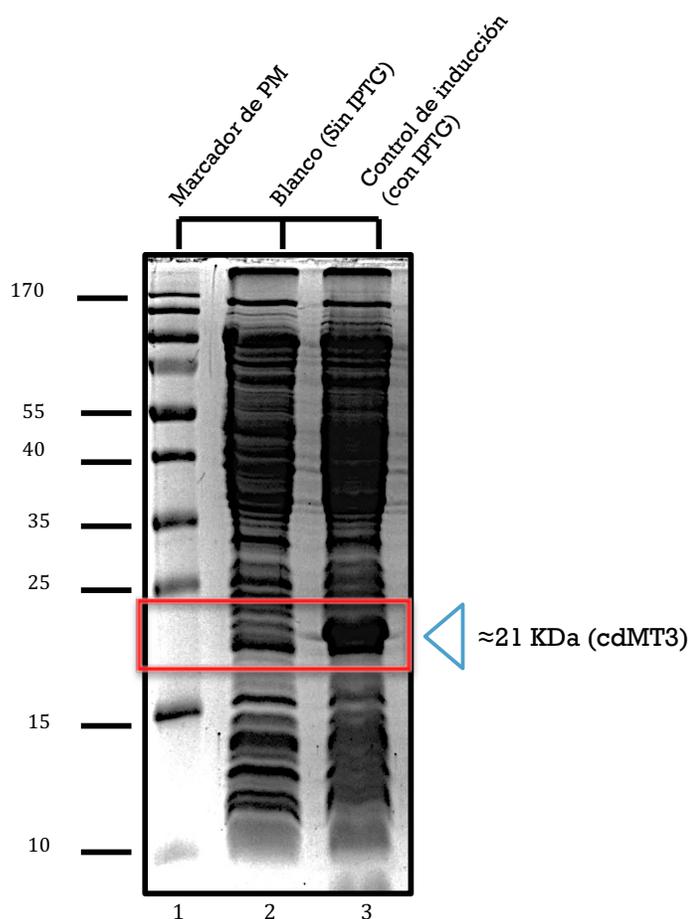
Posteriormente se realizó un alineamiento (*BLASTp*) de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura anterior (**Fig. 13**) y se realizó una búsqueda de coincidencias en una base de datos que arrojaron la siguiente información en cuanto a la identidad de la proteína expresada:

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
358 bits(920)	2e-121()	Compositional matrix adjust.	172/172(100%)	172/172(100%)	0/172(0%)	
Query 17	GQKWQHKHITYSIKNVTPKVGDPETRKAIRRAFVWQNVTPLTFFEEVPYSELENGKR			76		
Sbjct 124	GQKWQHKHITYSIKNVTPKVGDPETRKAIRRAFVWQNVTPLTFFEEVPYSELENGKR			183		
Query 77	ITIIIFASGFHGDSSPFDGEGGFLAHAYFPGPGIGGDTHFDSDEPWTLGPNHGDNDLFLV			136		
Sbjct 184	ITIIIFASGFHGDSSPFDGEGGFLAHAYFPGPGIGGDTHFDSDEPWTLGPNHGDNDLFLV			243		
Query 137	AVHELGHALGLEHSNDPTAIMAPFYQYMETDNFKLPNDDLQGIQKIYGPPDK			188		
Sbjct 244	AVHELGHALGLEHSNDPTAIMAPFYQYMETDNFKLPNDDLQGIQKIYGPPDK			295		

**Figura 14.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos para la búsqueda de coincidencias (*BLASTp*). El resultado arrojó una equivalencia del 100 % entre la proteína sobreexpresada (cdMT3-MMP) y el precursor de la Metaloproteasa de matriz humana encontrada en la base de datos.

### ➤ Comprobación de la Inducción.

Posterior a la comprobación de la transformación y crecimiento en medio líquido con Kanamicina, la sobreexpresión del cdMT3-MMP con IPTG se comprobó mediante una SDS-PAGE (15%) y tinción con azul de Coomassie. La banda señalada en un recuadro rojo corresponde al peso molecular teórico esperado. ( $\approx 21$  KDa).

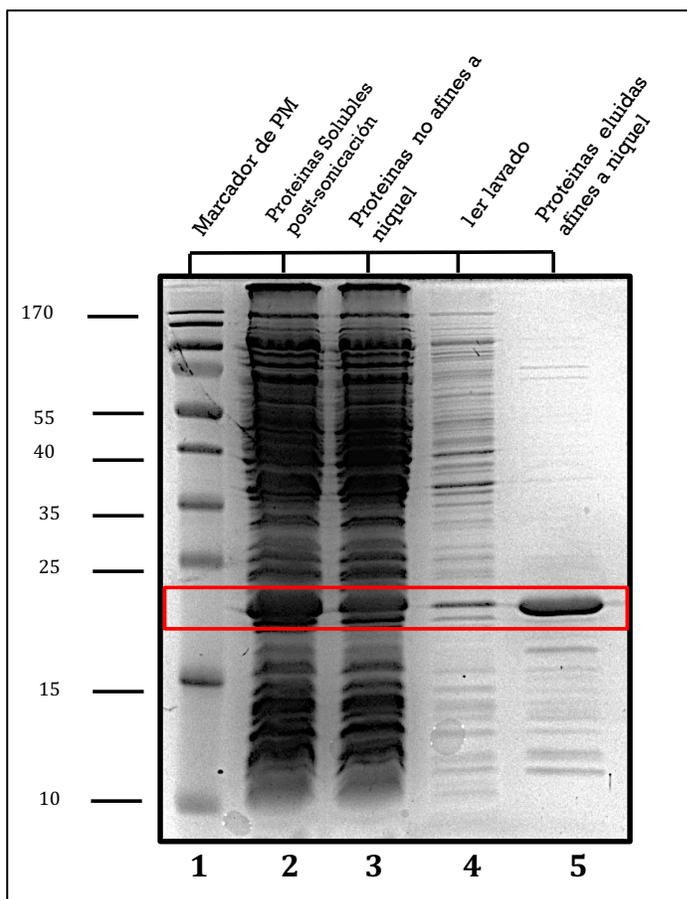


**Figura 15.** SDS-PAGE de la sobreexpresión de cdMT3-MMP. Se utilizaron 50 mL de medio con bacterias *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido ***pET27b(+)*MT3-MMP** (**Densidad Óptica** :  $0.7 < DO < 0.9$ ) con y sin IPTG (concentración final 1mM). Posiciones: 1) Marcador de peso molecular (*PageRuler*<sup>TM</sup>, 10 a 170 kDa), 2) Control negativo de inducción. 3) Control positivo de inducción.

## ➤ PURIFICACIÓN

### **Paso 1. Separación por afinidad con resina de níquel**

Después de la obtención de proteínas solubles totales después del proceso de inducción y sonicación, las proteínas afines a la resina de níquel fueron recuperadas con una concentración superior de Imidazol (*buffer B*). Entre estas proteínas se encuentra, en base al peso molecular teórico esperado ( $\approx 21$  KDa), el cdMT3-MMP.

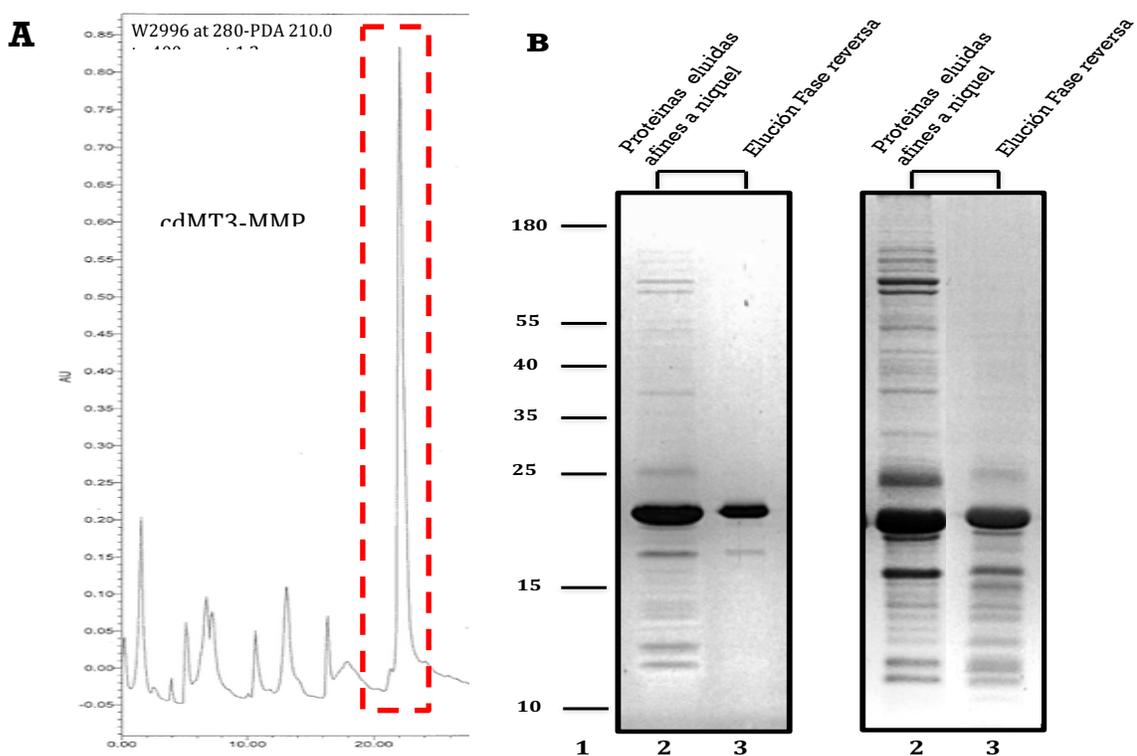


**Figura 16.** SDS-PAGE del paso 1 de purificación. Separación de cdMT3-MMP por afinidad con resina de níquel. Se realizó el procedimiento de separación y recuperación de la proteína. Posiciones: 1) Marcador de peso molecular, 2) Sobrenadante de muestra lisada por sonicación, 3) Sobrenadante No adherido a la resina de níquel, 4) 1er lavado, 5) Recuperación de proteína con *Buffer B* (*Tris HCl* 50 mM, *NaCl* 300 mM, *Imidazol* 500 mM, pH= 7.5).

## Paso 2. Separación Cromatografía en fase reversa (sistema C<sub>18</sub>-HPLC)

La separación de la mezcla de proteínas solubles obtenidas por afinidad con resina de níquel se observa en el siguiente cromatograma (Figura 17A) que muestra los diversos componentes de la mezcla en base a sus tiempos de retención en la columna (C18) al aumento gradual de concentraciones de acetonitrilo según el programa utilizado (Tabla 5).

Cada pico fue colectado de manera independiente denominadas fracciones y para las cuales se realizó una SDS-PAGE (*imagen no mostrada*) y se determinó que el tiempo de retención en el método utilizado fue de 22 min. para el dcMT3-MMP.



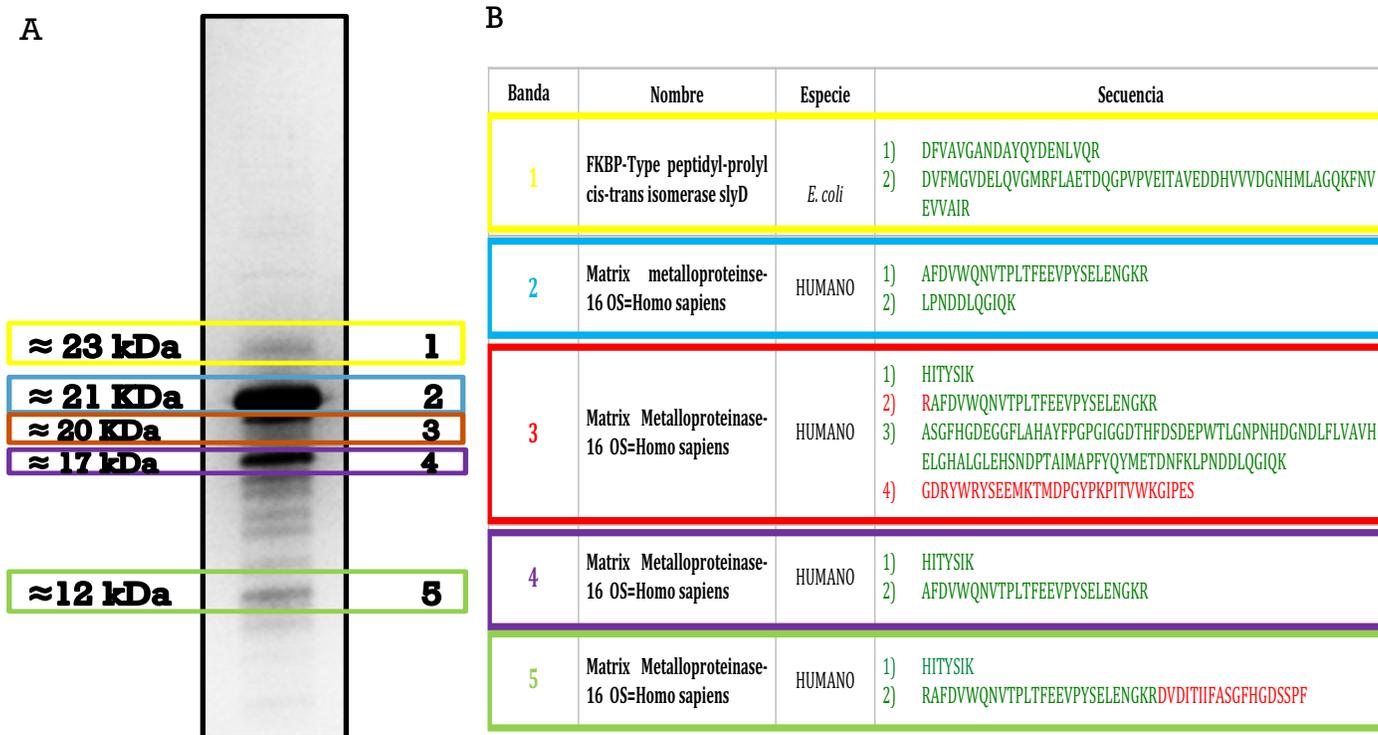
**Figura 17.** Cromatograma y SDS-PAGE del paso 2 de purificación del dcMT3-MMP. El pico que corresponde al dcMT3-MMP tiene un tiempo de retención de 22 minutos del método utilizado (53%agua/47%ACN). A) Cromatograma representativo de la separación mediante HPLC-Fase Reversa B) SDS-PAGE. En ambos geles se colocó la muestra descrita en la misma posición, sin embargo en el segundo gel se agregó mayor cantidad de la misma. Posiciones **Gel 1.** 1) Marcador de peso molecular, 2) Separación mediante resina de níquel (7  $\mu$ g.). 3) Cromatografía en fase reversa (3  $\mu$ g). Posiciones **Gel 2.** 2) Separación mediante resina de níquel (14  $\mu$ g). 3) Cromatografía en fase reversa (8  $\mu$ g).

## ➤ CARACTERIZACIÓN DEL dcMT3-MMP

### **Identificación de la proteína recombinante mediante espectrometría de masas**

Informe de resultados proporcionados por la unidad de Proteómica Medica del Instituto Nacional de Medicina Genómica. El análisis realizado para las muestras cumple los criterios asignados por la unidad según el protocolo establecido el cual incluye, proceso de muestras, análisis de las mismas en equipo y en software así como nivel de confianza establecido.

A continuación se muestran los resultados de la identificación de las muestra analizadas, la primer fila de cada banda (de la 1 a la 5) descrita en la tabla hace referencia a los resultados de la identificación de las muestras analizadas con Protein Pilot utilizando una base de datos de la pagina Uniprot (<http://www.uniprot.org>), ambas con un porcentaje de confianza al 66%. Los resultados mediante esta técnica confirman la identidad de la proteína sobreexpresada y purificada.



**Figura 18.** Identificación de péptidos mediante espectrometría de masas. A) SDS-PAGE de una muestra de dcMT3-MMP después del proceso de purificación. Las bandas con mayor intensidad se encuentra señas e identificadas con numero y color. B) Secuencias de péptidos detectados

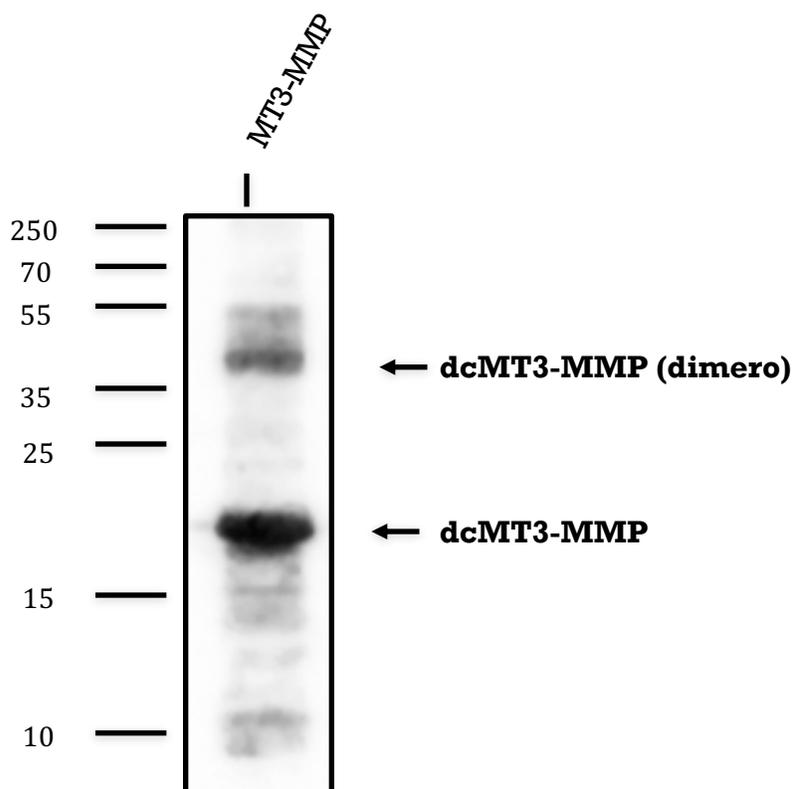
experimentalmente en MALDI TOF/TOF y la especie a la cual se sugiere pertenece dicha secuencia según la base de datos utilizada, el código de colores hace referencia al tipo de coincidencia entre resultados experimentales y base de datos. Verde: Coincidencia exacta; amarillo: cambio en secuencia. Rojo: combinación de cambios.

### ***Descripción del código de colores de las secuencia detectadas experimentalmente:***

- Las secuencias de color **verde** representan el péptido encontrado en la muestra digerida, que tiene una coincidencia **exacta** con la secuencia encontrada en la base de datos utilizada. Cuando se observan tres o más péptidos identificados en verde, se cuenta con un mayor porcentaje de cobertura y en consecuencia mayor certeza en la identificación.
- La parte de la secuencia que se encuentra de color **amarillo** indica que para que la secuencia del péptido determinado en la muestra analizada por masas, coincida con la secuencia de la base de datos, es necesario considerar un cambio en la secuencia, tal como: sustitución de un aminoácido, una desaminación, etc. \* *Resultados no obtenidos*
- La parte de la secuencia que se encuentra de color **rojo** indica que para que la secuencia del péptido determinado en la muestra analizada por masas, coincida con la secuencia de la base de datos, es necesario considerar varios cambios. Ejemplo: Sustitución de aminoácidos, desaminación, oxidación, etc.

## **Identificación de la proteína recombinante mediante Western Blot**

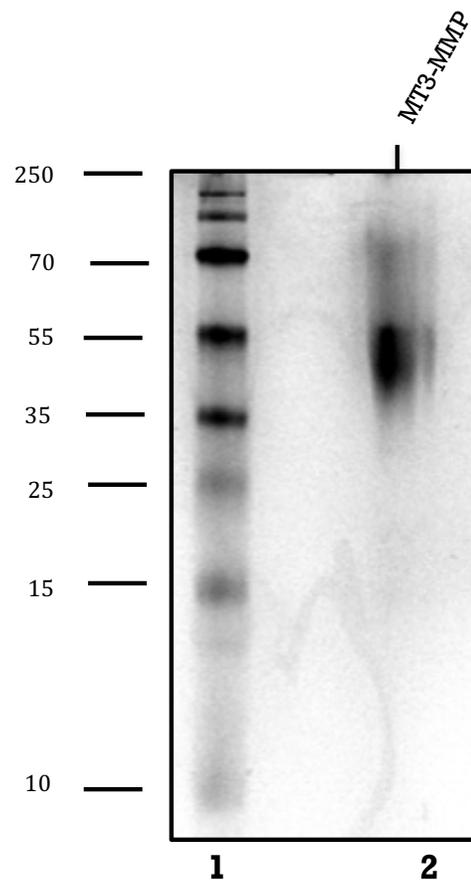
El siguiente paso de identificación y comprobación de la proteína sobreexpresada se obtuvo mediante Western Blot, en el cual la señal producida mediante la reacción quimioluminiscente (luminol + peróxido de hidrógeno) durante el proceso de detección se muestra en la siguiente figura, en la cual se observan dos señales importantes reconocidas por el anticuerpo utilizado ( $\alpha$ -MMP16), la primera en el peso molecular esperado ( $\approx$  21 KDa) y la segunda señal en un peso molecular alrededor de los 40 kDa, resultado que nos sugiere la presencia de una población de la proteína en forma de dímero.



**Figura 19.** Identificación de la proteína recombinante mediante Western Blot. Detección mediante quimioluminiscencia. *MT3-MMP*: dcMT3-MMP en buffer Tris HCl 25mM, NaCl 50 mM.

### ***Electroforesis nativa simple (CN-PAGE)***

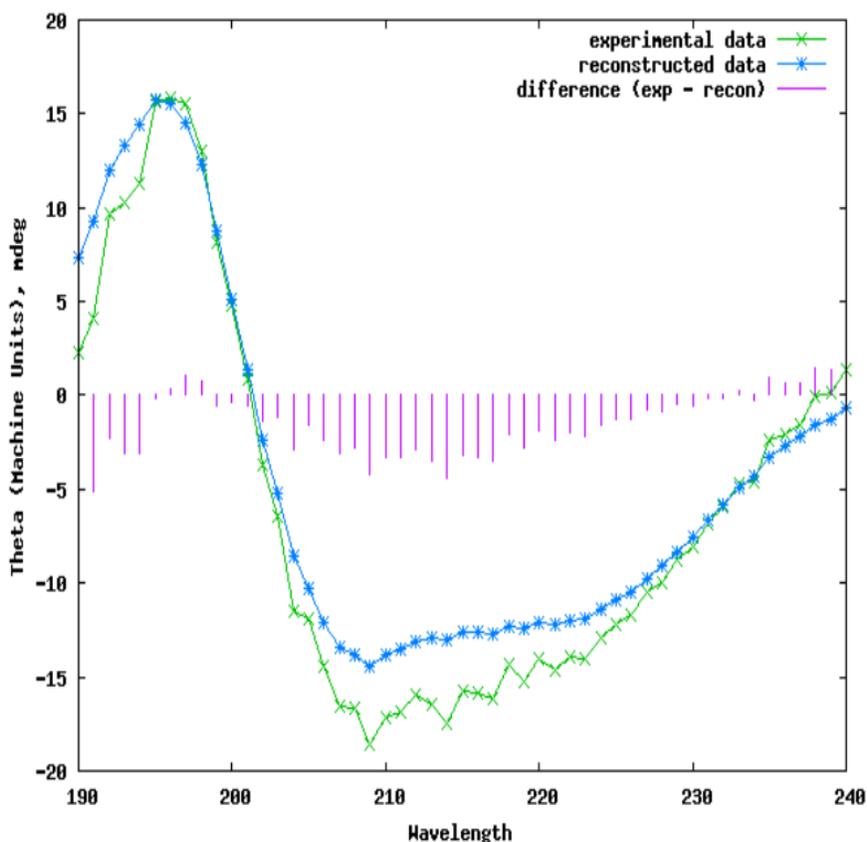
Mediante una electroforesis nativa simple y tinción con azul de Coomassie que se muestra a continuación se logró obtener información adicional sobre posibles interacciones entre cadenas polipeptídicas de la proteína sobreexpresada, en decir, el estado nativo del dcMT3-MMP obtenido. La electroforesis revela una señal intensa alrededor de los 40 kDa que sugiere la formación de dímeros en solución.



**Figura 20.** Electroforesis nativa simple del dcMT3-MMP. Comprobación del estado nativo de la enzima en condiciones no desnaturizantes. Posiciones 1) Marcador de peso molecular 2) dcMT3-MMP en buffer Tris HCl 25mM, NaCl 50 mM, pH= 7.5

## Dicroísmo circular

A través del análisis de la muestra mediante los espectros de absorción obtenidos mediante dicroísmo circular del dcMT3-MMP se logró adquirir información sobre el arreglo espacial a nivel secundario de ésta, los espectros obtenidos juntos con la interpretación de los mismos mediante DichroWeb en cuanto a las estructuras detectadas se muestran a continuación.

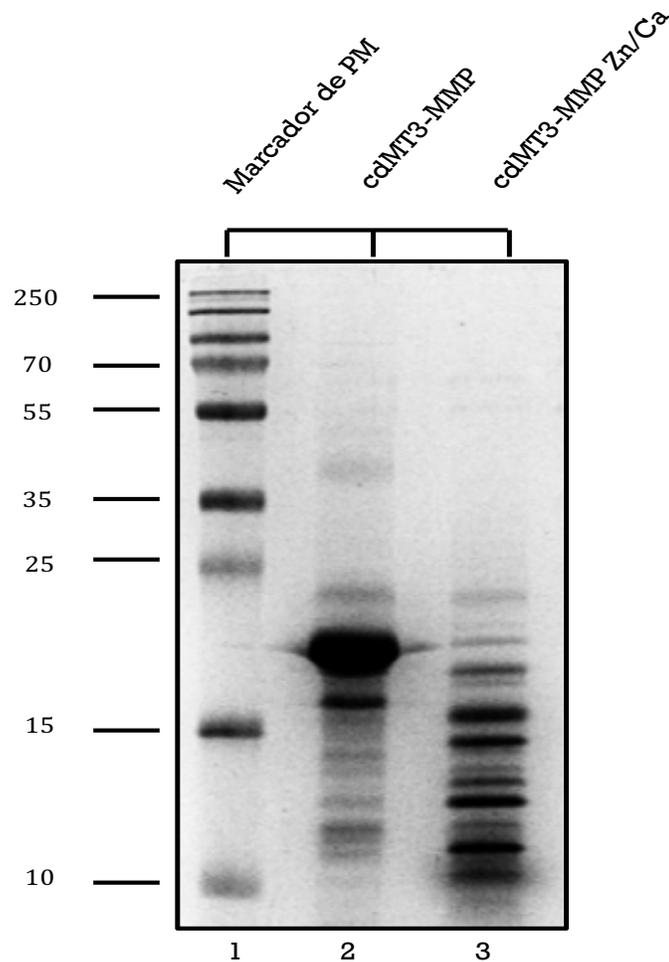


Temperatura (°C)	Helix1	Helix2	Strand1	Strand2	Turns	Unordered	Total
25	0.264	0.247	0.042	0.051	0.191	0.230	1.026

**Figura 21.** Espectro de Dicroísmo circular del dcMT3-MMP a 25°C analizados por DichroWeb. En la tabla se muestra el resultado del análisis del espectro. Referencia para análisis. Sreerama, N. And Woody, R.W. (2000), Analytical Biochemistry, 287, 252-260. Helix 1 (alfa hélice regular), Helix 2 (alfa hélice distorsionada), Strand1 (beta plegada regular), Strand2 (beta plegada distorsionada), Turns (giros) , Unordered (desordenadas).

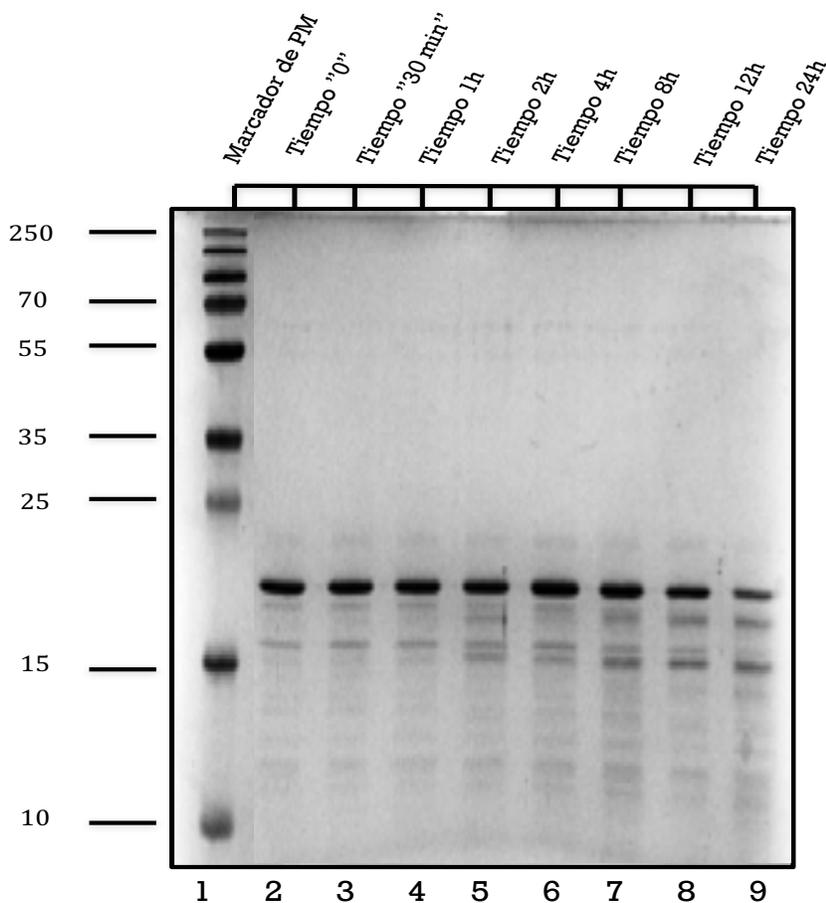
## **Actividad autoproteolítica del dcMT3-MMP en presencia de sus cofactores**

Como medida de la actividad del dcMT3-MMP en presencia de sus cofactores y posible autoproteólisis reportada en estudios previos, mediante una SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie 24 hrs. posteriores a la adición de sus cofactores se demostró dicha actividad autoproteolítica como se muestra a continuación:



**Figura 22.** Actividad autoproteolítica del dcMT3-MMP. SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie, realizado 24 h. posteriores a la preparación de la muestra. Posiciones: 1) Marcador de peso molecular ( *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 a 250 kDa*). 2) dcMT3-MMPP16 en Buffer C (Tris HCl 25 mM/NaCl 50 mM pH=7.5) 3) dcMT3-MMP en Buffer C + ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM pH=7.5.

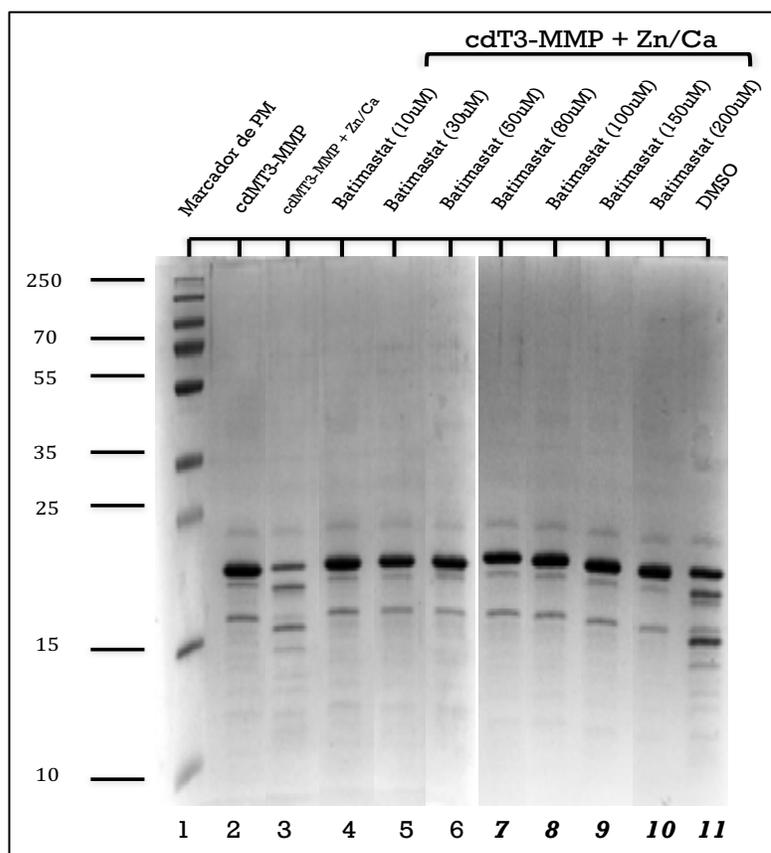
Posteriormente, una vez comprobada la autoproteólisis de la enzima en presencia de sus cofactores, el tiempo de dicho proceso fue monitoreada durante 24 horas y observado mediante una SDS-PAGE 15% y tinción con azul de Coomassie como se muestra en la siguiente figura, cabe señalar que el perfil de bandeado observado en menor intensidad se debe a que para este ensayo se utilizó una cantidad de proteína menor a la utilizada en el ensayo anterior.



**Figura 23.** SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie del monitoreo de la actividad autoproteolítica del MT3-MMP durante 24 hrs. Posiciones: 1) Marcador de peso molecular 2) dcMT3-MMP en presencia de sus cofactores al tiempo "cero", carril 3-9, dcMT3-MMP en presencia de sus cofactores al tiempo "30 min", 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h. respectivamente.

## ***Inhibición con Batimastat de la actividad autoproteolítica del dcMT3-MMP en presencia de sus cofactores.***

La capacidad de inhibición de diferentes concentraciones de Batimastat sobre el dcMT3-MMP se observó de manera indirecta mediante una SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Las muestras fueron incubadas durante 24 hrs/4°C.

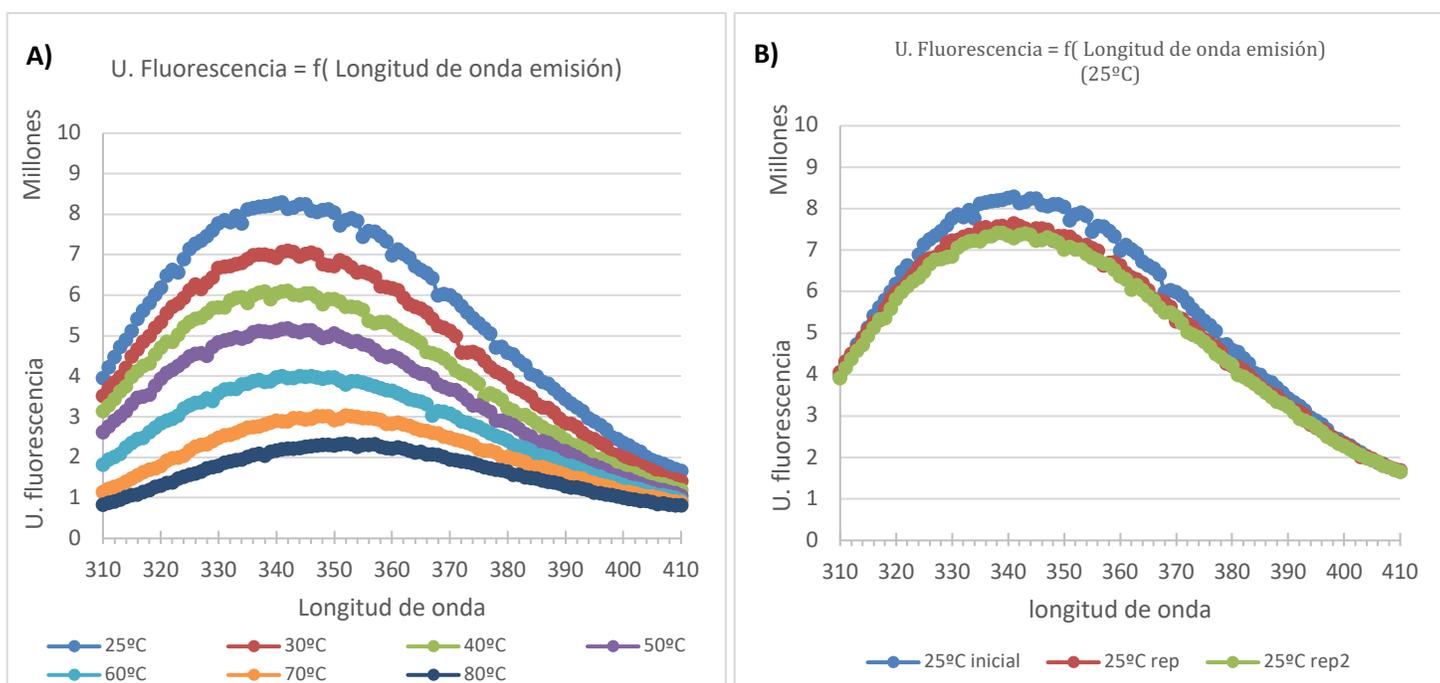


**Figura 24.** SDS-PAGE (15%) y tinción con azul de Coomassie de la capacidad inhibitoria de diferentes concentraciones de Batimastat sobre la actividad autoproteolítica del dcMT3-MMP. Posiciones: 1) Marcador de peso molecular. 2) cdMT3-MMP en *Buffer C* (Tris HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH=7.5) , 3) dcMT3-MMP en *Buffer C* + ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, posición 4 a 10) dcMT3-MMP en *Buffer C* + ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM + Batimastat 10, 30, **50**, 80, 100, 150 y 200 uM respectivamente. 11) dcMT3-MMP en *Buffer C* + ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM + 5uL DMSO absoluto.

## ➤ Fluorescencia intrínseca

Los espectros de emisión (310 a 410nm) obtenidos que nos proporcionan un acercamiento del estado conformacional de la proteína en solución de cada una de las condiciones utilizadas (buffer) y en un intervalo de temperatura que va de 25 a 80°C se muestra a continuación.

### Condición 1. *dcMT3-MMP* en buffer C (*Tris HCl* 25 mM, *NaCl* 50 mM, pH=7.5)

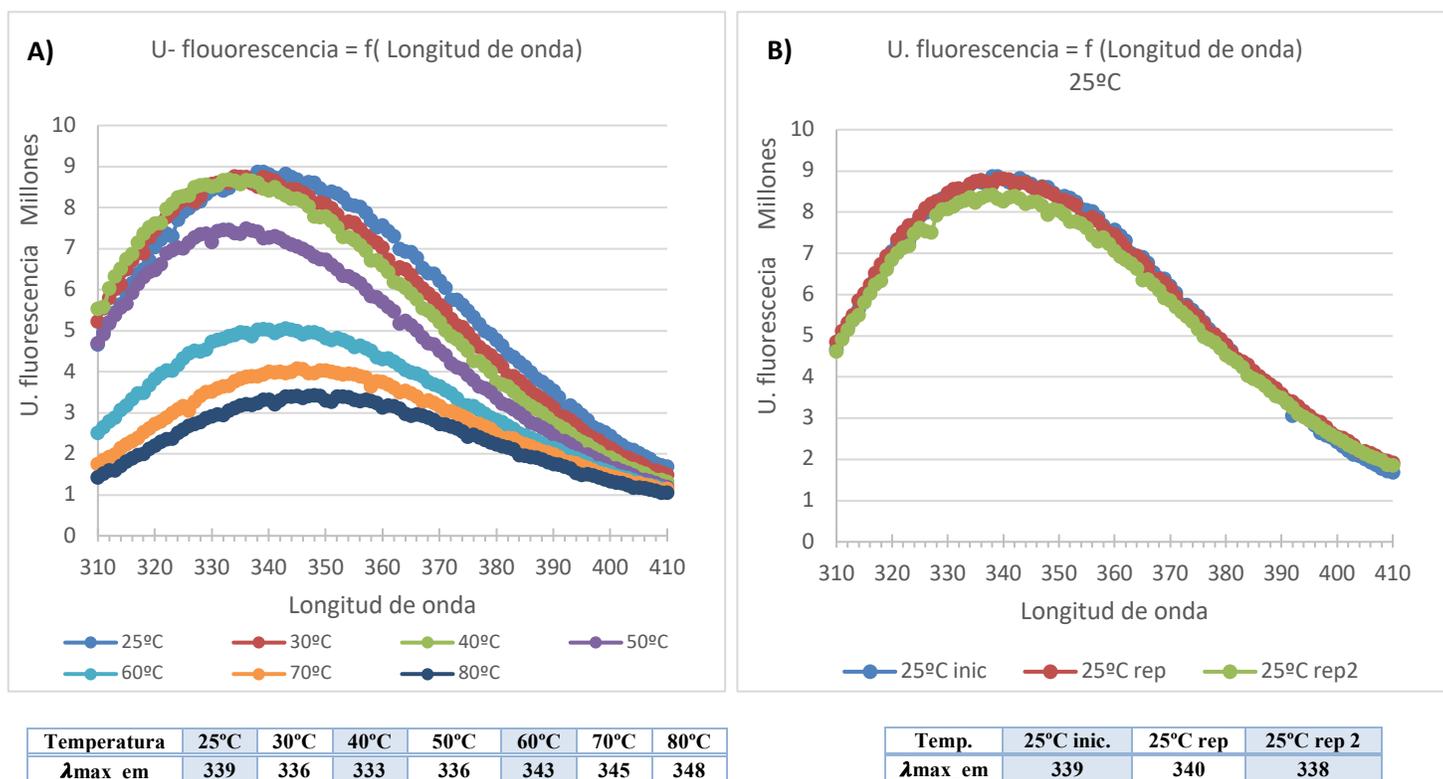


Temperatura	25°C	30°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C
$\lambda_{\max\_em}$	341	342	342	342	344	352	352

Temp.	25°C inic.	25°C rep	25°C rep 2
$\lambda_{\max\_em}$	341	341	339

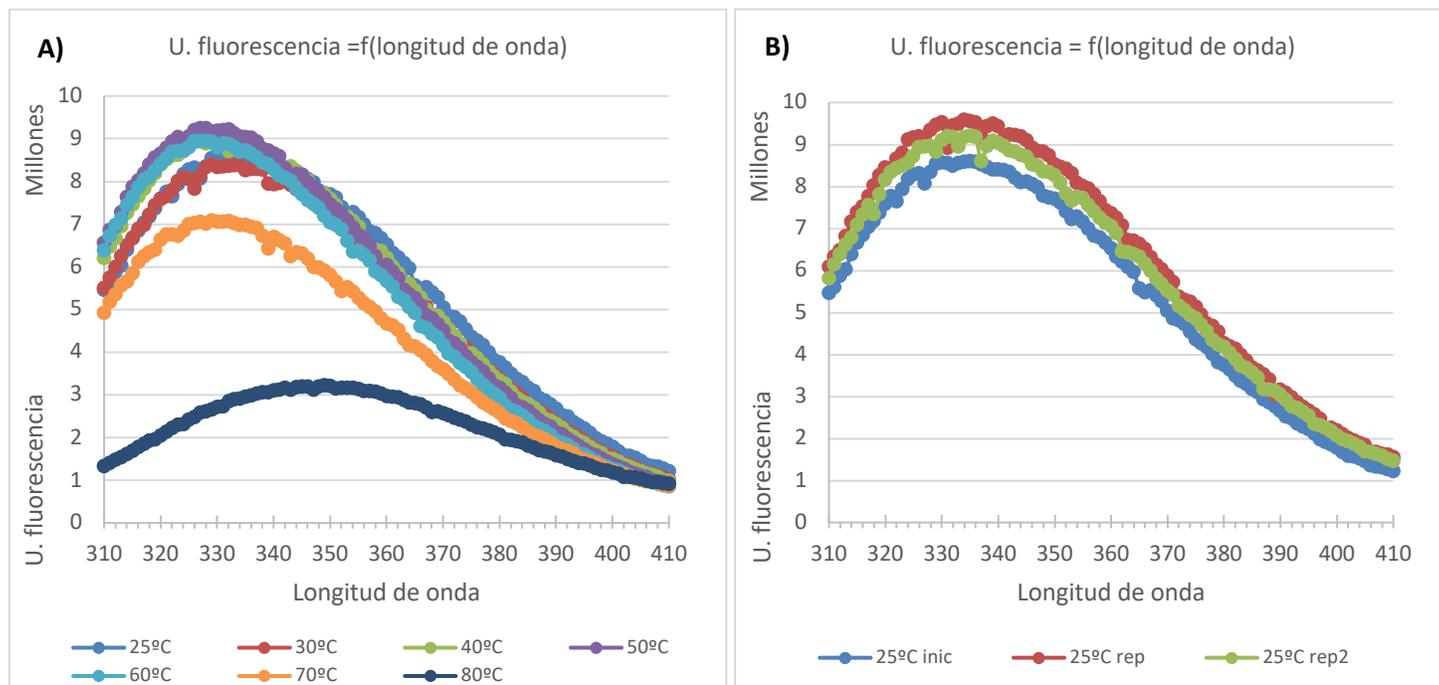
**Figura 25.** Graficas comparativas de los espectros de emisión de 310 a 410 nm de una muestra de enzima a una concentración final de 0.05 mg/mL en *buffer C* (*Tris HCl* 25mM/ *NaCl* 50mM pH=7.5) excitada a una  $\lambda=280$  nm A) Espectros de emisión dependiente de la temperatura (25, 30, 40, 50, 60, 70 y 80°C). B) El espectro denominado *25°C inicial* es el resultado obtenido previo al aumento de la temperatura, *25°C rep* y *25°C rep2* son los espectros consecutivos obtenidos al enfriar la muestra en el equipo desde 80°C hasta 25°C nuevamente. En las tablas se muestran las longitudes máximas de emisión a cada temperatura a la que fue sometida durante el ensayo.

**Condición 2.** *dcMT3-MMP* en buffer C ( Tris HCl 25mM/ NaCl 50mM pH=7.5) + ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM



**Figura 26.** Gráficas comparativas de los espectros de emisión de 310 a 410 nm de una muestra de enzima a una concentración final de 0.05 mg/mL en *buffer C* ( Tris HCl 25mM/ NaCl 50mM pH=7.5) en presencia de sus cofactores (ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM) excitada a una  $\lambda=280$  nm A) Espectros de emisión dependiente de la temperatura (25, 30, 40, 50, 60, 70 y 80°C). B) El espectro denominado *25°C inicial* es el resultado obtenido previo al aumento de la temperatura, *25°C rep* y *25°C rep2* son los espectros consecutivos obtenidos al enfriar la muestra en el equipo desde 80°C hasta 25°C nuevamente. En las tablas se muestran las longitudes máximas de emisión a cada temperatura a la que fue sometida durante el ensayo.

**Condición 3.** *dcMT3-MMP en buffer C ( Tris HCl 25mM/ NaCl 50mM pH=7.5) + ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM + Batimastat (50 uM)*

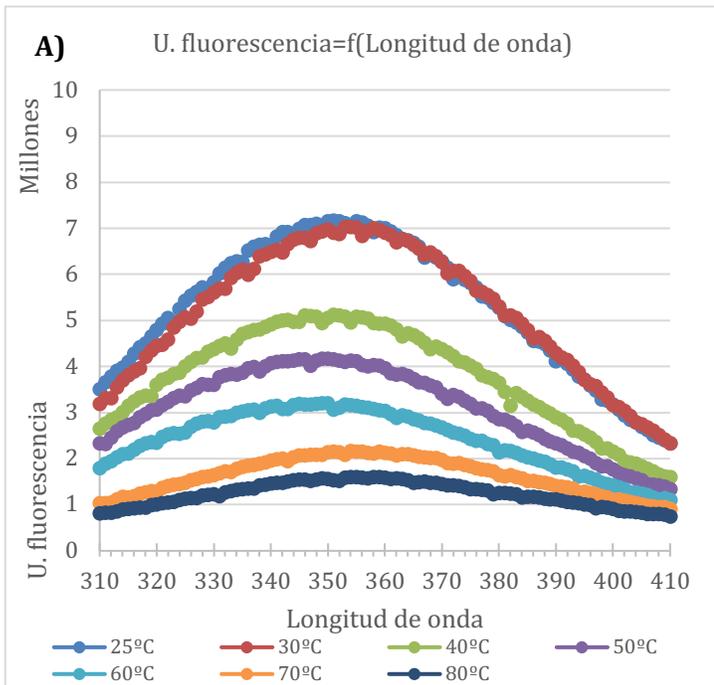


Temperatura	25°C	30°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C
$\lambda_{max\_em}$	335	329	330	327	327	329	349

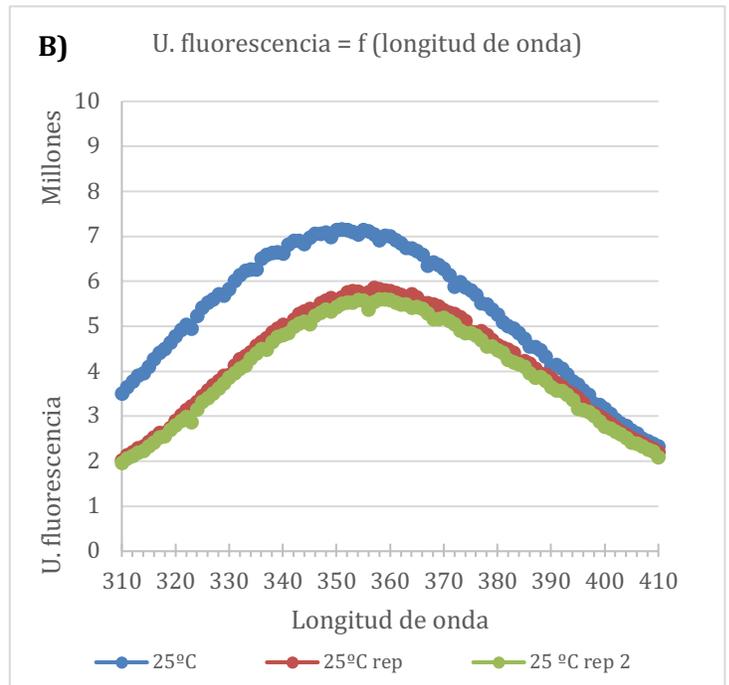
Temp.	25°C inic.	25°C rep	25°C rep 2
$\lambda_{max\_em}$	335	334	335

**Figura 27.** Graficas comparativas de los espectros de emisión de 310 a 410 nm de una muestra de enzima a una concentración final de 0.05 mg/mL en *buffer C ( Tris HCl 25mM/ NaCl 50mM pH=7.5)* en presencia de sus cofactores (ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM) y Batimastat (50uM) excitada a una  $\lambda=280$  nm **A)** Espectros de emisión dependiente de la temperatura (25, 30, 40, 50, 60, 70 y 80°C). **B)** El espectro denominado *25°C inicial* es el resultado obtenido previo al aumento de la temperatura, *25°C rep* y *25°C rep2* son los espectros consecutivos obtenidos al enfriar la muestra en el equipo desde 80°C hasta 25°C nuevamente. En las tablas se muestran las longitudes máximas de emisión a cada temperatura a la que fue sometida durante el ensayo.

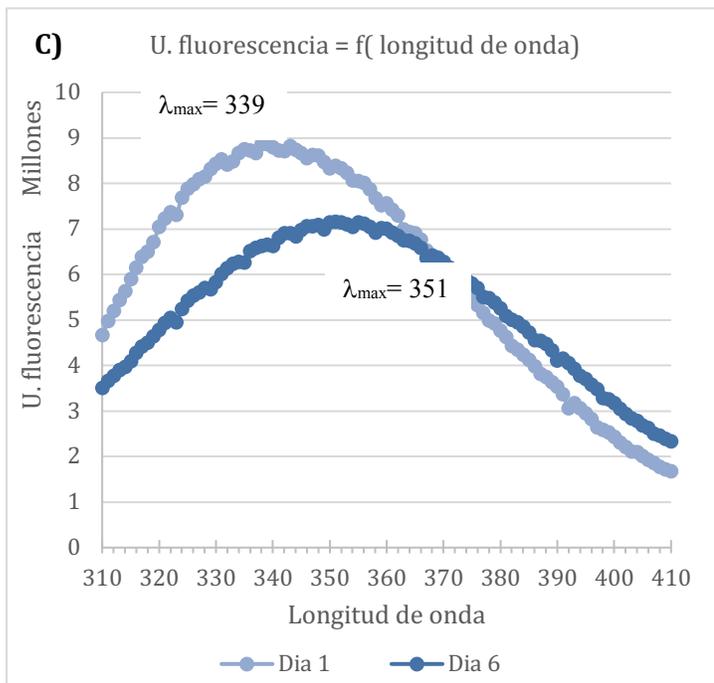
**Condición 2.** dcMT3-MMP en buffer C ( Tris HCl 25mM/ NaCl 50mM pH=7.5) + ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM  
**(6 días posteriores a su preparación)**



Temperatura	25°C	30°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C
$\lambda_{max\_em}$	351	354	351	350	350	354	354

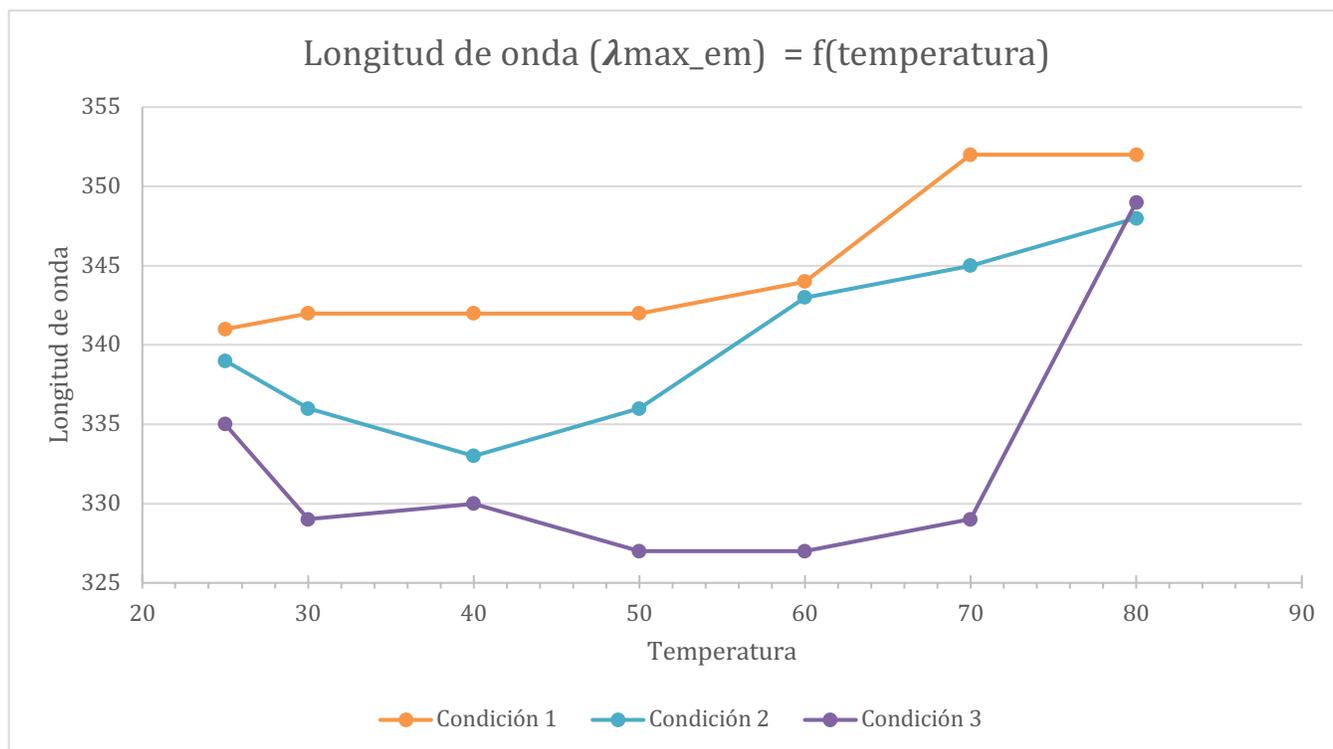


Temp.	25°C inic.	25°C rep	25°C rep 2
$\lambda_{max\_em}$	351	357	358



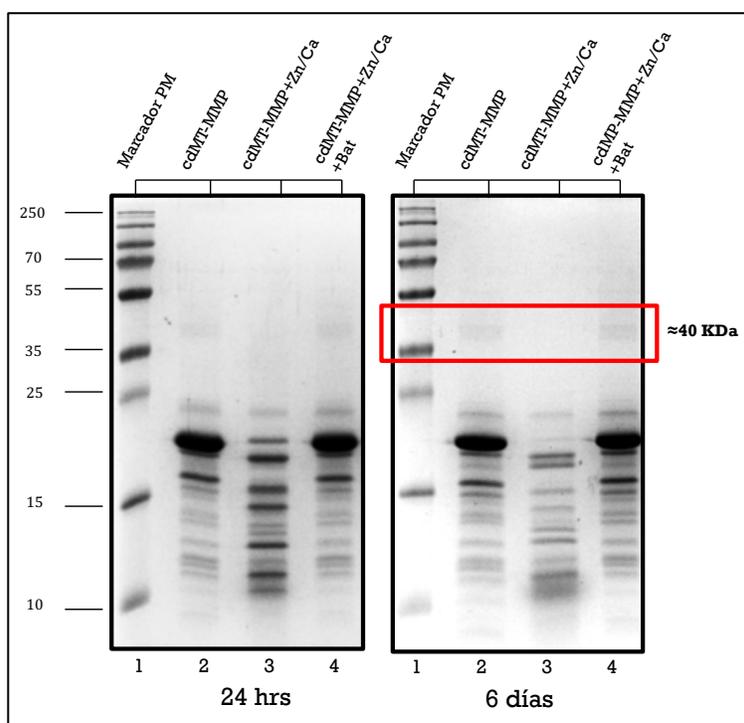
**Figura 28.** Graficas comparativas de los espectros de emisión de 310 a 410 nm de una muestra de enzima a una concentración final de 0.05 mg/mL en *buffer C* ( Tris HCl 25mM/ NaCl 50mM pH=7.5) en presencia de sus cofactores (ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM) excitada a una  $\lambda=280$  nm 6 días posteriores a su preparación. A) Espectros de emisión dependiente de la temperatura (25, 30, 40, 50, 60, 70 y 80°C). B) El espectro denominado 25°C inicial es el resultado obtenido previo al aumento de la temperatura, 25°C rep y 25°C rep2 son los espectros consecutivos obtenidos al enfriar la muestra en el equipo desde 80°C hasta 25°C nuevamente. En las tablas se muestran las

longitudes máximas de emisión a cada temperatura a la que fue sometida durante el ensayo. C) Comparación de los espectros de emisión a una temperatura de 25°C del día 1 y día 6 de la preparación de la muestra.



**Figura 29.** Grafica comparativa del comportamiento de las máximas longitudes de onda de emisión de cada condición en función de la temperatura. Condición 1. dcMT3-MMP en buffer C (Tris HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH=7.5), Condición 2. dcMT3-MMP en buffer C (Tris HCl 25mM/ NaCl 50mM pH=7.5) + ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, Condición 3. dcMT3-MMP en buffer C (Tris HCl 25mM/ NaCl 50mM pH=7.5) + ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM + Batimastat (50 uM).

**SDS-PAGE.** Por ultimo y como muestra del efecto de la presencia de los cofactores y Batimastat sobre el comportamiento de la enzima en función del tiempo, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 15% en los cuales se observa un patrón de bandeo distinto en la condición 2 (*dcMT3-MMP en buffer C ( Tris HCl 25mM/ NaCl 50mM pH=7.5) + ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM)*) entre las primeras 24 hrs y los 6 días posteriores a su preparación, lo cual demuestra que la actividad autoproteolítica de la proteína continua, así mismo, se hace evidencia de la capacidad inhibitoria del Batimastat durante en el tiempo que fue monitoreado.



**Figura 30.** SDS-PAGE de la enzima bajo 3 condiciones de disolvente 24 horas y 6 días posteriores a su preparación. Posiciones. 1) Marcador de peso molecular. 2) Condición 1. *dcMT3-MMP en buffer C(Tris HCl 25mM, NaCl 50 mM, pH=7.5)*, 3) Condición 2. *dcMT3-MMP en buffer C en presencia de sus cofactores (ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM)*. 3) *dcMT3-MMP en buffer C en presencia de sus cofactores (ZnSO<sub>4</sub> 4uM / CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM) y Batimastat (50 uM)*. Las muestras fueron almacenadas a 4°C/ sin agitación durante el tiempo descrito.

## DISCUSIÓN

Durante las últimas décadas los esfuerzos para desarrollar moléculas capaces de actuar como inhibidores de la actividad de las metaloproteasas (MMP) ha ido en aumento debido al papel que éstas desempeñan en una variedad de patologías favorecidas principalmente por un fino desbalance entre las formas activas de MMP y sus inhibidores naturales (TIMP), lo cual promueve una degradación excesiva de los componentes de MEC.

El diseño de estas moléculas había sido basado particularmente en los sustratos de las MMP, es decir, moléculas con secuencias análogas al sitio de corte, las cuales mediante la unión al ion Zinc del sitio catalítico bloquea su actividad; sin embargo, estas moléculas debido a la similitud del sitio catalítico entre MMP y por ende, su amplio espectro de acción, carecen de selectividad, además, algunos efectos adversos durante los ensayos clínicos limitaron sus aplicaciones terapéuticas<sup>(48)</sup> por lo que algunas características necesarias como alta selectividad, afinidad, potencia de inhibición y biodisponibilidad oral han sido el objetivo principal de estudio y con el uso de técnicas de análisis tridimensional y cristalografía en rayos-X de las MMP se han logrado diseñar moléculas con dichas características en base al conocimiento del sitio catalítico, subsitios, especificidad de unión a sus sustratos e inhibidores y mecanismo catalítico con base en su conformación estructural y secuencia. <sup>(59)</sup>

En el presente trabajo abordamos en primera instancia la sobreexpresión y purificación del dominio catalítico de la MT3-MMP (cdMT3-MMP) con el posterior análisis estructural y de actividad de la misma con base en la participación de esta proteasa en una variedad de patologías tales como, artritis reumatoide, aterosclerosis, entre otras.

Para hacer esto posible, el primer paso consistió en el diseño y construcción del plásmido, así como la elección de un sistema de expresión que nos hiciera posible la obtención del cdMT3-MMP en cantidades suficientes para el objetivo del estudio. El sistema de expresión consistió en el uso del vector pET-27b(+) y de la cepa bacteriana *E. coli* BL21 (DE3). <sup>(67, 68)</sup>

El vector pET-27b(+) porta un gen de resistencia a Kanamicina, el cual fue utilizado como marcador de selectividad de colonias después de proceso de transformación bacteriana. La secuencia de aminoácidos que corresponde a la región catalítica (dc) de la MT3-MMP (177 aa.)<sup>(66)</sup> se localizó entre los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* del vector, y contó además con un tag de Histidinas (Hisx6) en la región N-terminal, seguida por una secuencia *target* con capacidad de reconocimiento y posible corte por la TEV-proteasa (*Tobacco Etch Virus Protease*) posterior a la traducción. La construcción final insertada fue una secuencia de un total de 192 aminoácidos con un peso molecular de alrededor de 21 kDa.

Después del proceso de transformación y una vez comprobada la capacidad de sobreexpresión del dcMT3-MMP mediante IPTG como inductor de la expresión, a través de una electroforesis en condiciones desnaturalizantes, de la mezcla de proteínas solubles totales (SDS-PAGE), una banda intensa en el peso molecular esperado ( $\approx 21$ Kda) fue obtenido, en paralelo, los resultados de secuenciación por el método de Sanger después de la transformación y extracción del material genético plasmidico, ponen de manifiesto su correcto diseño tras la posterior *traducción* con herramientas informáticas (*ExpASy*) y búsqueda de coincidencias entre secuencias en una base de datos (*BLASTp*).

Para el proceso de purificación, en el paso 1 se separó la proteína por afinidad por resina de níquel, mediante la cual se forman enlaces de coordinación con los cationes divalentes del ion Níquel ( $Ni^{2+}$ ) adherido a la resina con el tag de polihistidinas (HisX6) que forma parte de la proteína obtenida.<sup>(68, 69)</sup> Aquellas proteínas que no formaron estas interacciones fueron descartadas y aquellas afines a la resina y con el uso de un eluyente con altas concentraciones de Imidazol que actúa como un agente competitivo al interaccionar de la misma manera con el Níquel, favorece la recuperación de entre otras, la enzima de interés. En este punto, se observa una pureza de casi un 80%.

El paso 2, consistió en el uso de Cromatografía de fase reversa en un sistema de alto desempeño (HPLC-FR).

Para este método, la retención selectiva de los componentes de la muestra en la columna utilizada (C18) como fase estacionaria, se debe a las propiedades polares

de ésta, de los componentes de la mezcla a separar y del cambio gradual de polaridad de la fase móvil.

Nuestra fase estacionaria que consiste de un empaque hidrofóbico, una base híbrida modificada con un grupo octadecilo (cadena recta de 18 carbonos) <sup>(70)</sup>, la cual, mediante interacciones hidrofóbicas retiene los solutos inyectados, los compuestos no polares tienden a adsorberse en la fase estacionaria y se mueven a través del sistema mas lentamente que los solutos polares, esta retención no se debe necesariamente a la interacción favorable del soluto con la fase estacionaria, sino el efecto de repulsión del disolvente por el soluto.

Esta retención hidrofóbica del soluto en la fase estacionaria comienza a disminuir con el aumento gradual de las concentraciones de acetonitrilo de la fase móvil, lo que promueve la disminución de su polaridad y menor capacidad de "repulsión" con los compuestos retenidos por la fase estacionaria, así, la distribución de estos compuestos se cambia hacia la fase móvil. <sup>(71)</sup>

El tiempo de retención, señalado en el cromatograma (figura 17A), para el dcMT-MMP, fue de 22 min., tiempo en el cual fue recuperada con un porcentaje de composición de la fase móvil de 53%agua/47%ACN.

Posterior a esto, mediante una SDS-PAGE, se observó la eliminación casi completa del patrón de bandeo observado antes del paso 2 de purificación de proteínas de alto peso molecular, sin embargo, un aparente aumento en la concentración de proteínas de peso molecular por debajo de los 20kDa fue visualizado, a pesar de que el cromatograma de fase reversa pusiera de manifiesto la presencia de una única población de enzimas representada como un pico monodisperso al minuto 22. Debido a esto, las bandas de mayor concentración observadas en la electroforesis, fueron enviadas la unidad de *Proteómica Medica del Inmegen* para su identificación por espectrometría de masas. Los resultados arrojaron dos datos importantes a considerar, el primero de ellos fue la confirmación de la identidad de la banda seleccionada con base a su peso molecular, es decir, su secuencia peptídica corresponde al *dcMT3-MMP*. El segundo fue que las bandas que se encuentran por debajo de nuestra proteína de interés (<21 kDa), al menos la seleccionadas, son identificadas como secuencias peptídicas que corresponden también al *dcMT3-MMP*.

Este hallazgo revela que la proteína se encuentra fragmentada por lo que es posible visualizarla en la electroforesis con diferentes pesos moleculares. Esta "fragmentación" puede ser por varias razones, una de ellas se puede deber al segundo paso de purificación (Fase reversa), donde las condiciones del proceso pueden influir sobre el comportamiento y estabilidad de la proteína, y por este motivo tiende a la proteólisis, una posible explicación a este comportamiento puede ser durante la eliminación de agua/ACN por evaporación después de su paso por la columna y recuperación, ya que el aumento de la concentración podría promover su autoproteólisis; *Shofuda K. y cols.* sugirieron la actividad autoproteolítica de la MT3-MMP como mecanismo regulador para prevenir la actividad excesiva de MMP in vivo. (65)

Por otro lado, debido a que estas bandas son observadas únicamente cuando se agregan cantidades de enzimas mayores a 8 µg, puede ser que estos péptidos ya se encuentren previo al proceso de purificación, y sean evidenciados cuando la mayoría de las proteínas solubles han sido descartadas de la mezcla, esto se puede deber a la formación de productos trancos durante la traducción de la proteína o autoproteólisis dentro de la bacteria, y debido a la conservación de la región amino terminal (cola poli-histidinas) son acarreados estos péptidos durante el proceso de purificación independientemente de su tamaño.

El siguiente paso para la confirmación de la identidad de la proteína fue mediante la realización de un Western Blot, en el cual además de demostrar que los péptidos observados corresponden a la MT3-MMP, se observó una banda alrededor de los 40kDa, que debido al peso molecular, se sugirió que representa a una pequeña población de la proteína en su forma dimérica a pesar de las condiciones desnaturizantes de la electroforesis.

Esta posible formación de dímeros ha sido uno de los modelos actuales de la actividad de la MT1-MMP sobre la activación de pro-MMP2<sup>(81)</sup> y degradación de colágeno sobre la superficie celular <sup>(82)</sup>, con lo cual podríamos hipotéticamente proponer un mecanismo similar para la MT3-MMP debido que hasta el momento no ha sido elucidado.

Con los resultados previamente conseguidos, a pesar de la presencia de los péptidos de bajo peso molecular identificados como propios de la enzima, se prosiguió a la caracterización de ésta a dos niveles estructurales.

El análisis de los espectros de absorción obtenidos de dicroísmo circular nos proporcionan la información suficiente que corroboran una combinación estructural  $\alpha/\beta$  del cdMT3-MMP y un correcto plegamiento de la proteína después del proceso de purificación. Se sabe que la proteína contiene 3 alfas hélices y 5 hojas beta en su estructura (73, 74), las cuales se observan en el espectro de absorción representados por una banda intensa negativa con dos picos (208 y 222 nm) y una banda positiva (entre 191-193 nm) donde la combinación entre alfas y hojas beta casi siempre muestra espectros dominados por el componente helicoidal.

Los giros tienen generalmente un espectro bien definido, sin embargo son difíciles de observar en el espectro global, debido a que muestra señales muy parecidas a las hélices alfa, pero de menor intensidad por lo que se debe considerar que el espectro de absorción es el reflejo de la suma de señales dadas por todos los componentes estructurales de la proteína. (72)

Dada la previamente reportada actividad autoproteolítica de la enzima en presencia de sus cofactores por *Meng F. y cols.* (64), la cual no había sido observado en otras MMP hasta el momento, nuestro resultado posterior a la adición de  $Zn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  corroboraron dicha característica, la cual fue observada y monitoreada 24 hrs después a su preparación (**fig. 22**), y que una vez que los cofactores son adicionados a la muestra, a partir de las 2 hrs (**fig. 23**), comienzan a hacerse notorias otras bandas de bajo peso molecular ( $\leq 21kDa$ ) que corresponden a los fragmentos de la misma enzima.

En conjunto a la determinación de la actividad de la proteína purificada, fue evaluada además, la capacidad de inhibición del Batimastat con concentraciones crecientes del mismo, donde todas las concentraciones probadas tuvieron capacidad inhibitoria notable sobre la enzima a medida que la concentración aumentaba ya que la muestra de enzima con la concentración mas baja de Batimastat (10  $\mu M$ ) mostró una ligera autoproteólisis (**fig. 24**).

Una vez confirmado su correcto plegamiento a nivel secundario y un indicio de su actividad, una aproximación del estado estructural terciario o disposición tridimensional de dcMT3-MMP en solución, se realizó mediante en análisis del espectro de emisión en la región UV-VIS entre 310-410 nm siguiendo la fluorescencia del triptófano después de que la muestra fue excitada a 280 nm.

Los espectros de emisión generados nos dan un acercamiento del comportamiento estructural de la proteína cuando se encuentra en distintos ambientes acuosos, es decir, con la comparación de los espectros de emisión de las 3 condiciones analizadas se puede argumentar lo siguiente:

- 1) En todas las condiciones (**fig. 25A, 26A, 27A**), al aumentar la temperatura, las intensidad de la fluorescencia disminuyó paulatinamente en función de su longitud de onda, lo cual puede ser explicado como un proceso de desdoblamiento de la proteína que experimenta cuando se encuentra expuesta a altas temperaturas debido a la exposición o proximidad del triptófano, por cambios conformacionales, a moléculas denominadas agentes extintores de la fluorescencia que mediante interacciones moleculares selectivas puede llevar a un apagamiento de la fluorescencia, o en otras palabra, una disminución del rendimiento cuántico del triptófano debido a que no todas la moléculas que se excitaron inicialmente retornan al estado basal de energía por emisión de fluorescencia.
- 2) La disminución de la fluorescencia en respuesta al aumento de la temperatura no fue el único fenómeno observado, además de esto, se evidenció un cambio en los máximos de emisión iniciales en cada una de las condiciones, es decir, de los 25°C a los 80°C (el máximo de emisión comenzó a desplazarse hacia longitudes de onda superiores a 340 nm. (353, 348 y 349, condición 1, 2 y 3 respectivamente), lo cual apoya el punto anterior, es decir, el cambio conformación que sufre la proteína, además de resultar en una disminución del rendimiento cuántico del triptófano, también sugiere procesos de

disipación de energía debido a su exposición al disolvente, ya que el fotón de energía emitido es de menor energía que el fotón absorbido por el fluoróforo. Como ya se mencionó, la localización de los residuos de triptófano se encuentran generalmente formando parte del núcleo hidrofílico de las mismas y por lo tanto, se encuentra en regiones donde las moléculas de agua tienen poco acceso, el espectro de emisión del mismo, se corre hacia el ultravioleta con máximo de emisión generalmente en 330 nm. Esto se debe a que la energía emitida es mayor que cuando la cadena lateral se encuentra en contacto con el disolvente, donde parte de la energía es transferida a las moléculas de agua y por lo tanto la longitud de onda del máximo de emisión es mayor (340-350 nm) lo cual confirma el proceso de desplegamiento o desnaturalización del estado plegado inicial con el aumento gradual de temperatura. (75, 76, 77)

3) Respecto a la influencia del disolvente (condición) en el cual se encuentra la proteína sobre su conformación espacial, en el espectro de emisión se observa una diferencia importante entre cada una de las condiciones utilizadas:

El primer cambio observable resulta de la adición de los cofactores Zn/Ca al ambiente acuoso en el que se encuentra la proteína, los cuales parecen proporcionarle *mayor estabilidad* y resistencia al desplegamiento con los aumentos graduales de temperatura y se observó que la condición 1 (Buffer C, Tris HCl/NaCl pH=7.5) con un máximo de emisión inicial a los 25°C de 341 nm (**fig. 25**) mostró un aumento gradual en las longitudes de onda de máxima emisión hasta llegar a los 80°C (352 nm), en cambio en la condición 2 (Buffer C + Zn/Ca), con un máximo de emisión inicial de 339 (**fig. 26**), mostró una tendencia contraria hasta los 50°C, es decir, las longitudes máximas de emisión disminuyeron hasta 336 nm, a partir de los 60°C hasta 80°C cambió nuevamente hacia longitudes de onda mayores hasta llegar a los 348 nm.

4) La tercera condición (**fig. 27**) en la cual se adicionó, además de los cofactores (Zn/Ca), un inhibidor no selectivo (Batimastat) mostró una tendencia similar,

aunque la posible tolerancia a los cambios de temperatura fue mayor que la condición 2, la  $\lambda_{max\_em}$  inicial (25°C) igual a 335 nm, disminuyó conforme la temperatura iba en aumento hasta los 70°C (329 nm) , sin embargo, a los 80°C la  $\lambda_{max\_em}$  aumentó súbitamente hasta 348nm.

Estos resultados demuestran la influencia del ambiente acuoso en el cual se encuentra la proteína, se observa que desde la temperatura inicial (25°C) su espectro de emisión es distinto en respuesta a su conformación posterior a la adición de sus cofactores, lo cual ha sido evidenciado por *Yang H. y cols.* para la MMP-1 donde demostraron la importancia de los iones de Zinc para el mantenimiento tanto de la estructura secundaria como terciaria.<sup>(80)</sup> Nuestros resultados fortalecen dichas aseveraciones además de demostrar que estos iones y la presencia de un inhibidor proporcionan estabilidad a los cambios de temperatura a los cuales fue expuesta la enzima.

- 5) Por ultimo, se advirtió que la exposición de los residuos de triptófano por cambios conformacionales en respuesta al aumento de la temperatura es reversible (**fig. 25B, 26B y 27B**) , lo cual fue evidenciado al llevar de regreso a la enzima en solución en cualquier condición a la temperatura inicial (25°C), debido a que el espectro de emisión no tiene una diferencia significativa a la de inicio, resultado que es sugerente de la capacidad de la proteína para adquirir su estado conformacional inicial.

Debido a que los cambios en la composición del disolvente (adición de Zn/Ca y Batimastat) parecían proporcionar un cambio estructural a la proteína, era probable que este efecto pudiera de alguna manera, ser percibido en una electroforesis (SDS-PAGE), con la cual a las 24 hrs posteriores a la preparación de las muestras (**fig. 30**) se observó lo siguiente: La condición 1, en donde la proteína se encuentra disuelta en el buffer C (Tris HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH=7.5), se visualiza el mismo comportamiento observado desde su purificación, ya que se muestran los mismos péptidos previamente analizados por espectrometría de masas. En la condición 2, al agregar los cofactores Zn/Ca a la mezcla, después de 24 horas la proteína es

escindida en pequeños (péptidos como ya se había observado en un experimento previo), sin embargo, la adición de Batimastat (condición 3) detiene dicha actividad autoproteolítica. Además de este hallazgo, otra observación notable fue la *desaparición*, en la condición 2 (*buffer Tris HCl/NaCl, pH=7.5 + Zn/Ca*) de una banda alrededor de los 40KDa, lo que refuerza su identidad propuesta evidenciada mediante Western Blot y electroforesis nativa simple, ya que su notable “*desaparición*” es debido a la autoproteólisis que experimenta.

Dicho ensayo (SDS-PAGE) fue repetido 6 días posteriores a la preparación de las muestras (3 condiciones) y se observó una modificación en el Patrón de bandeo para la condición 2, lo cual indica que la autoproteólisis continua, resultado que fue reforzado con un ensayo adicional de fluorescencia intrínseca para la condición 2 (**fig. 28**), donde los máximos de emisión muestran un cambio significativo desde la temperatura inicial (25°C) comparando el día 1 con el día 6 ( 339 y 351 nm respectivamente), así mismo, aunque se observa la misma tendencia de disminución de la fluorescencia, la variación de los máximos de emisión al aumentar la temperatura es poca, por otro lado, al regresar la temperatura de 80 a 25°C, la capacidad de replegamiento desaparece, lo cual es razonable debido a la fragmentación de la enzima provocada por autoproteólisis.

## **CONCLUSIONES**

- 1) El sistema de expresión utilizado fue útil para la obtención de la región catalítica de la MT3-MMP insertada en el vector de expresión utilizado. Mediante secuenciación se comprobó la identidad de la secuencia insertada en el vector de expresión, que pertenece a la región catalítica de la MT3-MMP.
- 2) La secuencia de purificación en dos pasos utilizado (afinidad a níquel y HPLC-Fase reversa), cumple con el primer objetivo planteado a pesar de que en la electroforesis se observa un bandeo difícil de eliminar mediante estas técnicas debido a la coelución de estos péptidos. En base a los resultados de espectrometría de masas y western blot se confirmó que estos péptidos pertenecen a la proteína misma.
- 3) La adición de Zn/Ca como cofactores, le confieren a la proteína actividad autoproteolítica, la cual es inhibida al añadir Batimastat, estos dos resultados nos dan un indicio de que la proteína sobreexpresada y purificada se encuentra activa y por ende, puede ser usada para futuros ensayos de actividad enzimática.
- 4) Los métodos de caracterización utilizados (Dicroísmo circular y Fluorescencia intrínseca) nos muestran presuntamente el correcto plegamiento de la proteína con base en los cambios conformacionales observados que sufre en distintos ambientes acuosos así como con el aumento de la temperatura y su capacidad de replegamiento por acción térmica.

## **PERSPECTIVAS**

Los resultados mostrados en el presente trabajo que pretende evidenciar la capacidad de obtención y purificación del dcMT3-MMP con un correcto plegamiento y aparente actividad enzimática sientan las bases para futuros estudios de actividad enzimática en presencia de su sustrato, afinidad e inhibición con moléculas sintetizadas y en desarrollo con dicha capacidad y mayor selectividad que aquellas que han sido probadas hasta el momento.

## Bibliografía

1. Nuria C, Francesc G. Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. *The protein Society*, Nov 2013. Vol 23:123-144.
2. Tomas N, Rosa N. y cols. La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad (parte I). *Rev Esp Patol*, 2009, vol 42, no. 4; 249-261.
3. Hideaki N, Robert V, et al. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research* 69, Jan 2006 ; 562-573.
4. Satya Prakash Gupta, Editor. Matrix Metalloproteinase inhibitors. Specificity of binding and structure-Activity Relationships. Springer. Vol 103.
5. Robert V, Hideaki N. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of metalloproteinases. Structure, function and Biochemistry. *Circ Res* 2003; 92 : 827-39.
6. Cynthia T, Aniebrys M. Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010; 20-28.
7. Alicia F, Alberto P. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int. J. Dev. Biol.* 2004; 48: 411-424.
8. Matthew C, Vera M. Metalloproteinases and wound healing. *Wound Healing Society*. Sep 2014, vol 4, No. 4.
9. S. Löffek, O. Schilling. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J* 2011; 38: 191-208.
10. Shogo K, Toshiyuki K. Atherosclerosis and Extracellular matrix. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 2003. Vol 10, no 5.
11. Hijova E. Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. *Bratis Lek Listy* 2005; 106 (3): 127-132
12. Andrew N. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovascular research* 69, 2006; 614-624.
13. Helen F, Timothy V. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. *Journal of neuro-Oncology* 53: 187-202, 2001.

14. Yoshifumi I, Membrane-type matrix metalloproteinases: Their function and regulations. *Matrix Biol*, 44-46, 207-223; 2015.
15. Marta M, Carl F. Membrane-type matrix metalloproteinases: key mediators of leukocyte function. *Journal of leukocyte biology*. Vol 94. August 2013.
16. Boris R, Piotr C. Basis for substrate recognition and distinction by matrix metalloproteinases. *PNAS*. Sep 2014.
17. Salanonsen LA, Zhang J. Regulation of metalloproteinases in human endometrium human *Reprod*. 2000; 15: 112-9
18. Lijnen H. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost*. 2001; 86: 324-33.
19. Joyce R. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J. cell. Mol. Med*. Vol 9, No 2, 2005 pp. 267-285
20. Stickens D. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development* 2004; 131: 5883-5895.
21. Chen J, Khalil R. Matrix Metalloproteinases in normal pregnancy and preeclampsia. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017; 148:87-165.
22. Joanne Shi, Mi-Young Son. Membrane-type MMPs enable extracellular matrix permissiveness and mesenchymal cell proliferation during embryogenesis. *Developmental Biology* 313, 2008; 196-209.
23. Thiennu H, Zena Werb. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes*
24. Peter Liu, Mei Sun. Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 2006; 22 (Suppl B); 25B-30B.
25. Nynke A, Bastiaan M. Distribution of matrix metalloproteinases in human atherosclerotic carotid Plaques and their production by smooth muscle cells and macrophage subsets. *Mol Imaging Biol* (2016) 18:283-291
26. William I. The pathology of atherosclerosis: Plaque development and plaque responses to medical treatment. *The American journal of medicine* 2009; vo 122, No 1A.
27. Martin F, Sandrine P. Role of Matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling. *Hypertension*. 2007; 50:212-218.

28. Peter Liu, Mei S. Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. *Can J cardiol* Vol 22 Suppl B February 2006.
29. J. A Páramo, I. Montero. Metaloproteasas en aterosclerosis: implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas. *Clin Invest arterioscl.* 2005; 17 (3) :133-41.
30. Tom T. Jeffrey J. Matrix metalloproteinases and descending aortic aneurysms: Parity, Disparity, and Switch. *J Card Surg.* 2012; 27 (1): 81-90
31. H. Lepetit, S. Eddahibi. Smooth muscle cell matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2005; 25: 834-842.
32. Zdenka N. Vitezslav K. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in Chronic Obstructive pulmonary disease. *Archivum immunologiae et therapiae experimentail.* 2016; vol 64, Issue 3, pp 177-193.
33. Belvisi M, Bottomley K. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): atherapeutic role for inhibitors of MMPs. *Inflamm Res.* 2003; 52 (3): 95-100.
34. Kelly E, Jarjour N. Role of matrix metalloproteinases in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2003; 9 (1) : 28-33.
35. Ohbayashi H. Shimokata K. Matrix metalloproteinase-9 and airway remodeling in asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005; 4(2): 177-81.
36. Vanessa C, Li Z. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015; vol 53, Iss 5, pp 585-600.
37. C. Jackson, M. Nguyen. Selective matrix metalloproteinase (MMP) inhibition in rheumatoid arthritis- Targetting gelatinase A activation. *Inflammation Research* 2001, Vol 50, Issue 4, pp 183-186.
38. Faber-Elmann A, Stoeber Z. Activity of matrix metalloproteinases-9 is elevated in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2002; 127 (2): 393-8.
39. Chang YH, Lin IL. Elevated circulatory MMP-2 and MMP-9 levels and activities in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Biochem*, 2008. 41 (12) : 955-9.

40. Zoi P, Dimitra M. Strategies to target matrix metalloproteinases as therapeutic approach In cancer. *Proteases and Cancer: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 2018, vol 1731: 325-348.
41. M. Rydlova, L. Holubec. Biological Activity and clinical implications of the matrix metalloproteinases. *Anticancer Research* 2008, 28: 1389-1398.
42. María C, Juan A. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cancer. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 2010, 76 (1): 59-84.
43. Costas R, Ioannis B. The role of matrix metalloproteinases in diabetes mellitus. *Current topics in Medicinal Chemistry*. 2012; vol 12, Issue 10.
44. Shiro U, Hidetsugu M. Diabetes Mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity. Role of Oxidative stress. *Circ Res*, 2001; 88:1291-1298.
45. Silvia C, Graciela L. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patologia tumoral. 2012; 72: 495-502.
46. Susan W, Gill T. Matrix metalloproteinase inhibitors. *BioDrugs* 1998; 9 (4): 325-335.
47. Keith B, Hideaki N. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803 (1): 55-71
48. L.E. Kapranov, A. Reznikov. The main structural types of inhibitors of matrix metalloproteinases. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2017. Vol 51, No. 3
49. Slawomir W, Jennifer L. Phase I trial of a novel matrix metalloproteinase inhibitor bastimastat (BB-94) in patients with advanced cancer.
50. R. Lang, M. Braun. Crystal Structure of the catalytic Domain of MMP-16/MT3: Characterization of MT-MMP Specific Features. *J. Mol Biol*, 2004. 336, 213-225.
51. Lee R. Rotem K. A new role of the membrane-type matrix metalloproteinases 16 (MMP16/MT3-MMP) in neural crest cell migration. *Int. J. Dev. Biol*. 2017. 61: 245-256
52. Hui ren Z, Margarida B. Differential inhibition of membrane Type 3 (MT3)-Matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP and MT1-MMP by tissue

inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 Regulates pro-MMP-2 activation. *The journal of biological chemistry*. 2004; vol. 279, No. 10, Issue of March 5, pp. 8592-8601.

53. Joji I. Krista L. Cell surface chondroitin sulfate glycosaminoglycan in melanoma: role in the activation of pro-MMP-2 (pro-gelatinase A). *Biochem. J.* 2007; 403, 553-563.
54. Olga T. Mariliina A. Membrane-type-3 Matrix metalloproteinase (MT3-MMP) functions as a Matrix Composition-Dependent effector of melanoma cell invasion. *PLoS ONE* 2011; vol. 6 , Issue 12.
55. Olga T. Erika G. MMP16 Mediates a proteolytic switch to promote cell-cell adhesion, collagen alignment, and lymphatic invasion in melanoma.
56. Li C, Chaowu C. MMP16 is a marker of poor prognosis in gastric cancer promoting proliferation and invasion. *Oncotarget* 2016. Vol 7, No. 32.
57. Shengwen W, Congchao M. High expression of matrix metalloproteinase 16 is associated with the aggressive malignant behavior and poor survival outcome in colorectal carcinoma. *Scientific reports*. 2017
58. S. Jalali, S. Singh. A role for matrix remodeling proteins in invasive and malignant meningiomas. *Neuropathology and applied neurobiology*, 2015. 42, e16-e28.
59. J. Martel. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best practice and research clinical rheumatology* 2001; vol 15, no 5, pp. 805-829.
60. Hiroyasu U. Alice H. Increased expression of membrane type 3-Matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque. Role of activated macrophages and inflammatory cytokines. *Circulation* 2002; 106: 3024-3030.
61. Tomoko S. Ken-ichi S. Cleavage of focal adhesion kinase in vascular smooth muscle cell overexpressing membrane-type matrix metalloproteinases. *Atherosclerosis Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 839-844.
62. Salvador Z. Paola T. Early transcriptomic response to LDL and oxLDL in vascular smooth muscle cells. *PLoS ONE*. 2016; 11 (10).
63. Cythia T, Raquel. On the relevance of the Met-turn methionine in metzincins. *The journal of biological chemistry* 2010; vol. 285, No 18, pp.1391-1357

64. Fan Meng, Hao Yang. Biochemical and spectroscopic characterization of the catalytic domain of MMP16 (cdMMP16). *J Biol Inorg Chem* 2016; 21: 523-535
65. Ken-ichi S, Hidetaro Y. Expression of three membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in rat vascular smooth muscle cells and characterization of MT3-MMPs with and without transmembrane domain. *The journal of biological chemistry* 1997; vol 272, No 15, pp 9749-9754.
66. pET System Manual 11<sup>th</sup> Edition. Novagen. User Protocol TB055 Rev. C 0611JN
67. Haeyoung J, Hyun J. Complete genome sequence of *Escherichia coli* Strain BL21. *Genome Announc.* 2015
68. Harper, *Bioquímica Ilustrada*. 28<sup>a</sup> edición. McGraw Hill. 2010. Cap. 38.
69. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. Qiagen 5<sup>a</sup> Edición. 2003.
70. Waters, *The Science of what's possible*<sup>®</sup>. (2012). XTerra Shield RP18 Cartridge, 125Å, 5 µm, 4.6 mm X 250 mm, 1/pkg [186000584]. <http://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186000584>
71. *Métodos fisicoquímicos en biotecnología. Cromatografía en fase reversa.* Instituto de biotecnología. UNAM. 2004.
72. Sharon M., Thomas J. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751 (2005) 119-139.
73. *Métodos físico-químicos en biotecnología. Dicroísmo circular.* Instituto de biotecnología-UNAM. 2013.
74. PDB ID: 1RM8 Lang, R., Braun, M., Sounni, N.E., Noel, A., Frankenne, F., Foidart, J.M., Bode, W., Maskos, K. (2004) Crystal structure of the catalytic domain of MMP-16/MT3-MMP: characterization of MT-MMP specific features. <http://www.rcsb.org/structure/1RM8>
75. Amar B., Sang C. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: A focus on Förster resonance energy transfer techniques. *Int. J. Mol. Sci* 2014, 15.
76. *Métodos físico-químicos en biotecnología. Espectrofluorimetría.* Instituto de biotecnología-UNAM. 2006.

77. Técnicas de bioquímica y biología molecular. David Freifelder. Editorial reverté, S. A. 1991. Capítulo 15.
78. UniProt Consortium (2012-2018). P51512 (MMP16\_HUMAN). Matrix metalloproteinase-16. <https://www.uniprot.org/uniprot/P51512>
79. Manicone A., McGuire J. Matrix Metalloproteinases as Modulators of Inflammation. Semin. Cell Dev Biol. 2008 February; 19 (1): 34-41
80. Yang H; Makaroff K. Metal Ion Dependence of the Matrix Metalloproteinase-1 Mechanism. Biochemistry 2015, 54, 23, 3631-3639.
81. Itoh Y; Takamura A. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. The EMBO Journal, 2001; 20, 4782-4793.
82. Itoh Y; Ito N. Cell Surface Collagenolysis Requires Homodimerization of the Membrane-bound Collagenase MT1-MMP. Molecular Biology of the Cell, 2006; Vol, 17, No. 12, 4937-5416.
83. English W; Holtz B. Characterization of the role of the "MT-loop": an eight-amino acid insertion specific to progelatinase A (MMP2) activating membrane-type matrix metalloproteinases. The Journal of biological chemistry, 2001; 276 (45) : 42018-26
84. Miyamori H; Takino T. Human membrane type-2 matrix metalloproteinase is defective in cell-associated activation of progelatinase A. Biochem Biophys Res Commun, 2000; 27; 267 (3): 796-800