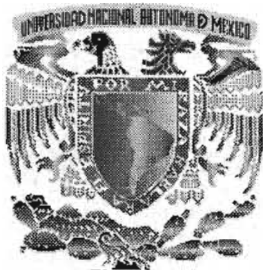


2005  
CHAVEZ GUTIERREZ, MARIA LUCIA

00591



**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
*Universidad Nacional Autónoma de México*

**Programa de Maestría y Doctorado  
en Ciencias Bioquímicas**

**“Estudio de la relación estructura-función en la  
piroglutamil peptidasa II”.**

**T E S I S**

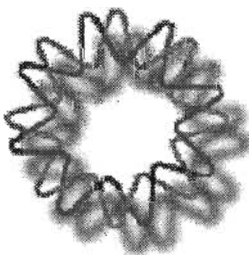
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**MARÍA LUCÍA CHÁVEZ GUTIÉRREZ**

Cuernavaca, Mor

2005



m.345216



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**El presente trabajo se realizó en el departamento de genética y fisiología  
moleculr del Instituto de Biotecnología-UNAM,  
bajo la dirección del Dr. Jean Louis Charli Casalonga.**

**Durante mis estudios de posgrado, fuí becaria del Consejo Nacional de  
Ciencia y Tecnología (CONACyT) y de la Dirección General de Estudios de  
Posgrado (DGEP) de la UNAM.**

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Luisa Chávez Gutiérrez

FECHA: 09/06/05

FIRMA: [Firma]

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Dr. Jean Louis Charli** y a la **Dra. Patricia Joseph**, por su apoyo y dirección durante la realización del presente trabajo.

A los **Dres. Joel Osuna y Eduardo Horjales**, por el apoyo experimental y por sus acertados comentarios, durante el desarrollo de este trabajo.

A los **Dres., Joel Osuna, Eduardo Horjales, Armando Gómez Puyou, Ruy Pérez Montfort, Lorenzo Segovia y Brenda Valderrama**, por sus comentarios y observaciones durante la escritura de la tesis, y por fungir como jurado del examen de grado.

A **Paul Gaytán y Eugenio López**, por su apoyo técnico en la unidad de síntesis de oligonucleótidos.

A todos mis **compañeros y amigos** del laboratorio por los momentos que pasamos juntos.

Dedico este trabajo a mi familia,  
especialmente a mis padres y a mis  
abuelas.

# ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS .....	v
RESUMEN (INGLES) .....	vi
RESUMEN.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 La PPII pertenece a la familia M1 de las metalopeptidasas dentro del clan MA.....	3
I.2 La piroglutamil peptidasa II: características bioquímicas y especificidad. ....	8
I.3 La aminopeptidasa N y la aminopeptidasa A, homólogos de la PPII.....	10
I.4 Estructura-función en la familia M1 .....	11
II. OBJETIVOS .....	16
II.1 Objetivo General .....	16
II.2 Objetivos Particulares.....	16
III. ESTRATEGIA.....	17
IV. RESULTADOS .....	18
IV.1 Expresión de las enzimas recombinantes .....	18
IV.2 Identificación de dominios implicados en la actividad o especificidad de la PPII.....	19
IV.3 Identificación de residuos implicados en la actividad o especificidad de la PPII .....	21
V. DISCUSIÓN .....	37
VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	43
VII. REFERENCIAS .....	44
VIII. ANEXOS .....	50

## SUMMARY

The motivation of this project was the study of the structure-function relationships of the Piroglutamyl aminopeptidase II (PPII). Pyroglutamyl peptidase II is a highly specific membrane-bound neuropeptidase that has the ability to remove N-terminal pyroglutamate (Glp) from Thyrotropin Releasing Hormone (TRH, Glp-His-Pro-NH<sub>2</sub>) or very closely related tripeptides or tripeptide amides. PPII has been proposed as the principal inactivation mechanism of TRH. This omega peptidase is a member of the M1 family of zinc- metallopeptidases, which also includes related enzymes such as aminopeptidase N (APN), aminopeptidase A (APA) or leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase (LTA4H).

LTA4H, a bifunctional soluble enzyme, is the only member of the M1 family of metallopeptidases with crystallographic structure solved; the structure is composed of three different domains: N-terminal consisting mainly of  $\beta$ -sheets, the globular active site domain and the C-terminal helical domain. The three domains form a deep cleft, accessible to the solvent, where the active site is located. Multiple alignment of the M1 family suggested that the modular structure for the ectodomains of these metallopeptidases is similar to that found in the LTA4 structure; moreover, the alignment showed that identity notably increases in the catalytic domains (30 to 45%), while N-terminal domains are partially conserved C-terminal domains sequences are divergent.

Our theoretical studies suggested that the C-terminal regions of APN, APA and PPII are structured by at least two domains ( $C_A$  and  $C_B$ ) connected by two solvent exposed loops: loop A and loop B. While loop A connects the catalytic domain to the  $C_A$  putative domain, the loop B connects  $C_A$  and  $C_B$  domains.

In the laboratory, Dr. Bourdais found a natural truncated form of PPII lacking part of C-terminal domain (CB). Despite PPII\* has its catalytic domain intact, it did not exhibit any PPII activity when it was expressed in COS-7 (or C6 glioma) cells. Co-transfections of PPII and increasing amounts of PPII\* expression vectors resulted in a dose-dependent reduction of PPII activity and the formation of covalent PPII-PPII\* heterodimers. Therefore, PPII\* is a dominant negative isoform of PPII and non-functional heterodimerization may be its mechanism of action. Moreover, natural expression of shortened versions of M1 aminopeptidases may constitute a new mode of regulation of their activity; in the other hand, the artificial expression could be a powerful tool to study the functional role of these metallopeptidases.

M1 exopeptidases act on the N-terminus of peptides with different specificities. Evidence indicates that the recognition of NH<sub>2</sub>-group of substrates/inhibitors by M1 *aminopeptidases* is by hydrogen bonding of two well conserved residues and the amine moiety. For PPII, an

*omegapeptidase* which substrate has not a free amino terminus the N-terminal recognition mechanism has not yet clarified. In order to identify structural determinants ensuring the specificity of PPII and related aminopeptidases we constructed three-dimensional models for the catalytic regions of the ectodomains of PPII and APN using the crystal structure of the LTA4 as template.

We found that glutamate residue within the exopeptidase motif (G<sub>I/A</sub>A<sub>I/G</sub>MEN) PPII-Glu408, but not APN-Glu355, is involved in a salt-bridge interaction with Lys463. Our multiple alignment for M1 family showed that Lys 463, partner of E408, is conserved within PPII sequences whereas most of the M1 family members have Asn in the corresponding position. According to our models, mutagenic replacement of PPII-Lys463 for Asn will leave E408 in a similar “physicochemical context” as in *aminopeptidases*. Moreover, functional data for M1 family as well as our models suggested that the mutagenic replacements of S269 for Gln or Glu, is also needed to transform PPII from an *amega* peptidase to an *aminopeptidase*. This hypothesis was supported by further site-directed mutagenesis, showing that E408-K463 salt bridge is crucial for PPII action while S269Q/K463N PPII mutant displayed *amino* peptidase specificity. Our results report by the first time a change in the specificity for the M1 metallopeptidases family.

Also, we explored the active site of the *omegapeptidase* by site-directed mutagenesis of PPII conserved residues: Y332, H468 and W525. These residues, located in the active site of the PPII model, were replaced and specific activities were determined for wild type and mutants using TRH-βNA as substrate. Based in our theoretical analysis we proposed hypothesis to explain the experimental results obtained.

To evaluate the role of the PPII C<sub>B</sub> terminal region in the inactivating mechanism displayed by the dominant negative form PPII\*, we co-transfected the inactive mutant PPII-K463N with the wild type enzyme. As in PPII:PPII\* co-transfections, increasing amounts of the PPII-K463N mutant expression vector resulted in a dose-dependent reduction of PPII activity. These results showed that dimerization of a non-functional PPII monomer with a functional one results in the inactivation of the wild type form suggesting that PPII is active as homodimer. Moreover, we conclude that PPII C-terminal region (C<sub>A</sub> + C<sub>B</sub> or C<sub>B</sub>), is necessary to obtain a PPII active form; however it is not involve in the dominant negative effect displayed by PPII\*. Our results demonstrate that the PPII model is a useful tool for investigating the activity and specificity mechanisms in the enzyme and, in comparison with that of other M1 family members, to understand the difference in specificities.



## RESUMEN

La motivación del trabajo presentado aquí fue el estudio de la relación estructura función en la piroglutamil peptidasa II (PPII), una zinc-metalopeptidasa perteneciente a la familia M1.

La PPII se diferencia dentro de su familia por su especificidad, restringida a grupos piroglutamil presentes en el N-terminal de tripéptidos (*omegapeptidasa*). Esta ectoenzima participa en la regulación de los niveles extracelulares del TRH (pGlu-His-ProNH<sub>2</sub>), su único sustrato biológico conocido y se le ha propuesto como su mecanismo principal de inactivación.

La leukotrieno A4 hidrolasa (LTA4H) es el único miembro de la familia M1 con estructura tridimensional conocida, se estructura por tres dominios (N-terminal, catalítico y C-terminal) que en su conjunto forman una fosa en la cual se localiza el sitio activo. Alineamientos múltiples entre los miembros de la familia M1 mostraron niveles de identidad mayores sobre las regiones correspondientes al dominio catalítico de la estructura de la LTA4H, con valores que varían entre el 30 y 45%; la secuencia del dominio N-terminal de la estructura se encuentra parcialmente conservada en la familia; en cambio, el dominio C-terminal de la LTA4H es divergente en secuencia y en longitud.

A partir de un análisis detallado de las regiones C-terminales de las ectopeptidasas PPII, *aminopeptidasa N* (APN) y *aminopeptidasa A* (APA), sugerimos que estas regiones se encuentran estructurada por al menos dos dominios conectados por regiones poco estructuradas y expuestas al solvente (lazos A y B). El lazo A conecta el dominio catalítico con la región C-terminal; el lazo B divide a esta última región en lo que podrían ser dos dominios estructurales. En este contexto se estudió una forma corta natural de PPII (PPII\*), troncada alrededor del residuo 800 (lazo B). La expresión y caracterización de la PPII\*, mostró que se trata de una proteína carente de actividad enzimática pero con un comportamiento de dominante negativa cuando es co-transfectada con la enzima silvestre. El estudio de la co-expresión PPII-PPII\*, a diferentes relaciones molares, nos llevó a proponer como mecanismo de acción a la heterodimerización no funcional. Mientras que la expresión natural de la PPII\* en el cerebro pudiera ser un mecanismo de regulación de la actividad de la PPII en el cerebro, la expresión artificial pudiera utilizarse como una herramienta en el estudio de la función de esta ectopeptidasa..

Sacando ventaja de la conservación entre el dominio catalítico de la estructura de la LTA4H y las regiones catalíticas de las metalopeptidasas M1, llevamos a cabo la construcción de un modelo teórico para la estructura tridimensional del sitio activo de la PPII. Para abordar el tema de la especificidad, decidimos incluir en el análisis a la APN, una peptidasa poco específica, que comparte un 34% de identidad global y un 43% de identidad local (región catalítica) con la PPII. Basados en la estructura cristalográfica de la LTA4H, generamos modelos estructurales para

las regiones catalíticas de la PPII y de la APN sobre los cuales seleccionamos residuos que pudieran participar en la actividad y/o especificidad de la PPII. La inspección de los modelos, nos llevó a identificar un puente salino específico de la PPII entre el E408 (firma de exopeptidasas) y la K463. En las *aminopeptidasas* de la familia M1, el glutamato correspondiente al E408 de la PPII conforma el sitio aniónico de unión del amino terminal de sustratos e inhibidores. Dada la importancia de este residuo en la especificidad y debido a que el TRH no presenta un grupo amino terminal libre, propusimos que la interacción carga-carga pudiera explicar la actividad de la *omegapeptidasa*. Por otra parte, el modelaje teórico de la interacción PPII-TRH fue muy útil tanto en el diseño de las mutantes como en la interpretación de los resultados experimentales.

Experimentalmente mostramos que la ruptura del puente salino E408/K463 inactiva a la PPII; más allá, el cambio simultáneo S269Q/K463N, que en teoría cambiaría la especificidad de la PPII de *omega* a *aminopeptidasa*, resultó en una enzima con especificidad de alanil *aminopeptidasa*.

Además, exploramos la estructura del sitio activo de la PPII a través de mutagénesis sitio dirigida sobre los residuos Y332, H468 y W525, localizados en el sitio activo del modelo. Para todas las mutantes determinamos las actividades específicas utilizando al TRH-βNA como sustrato y propusimos una hipótesis que pudiera explicar los resultados observados.

Por último, para esclarecer el papel de la región C-terminal de la PPII en el mecanismo de inactivación observado en las co-expresiones PPII,PPII\* co-transfectamos a la enzima silvestre con la mutante inactiva PPII-K463N. Al igual que la PPII\* la mutante K463N mostró un comportamiento de dominante negativa, sugiriendo que la heterodimerización del dominio catalítico “no funcional” con el dominio catalítico de la PPII silvestre es suficiente para causar la inactivación del último y evidenciando una estrecha interacción entre los dominios catalíticos del dímero de PPII.

En conjunto, los análisis teórico experimentales sobre la PPII y su familia, nos permitieron identificar determinantes estructurales implicados en la actividad y especificidad de la enzima, así como plantear mecanismos de acción para los mismos. En algunos casos, logramos demostrar el mecanismo sugerido, mientras que para otras propuestas se harán necesarios otros análisis teórico experimentales. Más allá, los modelos teóricos y la propuesta de unión para el TRH en el sitio activo de la PPII, son herramientas útiles para el desarrollo de proyectos encaminados a estudiar la estructura-función de la PPII, así como en el estudio y diseño de inhibidores específicos de esta enzima.

## I. INTRODUCCIÓN

Diversos tipos de moléculas son responsables del funcionamiento del sistema nervioso: incluyen neurotransmisores, factores de crecimiento, hormonas, iones y productos metabólicos. Los péptidos constituyen una gran familia de moléculas que participan en la comunicación celular a todo lo largo de la escala filogenética. En el sistema nervioso central (SNC) el concepto de neurona peptidérgica se aplicó inicialmente a neuronas hipotalámicas que proyectan sus axones hasta la pituitaria posterior en donde secretan oxitocina y vasopresina directamente al torrente sanguíneo. Posteriormente, durante la década de los 40's, **Harris et al, 1948**, especificaron que sustancias hipotalámicas secretadas al sistema porta hipotálamo adenohipofisiario son generadoras de cascadas de eventos que resultan en la liberación de hormonas periféricas a las que denominaron "factores liberadores". El primero de ellos en ser caracterizado fue la hormona liberadora de tirotrina (TRH), un tripéptido con estructura pGlu-His-ProNH<sub>2</sub> (**Guillemin et al, 1978; Schally et al, 1978**). En la rata, el TRH es procesado a partir de un precursor de 255 aminoácidos (29 kDa) cuya secuencia presenta en el N-terminal un péptido señal, seguido de cinco copias de la secuencia Gln-His-Pro-Gly flanqueada por motivos dibásicos y péptidos crípticos. El procesamiento proteolítico de las prohormonas, a sus formas maduras, se ha asociado con las últimas etapas de la vía de secreción y principalmente, con el hacinamiento de estos precursores en los gránulos de secreción. Durante la biosíntesis de la hormona TRH, ocurren cortes endoproteolíticos en el extremo C-terminal de las secuencias dibásicas, presentes en la prohormona, llevados a cabo por serín endoproteasas o convertasas con estructura similar a la subtilisina. Las secuencias dibásicas presentes en el extremo C-terminal son reconocidas y removidas por carboxipeptidasas; en algunos casos esto es suficiente para dar origen a péptidos activos; sin embargo, moléculas que presentan Gly en su extremo carboxilo pueden ser sustratos de la enzima peptidil-glicil-alfa monooxigenasa (PAM), cuya acción genera péptidos amidados. Así mismo, péptidos con glutaminil en su extremo N-terminal pueden ser transformados por la enzima glutaminil ciclasa en péptidos con piroglutamil en su extremo N-terminal. Conforme a lo descrito, la secuencia Gln-His-Pro-Gly es convertida en pGlu-His-ProNH<sub>2</sub> (**Nilni y Sevarino, 1999**).

El TRH es sintetizado en varios núcleos cerebrales, incluyendo neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) que proyectan sus axones hasta la eminencia media, en donde lo liberan al sistema portal que irriga a la adenohipófisis (**Palkovitz et al, 1982**); específicamente, son neuronas que se encuentran localizadas alrededor del tercer ventrículo en la región parvocelular del NPV (**Ishikawa et al, 1988; Lechan y Toni, 1992**). El TRH, liberado en la eminencia media, tiene su blanco en las células de la adenohipófisis, en las cuales controla la

síntesis y liberación de las hormonas tirotrópica (TSH) y prolactina (PRL) (Harris et al, 1978). Fuera del NPV, el TRH se encuentra presente en regiones hipotalámicas como el núcleo dorsomedial, el hipotálamo medial y el área preóptica (Lechan y Toni, 1992) así como en múltiples núcleos extrahipotalámicos en las cuales actúa como neuromodulador y/o neurotransmisor (Morley, 1979). La administración del TRH a animales, tiene efectos excitatorios; la activación afecta principalmente la vigilia y el sueño, pero también se observan efectos motores y cognitivos (Horita, 1998; Nillni y Sevarino, 1999). En general, se propone al TRH como un agente neuroprotector con acciones antinarcóticas, antidepresivas y posiblemente antiepiléptogénicas (Sato et al, 1986; Kubek y Sattin, 1989). En repetidas ocasiones, se le ha utilizado como agente terapéutico en el tratamiento de daño espinal y desórdenes degenerativos espino cerebelares y cognitivos. Estudios de este tipo, han reportado efectos benéficos de la administración del TRH en diversas enfermedades motoras; sin embargo, la mejoría es de corta duración debido principalmente a la corta vida media del tripéptido (Griffiths, 1987; Brooke, 1989; Kelly, 1995; Nillni y Sevarino, 1999; Prokai, 2002). Se propone que la mayoría de los efectos del TRH en el SNC suceden en el sistema límbico-cortical y se deben a la capacidad del péptido para potenciar otros sistemas de neurotransmisores; en especial el catecolinérgico (Horita, 1998; Prokai, 2002; Gary et al, 2003). Hay que destacar observaciones recientes que plantean al sistema TRHérgico en el SNC como un sistema integrador que controla la homeostasis (Gary et al, 2003; Wittmann et al, 2004).

En las células blanco, el TRH desencadena una respuesta al interaccionar específicamente con sus receptores membranales TRH-R1 y TRH-R2. El receptor 1, el primero en ser descrito, esta altamente conservado entre especies y comparte con el receptor 2 un 44 % de su secuencia aminoacídica (Zhao et al, 1992; Cao et al, 1998). Mientras que el receptor 1 se ha relacionado con los efectos endocrinos del TRH, la expresión del TRH-R2, confinada al SNC y enriquecida en el cerebelo, en el tracto espino-talámico y en la espina dorsal, sugiere su participación en el control motor y en la percepción sensorial (Heuer et al, 2000; Gershengorn y Osman 1996). Ambos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y transducen su activación a través de su acoplamiento con  $G_q$  o  $G_{11}$ , aunque en algunos tipos celulares también se ha observado acoplamiento a las proteínas  $G_{12}$ ,  $G_{13}$  así como a un tipo de proteína  $G_s$  que no activa a la adenilato ciclasa (Gershengorn y Osman, 1996).

La respuesta celular al TRH puede ser regulada, por el mismo tripéptido o por otros factores extracelulares, al modular la cantidad de receptor presente en la superficie celular, a través del control de su biosíntesis o de su internalización; o bien, sin modificación de la cantidad del receptor, por un proceso de desensibilización que implica su fosforilación (Yang et al, 1993;

Hinkle et al, 1989; Nussenzweig y Gershengorn, 1996). Adicionalmente, la acción del TRH depende también de la inactivación del mismo y en este caso se ha propuesto a la piroglutamil peptidasa II (PPII; EC 3.4.19.6), una metalopeptidasa de la familia M1, como el mecanismo principal de inactivación del tripéptido cuando este es liberado al espacio extracelular (Bauer et al, 1997; Charli et al, 1988; Charli et al, 1989; O'Cuinn et al, 1990). De hecho, la rápida inactivación del TRH, debida a la acción de la PPII, representa una limitante para su uso como agente terapéutico y ha motivado el desarrollo de análogos del TRH con efectos agonistas pero resistentes a la degradación (O'Leary y O' Connor, 1995; Kelly, 1995).

Cuatro son las enzimas que pueden hidrolizar el TRH in vivo: la PPII, la tiroliberinas, enzima sérica que proviene del mismo gen que la PPII (Schmitmeier et al, 2002); la piroglutamil peptidasa I (PPI; EC 3.4.19.3), una cisteín proteasa y la proil endopeptidasa (PE; EC 3.4.21.26). Las tres primeras, son capaces de hidrolizar el enlace peptídico pGlu-His liberando grupos 5-oxoprolina y al dipéptido His-Pro-NH<sub>2</sub>; este último genera a su vez al metabolito cíclico histidil-prolil-diceto piperacina (CHP). La PE puede actuar sobre el carboxilo terminal deaminándolo para producir lo que se denomina TRH ácido (pGlu-His-Pro-OH). Las evidencias sugieren que, in vivo, la PPI y la PE no participan en la degradación del TRH (Mendez et al, 1990), probablemente porque el TRH es inactivado en el exterior celular. En cambio, la alta especificidad de la PPII por el TRH, su localización (ver abajo) y la regulación endocrina a la que esta sujeta en la adenohipófisis, apoyan fuertemente su participación en el metabolismo del TRH. Por ejemplo, la actividad de la PPII en adenohipófisis esta estrictamente regulada por la hormona tiroidea y durante el ciclo estral o circadiano (Ponce et al, 1998; Uribe et al 1991; Vargas et al, 2002a); mientras que en cultivos de adenohipófisis, se observa que la actividad de la PPII esta regulada tanto por el TRH como por otros efectores que modulan la liberación de PRL vía PKA, PKC o Ca<sup>2+</sup> (Vargas et al, 1994, 1998, 2002b).

### ***1.1. La PPII pertenece a la familia M1 de las metalopeptidasas clasificada dentro del clan MA***

Las metalopeptidasas forman el más diverso de los tipos catalíticos de proteasas; pueden actuar como endopeptidasas o como exopeptidasas, y existen formas solubles citosólicas ó que se secretan al exterior celular, así como asociadas a la membrana celular. Participan en procesos fisiológicos tales como la generación o degradación de péptidos biológicamente activos y por lo tanto juegan papeles importantes tanto en la célula como en la comunicación célula-célula.

Se agrupan dentro de las hidrolasas debido a la participación de una molécula de agua en el ataque nucleofílico al enlace peptídico en cuestión y se han clasificado en ocho clanes tomando en cuenta la secuencia de los residuos que coordinan al metal. Generalmente contienen Zn<sup>2+</sup>,

aunque también se pueden encontrar con  $\text{Co}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$ . Se dividen en dos grandes grupos, dependiendo del número de iones metálicos que participan en la catálisis; aunque la mayoría presenta un ión metálico en su sitio activo, coordinado por tres ligandos de la proteína, algunas familias contienen dos actuando co-catalíticamente. En este último caso, son cinco los ligandos de la proteína que coordinan a los metales y en todos los casos tienen actividad de exopeptidasas. Los residuos que comúnmente son ligandos del metal son histidinas, aspárticos, glutámicos o lisinas (**Barret et al, 1998**).

La PPII, se encuentra clasificada dentro de la familia M1 del clan MA, caracterizado por la firma catalítica HEXXH...<sub>18</sub>E y en el cual se agrupan también las familias M2, M4, M5, M9, M13, M30, M36 y M48; estas familias contienen tanto exopeptidasas como endopeptidasas. En particular, hay que destacar a la termolisina (EC 3.4.24.27) como el miembro más estudiado del clan MA.

La familia M1 está presente a todo lo largo de la escala filogenética e incluye tanto enzimas solubles como membranales. En animales, sus miembros se encuentran distribuidos ampliamente en los diferentes tejidos. Son ejemplos de enzimas solubles: la aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA; EC 3.4.11.14), la aminopeptidasa B (APB; EC 3.4.11.6) y la leucotrieno A4 hidrolasa (LTA4H; EC 3.3.2.6); mientras que la aminopeptidasa N (APN; EC 3.4.11.2), la aminopeptidasa A (APA; EC 3.4.11.7), la leucina aminopeptidasa derivada de adipocitos (A-LAP o E-RAP; EC 3.4.-), la leucina aminopeptidasa derivada de placenta (P-LAP; EC 3.4.11.3), también llamada aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP) u oxitocinasa, la arginil aminopeptidasa derivada de leucocitos (L-RAP) y la PPII son ejemplos de proteínas membranales (**Albiston et al, 2004**). Estas últimas son proteínas integrales del tipo II y la mayoría se encuentra como dímeros en la superficie celular (**Barret et al, 1998; Wilk y Wilk, 1989; Bauer, 1994**). En otras especies, las más estudiadas son las aminopeptidasas de levadura 1 y 2 (AP1 y AP2) y la lisil-aminopeptidasa de bacterias y hongos, también llamada PepN.

Los miembros de la familia M1 contienen un átomo de zinc por monómero y son insensibles a inhibidores de tipo serino, aspártico o cisteíno, a excepción de la APB la cual es inhibida por agentes reductores (**Hopsu et al, 1966; Cadel et al, 1995**). Todas las aminopeptidasas M1 son inhibidas por agentes quelantes de metales de acuerdo a su naturaleza de metalopeptidasas (**O'Connor y O'Cuinn, 1984; Friedman y Wilk, 1986; Tiekú y Hooper, 1992; Taylor, 1996**).

Dentro del clan MA, perteneciente a la familia M4, la termolisina es una de las pocas metalopeptidasas con estructura terciaria resuelta (**Colman et al, 1972**); se trata de una endoproteasa soluble, de origen bacteriano, con un peso aproximado de 35 kDa y que debido a su

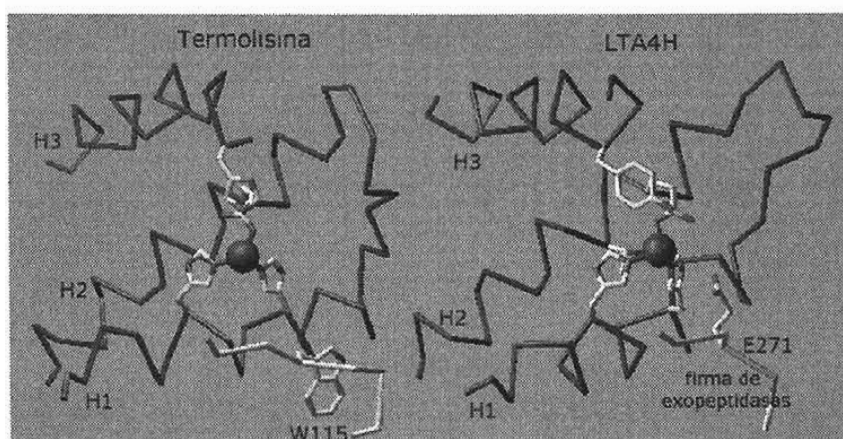
poca especificidad ha sido muy utilizada dentro de la química de proteínas para obtener información sobre estructura primaria o terciaria. Prefiere hidrolizar enlaces peptídicos en el N-terminal de Leu, Phe, Ile o Val; aunque también puede hidrolizar enlaces con Met, His, Tyr, Ala, Asn, Ser, Thr, Gly, Lys, Glu o Asp en P1' de péptidos o proteínas (**Heinrikson, 1977**). Su estructura consiste de dos dominios en cuya interfase se encuentra al sitio activo; el dominio N-terminal se estructura tanto de hélices alfa como de plegamientos  $\beta$  y contiene la secuencia consenso de las metalopeptidasas del clan MA (HEXXH..E), mientras que el dominio C-terminal es rico en alfa-hélices. La secuencia <sup>142</sup>HEALTH-<sup>146</sup> se localiza sobre una alfa hélice, al centro de la estructura; mientras que el residuo E166, C-terminal de la firma y tercer ligando del zinc, se encuentra posicionado sobre la siguiente hélice. En conjunto, los tres residuos y una molécula de agua coordinan al metal con una geometría tetraédrica. Durante la catálisis, el oxígeno del carbonilo del enlace peptídico a hidrolizar se aproxima al ión metálico hasta desplazar a la molécula de agua de la esfera de coordinación; mientras tanto, esta molécula del solvente, activada por su interacción con el E143 y con el metal, ataca al carbono del mismo carbonilo formando un intermediario penta-coordinado. El protón aceptado por el E143 es entonces transferido al nitrógeno del enlace peptídico en cuestión, terminando así con la liberación de los productos. Conjuntamente con los residuos presentes en la firma catalítica, la H231 participa en la estabilización del estado de transición a través de un puente de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo (**Hangauer et al, 1984; Matthews, 1988**).

Además del ión zinc, la termolisina une a cuatro átomos de calcio, dos de ellos en un sitio de unión cercano al sitio activo y los restantes en lazos superficiales; ninguno de ellos tiene un rol catalítico, sino que se relacionan con la estabilidad térmica de la enzima (autólisis) (**Roche y Voordouw, 1978; Fontana, 1988**).

Alineamientos de los miembros de las familias M2, M5, M9, M13, M30, M36 y M48, en el contexto de estructura secundaria, predicen que presentan el mismo plegamiento que la termolisina. Incluso, la estructura de la termolisina ha sido utilizada con éxito como referencia para el modelaje del sitio activo de la neprilisina (EC 3.4.24.11, familia M13) en el diseño de inhibidores (**Roques et al, 1993**). La elucidación de la estructura de la leukotrieno A4 hidrolasa de humano mostró que el dominio catalítico de esta enzima comparte el mismo plegamiento con la termolisina (**Thunnissen et al, 2001**); al igual que lo propuesto para otras familias del clan, el alineamiento estructural entre la termolisina y el dominio catalítico de la LTA4H (familia M1) muestra que la estructura secundaria está conservada, a excepción de una hélice alfa que en la primera se encuentra interrumpida por una región no estructurada. La sobreposición también muestra a los sitios activos de la LTA4H y de la termolisina estructurados por tres alfa hélices

(H1, H2 y H3) que posicionan a los residuos que coordinan al metal (firma catalítica) y al residuo involucrado en el estado de transición: Y o H, respectivamente (Thunnissen et al, 2001, Matthews, 1988). A excepción de la aminopeptidasa O (APO) (Díaz-Pelares et al, 2005), los miembros de la familia M1 mantienen conservada la secuencia (G/A)XMEN o firma de exopeptidasas, que presenta a un residuo Glu involucrado tanto en el reconocimiento del sustrato como en la catálisis. La estructura de la LTA4H muestra al glutamato de la firma de exopeptidasas sobre un lazo que se aproxima al sitio activo; a diferencia, la estructura de la termolisina presenta en la posición correspondiente al W115 (Fig 1A). En la PPII de rata las firmas mencionadas corresponden a las secuencias <sub>405</sub>AAMEN<sub>409</sub> y <sub>441</sub>HEICH...E<sub>464</sub> (Fig. 1B).

A



B

				↑	↑		↑	
PPII	Rata	QFSPT--YLLAW--AAMENWGLSIF--VIVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGFAB--WIAYKKG	531					
PPII	Humano	QFSPT--YLLAW--AAMENWGLSIF--VIVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGFAB--WIAYKKG						
PPII	Ratón	QFSPT--YLLAW--AAMENWGLSIF--VIVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGFAB--WIAYKKG						
PPII	Pollo	QFSPT--YLLAW--AAMENWGLSVF--VIVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGLAH--WIAYKKG						
PPII	Perro	QFSPT-----AAMENWGLSIF--VIVHELCHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGFAB--WIAYKKG						
PPII	Pez*	-----YLLAW--AAMENWGLSVF--VIVHELCHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGFAB--WIAYKKG						
PPII	Xenopus*	-----AAMENWGLSVF--VVVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGFAB--WIAYKKG						
APN	Humano	QMQA--YLLAF--GAMENWGLVTY--VIAHELABQWFGNLTVEWVNDLWLNNEGFAS--AISYSKG	480					
APA	Ratón	DHEPT--YLVCF--GAMENWGLVTY--VVAHELVBQWFGNTVTMDWDDLWLNNEGFAS--GISYSKG	474					
A-LAP	Rata	QFEPT--YLVAF--GAMENWGLTLY--TVSHELABQWFGNLTMEWVNDLWLNNEGFAPK--DVSYEKG	430					
P-LAP	Humano	QFEPL--YLVAF--GAMENWGLTLY--IIAHELABQWFGNLTMEWVNDLWLNNEGFAT--SLSYFKG	552					
L-RAP	Humano	DFEPT--YLVAY--GAMENWGLTLY--VIAHELABQWFGNLTMEWVNDLWLNNEGFAPK--EVSYNKG	458					
AP2	Levadura	QMEPT--YLVAF--GAMENWGLVTY--VVQHELABQWFGNLTMDWVEGLWLNNEGFAT--AISYSKG	394					
AP1	Levadura	QMEAT--YLVAF--GAMENWGLVTY--VIQHELABQWFGNLTMDWVEGLWLNNEGFAT--AISYSKG	389					
PSA	Humano	QFEAT--YLVAF--GAMENWGLVTY--VVQHELABQWFGNLTMEWVNDLWLNNEGFAS--AISYSKG	371					
APB	Humano	QGQAV--YLIAL--GGMENPCLTFV--VILHEISHSWFGNLTNANWGEFPLWLNNEGFAT--STPYEKG	417					
LTA4	Humano	QCQAI--YLIAL--GGMENPCLTFV--VIAHELISHSWTGNLVTNKTWDHPWLNNEGHTV--SVPYEKG	388					

Firma de exopeptidasas

Firma catalítica

		S269	Y332	E408	E442	K463	E464	H468	W525	Y528
PPII	rata	Q215	L279	E355	E389	N410	E411	S415	A474	Y477
APN	humano	E215	L286	E352	E386	N407	E408	S412	G476	Y479
APA	ratón	Q136	L201	E271	E296	N317	E318	V322	S380	Y383



Figura 1. A: Sitios activos de la termolisina y la LTA4H. En ambas figuras se muestran las cadenas laterales de los ligandos del metal (firma catalítica, H1 y H2), al residuo involucrado en la estabilización del estado de transición (H3) y el glutamato de la firma de exopeptidasas o su equivalente en la termolisina. Como esferas se representan a los iones  $Zn^{2+}$ . B: Panel superior: Alineamiento para la familia M1 de las metalopeptidasas. Arriba: secuencias codificantes para PPII; la numeración sobre el alineamiento corresponde a la PPII de rata; en negritas se indican los residuos que fueron seleccionados para realizar experimentos de mutagénesis sitio dirigida. Abajo: se agrupan otros miembros de la familia M1. En el panel inferior se presentan los residuos correspondientes en PPII, APN, APA y LTA4H.

La mayoría de las metalopeptidasas M1 prefieren hidrolizar di- o tri-péptidos aunque casi todas pueden hidrolizar péptidos de más de 10 residuos y su especificidad es muy variada. La APN hidroliza sucesivamente el enlace peptídico aminoterminal de péptidos, con excepción de aquellos que presentan Glu ó Pro en la posición N-terminal; la APA reconoce como sustratos péptidos que presentan en el aminoterminal un residuo ácido, mientras que APB, LTA4H y L-RAP prefieren sustratos con Arg en su amino terminal (**Wang y Cooper, 1996**). La PPII, la más específica de todas, es una *omegapeptidasa* para la cual las posiciones P1 y P1' (piroglutamil e histidil en TRH) son críticas para que se efectúe la catálisis (**Bauer et al, 1997; Kelly et al, 2000**). En la **tabla 1** se resume la especificidad de las enzimas membranales así como sus probables sustratos *in vivo*. Cabe destacar que el grupo conformado por la P-LAP, la A-LAP y la L-RAP conforman una subfamilia dentro de las aminopeptidasas M1, denominado la familia de las oxitocinasas (**Tanioka et al, 2003**). Dos de ellas, la A-LAP y la L-RAP se encuentran localizadas en el lumen del retículo endoplásmico (RE); mientras que la oxitocinasa, se localiza de manera regulada en la membrana celular, donde efectúa la hidrólisis de algunas hormonas (**Keller, 2003**). Para las enzimas A-LAP y L-RAP, residentes del RE, se ha propuesto una función en el procesamiento de procesamiento de antígenos (**Saric et al, 2002; Serwold et al, 2002; Tanioka et al, 2003**).

Aminopeptidasa N (APN, CD13)	Aminoácidos neutros	angiotensina III, encefalinas
Aminopeptidasa A (APA, BP-1)	Glu, Asp	angiotensina II e colicistoquinina 8 (CCK-8)
Piroglutamil peptidasa (PPII)	PGlu-X-Y; X-> aminoácidos neutros y de tamaño mediano. Y->Pro, Trp, Ala, Pro-Gly, Pro-NH <sub>2</sub> , Pro-MCA, Pro-βNA.	TRH
Leucina aminopeptidasa de adipocitos (A-LAP)	Leu, Met, Cys y Phe	encefalinas, angiotensina III
Leucina aminopeptidasa de placenta (P-LAP, IRAP, oxitocinasa)	Cys, Leu, principalmente	vasopresina, oxitocina, Lys- bradiquinina, angiotensina III, Met-encefalina, dinorfina A, neuroquinina
Arginina-aminopeptidasa (L-RAP)	Arg y Lys con muy baja eficiencia: Leu, Met y Ala,	diversos péptidos dentro del RE

Tabla 1. Miembros membranales de la familia M1, su especificidad y sus posibles substratos *in vivo*.

### I.2. La piroglutamil peptidasa II: características bioquímicas y especificidad.

La piroglutamil peptidasa II, aunque presente en varios tejidos, se encuentra enriquecida en cerebro y adenohipófisis (O'Connor y O'Cuinn, 1984; Friedman y Wilk, 1986; Vargas et al, 1987 y 1992; Bauer, 1988; Bauer et al, 1990).

El ADN complementario de la PPII de rata codifica para una proteína de 1025 aminoácidos. El análisis de su estructura primaria muestra, en la región intracelular, un sitio potencial de fosforilación que pudiera participar en la regulación de la enzima; una región transmembranal, que incluye al péptido señal y la región extracelular que presenta, además de las

firmas características (AAMEN y HEICH...<sub>18</sub>E), doce sitios potenciales de glicosilación y un motivo de dimerización tipo "hélice-lazo-hélice" (Fig. 2). El análisis por SDS-PAGE de la enzima solubilizada, por la acción controlada de la tripsina, indica una masa de 116 o 230 kDa, en presencia o ausencia de un agente reductor, respectivamente (Bauer et al, 1994). La mutagénesis sitio dirigida sobre cada uno de los nueve residuos de cisteína presentes en la región extracelular mostró que la PPII se encuentra como homodímeros unidos covalentemente a través de los residuos C68; aunque la dimerización covalente no es necesaria para la actividad de la enzima (Papadopoulos et al, 2000), no queda clara la importancia de la dimerización no covalente.

Hasta el momento se han clonado las secuencias de la PPII de rata (Schauder et al, 1994) y de humano (Schomburg et al, 1999) y por análisis genómico se conocen total o parcialmente las secuencias de ratón, chimpancé, peces, pollo y sapo; entre ellas guardan una identidad por arriba del 90%.

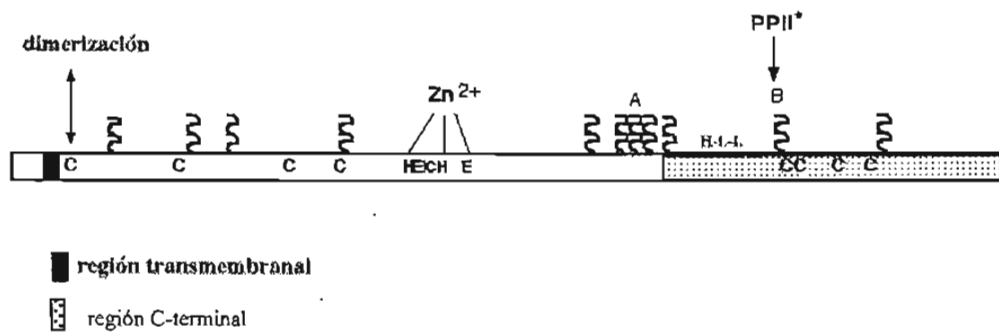


Figura 2. Esquema de la estructura primaria de la PPII de rata. La secuencia deducida a partir de su ADNc presenta una región intracelular, una región transmembranal y en la parte extracelular, nueve residuos cisteínas, la firma HEXXH...E (441-464), doce sitios potenciales de glicosilación (§) y un dominio potencial de dimerización tipo hélice-vuelta-hélice (H-L-H). Las letras A y B indican la posición de los lazos correspondientes. La flecha con doble punta, indica la posición de la cisteína involucrada en la dimerización covalente; mientras que la flecha sencilla indica la posición del C-terminal de la forma truncada PPII\*.

La PPII se distingue dentro de la familia M1 por ser una omega peptidasa altamente específica; prefiere tripéptidos con estructura pGlu-His-X; donde X= Pro, Trp, Ala, ProNH<sub>2</sub> (TRH) o Pro-NA (pro-βnaftilamida) aunque el pGlu-His-Pro-Gly también puede ser hidrolizado

(Wilk y Wilk, 1989; Elmore et al, 1990; Friedman y Wilk, 1986; O'Connor y O'Cuinn, 1984). Su acción sobre el TRH, libera grupos 5-oxoprolina al hidrolizar el enlace peptídico entre los residuos piroglutamil e histidil. Un estudio extenso sobre la enzima purificada de porcino, utilizando péptidos análogos al TRH en los cuales se sustituyó la histidina (P1') por otros aminoácidos, muestra que tripéptidos pGlu-X-ProNH<sub>2</sub> en los cuales X es un aminoácido de tamaño mediano y sin carga son sustratos preferenciales de la enzima (Kelly et al, 2000). Un estudio reciente sobre la estructura-función de la PPII aplicado al desarrollo de inhibidores indica que la inhibición mostrada por el péptido pGlu-Asn-Pro-MCA esta mediada por la interacción, a través de un puente de hidrógeno, entre la cadena lateral de la Asn y la enzima. Así mismo, estos resultados corroboran la existencia de un bolsillo hidrofóbico en las cercanías del sitio activo importante en la afinidad de la enzima por sustratos o inhibidores (Kelly et al, 2005).

### **I.3. La aminopeptidasa N y la aminopeptidasa A, homólogos de la PPII.**

Cuando se realiza una búsqueda de secuencias homólogas a la PPII se encuentran a los diferentes miembros de la familia M1 y después con mucho menor similitud a las colagenasas (Clan MA, familia M9). El alineamiento múltiple para la familia M1 muestra a las aminopeptidasas N y A con un 34 y 32 % de identidad global con la PPII, respectivamente. Cabe mencionar que la identidad entre estas aminopeptidasas y, en general en la familia, se incrementa de manera notable alrededor del sitio activo, llegando a 43 y 42% de identidad sobre 200 residuos de la región catalítica, respectivamente. Más allá, las secuencias reportadas para los genes codificantes para estas aminopeptidasas se estructuran de manera similar, manteniendo conservadas las fronteras intrón-exón (Lerche et al, 1996; Wang et al, 1996; Aurich-Costa et al, 1998).

En mamíferos la APN, conocida también como alanil aminopeptidasa, esta presente en la membrana plasmática como homodímeros no covalentes (Hussain et al, 1981; Sjostrom y Noren, 1982), a excepción del conejo en donde esta reportado que existe como monómero (Feracci y Maroux, 1980). Tiene un peso molecular estimado de entre 140 y 150 kDa por monómero y esta altamente glicosilada. Bajo proteólisis limitada, se generan dos fragmentos de pesos moleculares aproximados a 90 kDa y 45 kDa, que han sido descritos en la literatura como subunidades β y gamma, respectivamente (Maroux et al, 1973). Es abundante en tejidos como riñón, intestino e hígado y se encuentra también en células de linaje hematopoyético en donde se le conoce como CD13 (antígeno de superficie) (Look et al, 1989). En el humano, el gen de APN mapea en el cromosoma 15 (q25-q26) y la región codificante se distribuye sobre veinte exones (Olsen et al, 1989). Ha sido ampliamente estudiada en el sistema nervioso central debido a que

puede hidrolizar e inactivar a varios neuropéptidos, entre ellos a las encefalinas en el enlace Tyr1-Gly2 (Gros et al, 1985; Matsas et al, 1985; Solhonne et al, 1987; Barnes et al, 1988, 1994). Actualmente, se le estudia con gran interés en relación al cancer pues se ha encontrado que tanto la disminución de su expresión como de su actividad tienen efectos antiproliferativos; la actinonina, un inhibidor relativamente específico de la APN ( $I_{50}=2\mu\text{M}$ ), así como anticuerpos anticatalíticos anti-APN funcionan como agentes antitumorales (Wex et al, 1997; Tiekou y Hooper, 1992; Saiki et al, 1993).

Como se mencionó anteriormente, se trata de una enzima poco específica; prefiere alanina en el extremo N-terminal de péptidos pero Phe, Tyr, Leu, Arg, Thr, Trp, Lys, Ser, Asp, His y Val, son también aceptados en el orden de preferencia en el cual se han escrito, mientras que péptidos que presentan Pro o Glu no son sustrato de la enzima. Cabe añadir que cuando se presenta un residuo hidrofóbico como Leu, Tyr o Trp seguido de prolina la APN actúa de manera inusual liberando el dipéptido X-Pro (Barret et al, 1998). Independientemente de su actividad enzimática, la APN es el receptor para ciertos virus, como el coronavirus 229E que en humanos es causante de enfermedades respiratorias o el coronavirus causante de gastroenteritis en puercos "TGV" (Yeager et al, 1992; Delmas et al, 1994). Además, se estudia como parte del sistema de reconocimiento de la toxina CryIAC de *Bacillus thuringiensis* en insectos (Lee et al, 1996).

La APA es también una enzima membranal homodimérica y con una masa reportada de 160 kDa por subunidad. En el ratón se le conoce también como antígeno BP-1 (Cooper et al, 1986). El gen codificante para la APA (ENPEP) abarca más de 100 kb sobre 20 exones y mapea en el humano en el cromosoma 4 (q25) (Wang y Cooper, 1996). In vivo, puede encontrarse parcialmente procesada en dos fragmentos de 107 y 45 kDa de peso molecular que permanecen fuertemente asociados; así, puede decirse que se encuentra en la membrana como un trímero conformado por subunidades de 45, 107 y 160 kDa (Hesp y Hooper, 1997). Su actividad está regulada por  $\text{Ca}^{2+}$  y restringida a residuos glutamilo o aspartilo del aminoterminal de péptidos (Glenner et al, 1962). Está presente con relativa abundancia en tejidos epiteliales de intestino y riñón así como en el endotelio vascular. Inhibidores específicos de la APA han evidenciado su participación en la conversión de angiotensina II a angiotensina III en el cerebro y por lo tanto en la regulación central de la presión sanguínea en modelos de hipertensión sugiriéndola como un posible blanco en el tratamiento terapéutico (Zini et al, 1996; Reaux, 1999).

#### **I.4. Estructura-función en la familia M1.**

##### **I.4.1. La familia M1 tiene una estructura modular.**

La leukotrieno A4 hidrolasa es una enzima soluble citosólica y bifuncional, con actividades de arginil aminopeptidasa y de epóxido hidrolasa en un centro activo común (**Minami et al, 1992**). Como epóxido hidrolasa, cataliza la biosíntesis del leukotrieno B4 (LTB4), un potente quimio-atrayente involucrado en procesos inflamatorios y alérgicos (**Samuelsson et al, 1987**). Como aminopeptidasa, prefiere di and tri-péptidos que presentan Arg en el aminoterminal así como Ala-, o Arg acoplados a  $\beta$ -NA o p-nitroanilida (**Orning et al, 1994**). Clonada de diferentes fuentes, codifica para una proteína de alrededor de 600 aa, contiene un átomo de zinc por mol de proteína (**Malfroy et al, 1989; Minami et al, 1990; Haeggsrom, 1990**) y la secuencia aminoacídica muestra las firmas características de la familia M1. Es una de las enzimas más estudiadas dentro de la familia M1 y la única en la familia con estructura cristalográfica resuelta (**Thunnissen et al, 2001**). La estructura se compone por tres dominios: el N-terminal, conformado por plegamientos beta; el catalítico, el más conservado a nivel de secuencia en la familia y con plegamiento semejante al de la termolisina y el C-terminal, rico en alfa-hélices y divergente entre la LTA4H y el resto de los miembros de la familia, con excepción de la APB y la APO.

Alineamientos múltiples para la familia M1, predicciones de estructura secundaria y de accesibilidad al solvente, así como resultados obtenidos por proteólisis controlada (**Bauer, 1994; Hesp y Hooper, 1997**), indican que los ectodominios de las peptidasas membranales M1 tienen una estructura modular semejante a la de la de la LTA4H, con un dominio C-terminal que varía en longitud y en secuencia; mientras que el dominio C-terminal de las ectopeptidasas de la familia M1 tiene una longitud de entre 300 y 400 aa, el dominio correspondiente en la LTA4H se conforma aproximadamente por 150 aminoácidos.

Los dominios C-terminales de las peptidasas M1, están conectados al dominio catalítico por una región no estructurada y expuesta al solvente a la que hemos llamado lazo A. Esta zona concentra en la PPII y en la APN varios de los sitios probables de glicosilación (**Fig. 2**). Para la aminopeptidasa A de cerdo ha sido reportada la ocurrencia de un corte postraduccional en el lazo A, entre los aminoácidos N602-G603, dividiéndola en dos polipéptidos de 107 y 45 kDa que se mantienen unidos conformando una enzima activa (**Hesp y Hooper, 1997**). Además, existe una forma corta de la APA de la rata producida en el hipocampo por edición alternativa y que resulta en una proteína truncada en el lazo A y carente de actividad enzimática (**Lee et al, 2000**). De forma similar, la creación y expresión de truncadas artificiales en el lazo A, para la APA y APN, resulta en proteínas inactivas que se quedan atrapadas en el retículo endoplásmico (**Ofner y Hooper, 2002; Rozenfeld et al, 2004**). La coexpresión de estas formas truncadas con el dominio carboxilo terminal respectivo genera proteínas activas y con un tráfico celular correcto; más allá,

la disociación del dominio carboxilo terminal del resto de la proteína no afecta la actividad enzimática indicando que el dominio C-terminal no participa en la catálisis y sugiriendo un papel de chaperona para el mismo (Rozenfeld et al, 2004). En la PPII de rata el lazo A corresponde a la región del residuo 630 al 660 y concentra cinco de los doce sitios posibles de glicosilación (Fig. 2).

En conclusión, estudios sobre la relación estructura y función en la región extracelular de las ectopeptidasas plantean una estructura modular común para la familia M1: un dominio N-terminal rico en plegamientos  $\beta$ ; un dominio catalítico, con todos los residuos hasta ahora involucrados en la catálisis y una región carboxilo terminal conectada a través del lazo A y posiblemente implicada en el plegamiento y activación de la enzima.

#### **I.4.2. El sitio activo de la LTA4H y otros miembros de la familia M1.**

Estudios sobre la relación estructura-función en la LTA4H identificaron a los residuos H295, H299 y E318, presentes en la firma catalítica ( $_{295}\text{-HEXXH}\dots_{318}\text{E}$ ) como los ligandos del ión metálico (Medina et al, 1991); mientras que alineamientos de secuencias con otras hidrolasas, en particular con la termolisina, ayudaron en el reconocimiento de otros residuos implicados en la catálisis. Así se identificaron al E296 y la Y383 de la LTA4H como análogos del E143 y la H231 de la termolisina, participando como aceptor y donador de un protón durante la catálisis, respectivamente (Fig. 1A) (Wetterholm et al, 1992; Blomster et al, 1995; Holmes et al, 1982). Una vez identificados en la LTA4H, estos residuos también han sido estudiados en otros miembros de la familia M1, confirmándose los roles propuestos inicialmente en la LTA4H (Vazeux et al, 1996; Vazeux et al, 1997; Papadopoulos et al, 2001).

Adicionalmente, a partir del mecanismo catalítico de la termolisina y de análisis mutagénicos de la misma, se postuló para APN un estado de transición pentavalente, en el cual el E350 de la firma de exopeptidasas (G/A)XMEN participa como un sitio de unión al grupo alfa-amino del sustrato que activado por esta interacción se coordina al metal (Luciani et al, 1998). Ensayos de mutagénesis sitio dirigida sobre este residuo, en varias de las aminopeptidasas M1, confirmaron que se trata de un sitio aniónico de unión del grupo amino terminal de sustratos; sin embargo, la caracterización bioquímica de las mutantes indica que su participación no se limita al reconocimiento del sustrato y lo involucra en la catálisis (Vazeux et al, 1998). La estructura de la LTA4H muestra la interacción propuesta entre el glutamato de la firma de exopeptidasas y el amino terminal del inhibidor bestatina; sin embargo, descarta la coordinación del grupo amino al ión metálico (Rudberg et al, 2002)

La firma de exopeptidasas esta conservada en todos los miembros de la familia M1. En la PPII, una enzima cuyo sustrato no presenta un amino terminal libre, corresponde a la secuencia <sub>405</sub>AAMEN<sub>409</sub> y datos generados por mutagénesis dirigida sobre el E408 mostraron que cambios a glutamina o aspártico acaban o disminuyen notablemente la catálisis, respectivamente (**Papadopoulos et al, 2001**). Estos resultados evidencian que tanto la carga negativa, presente en el E408, como la longitud de la cadena lateral son fundamentales para la función de la enzima. A diferencia de las *amino*peptidasas M1, los parámetros cinéticos descritos para la mutante PPII-E408D no lo señalan como un residuo involucrado en la unión del sustrato.

Por otra parte, la estructura de la termolisina y alineamientos múltiples entre las familias M1 y M4 ayudaron en la identificación del residuo Y471 de la APA, correspondiente a la H231 de la termolisina (**Vazeaux et al, 1997**). La mutagénesis sitio dirigida sobre la Y528 de la PPII, análogo de la Y471 de APA, confirma su participación en la catálisis, probablemente a través de estabilizar el estado de transición (**Papadopoulos et al, 2001**).

En la estructura de la LTA4H de humano acomplejada con bestatina, se identifica además que el E136 establece un puente de hidrógeno con el amino libre del inhibidor, sugiriendo la acción conjunta de los residuos E136 y E271 en el reconocimiento y unión de sustratos e inhibidores. El análisis de la estructura cristalográfica de la mutante inactiva E271Q-LTA4H sugirió que la afectación en la catálisis podría deberse a la interacción del residuo 271 con el E296 de la firma catalítica (<sub>295</sub>-HEXXH...E<sub>318</sub>) y el E136; mientras que los resultados experimentales reportados para mutantes sobre el E136 de la LTA4H no tienen una explicación sencilla (**Rudberg et al, 2002**). Para la APA, mutantes sobre el residuo análogo al E136 de la LTA4H (E215) afectan principalmente a la Km de la enzima, corroborando la interacción con el sustrato predicha a partir de un modelo teórico para la APA, basado en la estructura de la LTA4H de humano (**Rozenfeld et al, 2003**). El alineamiento múltiple para la familia M1 (**Fig. 1**) muestra que en la posición correspondiente al E215-APA o E136-LTA4H existe glutámico o glutamina, a excepción de las secuencias tipo PPII que presentan serina (S269 en la rata); este hallazgo no sorprende dada la naturaleza de *omegapeptidasa* de la PPII.

Por otra parte, en analogía a la termolisina, se identificó también a la H450 de la APA como un residuo involucrado en determinar la especificidad del sitio SI ya que distintas concentraciones de Ca<sup>2+</sup> regulan de manera diferencial la especificidad de las mutantes H450F o H450R (**Iturrioz et al, 2000**). En la PPII, la mutagénesis del residuo correspondiente, la H507, disminuye la eficiencia catalítica debido principalmente a cambios en la kcat (**Papadopoulos et al, 2001**).



Resumiendo, la información que se encuentra en la literatura sobre las metalopeptidasas de la familia M1 sugiere que los miembros de esta familia mantienen una estructuración similar a la de la estructura de la LTA4H, con un dominio N-terminal, un dominio catalítico y una región C-terminal conectada al dominio catalítico por un lazo expuesto al solvente. Además, el alineamiento entre las secuencias de los miembros de la familia M1 sugiere que las regiones catalíticas conservan un plegamiento similar, abriendo la posibilidad de utilizar la estructura del dominio catalítico de la LTA4H como un templado en el modelaje de los sitios activos de otras metalopeptidasas M1. También es importante destacar que el plegamiento del dominio catalítico de la LTA4H es el mismo que el de otros miembros del clan MA.

## **II. OBJETIVOS**

### **II.1. Objetivo general.**

Identificar determinantes estructurales sean residuos o dominios implicados en la actividad y/o especificidad de la PPII.

### **II.2. Objetivos particulares.**

II.2.1. Realizar análisis teóricos que ayuden a identificar residuos o dominios implicados en la actividad y/o especificidad de la PPII.

II.2.2. Caracterizar residuos o dominios implicados en la actividad y/o especificidad de la PPII

### **III. ESTRATEGIA**

#### **ANÁLISIS TEÓRICOS**

- Identificación de homólogos a la PPII con estructura resuelta;
- Identificación de dominios estructurales en la PPII y en la familia M1;
- Construcción de un modelo estructural para la PPII que permita identificar residuos implicados en la actividad de la enzima;
- Modelaje de la interacción entre la PPII y su sustrato (“docking” del TRH);
- Construcción de un modelo estructural para la APN que en comparación con el de la PPII ayude en la identificación de residuos implicados en la especificidad de la *omega*peptidasa;
- Identificación de residuos implicados en la catálisis y/o especificidad de la PPII por comparación de los modelos teóricos de la PPII y APN.

#### **ANÁLISIS EXPERIMENTAL**

- Expresión de la PPII en un sistema heterólogo;
- Caracterización bioquímica de la enzima silvestre;
- Construcción de mutantes de PPII sobre residuos seleccionados;
- Expresión de cada una de las mutantes; comprobación de los niveles de expresión y del tráfico celular;
- Caracterización bioquímica de cada una de las mutantes;
- Construcción de proteínas truncadas generadas por la delección de dominios;
- Caracterización bioquímica de las formas truncadas.

#### **ANÁLISIS TEÓRICO- EXPERIMENTAL**

- Validación o rectificación del modelo teórico con los datos experimentales.

## IV. RESULTADOS

### IV.1. Expresión de las enzimas recombinantes.

La expresión de la PPII silvestre se intentó en diversos sistemas: bacteria, levadura, células de insecto (infectadas con baculovirus recombinantes) y cultivos de líneas celulares de mamíferos. Las actividades catalíticas se cuantificaron utilizando como sustrato al TRH  $\beta$ -naftilamida (TRH- $\beta$ NA) en un ensayo acoplado a la actividad de la enzima dipeptidil-peptidasa IV (DAPIV); mientras que las determinaciones con sustratos como Ala- $\beta$ NA y Glu- $\beta$ NA, se realizaron de manera directa. En general, las determinaciones cinéticas se llevaron a cabo en preparaciones membranales totales.

La expresión de la región extracelular de la PPII como una proteína soluble citosólica en bacteria (*E. coli*) o secretable en Levadura (*Pichia pastoris*) generó proteínas recombinantes con un peso molecular por debajo del esperado (no mostrado); probablemente debido al uso diferencial de codones entre estos organismos y los mamíferos. La expresión de una forma soluble de la enzima se intentó también en el sistema de baculovirus sin éxito pero se obtuvieron resultados positivos cuando se expresó la forma membranal ( $127 \pm 24$  pmol  $\beta$ NA/ (min  $\cdot$  mg proteína total)). En cultivos de las líneas celulares COS-7 (riñón de mono) y C6 (células gliales de rata) transfectados con lipofectamina 2000, se logró expresar de forma transitoria tanto la enzima silvestre de rata como las proteínas de fusión 6xHis-PPII y PPII-proteína verde fluorescente (PPII-EGFP). Las actividades específicas en cada caso fueron de  $762 \pm 87$ ,  $240 \pm 32$  y  $263.9 \pm 40$  pmol  $\beta$ NA/ (min  $\cdot$  mg proteína total), respectivamente (Chávez-Gutiérrez et al, 2005). Debido a que la transfección y la construcción de mutantes resultó técnicamente más sencilla que la infección con el sistema de baculovirus recombinantes, seleccionamos a los cultivos de células de mamíferos para la expresión heteróloga de las enzimas a analizar.

La distribución de la enzima de fusión PPII-GFP dependió del tipo celular; en células COS-7, transfectadas con la fusión PPII-EGFP, la fluorescencia se observó de forma mayoritaria en el interior de las células. En cambio, en cultivos de células de origen glial C6, la fluorescencia se distribuyó principalmente en la membrana plasmática obteniéndose una actividad específica de  $296 \pm 60$  pmol  $\beta$ NA/ (min  $\cdot$  mg proteína). La expresión de la enzima silvestre de rata fusionada en su amino terminal a una secuencia de seis histidinas (His-PPIIr), tanto en células COS-7 como en C6, mostró un peso molecular de 145 kDa por monómero y se localizó principalmente en la membrana plasmática; el análisis en condiciones no reductoras mostró que tanto la 6xHis-PPII como la PPII-GFP formaron homodímeros unidos covalentemente (Chávez-Gutiérrez et al, 2005), de manera consistente con lo publicado (Papadopoulos et al, 2000).

## **IV.2. Identificación de dominios implicados en la actividad o especificidad de la enzima piroglutamil peptidasa II.**

### **IV.2.1. La estructura cristalográfica de la LTA4H propone una estructura modular para la familia M1**

La estructura de la leukotrieno A4 hidrolasa de humano, una enzima soluble, esta conformada por tres dominios que en conjunto forman una fosa en la cual se encuentra enterrado el sitio activo pero accesible al solvente. En el alineamiento múltiple para la familia M1 se observa que los dominios N-terminal y catalítico de estas peptidasas, presentan una mejor conservación a nivel de estructura primaria. En cambio, las regiones carboxilo terminales pueden variar en secuencia y en longitud.

En la estructura de la LTA4H, el dominio catalítico une al dominio carboxilo terminal a través de un lazo expuesto al solvente (lazo A). El análisis del alineamiento múltiple de las regiones C-terminales de metalopeptidasas M1, de las predicciones de estructura secundaria y accesibilidad al solvente y de la información derivada de proteólisis controlada sobre la APA, la APN y la PPII (Hesp y Hooper, 1997; Bauer, 1994) nos llevó a proponer dentro de las regiones carboxilo terminal de la familia M1 una región con características similares al lazo A: poco estructurada, expuesta al solvente y con sitios potenciales de glicosilación. Hay que destacar se ha implicado a esta región en la función de la APN como receptor del coronavirus "TGV" en puercos (Delmas et al, 1994). En la PPII corresponde a los residuos 795-825, presenta un sitio potencial de glicosilación y lo denominamos lazo B. Cabe mencionar que los cuatro residuos cisteína presentes en la región C-terminal de la PPII se encuentran en la secuencia C-terminal al lazo B. Lo mismo ocurre con la APN.

La identificación de una forma truncada natural de la PPII de rata (PPII\*), como una proteína de 831 aa., truncada en la región correspondiente al lazo B (Chávez-Gutiérrez et al, 2005), apoyó nuestra hipótesis sobre una región C-terminal dividida en dos dominios (C<sub>A</sub> y C<sub>B</sub>) y nos permitió evaluar el impacto del dominio C<sub>B</sub> en la función de la enzima.

La expresión y caracterización de la PPII\* en la línea celular COS-7, mostró que se trata de una proteína inactiva y con un peso molecular aproximado a 120 kDa. Al igual que la forma larga, la PPII\* se encuentra como dímeros en la superficie celular probablemente unidos covalentemente a través de los residuos C68 (Chávez-Gutiérrez et al, 2005). Estos resultados, en conjunto con los datos reportados para aminopeptidasas M1 truncadas en el lazo A, implican que la delección de la secuencia carboxilo terminal (sea en el lazo A o en el lazo B) es suficiente para terminar con la actividad enzimática.

La baja homología entre las regiones C-terminales de las metalopeptidasas membranales y el C-terminal de la LTA4H y la falta de otro homólogo con estructura resuelta, han dificultado el modelaje de esta región. Sin embargo, el programa reciente **ModWeb(...)** permitió modelar una estructura para la región  $C_A$  (residuos 610-758) de la PPII basada en la estructura del dominio C-terminal de la LTA4H. Lo anterior implica que el dominio C-terminal de la LTA4H y el  $C_A$  de la PPII son homólogos estructurales a pesar de su baja similitud en secuencia. Hay que mencionar que el dominio  $C_B$  de la PPII presenta una similitud mayor con el dominio C-terminal de la LTA4H que el dominio  $C_A$ ; de hecho, utilizamos también la estructura del dominio C-terminal de la LTA4H como templado para modelar la región  $C_B$  de la PPII. En este momento queda por definir la posición de los dominios  $C_A$  y  $C_B$  en el modelo de PPII (“docking”). Una propuesta inicial basada en la estructura secundaria de la estructura templado, en la predicción de la estructura secundaria de la región C-terminal de la PPII ( $C_A + C_B$ ) y en el alineamiento de las regiones C-terminales de las ectopeptidasas y la LTA4H, fue colocar al dominio  $C_B$  en la posición correspondiente al dominio C-terminal de la LTA4H, insertando al dominio  $C_A$  en la posición correspondiente al lazo A de la LTA4H (Fig. 3). Sin embargo, en este momento no existen datos experimentales que pudieran corroborar o descartar esta propuesta. Los datos anteriores sugieren que los dominios  $C_A$  y  $C_B$  de las ectopeptidasas MI surgieron de la duplicación de un dominio C-terminal similar al de la LTA4H.

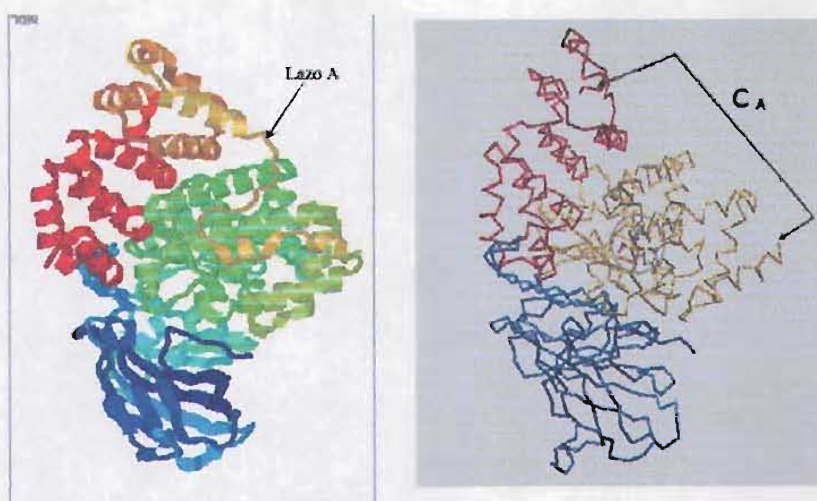


Fig. 3 Izquierda: Estructura de la LTA4H de humano (Thunnissen et al, 2001). En azul, amarillo y rojo se muestran los dominios N-terminal, catalítico y C-terminal, respectivamente. Con una flecha se indica la posición del lazo A. Derecha: Modelo estructural de la PPII. En azul y amarillo se indican los dominios N-terminal y catalítico, respectivamente. En rojo se muestra parte de la región C-terminal de la PPII ( $C_n$ ), modelado a partir de la estructura del dominio catalítico de la LTA4H. Con flechas se indican los extremos C- y N-terminal del dominio catalítico y  $C_B$ , respectivamente.  $C_A$  se refiere al lugar de inserción propuesto para el mismo dominio.

#### **IV.2.2. La PPII\*, una forma corta natural de la PPII que actúa como dominante negativa de la enzima silvestre.**

La existencia de una forma corta, de origen natural e inactiva de la PPII en la rata y la naturaleza dimérica de la enzima nos llevó a evaluar una posible interacción con la enzima silvestre. Co-transfecciones PPII:PPII\*, a diferentes relaciones molares en la línea celular COS-7, mostraron una disminución de la actividad enzimática inversamente proporcional a la concentración de la PPII\*, obteniendo un decremento del 65% al transfectar una relación equimolar. Para determinar la especificidad del efecto de la PPII\*, se midió la actividad de la APN endógena en las preparaciones membranales de células co-transfectadas. Las determinaciones se realizaron utilizando Ala-βNA como sustrato y no mostraron variaciones significativas.

De la misma forma, coexpresiones de las proteínas His-PPII e His-PPII\* mostraron un comportamiento similar al de sus contrapartes sin la secuencia 6XHis. El análisis por SDS-PAGE y Western blot, utilizando anticuerpos anti-6XHis, en condiciones reductoras y no reductoras, mostró la formación de heterodímeros covalentes entre la PPII y la PPII\*.

Co-transfecciones de la PPII\* con la fusión PPII-GFP, en la línea celular C6, mostraron un efecto inhibitorio similar al observado en la línea celular COS-7; además, el análisis por microscopía no mostró cambios en la distribución de la fluorescencia debida a la presencia de PPII\*. Considerando los resultados anteriores, concluimos que la PPII\* actúa como una dominante negativa específica para PPII y proponemos como mecanismo de acción la heterodimerización no funcional (Chávez-Gutiérrez et al, 2005).

### **IV. 3. Identificación de residuos implicados en la actividad o especificidad de la enzima piroglutamil peptidasa II.**

#### **IV.3.1. La estructura de la leukotrieno A4 hidrolasa: un templado para el modelaje de otros miembros de la familia M1.**

La elucidación de la estructura de la leukotrieno A4 hidrolasa de humano, acompañada al inhibidor bestatina, nos permitió modelar los dominios catalíticos de la PPII de rata y de la APN de humano.

En base al alineamiento múltiple para la familia M1, en las predicciones de estructura secundaria de las secuencias a modelar y considerando la estructura secundaria de la LTA4H, se construyó un alineamiento secuencia-estructura entre la APN, PPII y LTA4H. El alineamiento realizado sobre 400 residuos aproximadamente (263-623 y 190-567 de la PPII y APN;

respectivamente) abarcó parte del dominio N-terminal y por completo el dominio catalítico de la LTA4H. Dentro del alineamiento, se definieron regiones estructuralmente conservadas (REC) sobre las cuales se transfirieron las coordenadas de la estructura templado; mientras que las regiones faltantes fueron modeladas de acuerdo a su longitud y tipo de aminoácidos, así como a los residuos localizados en las fronteras de las REC's colindantes. Una vez construidos los modelos iniciales, se colocó un ión zinc en cada uno de los sitios activos basándonos en la posición del zinc en la estructura de referencia así como los cationes ( $\text{Na}^+$ ) necesarios para asegurar la neutralidad eléctrica del sistema. Los sistemas proteína +  $\text{Zn}^{2+}$  en agua fueron sometidos a ciclos de minimización de energía seguidos de dinámicas moleculares cortas (100 ps).

Los modelos para PPII y APN presentan una organización similar, con una zona N-terminal rica en hojas  $\beta$  y un dominio catalítico constituido principalmente por alfa hélices que contiene las firmas características de la familia (**Chávez-Gutiérrez et al, sometido**). En la región N-terminal de ambos modelos, se observó el puente salino estructural descrito anteriormente para la APA (**Fig. 4A**) e importante en la cohesión del dominio N-terminal de este tipo de aminopeptidasas (**Rozenfeld et al, 2002**). Cabe destacar que el puente salino que involucra a la K530 de PPII tiene una contraparte en la PSA; datos experimentales indican que la K396 de la PSA esta implicada en un puente salino estructural (**Thompson y Hersh, 2003**).

Los sitios activos de los modelos se estructuraron por tres alfa hélices entrecruzadas de manera similar al sitio activo de la termolisina (**Fig. 1A**) (**Colman et al, 1972**). La primera de ellas contuvo parte de la firma catalítica y presentó a dos de los ligandos del zinc; la segunda hélice presentó al Glu C-terminal de la firma catalítica, tercer ligando del metal; mientras que la tercera aproximó al residuo tirosina involucrado en la estabilización del estado de transición. Además, se encontró a dos lazos que se aproximan al conjunto de hélices. En el modelo para la APN de humano, los lazos 1 y 2 posicionaron a la Q213 y al E350 (firma de exopeptidasas), respectivamente; estos residuos han sido relacionados con el reconocimiento y la unión del sustrato. En ambos modelos, las histidinas y el glutamato C-terminal de la firma catalítica (HEXXH...<sub>18</sub>E) coordinaron al metal. En la APN, el cuarto ligando fue una molécula de agua que se encuentra interaccionando por puentes de hidrógeno con dos glutamatos: el de la firma de exopeptidasas (E355) y el primero de la firma catalítica (E389). Mientras que en el modelo para la PPII, el cuarto ligando fue el primer glutamato de la firma catalítica (E442); además, el residuo E442 en conjunto con el E408 (firma de exopeptidasas) posicionaron a una molécula de agua en las cercanías del ión metálico (**Fig. 4**) (**Chávez-Gutiérrez et al, sometido**).



Otra diferencia notoria entre los sitios activos de los modelos estuvo dada por el tipo de interacciones que establecieron los carboxilatos de la firma de exopeptidasas. Además de su interacción con el solvente, el PPII-E408 estableció una interacción salina con el grupo amino de la K463, posicionada en la helice 3 y vecina a uno de los ligandos del zinc (E464). En cambio, el APN-E355 interaccionó con el solvente y con la Y278 (no mostrado), un residuo conservado en la familia M1.

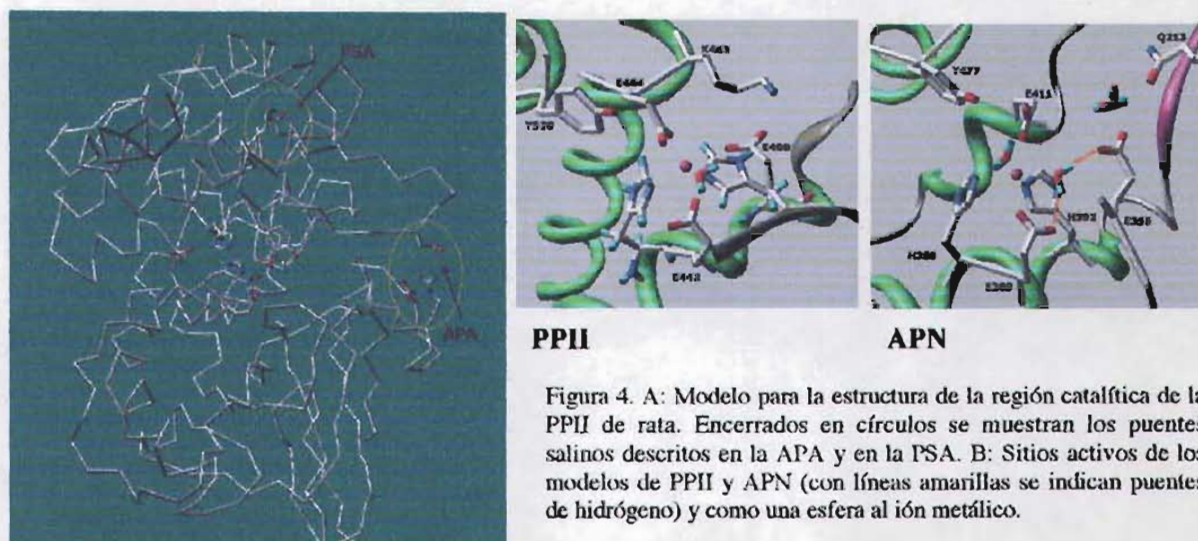


Figura 4. A: Modelo para la estructura de la región catalítica de la PPII de rata. Encerrados en círculos se muestran los puentes salinos descritos en la APA y en la PSA. B: Sitios activos de los modelos de PPII y APN (con líneas amarillas se indican puentes de hidrógeno) y como una esfera al ión metálico.

#### IV.3.1.1. EL TRH en el sitio activo del modelo de PPII.

Basándonos en la posición de la bestatina en el sitio activo de la LTA4H, se colocó el TRH en el sitio activo de la PPII. El sistema PPII-TRH fue sometido a minimización de energía seguida de dinámica molecular. Durante la dinámica molecular, el TRH mantuvo la misma orientación que la bestatina; e incluso, el anillo del piroglutamil estableció una interacción con la Y404 (firma de exopeptidasas) de la PPII de manera similar a lo que se observa en la estructura de la LTA4H para el anillo fenólico de la bestatina y la Y271 (firma de exopeptidasas). En el modelo PPII-TRH, los anillos del piroglutamil y de la Y404 se encontraron sobre planos paralelos colocados a una distancia de 3.4 Å (Fig. 5). Además, los grupos amino del piroglutamil y del enlace peptídico N-terminal establecieron puentes de hidrógeno con el oxígeno de la cadena principal de la A406 de la firma de exopeptidasas (no mostrado). La posición de la histidina del sustrato sugiere una interacción entre el grupo imino y el carboxilato del E442 durante la catálisis (Fig. 5).



El carbonilo del enlace peptídico N-terminal del TRH estableció, durante las dinámicas moleculares, puentes de hidrógeno con la Y528 (involucrada en la estabilización del estado de transición) y con una molécula del solvente, colocándose a aproximadamente 4 Å del ión metálico; a su vez la molécula de agua se encuentra a 2.1 Å del metal e interaccionando por puente de hidrógeno con el E442 (no mostrado). En cuanto al carboxilo terminal del sustrato, el carbonilo interaccionó con una molécula del solvente mientras que el grupo amida interaccionó débilmente tanto con el E464, ligando del zinc como con la H468, un residuo específico de la PPII (no mostrado).

Se observó también que la presencia del sustrato TRH, en el sitio activo del modelo de la PPII, no afectó la interacción salina entre el E408 y la K463 (ver más adelante); pero favoreció la interacción por puente de hidrógeno entre el E408 y la Y332 (no mostrado). El alineamiento múltiple para la familia M1 mostró que el residuo Y332 es específico de secuencias tipo PPII, el resto de las secuencias presentó de manera conservada leucina (L279 en APN) (Fig. 1).

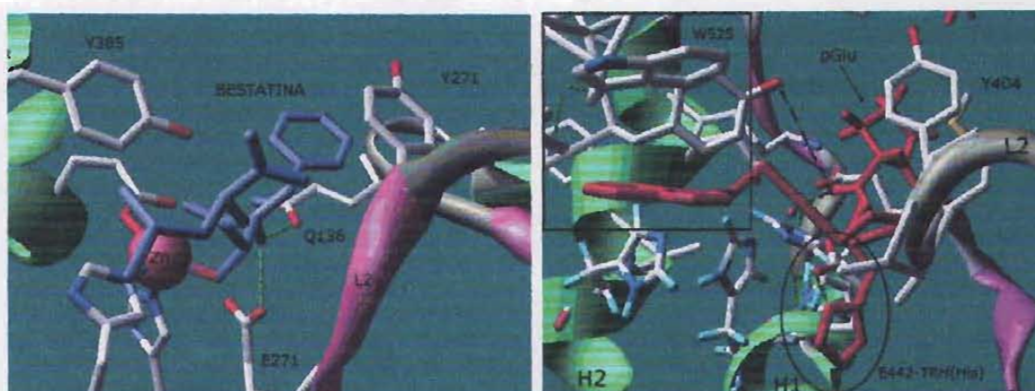


Figura 5. Izq. Sitio activo de la estructura de la LTA4H acomplejada con el inhibidor bestatina (azul). Los residuos Q136 y E271 participan en el reconocimiento del amino terminal del inhibidor a través de puentes de hidrógeno (líneas). Se muestran también a los residuos Y271 y Y385, la primera interaccionando con el anillo fenólico del inhibidor, mientras que la segunda participa en la estabilización del estado de transición. Der. Sitio activo del modelo de PPII con el pGlu-His-Pro-Trp (rojo). El anillo de la Y404 se encuentra a 3.4 Å del anillo del pGlu del TRH. En círculo se encierra al residuo His del TRH, interaccionando con el E442 de la firma catalítica. En un cuadro se enmarca al W525 de la PPII interaccionando con un residuo hidrofóbico en la posición P3' del sustrato.

Por último, hay que destacar que la presencia del TRH en el sitio activo de la PPII o del péptido pGlu-His-Pro-Trp modificó sustancialmente la cadena lateral del W525, alejándolo de la Y528 (no mostrado). El docking del pGlu-His-Pro-Trp sugiere que el W525 interacciona con

residuos hidrofóbicos localizados en la posición P3' del sustrato (Fig. 5), apoyando la idea de la participación del W525 en la conformación del bolsillo hidrofóbico de la PPII.

En el contexto del reconocimiento del amino terminal del sustrato analizamos la posición equivalente a la Q213 (lazo 1) de la APN en la PPII. Según el alineamiento para la familia M1, la S269 de la PPII es contraparte de la Q213 de APN; sin embargo, el docking del sustrato no mostró interacción alguna entre el TRH y la S269. Con respecto al lazo 1, el grupo cetónico del piroglutamil del TRH estableció un puente de hidrógeno con el alcohol de la cadena lateral del residuo T271. Cabe hacer notar que el lazo 1 se encuentra en el extremo N-terminal del modelo de PPII y por lo tanto, su posición pudiera estar afectada por efectos de frontera. La sobreposición de los modelos inicial (previo a las dinámicas moleculares) y final muestra que la T271 sustituyó en el espacio a la S269.

Más allá, la construcción automática de un modelo para los dominios N-terminal y catalítico de la PPII (residuos 132-570) y la sobreposición de este con el modelo de la APN mostró a la PPII-S269 en una posición similar a la APN-Q213. La selección del templado y el modelaje se realizó con el programa CPHmodels 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels>) (Lun et al, 2002).

#### **IV.3.1.2. Identificación de residuos importantes en la función de la PPII.**

La identificación de residuos que pudieran participar en la catálisis y/o especificidad de la PPII, se basó en la inspección de nuestros modelos teóricos, así como en el análisis del alineamiento múltiple para la familia M1 y en la información reportada en la literatura. En los modelos, los residuos fueron seleccionados considerando su localización en el sitio activo así como su conservación en secuencias codificantes para PPII.

Elegimos a la Y332 y a la K463 de la PPII de rata para realizar experimentos de mutagénesis sitio dirigida encaminados a evaluar la participación del E408 (firma de exopeptidasas) en la actividad y/o especificidad de la PPII. Además, incluimos en el análisis experimental al residuo S269, posible contraparte de la Q136 de la LTA4H o E213 en la APA.

Otros residuos seleccionados fueron la H468 y el W525. La H468, fue seleccionada debido a su cercanía con la H441 de la firma catalítica; además, la comparación con el modelo para la APN mostró que en la PPII la H468 sustituye a la H441 en su interacción con el E471. En la selección del W525, consideramos datos bioquímicos reportados para la PPII silvestre sobre el comportamiento de inhibidores, como el pGlu-Asn-Pro-NH<sub>2</sub> y su derivado pGlu-Asn-Pro-7amino-4-metilcumarina. El pGlu-Asn-Pro-NH<sub>2</sub> inhibe a la PPII con una constante K<sub>i</sub> = 17.5 μM, mientras que su derivado lo hace más eficazmente (K<sub>i</sub> = 0.97 μM) (Kelly et al, 2000). Aunado a

Lo anterior, un estudio muy reciente mostró que otros péptidos con estructura pGlu-Asn-Pro-R, donde R es una sustitución hidrofóbica, son buenos inhibidores de la enzima (Kelly et al, 2005). Lo anterior implica la existencia de un “bolsillo hidrofóbico” que favorece la unión de sustratos o inhibidores con C-terminales hidrofóbicos. Basándonos en el análisis teórico para PPII, así como en la posición el sustrato en el sitio activo del mismo, propusimos que el W525 pudiera ser parte de la región hidrofóbica implicada en la afinidad de la enzima.

#### IV.3.2. El diseño de las mutantes y su caracterización bioquímica.

Los residuos S269, Y332, K463, H468 y W525 de la PPII de rata fueron cambiados siguiendo el método “one-step overlap extensión PCR, OE-PCR” (tabla 2) (Urban et al, 1997). En el diseño de las mutantes, siempre se incluyó el cambio del residuo en cuestión por aquel o aquellos presentes en la familia M1; alternativamente, las mutantes fueron diseñadas dando importancia a las propiedades fisicoquímicas de residuo. En total, se han analizado 16 mutantes sencillas y dos dobles.

Para cada una de las mutantes se determinó la actividad específica utilizando como sustratos al TRH-βNA (Fig. 6). Para las mutantes Y332L, Y332F, K463N, K463Q, K463R, K463E, H468Y, H468F, W525R, W525F, S269Q/K463N y S269Q/K463R se verificó también su expresión por Western blot (fusionándolas a 6 residuos histidinas) (Fig. 6; Fig. 3, anexo 2), o en el caso de las mutantes W525F, W525R y K463N fusionándolas a la proteína verde fluorescente (Fig. 7, Fig. 4, anexo 2). Además, para las mutantes Y332L, Y332F, W525R y W525F fueron determinadas sus constantes catalíticas  $K_m$  y  $k_{cat}$ .

MUTANTES SENCILLAS				
S269	Q	E		
Y332	Y	F	R	
K463	N	R	Q	E
H468	S	Y	F	
W525	A	S	F	R
MUTANTES DOBLES				
	S269Q/K463N			
	S269Q/K463R			

Tabla 2. Se muestran los residuos seleccionados para realizar mutagénesis sitio dirigida, así como los cambios realizados. Todos los residuos se localizaron en el sitio activo del modelo de PPII y son específicos de secuencias codificantes para PPII. La mutagénesis fue realizada por el método de Urban et

al, 1997. En gris se marcan los cambios que han sido realizados como parte del proyecto de maestría de Edna Matta.

#### **IV.3.2.1. Identificación de un puente salino en el sitio activo de la PPII y su implicación en la especificidad de la familia M1.**

La predicción teórica sobre la existencia de un puente salino entre los residuos E408 (lazo 2) y K463 (hélice 2) es congruente con datos experimentales publicados sobre mutantes en el E408 (Papadopoulos et al 2001). Para validar la interacción salina, se construyeron y analizaron mutantes en el residuo K463 de la PPII de rata.

El alineamiento múltiple entre miembros de la familia M1 mostró a la K463 conservada en secuencias del tipo PPII, mientras que el resto de la familia M1 tuvo Asn en la posición correspondiente, a excepción de algunas aminopeptidasas bacterianas y de la enzima humana L-RAP que presentaron lisina al igual que la PPII (Fig. 1; Fig. 5 A, anexo 2).

Las mutantes PPII-K463N, K463Q, K463R y K463E, mostraron niveles de expresión similares a los de la enzima control, pero resultaron inactivas cuando se evaluaron frente al TRH- $\beta$ NA (Fig. 3, anexo 2). Exceptuando a la mutante K463R, concluimos que nuestros resultados en conjunto con el análisis mutagénico sobre el residuo E408 (Papadopoulos et al, 2001) validan la existencia de un puente salino en el sitio activo de la PPII; mientras que la inactivación causada por el cambio K463R pudiera ser explicada si el residuo Arg no estableció el puente salino con el glutamato de la firma de exopeptidasas. De hecho, el modelo de la mutante PPII-K463R muestra a la cadena lateral de la R463 alejada del carboxilato de la cadena lateral del E408 y apuntando al solvente (Fig. 5B, anexo 2). Con el objetivo de evaluar esta propuesta decidimos construir la doble mutante S269Q/K463R (ver adelante).

Según nuestras predicciones, la sustitución de la K463 por residuos que no presentan una carga positiva dejaría el carboxilato de la cadena lateral del E408 en una situación similar a la que se encuentra en las aminopeptidasas de la familia M1. Adicionalmente, el cambio S269Q colocaría, en la PPII de rata, al segundo carbonilo involucrado en el reconocimiento del amino terminal de sustratos e inhibidores. Propusimos entonces que el cambio simultáneo en la S269 y K463 de la PPII por los residuos comúnmente encontrados en las aminopeptidasas de la familia (S269Q, K463N), implicaría un cambio en la especificidad de la misma, transformando a la PPII de una *omegapeptidasa* a una *aminopeptidasa*.

Al igual que para las mutantes en la K463, los cambios S269Q, S269Q/K463N o S269Q/K463R resultaron en mutantes con niveles de expresión similares al de la enzima silvestre pero inactivas cuando se ensayaron frente al TRH- $\beta$ NA (Fig 3A, anexo 2) o pGlu- $\beta$ NA (no

mostrado). El docking del TRH en el sitio activo del modelo extendido de la PPII sugirió que la S269 participa en el reconocimiento y unión del piroglutamil, mediante un puente de hidrógeno entre el hidroxilo de su cadena lateral y el grupo cetónico del sustrato; por lo tanto, la inactivación de la mutante S269Q frente al TRH se debe probablemente a problemas estéricos causados por el crecimiento de la cadena lateral en la posición 269 (lazo 1). Los resultados obtenidos utilizando como sustrato al pGlu-βNA fueron los esperados.

Como paso siguiente, las mutantes S269Q, K463N, K463R, K463Q, S269Q/K463N y S269Q/K463R fueron evaluadas frente a Ala-βNA y Glu-βNA, sustratos de las APN y APA, respectivamente. Las actividades específicas de las mutantes no fueron significativamente distintas a las de los controles cuando se utilizó Glu-βNA como sustrato. En cambio, los resultados obtenidos usando Ala-βNA como sustrato mostraron a la doble mutante con una actividad específica mayor a la de los controles (alrededor del 150% de la actividad endógena de células C6). Las mutantes sencillas S269Q y K463N no mostraron diferencias significativas (**Fig 3B y C, anexo 2**). Las actividades específicas que se muestran en las gráficas fueron determinadas en membranas de células C6, transfectadas con EGFP (control), PPII o mutantes de PPII y fueron normalizadas por proteína total (pmol de βNA/min·mg prot); cabe mencionar que las actividades específicas normalizadas por los niveles de expresión de cada una de las proteínas heterólogas mostraron tendencias similares.

Para observar con mayor claridad el cambio de especificidad, utilizamos un inhibidor específico de la APN durante la determinación de la actividad catalítica (**Tieku y Hooper, 1992**). El incremento en la actividad específica observado en las preparaciones membranales de células transfectadas con las mutantes dobles S269Q-K463N o S269Q-K463R se magnificó de manera directamente proporcional a la concentración del inhibidor actinonina. (**Fig. 3B, anexo 2**). El cambio en la especificidad de la PPII, de *omega* a *amino*peptidasa, apoya la existencia de un puente salino entre el E408 y la K463 y sugiere, además, que la interacción carga-carga es necesaria para el reconocimiento del TRH, un sustrato que no presenta un grupo amino terminal libre.

Una búsqueda exhaustiva de secuencias homólogas a la PPII, reveló que más de 150 secuencias bacterianas y una secuencia de mamífero presentan un residuo lisina en la posición correspondiente a la K463 de la PPII de rata; estas proteínas podrían presentar un puente salino similar al descrito en la PPII. Entre ellas encontramos a la enzima PepN de *E. coli* y a la L-RAP de humano. Reportes sobre la actividad y especificidad de la PepN de *E. coli*, confirman su acción sobre una amplia gama de péptidos con amino terminal libre (**Chandu y Nandi, 2003; Chandu et al, 2003**). Por otra parte, en el humano han sido reportadas dos secuencias

codificantes para la enzima L-RAP, que varían en longitud y en el residuo 392, correspondiente a la K463 de PPII. Las secuencias presentan asparagina o lisina (L-RAP-Asn392, L-RAP-Lys392) y solo la primera ha sido caracterizada experimentalmente como una arginil *amino*peptidasa (Tanioka et al, 2003).

El modelaje del dominio catalítico de la L-RAP-Lys392 de humano, basado en la estructura de la LTA4H, sugirió una alternativa a la existencia de un puente salino entre la K392 (hélice 2) y el Glu de la firma de exopeptidasas (Glu337, lazo 2). El modelo mostró una interacción entre la K392 de la hélice 2 y el E200 del lazo 1 (equivalente a la S269 en PPII), quedando sin neutralizar la carga del glutamato de la firma de exopeptidasas, necesario para la actividad de aminopeptidasas (Fig. 5B, anexo 2).

El alineamiento de secuencias bacterianas que presentan lisina en la posición análoga a la K463 de PPII (más de 150 secuencias), homólogas a las aminopeptidasas M1 de mamíferos, mostró que la presencia de Lys en la hélice 2 esta siempre acompañada por Glu en el lazo 1. En cambio, las secuencias codificantes para la PPII presentaron Lys y Ser en la hélice 2 y el lazo 1, respectivamente (Fig. 5A, anexo 2).



#### IV.3.2.2. Otros residuos que afectan la actividad enzimática de la PPII.

Las otras mutantes fueron analizadas utilizando al TRH-βNA como sustrato. La expresión de estas fue determinada mediante su fusión a 6x-His o a GFP, el análisis por Western blot mostró en todos los casos un patrón similar al de la enzima silvestre. Además, en el análisis por microscopía de las fusiones PPII-W525F-EGFP y PPII-W525R-EGFP, expresadas en la línea celular C6, no se observaron diferencias con respecto a la distribución de la PPII-EGFP (Fig. 7).

La figura 6 muestra las actividades específicas determinadas en células COS-7, transfectadas con las construcciones pN3-rPPII o pN3-rPPII-mutante, expresadas como porcentaje de la enzima silvestre y normalizadas por proteína total. También se indican las constantes cinéticas determinadas para las mutantes en la Y332 y para las mutantes W525R y W525F.

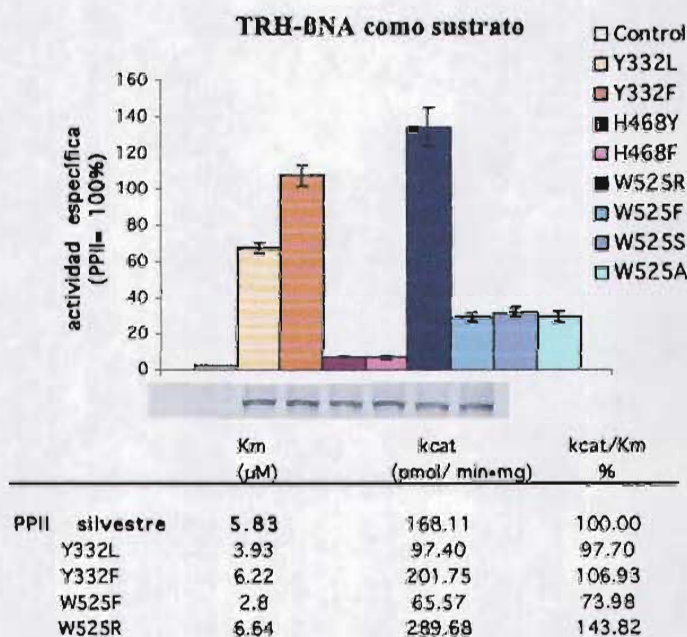
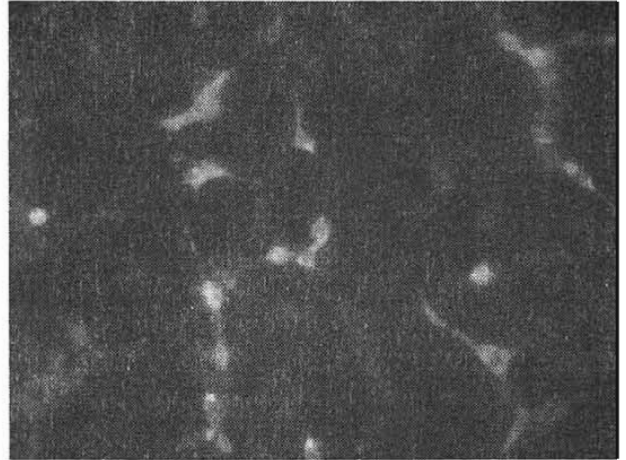
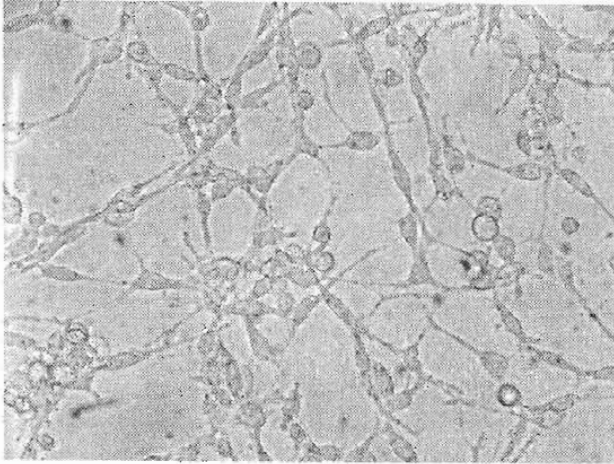


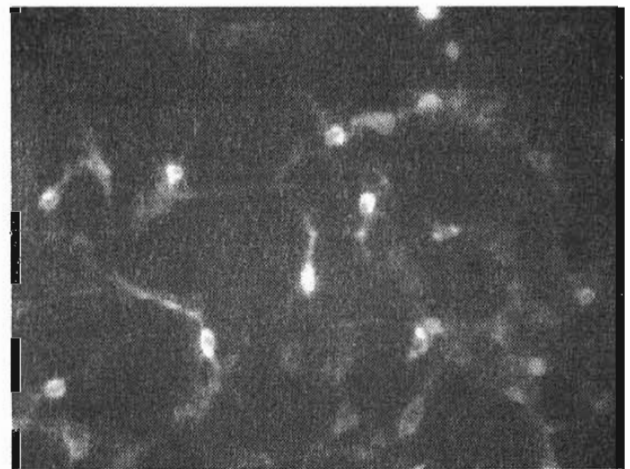
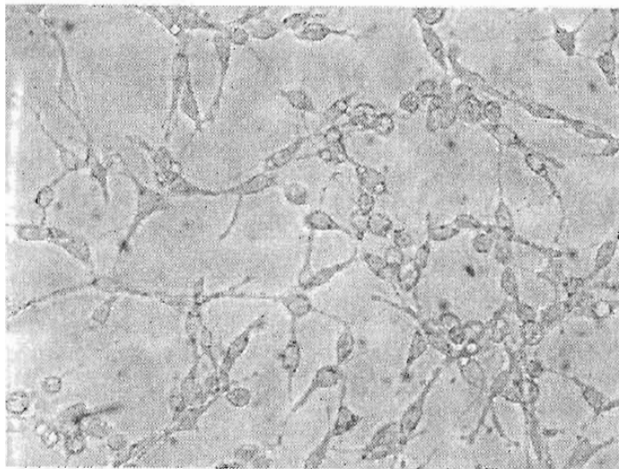
Figura 6. Actividades específicas determinadas en membranas de células COS-7, transfectadas con EGFP (control), PPII o mutantes de PPII, usando TRH-βNA como sustrato. Las actividades se normalizaron por proteína total ( $\text{pmol}/\text{min}\cdot\text{mg}$  prot) y se muestran como porcentajes de la actividad específica de la PPII silvestre  $\pm$  error estándar,  $n=9$  en tres experimentos independientes, excepto para las mutantes W525S y W525A donde  $n=6$  en dos experimentos independientes. En el panel inferior a la gráfica: Western blot de membranas de células COS-7 transfectadas con las mutantes fusionadas a 6X-His, W525A y W525S no se muestran. En la tabla, se muestran las constantes catalíticas determinadas para el TRH-βNA;  $n=3$ . Las eficiencias catalíticas se indican como porcentaje del valor para la enzima silvestre.



PPII-GFP



PPII-W525F-GFP



PPII-W525R-GFP

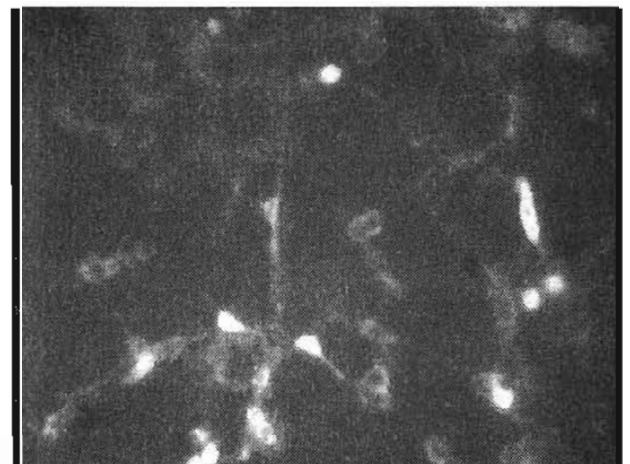
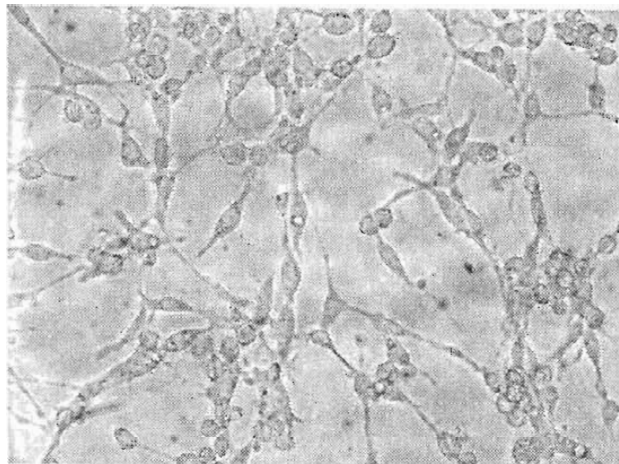


Figura 7. Transfecciones de células C6 con vectores que expresan a la PPII silvestre o mutante fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP). Izquierda: campo claro; Derecha: fluorescente. Magnificación :40X

#### IV.3.2.2.1. La Y332.

La Y332 se localizó, en el modelo teórico para la PPII, sobre un lazo que se aproxima al lazo 2 (firma de exopeptidasas). El alineamiento múltiple para las aminopeptidasas de la familia M1 mostró que este residuo corresponde, en las aminopeptidasas M1, a una leucina completamente conservada (L279 en APN) (Fig. 1). Por otra parte, el modelaje de la PPII con el sustrato TRH sugirió un posible puente de hidrógeno entre la Y332 y el E408 (sección IV. 3.1.1.).

Las mutantes Y332L y Y332F mostraron variaciones del 70 y 110 % de la actividad específica de la enzima silvestre, con cambios en  $K_m$  y  $k_{cat}$  muy modestos (Fig. 6); sin embargo, llama la atención el incremento en la  $k_{cat}$  mostrado por la mutante Y332F (52%) con respecto al de la enzima silvestre; así como su comportamiento frente al sustrato TRH[Phe]- $\beta$ NA (Fig. 8). Lo datos bioquímicos para este residuo muestran que su participación en la catálisis no es preponderante, aunque sugieren que la pérdida del grupo hidroxilo del anillo fenólico facilita la catálisis.

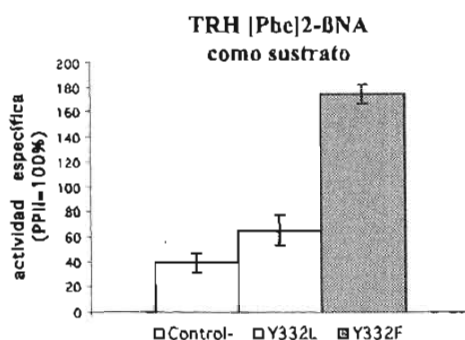


Figura 8. Actividades específicas determinadas en membranas de células COS-7, transfectadas con EGFP (control), PPII o mutantes de PPII, usando TRH- $\beta$ NA como sustratos. Las actividades específicas se normalizaron por proteína total (pmol/min·mg prot) y se muestran como porcentaje del valor de la enzima silvestre  $\pm$  error estándar; n=4, en dos transfecciones independientes.

#### IV.3.2.2.2. El W525.

Las actividades específicas determinadas para las mutantes en el W525 muestran que el cambio W525R es el único que puede sustituir apropiadamente a la cadena original, mientras que cambios a Phe, Ala o Ser producen enzimas con actividades disminuidas en igual proporción. Las constantes catalíticas para las mutantes W525R y W525F indican que los cambios se deben principalmente a cambios en la  $V_{max}$ . Sin embargo, la comparación entre las mutantes muestra

una diferencia de más de dos veces en la  $K_m$ . De manera contraria a lo que se esperaría dadas las propiedades fisicoquímicas de las cadenas sustitutas, la mutante W525R lleva cabo la catálisis mejor que la enzima silvestre y en contraste, la mutante W525F tiene una eficiencia catalítica disminuída (**Fig. 6**).

El modelo teórico para la PPII mostró al W525 localizado sobre uno de los extremos de la hélice 3, que presenta al residuo Y528 involucrado en el estado de transición (**Fig. 9B**). El W525 se localizó en una zona accesible al solvente, en donde interaccionan cuatro hélices, entre las cuales se encontraron las tres que conforman el sitio activo. A diferencia del modelo teórico para la APN, estas hélices interaccionaron en la PPII a través de varios puentes salinos, entre ellos el E471-R488 que se discutirá más adelante. Hay que mencionar que uno de los lazos que conecta a este conjunto de hélices (hélice 3 y hélice 4) presentó a la H507, un residuo conservado en la familia M1 y correspondiente a la H450 en la APA, que ha sido involucrado en la regulación de la especificidad del sitio S1 en conjunto con  $Ca^{2+}$  (**Iturrioz et al, 2000**).

La sustitución W525R en el modelo teórico para el dominio catalítico, seguido de dinámicas moleculares, mostró que la R525 establece un puente salino con el E496 (hélice 4), un residuo que en el modelo de la PPII silvestre se encontró interaccionando con el solvente (**Fig. 9 B**). La inspección de la estructura de la LTA4H de humano, en particular de los residuos S380 y E348, correspondientes al W525 y al E496 de la PPII, muestra a la S380 a 5 Å del carboxilato E348, de manera que la sustitución S380R podría generar un nuevo puente salino al igual que en la PPII (no mostrado). Hay que destacar que el E348 está ya participando en una serie de interacciones iónicas con cadenas laterales de la región carboxilo terminal de la LTA4H, entre las que se encuentra la R563 y la K565.

De manera interesante, la presencia del TRH en el sitio activo del modelo de PPII causó el movimiento de la cadena lateral del W525, alejándolo de la Y528 que participa en el estado de transición. De la misma forma, la presencia del sustrato pGlu-His-Pro-Trp modificó de manera importante la posición de este residuo (no mostrado).

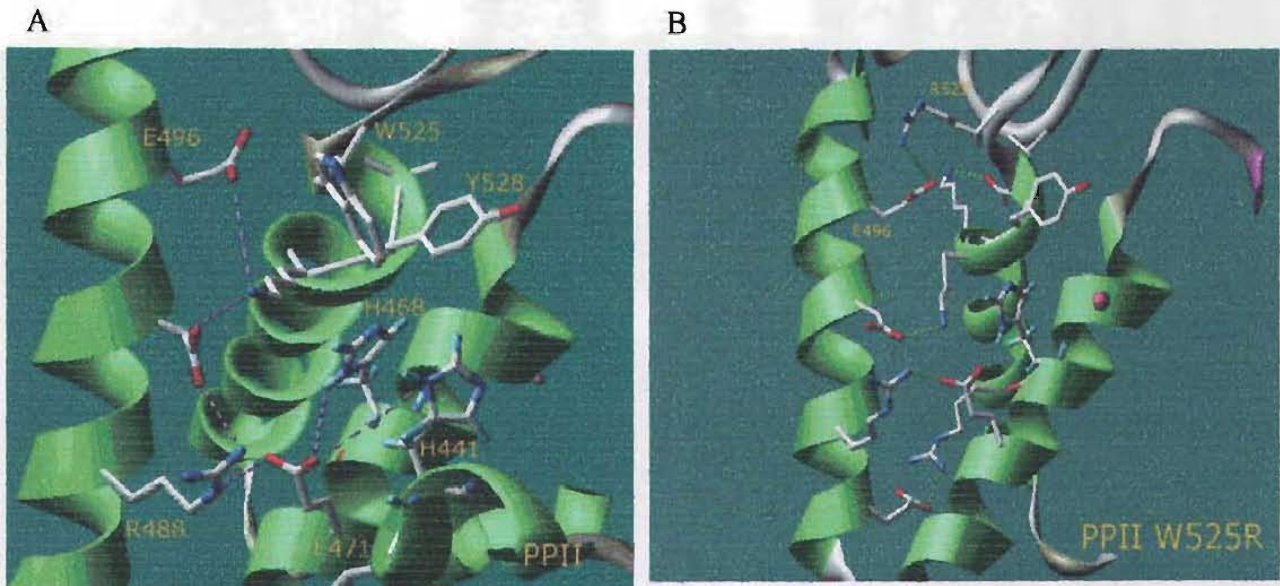


Figura. 9 A: Izquierda: Modelo inicial de la PPII antes de las dinámicas moleculares. La H441 interactúa a través de un puente de hidrógeno (línea punteada verde) con el E471, una vez iniciadas las dinámicas moleculares el E271 y la R488 se aproximaron para establecer un puente salino (flechas). Derecha: Durante las dinámicas moleculares la H468 sustituye a la H441 en su interacción con el E471. En amarillo se muestra el modelo inicial después de 200 ps de dinámica molecular y en colores las cadenas laterales 400 ps después. B: Izquierda: El modelo teórico para la PPII muestra un puente de hidrógeno entre la H468 y el E471. Además, sugiere la existencia de un puente salino entre el E471 y la R488, así como de otras interacciones salinas entre las hélices que presentan a la R488 y a la Y528 (hélice 3 del sitio activo). Se muestran también las cadenas laterales del W525 y el E496. Derecha: Mutante PPII-W525R, el modelo para esta mutante muestra a la cadena lateral de la R525 en puente salino con el E496.



#### IV.3.2.2.3. La H468.

Los datos experimentales para las mutantes en la H468 indican que este residuo juega un papel preponderante en la función de la enzima (Fig. 6); incluso, la disminución en las actividades catalíticas de las mutantes nos ha impedido la determinación de las constantes catalíticas.

En la familia M1 la posición análoga a la H468 esta ocupada por serina (APN, APA, PSA), treonina (AP1 y AP2), asparagina (APN bacterianas), lisina (L-RAP y A-LAP) o arginina (APN bacterianas) (Fig. 1). La H468 se encontró localizada, en el modelo teórico, sobre la hélice 2 que conforma el sitio activo, en el extremo opuesto a la K463, interaccionando por medio de un puente de hidrógeno con el E471, que a su vez esta en puente salino con la R488 (Fig. 9 y 10). El E471 de la PPII se encontró conservado en la mayoría de los miembros de la familia M1 y correspondió al E325, E418 y E415 de LTA4H, APN y APA, respectivamente. La inspección de los modelos teóricos mostró que el E471 se encuentra en puente salino solamente en la PPII debido a que la R488 es específica de la *omegapeptidasa*. En el modelo para el dominio catalítico de la APN, la posición correspondiente a la H468 de PPII estuvo ocupada por la S415; al igual que la H468, la S415 interaccionó por puente de hidrógeno con el E418. El E418 estableció a su vez un puente de hidrógeno con la primera histidina de la firma catalítica HEXXH..E (Fig. 10).

Por lo tanto, mientras que el modelo para la APN propone una interacción entre el E418 y la H388 de la firma catalítica, el modelo para el dominio catalítico de PPII sugiere que la H468 sustituye a la H441 de la firma catalítica (<sub>441</sub>HEXXH..<sub>E464</sub>) en la interacción con el residuo ácido. Incluso, el análisis de la evolución del modelo de PPII, mostró el movimiento de la cadena lateral del E471, de una posición inicial en la cual interacciona con la H441 (firma catalítica) a la posición en la que interacciona con la H468 (Fig. 9). Este movimiento se debió, en gran parte, al establecimiento del puente salino entre el E471 y la R488.

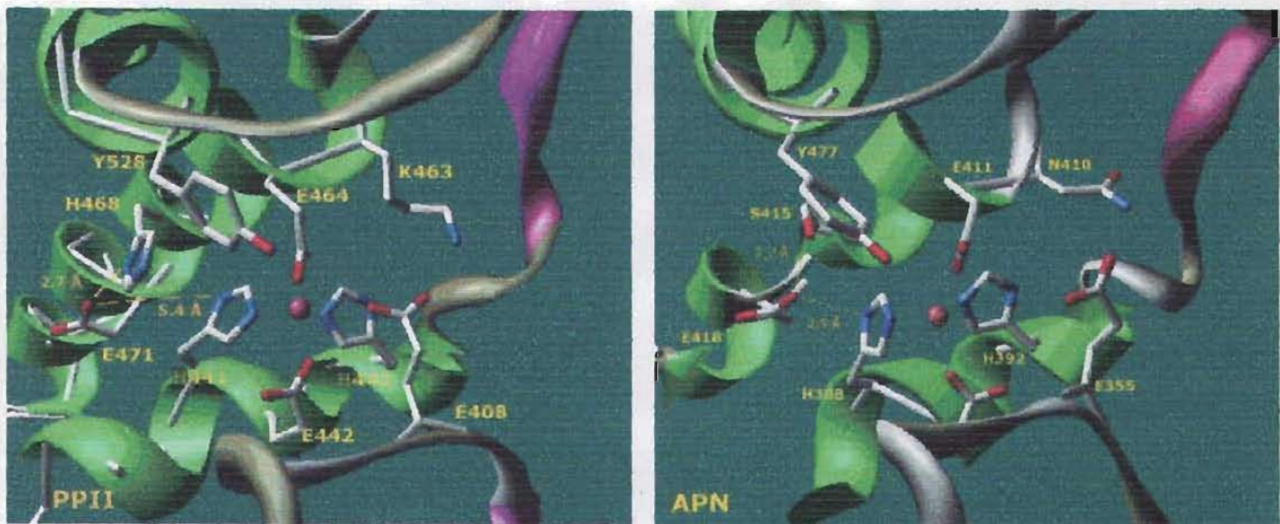


Figura 10. Sitios activos de los modelos de PPII y APN, destacando las posiciones y las distancias entre las cadenas laterales de los residuos H441, H468 y E471 de la PPII o sus equivalentes en la APN: H388, S415 y E418.

## V. DISCUSIÓN

La elucidación de la estructura de la LTA4H de humano abrió la posibilidad de realizar estudios sobre la estructura función en la familia M1 de las metalopeptidasas. La conservación en la secuencia aminoacídica de los miembros de esta familia indica que los dominios N-terminal y catalítico de la LTA4H pueden ser utilizados como estructuras templado en el modelaje de otros miembros de la familia M1; además, la similitud entre el dominio catalítico de la LTA4H y la termolisina sugiere que el clan MA mantiene el mismo plegamiento en su región catalítica y permite entonces considerar en el análisis de la familia M1, datos reportados para la endopeptidasa u otros miembros del clan MA.

La estructura de la LTA4H muestra al dominio catalítico conectado al dominio C-terminal por un lazo expuesto al solvente y poco estructurado. El alineamiento de las regiones C-terminales de miembros de la familia M1 las muestra divergentes en secuencia y longitud. Sin embargo, el programa ModWeb reconoció a la estructura del dominio C-terminal de la LTA4H como el plegamiento de una parte de la región C-terminal de la PPII ( $C_A$ ). Cabe mencionar que el alineamiento, entre las secuencias de la LTA4H y la PPII, muestra mayor similitud entre el dominio C-terminal de la LTA4H y la región  $C_B$  de la PPII; lo anterior sugiere que la región C-terminal de la PPII y probablemente también de la APN, se originó por la duplicación de un dominio. Como siguiente paso se propone el modelaje de las regiones  $C_A$  y  $C_B$  de la PPII utilizando como templado al dominio C-terminal de la LTA4H.

Al igual que lo reportado para las *amino*peptidasas M1 truncadas en el lazo A, la PPII sin la región  $C_B$  es inactiva. La carencia de actividad en la formas truncadas en el lazo B pudiera deberse a la falta de una función de tipo chaperona atribuida a la región C-terminal al lazo A en la APA y APN (Rozenfeld et al, 2004). Suponiendo que la región C-terminal de la PPII funciona también como chaperona, estos resultados pueden interpretarse de maneras diferentes: la región  $C_A + C_B$  es necesaria para la activación o bien, la función de chaperona la lleva a cabo la región  $C_B$  y por lo tanto, su delección es suficiente para evitar la activación.

La existencia de una forma corta natural de la PPII (PPII\*) y la naturaleza dimérica de la misma, nos llevo a analizar la posibilidad de una interacción con la enzima silvestre y su significado biológico. Encontramos que la PPII\* funciona como dominante negativa de la PPII silvestre y el mecanismo propuesto fue la heterodimerización no funcional.

De los aspectos importantes en el estudio de la forma truncada PPII\* por evaluar resalta su comportamiento *in vivo*. Para ello, un primer acercamiento sería la expresión de la PPII\* en líneas celulares que presentan actividad endógena de PPII; así como el análisis de su expresión en tejidos, en particular en el cerebro.

Como parte del estudio del mecanismo de inactivación de la enzima silvestre por heterodimerización llevamos a cabo co-transfecciones PPII, PPII-K463N a diferentes relaciones molares; sorprendentemente, la mutante inactiva mostró un comportamiento similar a las formas truncadas (**Fig. 11**). Lo anterior puede explicarse si la mutante inactiva K463N tiene un plegamiento anómalo; sin embargo, la actividad catalítica mostrada por las dobles mutantes S269Q/K463N y S269Q/K463R frente a Ala-βNA contradice esta idea.

Considerando la naturaleza dimérica de la enzima, nuestros datos implican que cambios en uno de los sitios activos afectan la actividad del otro monómero, sugiriendo que los dominios catalíticos interaccionan íntimamente; alternativamente, pueden significar que la enzima es activa solo en estado dimérico. Hay que recordar que algunas metalopeptidasas del clan MA funcionan con dos iones metálicos actuando co-catalíticamente (**Barrett et al, 1998**).

Los resultados en conjunto implican que la inactivación de la enzima silvestre por la PPII\* u otras enzima truncadas artificialmente en el lazo B, se debe a la interacción del dominio “catalítico” de la PPII\*. Es decir, proponemos que el mecanismo de acción de las dominantes negativas de PPII, PPII\* y PPII-K463N, es la heterodimerización no funcional entre los dominios catalíticos. Sin embargo, no es posible plantear un mecanismo molecular para este proceso.

La expresión natural de otras formas truncadas, para la familia M1, plantea la posibilidad de que se trate de un fenómeno regulatorio general y la expresión artificial de estas formas truncadas podría ser una herramienta útil en el estudio de su función.

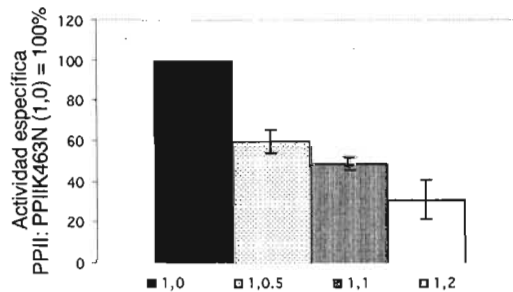


Fig. 11 Efecto de la co-expresión de la mutante His-PPII-K463N con la His-PPII silvestre a diferentes relaciones molares, realizada en cultivos de células gliales C6. Condiciones 1,0; 1,0,5; 1,1 y 1,2: 3µg del vector de expresión pcDNA3.1/HisA-PPIIr con 0, 1,5, 3 y 6 µg de pcDNA3.1/HisA-PPII-K463N, respectivamente. En todos los casos, 10 µg totales de DNA ajustados con el vector pN3EGFP. Actividades específicas medias como porcentajes de la condición 1,0 ± desviación estándar. n=6 de tres transfecciones independientes, excepto para la condición 1,0,5 en la cual n=4 de dos transfecciones independientes



El estudio de la relación entre la estructura y la función en el sitio activo de la PPII nos llevó al modelaje de los dominios catalíticos de la PPII y de la APN utilizando a la estructura de la LTA4H como template. Estos modelos fueron cruciales en la selección de residuos que pudieran estar implicados en la función de la *omega*peptidasa, así como en la interpretación de los resultados experimentales derivados de la mutagénesis. Como primer paso, para validar nuestros modelos, decidimos comparar los datos bioquímicos reportados para la familia M1 con nuestras propuestas estructurales. Encontramos a todos los residuos hasta ahora involucrados en la catálisis, a excepción de la H507 de PPII (H453 de APN) que será discutida más adelante, posicionados sobre tres hélices entrecruzadas de una manera similar a la LTA4H. Mientras que mutaciones sitio dirigidas sobre los residuos PPII-Y554, PPII-R488 o APN-E265, localizados lejos del sitio activo y en la superficie de los modelos teóricos, no afectan la función de las enzimas (Papadopoulos et al, 2001; Luciani et al, 1998).

En los sitios activos de los modelos observamos diferencias importantes en la coordinación del metal. La esfera de coordinación en la APN esta acorde con los datos publicados: tres de los ligandos se encuentran en la proteína y el cuarto ligando es el agua. En contraste, en la PPII el E442 de la firma catalítica (HEXXH...E) sustituyó a la molécula de agua en la interacción con el metal; si bien este comportamiento puede ser característico de la PPII, en este momento no contamos con datos experimentales para validar o descartar esta predicción.

Una diferencia importante entre los modelos de PPII y APN es la neutralización de la carga negativa del carboxilato del E408 de la firma de exopeptidasas de la PPII; este puente salino se encuentra en el sitio activo del modelo y dada su cercanía con el E442 podría explicar las diferencias en el estado de coordinación entre la *omega* y la *amino*peptidasa.

El análisis del alineamiento múltiple, entre mas de 300 miembros de la familia M1, mostró que las secuencias tipo PPII presentan siempre Lys en la hélice 2 acompañada de Ser en el lazo 1. En cambio, las *amino*peptidasas de la familia presentan Gln/Glu en el lazo 1 y Asn en la hélice 2 o alternativamente, Glu en el lazo 1 y Lys en la helice 2.

Siguiendo en el análisis del lazo 1, la interacción propuesta entre el piroglutamil del TRH y la S269 de la PPII nos sugiere que la retracción de la cadena lateral del residuo 269, de Glu/Gln en las *amino*peptidasas a Ser en secuencias codificantes para PPII, correlaciona con la presencia de pGlu en el N-terminal del sustrato (Fig. 6, anexo II). Bajo este supuesto, los resultados obtenidos para la mutante PPII-S269Q se explican como el resultado de problemas estéricos en el reconocimiento y unión del sustrato. Sin embargo, para confirmar nuestra hipótesis será necesario la determinación experimental de la unión del TRH a la mutante S269Q.

Proponemos como siguiente paso en el análisis de la especificidad de la familia M1, la construcción y caracterización bioquímica de la mutante S269E de la PPII. Según nuestra predicción, el cambio propuesto dejaría una configuración similar a la encontrada en la L-RAP de humano cambiando la especificidad de la PPII de *omega* a *amino*peptidasa, con la mutación de un solo residuo.

Nuestros resultados sobre el residuo K463 y los datos publicados para el E408 indican que la carga y la distancia de las cadenas laterales son cruciales para la actividad de la enzima. Datos bioquímicos para la mutante E408D muestran que la eficiencia catalítica es 30 veces menor debido a cambios en la  $k_{cat}$ , mientras que la unión del sustrato TRH se lleva a cabo con una ligera disminución en la afinidad de la mutante. Sin embargo, las constantes inhibitorias determinadas utilizando a los inhibidores pGlu-His(3Me)-Pro-NH<sub>2</sub> y pGlu-Asn-Pro-NH<sub>2</sub> mostraron incrementos de 1.4 y 8.2 veces con respecto al valor de la enzima silvestre, respectivamente (**Papadopoulos et al, 2001**). De hecho, el inhibidor pGlu-Asn-Pro-NH<sub>2</sub> ( $K_i = 5.33 \mu\text{M}$  para la enzima silvestre) mostró valores similares de  $K_i$  al pGlu-His(3Me)-Pro-NH<sub>2</sub> ( $K_i = 54 \mu\text{M}$  para la enzima silvestre) cuando se probó frente a la mutante E408D. El análisis de los datos anteriores indica que el acortamiento de la cadena lateral en la posición 408 de la PPII (lazo 2) afecta notoriamente la catálisis y en menor medida la afinidad de la enzima. Además, sugiere que el cambio E408D afecta la afinidad de la enzima debido probablemente a cambios en el sitio S1' de la enzima.

Según nuestro modelo teórico para la interacción PPII-TRH, el sitio S1' podría estar localizado entre el lazo 2 y la hélice 1 de la PPII; incluso, nuestros resultados preliminares sugieren una interacción entre el residuo histidina del TRH y el E442 de la firma catalítica de la PPII, presente en la hélice 1 (**Fig. 4**). La interacción salina entre el E408 y la K463 implica al lazo 2 y a la hélice 2 del sitio activo y entre estas estructuras se encuentra la hélice 1 que contiene al E442; por lo tanto, el puente salino E408-K463 podría estar involucrado en la conformación del sitio S1' de la enzima. En conclusión, proponemos que en una enzima cuyo sustrato no presenta un grupo NH<sub>3</sub><sup>+</sup> terminal, el puente salino E408-K463 no solo implica la neutralización del glutamato de la firma de exopeptidasas, sino que además podría estar relacionado con la alta especificidad que caracteriza a la PPII por el residuo P1' del sustrato. Sin embargo, esta hipótesis necesitará de un análisis cuidadoso de la especificidad de las mutantes E408D y E442D, así como de ensayos experimentales para determinar la unión de sustratos en las mutantes en la K463.

Por otra parte, la inspección del modelo para PPII con el TRH en el sitio activo sugiere, para la Y332, una interacción por puente de hidrógeno con el E408. Tomando en cuenta que la

mutante E408D afecta notablemente la  $k_{cat}$  de la PPII, proponemos que los cambios observados para las mutantes Y332L y Y332F se explican a través de su posible interacción con el E408. El incremento en la  $k_{cat}$  de la Y332F indica que la pérdida del puente de hidrógeno facilita la catálisis y sugiere también que la presencia del anillo fenólico es importante, probablemente por efectos sobre el empaquetamiento de la cadena lateral del residuo Y331 (no mostrado).

La disminución en las actividades específicas de las sustituciones W525F, W525A y W525S indica que el tamaño del residuo sustituto es muy importante, sugiriéndonos que la interacción hidrofóbica en esta zona juega un papel preponderante. El análisis del modelo teórico para la PPII, muestra en la zona del W525, a cuatro hélices interaccionando; aunque tres de ellas conforman al sitio activo de la enzima, la posición del residuo W525 sugiere que su participación en la función no es debida a un efecto directo sobre la catálisis. Por su parte, el modelo teórico para la mutante W525R sugiere que el incremento en la actividad específica se debe a la creación de un puente salino entre el E496 y la R525; proponemos que la nueva interacción salina compensa la pérdida de la fuerza hidrofóbica causada por la mutación. Es interesante encontrar al residuo análogo al E496 de PPII, el E348 en la LTA4H interaccionando con las cadenas laterales de los residuos R563 y K565 de la región carboxilo terminal puesto que el estudio de la relación estructura función para estos residuos los propone como sitios de reconocimiento para el carboxilo terminal de los sustratos (**Rudberg et al, 2004**); estos resultados apoyan nuestra hipótesis sobre la posible interacción entre el W525 de la PPII y residuos hidrofóbicos presentes en el C-terminal de inhibidores o sustratos. Para determinar si este residuo forma parte del bolsillo hidrofóbico involucrado en la afinidad de la enzima, proponemos evaluar a las mutantes en el W525 frente a inhibidores que presentan grupos hidrofóbicos en su carboxilo terminal.

Tanto el W525 como la H458 se encuentran localizados en la región que conecta a las hélices 2 y 3 del sitio activo; en esta zona interaccionan cuatro hélices y tres de ellas conforman al sitio activo de la enzima. Sobre unos de los lazos que conectan a este conjunto de hélices encontramos a la H507, que ha sido relacionada en la APA con la regulación de la especificidad de la enzima de manera dependiente de  $Ca^{2+}$  (**Iturrioz et al, 2000**). La comparación del sitio activo de la PPII con el sitio activo de la estructura de la termolisina, muestra que la región correspondiente interviene en la termolisina en la unión a  $Ca^{2+}$  y por tanto en la estabilidad térmica de la endopeptidasa. En la PPII, una enzima que no es dependiente de calcio, los cambios H507F o H507R afectan principalmente la  $k_{cat}$  de la enzima, produciendo mutantes con eficiencias catalíticas reducidas 15 y 5 veces con respecto al control; mientras que las  $K_i$  frente al inhibidor pGlu-SH se incrementan 10 y 8.5 veces, respectivamente (**Papadopoulos et al,**

2001). Aunque los efectos de cambiar este residuo no son tan drásticos en PPII como en APA, los datos reportados en la familia sugieren que esta zona podría estar involucrada en la estabilización del estado de transición.

De los resultados obtenidos para las mutantes de PPII en la H468 podemos concluir que la afectación en las actividades específicas no es el resultado de problemas en la expresión. Por otra parte, la comparación de los modelos teóricos para PPII y APN, mostró que la H468 sustituye a la H411, primera histidina de la firma catalítica, en su interacción con el residuo E471 y sugiere que esta interacción podría estar involucrada en el comportamiento observado para las mutantes en el residuo H468 de PPII. Hay que mencionar que a diferencia de las mutantes en la H468 de PPII, la mutante S408A de APA de ratón (residuo correspondiente a la H468 de la PPII) no produce efecto alguno sobre la catálisis de la enzima (Vazeux et al, 1998).

La interacción entre un residuo ácido y la primera histidina de la firma catalítica esta conservada entre miembros de la familia M1 y también dentro del clan MA. Por ejemplo, la estructura de la LTA4H muestra a los residuos E325 y H295 correspondientes al E471 y la H441 de PPII en puente de hidrógeno; del mismo modo, el modelo publicado para la APA de ratón muestra una interacción entre el E415 y la H385 (Thunnissen et al, 2001; Rozanfeld et al, 2002). Dentro del clan MA, las estructuras de la termolisina y de la neprilisina (NEP; EC 3.4.24.11) muestran a la primera histidina de la firma catalítica interaccionando con los residuos D170 y D650, respectivamente. En estos dos últimos casos, se propone que la interacción entre el grupo ácido y la histidina favorece la coordinación de la misma, no solo porque la posiciona correctamente sino también por un efecto electrónico que fortalece el enlace de coordinación (Matthews, 1988; Oefner et al, 2000). Sin embargo, datos bioquímicos para la enzima convertidora de angiotensina I (ACE; EC 3.4.15.1), que presenta el grupo ácido en su secuencia (D991), no aclaran el mecanismo de participación del mismo en la catálisis. La mutante D991A muestra una disminución de 22 veces en su  $k_{cat}$  con respecto a la enzima silvestre sin cambios significativos en su  $K_m$ ; sin embargo, la  $K_i$  de la mutante frente el inhibidor trandolaprilato, un quelante específico de la ACE, se incremento 29 veces con respecto a la enzima silvestre (Williams et al, 1994).

Una vez mas, los datos anteriores sugieren que la zona en la cual se localizan los residuos H468, H507 y W525 es importante en la función de la enzima y apuntan a que los efectos de las mutantes podrían explicarse a través de un mecanismo común; sin embargo, con los datos experimentales actuales no es posible establecer una relación funcional para estos residuos.

## VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En conclusión, este estudio sobre la estructura y función de la PPII sugiere, al igual que lo reportado para la APN y APA, que la región C-terminal de la PPII esta involucrada en la activación del dominio catalítico. Además, los datos resultantes de las co-expresiones de la PPII\* o de la mutante inactiva PPII-K463N con la enzima silvestre implican que la dimerización de un dominio catalítico no funcional con el dominio catalítico de la enzima activa tiene consecuencias sobre la función del dímero, sugiriendo la participación conjunta de los dominios catalíticos durante la catálisis. Para evaluar la importancia de la dimerización no covalente en el mecanismo catalítico de la PPII sería interesante evaluar el efecto de otras mutantes sobre la enzima silvestre; En este sentido, resulta especialmente interesante investigar el efecto de la mutante PPII-S269Q/K463N, debido a que esta activa pero con un mecanismo de reconocimiento del sustrato diferente; así como el efecto de mutantes sobre el W525 puesto que nuestros resultados sugieren que participa en la estabilización del estado de transición de la PPII.

Los estudios llevados a cabo sobre residuos presentes en el sitio activo mostraron la utilidad de los modelos teóricos para la PPII y la APN en el estudio de los mecanismos catalíticos y de reconocimiento del sustrato. En particular, las mutantes sobre la S269 y la K463 generaron información sobre la relación estructura-función de la PPII y permitieron sustentar el cambio en la especificidad entre la *omegapeptidasa* y las *aminopeptidasas* M1.

Un paso siguiente, en el estudio de la especificidad de la PPII, sería mejorar la propuesta teórica para la interacción de la PPII con el TRH basados en la confrontación del modelo teórico PPII-TRH con los datos experimentales generados durante este proyecto. Además, el modelaje de la interacción de la PPII con inhibidores como el pGlu-Asn-ProAMC o el pGlu-Asn-Pro-Tyr-Trp-Trp-AMC, sería una herramienta útil en el estudio del efecto inhibitorio.

Por otra parte, el modelaje de la interacción APN-sustrato, podría ser muy útil en la identificación el subsitio S1 de la enzima y en la elucidación del mecanismo de reconocimiento de la cadena lateral del residuo aminoterminal (P1) de los sustratos, un tema pendiente en el estudio de la estructura función de las metalopeptidasas M1.

## VI. REFERENCIAS

1. Albiston, A.L., Ye, S., y Chai, S.Y. (2004) *Protein Pep. Lett.* **11**, 491-500.
2. Aurich-Costa, J., Cadel, S., Gouzy, C., Foulon, T., Cherif, D. y Cohen, P. (1998) *Cytogenet. Cell Genet.* **79**(1-2),143-144.
3. Barnes, K., Kenny, A.J. y Turner, A.J. (1994) *Eur. J. Neurosci.* **6**, 531-537.
4. Barnes, K., Matsas, R., Hooper, N.M., Turner, A.J. y Kenny, A.J. (1988) *Neuroscience* **27**, 799-817.
5. Barrett, A.J., Rawlings, N.D., y Woessner, J. F. (1998) **Handbook of Proteolytic Enzymes**, Academic Press, San Diego, CA, USA
6. Bauer, K. (1988) *Biochimie* **70**, 69-74.
7. Bauer, K. (1994) *Eur. J. Biochem.* **224**, 387-396.
8. Bauer, K., Carmeliet, P., Schulz, M., Baes, M. y Deneff, C. (1990) *Endocrinology* **127**, 1224-33.
9. Bauer, K., Heuer, H., Ifflander, F., Peters, A., Schmitmeier, S., Shomburg, L., Turwitt, S., y Wilkins, M. (1997) **In Cell-Surface Peptidases In Health And Disease**, Kenny, A.J., y Boustead, C.M., eds., pp. 239-248, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK.
10. Blomster, M., Wetterholm, A., Mueller, M.J., y Haeggstrom, J.Z. (1995) *Eur. J. Biochem.* **231**, 528-534.
11. Brooke, M.H. (1989) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **553**, 422-430
12. Cadel, S., Pierotti, A.R., Foulon, T., Créminon, C., Barré, N., Segrétain, D. y Cohen, P. (1995) *Mol. Cell. Endocrinol.* **110**, 149-160.
13. Cao, J., O'Donnell, D., Vu, H., Payza, K., Pou, C., Godbout, C., Jakob, A., Pelletier, M., Lembo, P., Ahmad S. et al. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 32281-32287
14. Chandu, D. y Nandi, D. (2003) *Microbiology* **149**, 3437-47.
15. Chandu, D., Kumar, A. y Nandi, D. (2003) *J. Biol.. Chem.* **278**, 5548-5556.
16. Charli, J. L., cruz, C., Vargas, M. A., y Joseph-Bravo, P. (1988) *Neurochem.Int.* **13**, 237-242
17. Charli, J. L., Mendez, M., Vargas, M. A., Cisneros, M., Assai, M., Joseph-Bravo, P., y Wilk, S. (1989) *Neuropeptides* **14**, 191-196
18. Chávez-Gutiérrez L., Bourdais J., Aranda G., Vargas M.A., Matta-Camacho E., Ducancel F., Segovia L., Joseph-Bravo P. y Charli J.L. (2005) *J. Neurochem.* **92**, 807-817.
19. Colman, P.M., Jansnius, J.N. y Matthews, B.W. (1972) *J. Mol. Biol.* **70**, 701-724.
20. Cooper, M.D., Mulvaney, D., Coutinho, A., Cazenave, P.A. (1986) *Nature* **321**, 616-618.
21. Delmas B., Gelfi J., Kut E., Sjöström H., Noren O. and Laude H. (1994) *J. Virol.* **68**, 5219-5224

22. Elmore, M.A., Griffiths, E.C., O'Connor, B., y O'Cuinn, G. (1990) *Neuropeptides* **15**, 31-36.
23. Feracci H. and Maroux S. (1980) *Biochim. Biophys. Acta.* **599**, 448-463
24. Fontana, A. (1988) *Biophys. Chem.* **29**, 181-193.
25. Friedrman, T.C., Wilk, S. (1986) *J. Neurochem.* **46**, 1231-1239
26. Gary, K.A., Sevarino, K.A., Yarbrough, G.G., Prange, A.J., y Winokur, A. (2003) *J. of Pharmacol. Exp. Ther.* **305**, 410- 416.
27. Gershengorn, M.C. y Osman, R. (1996) *Physiol. Rev.* **76**, 175-191
28. Glenner, G.G., McMillan, P.J.y Folk, J.E. (1962) *Nature* **194**, 867
29. Griffiths, E.C., Baris, C., Visser, T.J., y Klootwijk, W. (1985) *Regul. Pept.* **10**, 145-55.
30. Gros, C., Giros, B. y Schwartz, J.C. (1985) *Biochemistry* **24**, 2179-2185.
31. Guillemin, R. (1978) *Science* **202**, 390-402.
32. Haeggstrom, J.Z., Wetterholm, A., Shapiro, R., Vallee, B.L., Samuelsson, B.(1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 965-970.
33. Hangauer, D.G., Monzingo, A.F. y Matthews, B.W. (1984) *Biochemistry* **23**, 5730-5741.
34. Harris, A.R., Christianson, M. S., Smith, M.S., Fang, S.L., Braverman, L.E., y Vagenakis, A.G. (1978) *J.Clin.Invest.* **61**, 441
35. Harris, G. W. (1948) *Physiol Rev* **28**, 139.
36. Henrikson, R. (1977) *Methods Enzimol.* **47**, 175-189.
37. Hesp, R., y Hooper, N. (1997) *Biochem.* **36**, 3000-3007
38. Heuer, H., Schafer, M.K.H., O'Donnell, D., Walker, P.K., y Bauer, K. (2000) *J. Comp. Neurol.* **428**, 319-336
39. Hinkle, P. (1989). *Ann N.Y. Acad. Sci.* **553**:176-187.
40. Holmes, M.A. y Matthews, B.W. (1982) *Biochemistry* **20**, 6912-6920.
41. Hopsu, V.K. y Makinen, K.K. (1966) *Nature* **212**, 1271-1272.
42. Horita, A. (1998) *Life Sci.* **62**, 1443-1448.
43. Hussain M. M., Trantum-Jensen J., Noren O., Sjöström H. and Christiansen K. (1981) *Biochem. J.* **199**, 179-186
44. Ishikawa, K., Taniguchi, Y., Inoue, K., Kurosumi, K., Suzuki, M. (1988) *Neuroendocrinology.* **47**, 384-388.
45. Iturrioz, X., Vazeux, G., Celerier, J., Corvol, P., y Llorens-Cortes, C. (2000) *Biochemistry* **39**, 3061-3068.
46. Keller, S.R. (2003) *Front Biosci.* **8**, s410-20. Review.
47. Kelly, J. A. (1995) *Essays Biochem.* **30**, 133-149.

48. Kelly, J. A., Scalabrino, G. A., Slator, G. R., Cullen, A.A., Gilmer, J.F., Lloyd, D.G., Bennett, G.W., Bauer, K., Tipton, K. F., y Williams C. H. (2005) *Biochem. J.* doi: 10.1042/BJ20041722
49. Kelly, J. A., Slator, G. R., Tipton, K. F., Williams, C. H., y Bauer, K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 16746-16751
50. Kubek y Sattin, (1984) *Life Sci.* **34**,1149-1152.
51. Lechan, R. M., Toni, R. (1992) *CRC Press*, Boca Raton, FL, USA. pp 279-329.
52. Lee H. J., Tomioka M., Takaki Y., Masumoto H. and Saido T. C. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1493**, 273-278.
53. Lee, M.K., You, T.H., Young, B.A., Cotrill, J.A., Valaitis, A.P. y Dean, D.H. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2845-2849.
54. Lerche, C., Vogel, L.K., Shapiro, L.H., Noren, O. y Sjostrom, H. (1996) *Mamm. Genome* **7**, 712-713.
55. Look, A.T., Ashmun, R.A., Shapiro, L.H.,y Peiper, S.C. (1989) *J. Clin. Invest.* **83**, 1299-12307.
56. Luciani, N., Marie-Claire, C., Ruffet, E., Beaumont, A., Roques, B.P., y Fournie-Zaluski, M.C. (1998). *Biochemistry*; **37**(2):686-92.
57. Lund O., Nielsen M., Lundegaard C. y Worning P. (2002) Abstract at the CASP5 conference A102.
58. Malfroy, B., Kado-Fong, H., Gros, C., Giros, B., Schwartz, J.C. y Hellmiss, R. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 236-241.
59. Maroux, S., Louvard, D., y Baratti, J. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **321**, 282-295.
60. Matsas, R., Stephenson, S.L., Hryszko, J., Kenny, A.J. y Turner, A.J. (1985) *Biochem. J.* **231**, 445-449.
61. Matthews, B.W. (1988) *Acc. Chem. Res.* **21**, 333-340.
62. Medina, J.F., Wetterholm, A., Radmark, O., Shapiro, R., Haeggstrom, J.Z., Vallee, B.L., y Samuelsson, B. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88**, 7620-7624.
63. Mendez M., Cruz, C., Joseph-Bravo, P., Wilk, S. y Charli, J.L. *Neuropeptides* **2**, 55-62.
64. Minami, M., Bito, H., Ohishi, N., Tsuge, H., Miyano, M., Mori, M., Wada, H., Mutoh, H., Shimada, S. And Izumi, T. et al (1992) *FEBS Lett.* **309**, 353-357.
65. Minami, M., Ohishi, N., Mutoh, H., Izumi, T., Bito, H., Wada, H., Seyama, Y., Toh, H. y Shimizu, T. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 620-626.
66. Morley, J.E. (1979) *Life Sci.* **25**, 1539-50.
67. Nillni, E.A., y Sevarino, K.A. (1999) *Endocr. Rev.* **20**, 599-648.
68. Nussenzweig, D.R., Heinfliink, M. y Gershengorn, M.C. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 2389-2392.
69. O'Leary, R.M., and O'Connor, B. (1995) *J. Neurochem.* **65**, 953-963



70. O'Connor, B. y O'Cuinn, G. (1984) *Eur. J. Biochem.* **144**, 271.
71. O'Cuinn, G., O'Connor, B., y Elmore, M. (1990) *J. Neurochem.* **54**, 1-13
72. Ofner L. D. and Hooper N. M. (2002) *Biochem. J.* **362**, 191-197
73. Olsen, J., Sjostrom, H. y Noren, O. M. (1989) *FEBS Lett.* **251**, 275-281.
74. Orning, L., Gierse, J.K. y Fitzpatrick, F.A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 11269-11273.
75. Palkovitz, M. (1982) *Peptides.* **3**, 299-303.
76. Papadopoulos, T., Heuer, H., y Bauer, K. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 2617-2623
77. Papadopoulos, T., Kelly, J. Y. y Bauer, K. (2001) *Biochem.* **267**, 2617-2623.
78. Ponce, G., Charli, J. L., Pasten, J. A., Aceves, C., y Joseph-Bravo, P. (1988) *Neuroendocrinology* **48**:211-218
79. Prokai, L. (2002) *Progress in Drug Research* **59**, 133- 169.
80. Reaux, A., Fournie-Zaluski, M.C., David, C., Zini, S., Roques, B.P., Corvol, P. y Llorens-Cortes, C. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**, 13415-13420.
81. Roche, R. y Voordouw, G. (1978) *CRC Crit. Rev. Biochem.* **5**, 1-23.
82. Roques, B.P., Noble, F., Dagué, V., Fournié-Zaluski, M.C. y Beaumont, A. (1993) *Pharmacol. Rev.* **45**, 87-146.
83. Rozenfeld, R., Iturrioz, X., Okada, M., Maigret, B., y Llorens-Cortes, C. (2003) *Biochemistry* **42**, 14785-14793
84. Rozenfeld, R., Muller, M., El Messari, S. y Llorens-Cortes (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 43285-43295.
85. Rudberg, P., Tholander, F., Thunnissen, M., y Haeggström, J.Z. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 1398-1404
86. Rudberg, P.C., Tholander, F., Andberg, M., Thunnissen, M.M., y Haeggstrom, J.Z. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 27376-82.
87. Saiki, I., Fujii, H., Yoneda, J., Abe, F., Nakajima, M., Tsuruo, T. y Azuma, I. (1993) *Int. J. Cancer.* **54**, 137-143.
88. Samuelsson, B., Dahlen, S.E., Lindgren, J.A., Rouzer, C.A., Serhan, C.N. (1987) *Science* **237**, 1171-1176. Review.
89. Saric, T., Chang, S.C., Hattori, A., York, I.A., Markant, S., Rock, K.L., Tsujimoto, M. y Goldberg, A.L. (2002) *Nat. Immunol.* **3**, 1169-1176.
90. Sato, Y. (2004) *Biol. Pharm. Bull* **27**, 772-776.
91. Schally A. V. (1978) *Science* **202**, 18-28.
92. Schauder, B., Schomburg, L., Kohrle, J., y Bauer, K. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9534-38.

93. Schmitmeier, S., Thole, H., Bader, A. and Bauer, K. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269**, 1278-1286.
94. Schomburg, L., Turwitt, S., Prescher, G., Lohmann, D., Horsthemke, B., y Bauer, K. (1999). *Eur J Biochem.* **265**(1), 415-422.
95. Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., y Shastri, N. (2002) *Nature* **419**, 480-483.
96. Sjostrom, H. y Noren, O. (1982) *Eur. J. Biochem.* **122**, 245-50.
97. Solhonne, B., Gros, C., Pollard, H., Schwartz, J.C. (1987) *Neuroscience* **22**, 225-232.
98. Tanioka, T., Hattori, A., Masuda, S., Nomura, Y., Nakayama, H., Mizutani, S., y Tsujimoto, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 32275-32283
99. Taylor, A. (1996) *FASEB J.* **7**, 290-298.
100. Thompson, M.W. y Hersh, L.B. (2003) *Peptides* **24**, 1359-1365.
101. Thunnissen, M. M., Nordlund, P. y Haeggstrom J. Z. (2001). *Nat. Struct. Biol.* **8**, 131-135.
102. Tiekou, S. y Hooper, N.M. (1992) *Biochem. Pharmacol.* **44**, 1725-1730.
103. Urban A., Neukirchen S. y Jaeger K.E. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 2227-8.
104. Uribe, R. M., Joseph-Bravo, P., Pasten, J., Ponce, G., Mendez, M., Covarribias, L., Charli, J. L. (1991) *Neuroendocrinology* **54**:493-498.
105. Vargas, M. A., Joseph-Bravo P. and Charli J. L. (1994) *Neuroendocrinology* **60**, 323-330
106. Vargas, M., Mendez, M., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P. y Charli, J.L. (1987) *Neurosci. Lett.* **79**, 311-314.
107. Vargas, M.A., Bourdais, J., Sánchez, S., Uriostegui, B., Moreno, E., Joseph-Bravo, P. y Charli, J.L. (1998) *J. Neuroendocrinol.* **10**, 199-206.
108. Vargas, M.A., Cisneros, M., Herrera, J., Joseph-Bravo, P. y Charli, J.L. (1992) *Peptides* **13**, 255-260.
109. Vargas, M.A., Uribe, R.M., Cisneros, M., Romero, F., González, S., Joseph-Bravo, P. y Charli, J.L. (2002a) *Eur. J. Endocrinol.* **147**, 363-369.
110. Vargas, M.A., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P. y Charli, J.L. (2002b) *J. Neuroendocrinol.* **14**, 184-93.
111. Vazeux, G., Iturrioz, X., Corvol P., Llorens-Cortés, C. (1998) *Biochem J.* **334**, 407-413.
112. Vazeux, G., Iturrioz, X., Corvol, P., Llorens-Cortés, C. (1997) *Biochem J.* **327**, 883-889.
113. Vazeux, G., Wang, J., Corvol, P., Llorens-Cortés, C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271** (15), 9069-9074.
114. Wang, J., Walker, H., Lin, Q., Jenkins, N., Copeland, N.G., Watanabe, T., Burrows, P.D. y Cooper, M.D. (1996) *Genomics* **33**, 167-176.
115. Wang, J., Walker, H., Lin, Q., Jenkins, N., Copeland, N.G., Watanabe, T., Burrows, P.D. y Cooper, M.D. (1996) *Genomics* **33**, 167-176.

116. Wetterholm, A., Medina, J.F., Radmark, O., Shapiro, R., Haeggstrom, J.Z., Vallee, B.L., y Samuelsson, B. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89**, 9141-9145.
117. Wex, T., Lendeckel, U., Reinhold, D., Kahne, T., Arndt, M., Frank, K. y Ansorge, S. (1997) *Adv. Exp. Med. Biol.* **421**, 67-73
118. Wilk S. y Wilk E. (1989) *Neurochem. Int.* **15**, 81-89.
119. Williams, T.A., Corvol, P. y Soubrier, F. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 29430-29434.
120. Wittmann, G., Liposits, Z., Lechan, R. M., y Fekete, C. (2004) *Brain Res.* **1006**: 1-7.
121. Yang, J., y Tashjian jr., A. H. (1993). *Endocrinology* **133**:487-490.
122. Yeager, C.L., Ashmun, R.A., Williams, R.K., Cardellichio, C.B., Shapiro, L.H., Look, A.T. y Holmes, K.V. (1992) *Nature* **357**, 420-422.
123. Zhao, D., Yang, J., Jones, K.E., Gerald, C., Susuki, Y., Hogan, P.G. Chin, W.W. y Tashjian, A.H. (1992) *Endocrinology* **130**, 3529-3536.
124. Zini, S., Fournie-Zaluski, M.C., Chauvel, E., Roques, B.P., Corvol, P. y Llorens-Cortes, C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**, 11968-11973.

# ANEXO 1

## A truncated isoform of pyroglutamyl aminopeptidase II produced by exon extension has dominant-negative activity

Lucia Chávez-Gutiérrez,\* Julie Bourdais,\*<sup>1</sup> Gonzalo Aranda,\* Miguel Angel Vargas,\* Edna Matta-Camacho,\* Frédéric Ducancel,† Lorenzo Segovia,‡ Patricia Joseph-Bravo\* and Jean-Louis Charli\*

\*Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

†Département d'Ingénierie et d'Etude des Protéines, Commissariat à l'Energie Atomique, Centre d'Etudes de Saclay, Gif sur Yvette, France

‡Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

### Abstract

Thyrotropin-releasing hormone is inactivated in the extracellular space by a membrane-bound peptidase, pyroglutamyl aminopeptidase II (PPII), a member of the M1 family of zinc metallopeptidases. The functional significance of multiple PPII RNA species expression is unknown. We detected, in rat tissues, a RNA species derived from an alternative processing at the exon 14–intron 14 boundary. The alternatively processed RNA encoded a shorter version of PPII (PPII\*), lacking part of the C-terminal domain. PPII\* was expressed in COS-7 (or C6 glioma) cells but it did not exhibit any PPII activity. Co-trans-

fection of PPII and increasing amounts of PPII\* expression vectors resulted in a dose-dependent reduction in PPII activity and the formation of covalent PPII–PPII\* heterodimers. PPII\* is therefore a powerful dominant-negative isoform of PPII, and heterodimerization may be its mechanism of action. Natural expression of shortened versions of M1 aminopeptidases may constitute a new mode of regulation of their activity.

**Keywords:** aminopeptidase, dominant negative, heterodimerization, pyroglutamyl aminopeptidase II, RNA splicing, thyrotropin-releasing hormone.

*J. Neurochem.* (2005) **92**, 807–817.

The neuropeptide thyrotropin-releasing hormone (TRH; pyroGlu-His-ProNH<sub>2</sub>) is inactivated in the extracellular space by a membrane-bound peptidase, pyroglutamyl aminopeptidase II (PPII; EC 3.4.19.6) (Charli *et al.* 1998; Heuer *et al.* 1998). PPII activity is detected mainly in the CNS; lower levels are present in hypophysis and a few other organs (Friedman and Wilk 1986; Vargas *et al.* 1992). Inhibition of PPII activity in brain slices increases TRH levels recovered in the medium, pointing to its relevant role in TRH inactivation in the extracellular space (Charli *et al.* 1989).

PPII cDNA (Schauder *et al.* 1994; Schomburg *et al.* 1999) encodes a 1025 or 1024 amino acid protein (rat or human sequences, respectively) whose primary structure includes a small intracellular N-terminal fragment, one *trans*-membrane segment and a large extracellular C-terminal region with consensus sequences typical of the M1 family zinc-dependent aminopeptidases (H-E-X-X-H and E 18 amino acid carboxyl to the first H), in agreement

with biochemical data showing that it is a zinc ectopeptidase (Charli *et al.* 1988; Czekay and Bauer 1993). There is

Received September 23, 2004; accepted October 7, 2004

Address correspondence and reprint requests to Jean-Louis Charli, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenue. Universidad 2001, Cuernavaca, Mor., 62271, México.

E-mail: charli@ibt.unam.mx

<sup>1</sup>The present address of Julie Bourdais is Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenue. Universidad 1001, Cuernavaca, Morelos 62210, México.

Lucia Chávez-Gutiérrez and Julie Bourdais contributed equally to this study.

**Abbreviations used:** APA, aminopeptidase A; APN, aminopeptidase N; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EGFP, enhanced green fluorescent protein; ER, endoplasmic reticulum; ORF, open reading frame; PCR, polymerase chain reaction; PE, prolyl endopeptidase; PPII\*, truncated PPII; PPII, pyroglutamyl aminopeptidase II; TRH, thyrotropin-releasing hormone; βNA, β-naphthylamide.

a very high level of amino acid conservation among rat, mouse and human sequences.

The molecular mass of brain PPII solubilized with trypsin is 230 kDa (Wilk and Wilk 1989; Bauer 1994). The difference between the protein molecular mass deduced from its cDNA sequence and that found in brain PPII is mainly due to homodimerization and glycosylation (Bauer 1994). The extracellular region contains nine cysteine residues. C68 is involved in disulfide-linked homodimerization although covalent dimerization is not essential for activity. The additional cysteine residues may be required to generate or maintain an active structure (Papadopoulos *et al.* 2000).

PPII is a peptidase of the M1 family, with a sequence similar to that of aminopeptidase N (APN; EC 3.4.11.2) and aminopeptidase A (APA; EC 3.4.11.7); they share 34 or 32% amino acid identity, respectively. The domain structure of the M1 family of aminopeptidases is still not completely understood. Sequence alignments, secondary structure and solvent accessibility predictions as well as proteolytic fragmentation studies (Bauer 1994; Delmas *et al.* 1994; Hesp and Hooper 1997) indicate that the ectodomains of M1 peptidases have a similar organization with a C-terminal domain, separated from the catalytic region (zinc metallo-peptidase domain) by a region containing a solvent-exposed loop (loop A) and multiple glycosylation sites. rPPII loop A corresponds to amino acids 630–660 (Fig. 1). The only X-ray crystal structure resolved in the family (leukotriene A4 hydrolase; EC 3.3.2.6) confirms the existence of loop A (Thunnissen *et al.* 2001). Furthermore, the highly conserved sequence stretches of the M1 family are in the catalytic region, while the C-terminal domain is not conserved.

*In vivo*, APA can be found partially processed in loop A but the fragments (107 and 45 kDa) appear to remain tightly bound (Hesp and Hooper 1997). A variant form of APA mRNA, lacking an exon and having a stop codon introduced by phase shift, was cloned from rat hippocampus. It encodes a protein truncated in loop A. When over-expressed in COS-1

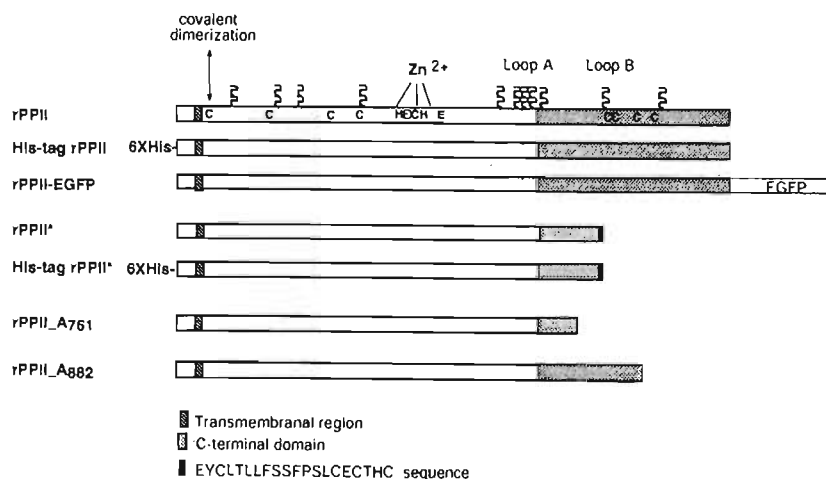
cells, the variant is expressed but inactive (Lee *et al.* 2000). In COS-1 cells, a construct of mouse APA lacking a similar portion of the C-terminal domain was retained in the endoplasmic reticulum (ER), suggesting that the C-terminal domain is a pro-domain required for the correct folding and trafficking of APA (Ofner and Hooper 2002). Recently, it was shown that the C-terminal domains of APA and APN are intramolecular chaperones required for folding, cell-surface expression and activity (Rozenfeld *et al.* 2004).

In rat or human, PPII is encoded by a single gene. Multiple RNAs have been detected in rat and human brain, and rat pituitary, ranging in size from 4.5 to 9 kb (Schauder *et al.* 1994; Schomburg *et al.* 1999). To date, one form of PPII protein has been detected in tissues. Another enzyme with the same substrate specificity and chemical characteristics (thyroliberinase) is present in serum (Bauer and Nowak 1979); it originates from liver and is generated from the PPII gene by an unknown mechanism (Schmitmeier *et al.* 2002). In rat tissues, we have identified a PPII mRNA that included an insertion in its coding sequence; it encoded a shorter version of PPII (PPII\*), which did not hydrolyze TRH. Co-transfection of PPII and increasing amounts of PPII\* expression vectors resulted in a dose-dependent decrease in PPII activity and the formation of heterodimers, showing PPII\* as a dominant-negative form of PPII.

## Materials and methods

### RNA and DNA preparation

Adult male Wistar rats were bred in the institute animal house and treated according to the Society for Neuroscience (USA) 'Guidelines for the use of animals in neuroscience research'. Adenohypophyseal cells were cultured as previously described (Vargas *et al.* 1994). Total or cytoplasmic RNAs were isolated from adenohypophyseal cells using the RNAeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNAs were digested



**Fig. 1** Schematic representation of the primary structure of the proteins expressed in this study. The figure shows the positions of transmembrane region and C-terminal domain, loops A and B, cysteines (C),  $Zn^{2+}$  ligands, putative glycosylation sites (serpentine), and tags.

with ribonuclease-free deoxyribonucleases (Qiagen). For other tissues, total RNA was isolated as described previously (Chomczynski and Sacchi 1987). Rat DNA was prepared from blood (Sambrook *et al.* 1989).

#### Reverse transcription

One microgram of total RNA was used in reverse transcription experiments using 100 units of M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) in the presence of poly(dT18) following the protocol recommended by the supplier.

#### Polymerase chain reaction

One-fifth of the RT reaction product was submitted to polymerase chain reaction (PCR) amplification using 1 unit of *Taq* DNA polymerase (Boehringer, Ingelheim, Germany) and 10 pmoles of each primer. The following primers were used: (A) 5'-TGGACCGC-ATGGAAAAC-3', nucleotides 2306–2323 of rPPII sequence (numbers beginning with the first adenosine residue of the initiation codon ATG); (B) 5'-GTGCATTCACACAGACTG-3', nucleotides 2469–2486 of rPPII\* cDNA; (C) 5'-AATCAGGAACCATGAGG-TAC-3', nucleotides 2118–2137 of rPPII cDNA; (D) 5'-GTGCA-GGCCTGATTGATG-3', nucleotides 2153–2173 of rPPII cDNA; (E) 5'-GCAGTGTGCATTCACACAG-3', nucleotides 2473–2493 of rPPII\* cDNA; (F) 5'-GACAGTGCTTGTCCCAAAGC-3', nucleotides 2471–2491 and 2558–2578 of rPPII and rPPII\* cDNAs, respectively; (G) 5'-CGCAGTGTAACACCTGTC-3' and (H) 5'-TGGCTGCAATGGCCATTGTGT-3', which allowed the amplification of an intronic 415 bp rPPII RNA sequence spanning exon 12; and (I) 5'-ACAGGGCATCACAAAGCTAGTG-3' and (J) 5'-CAGACTCAGTTGCATAGAGTGC-3', which allowed the amplification of an intronic 604 bp rPPII RNA sequence spanning exon 13. An annealing temperature of 60°C and 35 amplification cycles were used. In control experiments, we did not detect any PCR product when RNA was amplified without RT. For genomic DNA, 100 ng were amplified under the same conditions. A 426 bp PCR fragment obtained by amplification of olfactory bulb cDNA with primers D and F was separated by gel electrophoresis and purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen). The sequence was determined by DNA sequencing with primer D.

#### Construction of expression plasmids

The complete coding sequence of rat PPII cDNA (a gift from Dr K. Bauer) was amplified by PCR using the following primers: 5'-CCGCTCGAGCGGCCACCATGGGAGAGGA-3' and 5'-CGG-GGTACCCCGTGCCTCATGGCTTTTCC-3'. The fragment was cloned into pEGFP-N3 (CLONTECH, Palo Alto, CA, USA) by restriction with *XhoI* and *KpnI*; the resulting expression vector (pEGFP-N3/rPPII), with enhanced green fluorescent protein (EGFP) fused in-frame to the C-terminus of rPPII, was digested with *KpnI*–*NotI* to yield the rPPII expression vector (pN3/rPPII). The rat PPII\* expression vector (pN3/rPPII\*) was constructed by PCR amplification of a fragment of rPPII\* cDNA (also donated by Dr K. Bauer) using a primer corresponding to the N-terminal part of rPPII\* and a second (5'-TAAGAATCGGCCGCATATTAGTGCCTCATGGCT-3') that introduces a restriction site for *NotI* at the end of rPPII\* cDNA. Fragment *XmaI*–*NotI* of pEGFP-N3/rPPII was substituted for the PCR-product digested with the same enzymes. Expression vectors for rat PPII truncated at A761 or A882 (pN3/rPPII-A<sub>761</sub> and pN3/

rPPII-A<sub>882</sub>, respectively) were constructed by pN3/rPPII digestion with *SacI*–*XbaI* or with *PstI*–*XbaI*, respectively; the resulting vectors were purified, the 5' overhangs were filled in using DNA polymerase I (Klenow large fragment) (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) and phosphorylated before ligation. rPPII or rPPII\* cDNAs were cloned into pcDNA3.1/HisA (*XhoI*–*XbaI*) to generate rPPII or rPPII\* poly(His)-tagged expression vectors (pcDNA3.1/HisA-rPPII or pcDNA3.1/HisA-rPPII\*, respectively); in these vectors, rPPII or rPPII\* coding sequences were in-frame C-terminal to the poly(His) tag. Sequences of the PCR fragments were confirmed by DNA sequencing; DNA sequences were determined on ABI373 or 377 automatic sequencers using a Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primary structure of the expressed proteins is schematized in Fig. 1.

#### Tissue culture, transfection, membrane preparation and fluorescence microscopy

COS-7 or C6 glioma cells were cultured (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies, Rockville, MD, USA) supplemented with 19.5 mM glucose, 10% (v/v) fetal bovine serum, 50 units/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin and 125 ng/mL fungizone (DMEM-S). Cells (8 [COS-7] or 5 [C6 glioma] × 10<sup>5</sup> cells per 60 mm dish) were cultured for 18 h, washed twice with serum and antibiotic-free DMEM and transiently transfected in 4 mL serum and antibiotic-free DMEM with 10 µg of expression vector using 15 µL Lipofectamine 2000 (Gibco BRL). For co-transfection experiments, pN3/rPPII or pcDNA3.1/HisA-rPPII were mixed with various amounts of pN3/rPPII\* or pcDNA3.1/HisA-rPPII\*; pEGFP-N3 was added to maintain total DNA amount constant (12 µg). Alternatively, cells were transiently transfected with a mix of expression vectors pEGFPN3/rPPII, various amounts of pcDNA3.1/HisA-rPPII\*; pcDNA3.1/HisA was added to maintain total DNA amount constant (12 µg). Most cells were fluorescent in all conditions, suggesting that transfection efficiencies were similar. Cells were collected 24 or 48 h post transfection, and total membranes prepared essentially as described (Bourdais *et al.* 2000). Transfection of COS-7 cells with pN3/rPPII generated maximal PPII activity in this time range (not shown). The final membrane pellet was homogenized in 50 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.5 and stored at –80°C. Protein concentration was determined according to Lowry *et al.* (1951). For microscopic analysis, cells were observed under an eclipse TE 300 microscope (Nikon, Melville, NY, USA) equipped with the cool snap photometrics camera and visualized with cool snap software at 40× magnification. EGFP fluorescence was detected using the EPI-FL filter block (Nikon).

#### Aminopeptidase activity determination

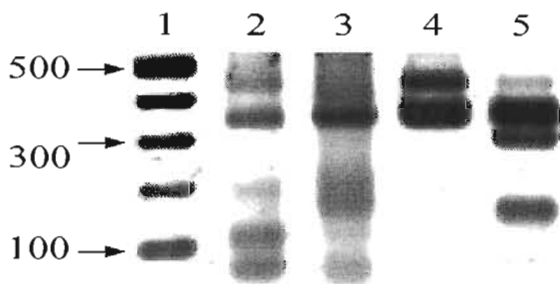
PPII activity was determined using in a coupled fluorometric assay essentially as described (Bourdais *et al.* 2000) except for minor modifications. Briefly, total membranes (7–20 µg of protein per assay) were mixed with 0.2 mM *N*-ethyl maleimide, 0.2 mM bacitracin and dipeptidyl aminopeptidase IV [4 nmol of Gly-Pro-β-naphthylamide (βNA) hydrolyzed per min] in 50 mM NaPO<sub>4</sub> buffer pH 7.5. The enzymatic reaction was initiated in duplicate or triplicate, by addition of 400 µM pGlu-His-ProβNA to the reaction mixture and carried out at 37°C; aliquots were withdrawn every 30 min from 30 to 120 min and the reaction was stopped by





rPPII\* cDNA structure appeared to result from an exon extension.

The presence of rPPII\* RNA in rat tissues was confirmed by RT-PCR experiments. Total RNAs were prepared from rat brain and pituitary submitted to RT-PCR amplification using oligonucleotides B and C (Fig. 3a). An intense band with a size comparable to a 368 bp fragment was obtained suggesting that rPPII\* RNA species were expressed in brain and pituitary (not shown). Similar results were obtained with other pairs of primers and tissues; RT-PCR with primers D and E (Fig. 3a), designed to amplify exclusively a 341 bp fragment of the rPPII\* RNA, produced a fragment of this size in all tissues tested (olfactory bulb, frontal cortex, hypothalamus, hippocampus, mesencephalon, pons, medulla oblongata, cervical spinal cord as well as in adenohipophyseal cell cultures, kidney, heart, spleen, liver and lung) (not shown). RT-PCR with primers D and F (Fig. 3a), designed to amplify 339 and 426 bp fragments of the RNAs coding for PPII and PPII\*, respectively, produced two fragments of these sizes in olfactory bulb (Fig. 4, lanes 2 and 4) as well as in other tissues and adenohipophyseal cell cultures (not shown). To confirm that the RT-PCR 426 bp products of olfactory bulb, lung or adenohipophyseal cell cultures included the specific PPII\* mRNA sequence, two strategies were used. An aliquot of the PCR product obtained with primers D and F was submitted to a seminested PCR amplification with primers D and E; we obtained a major product with a size compatible to a 341 bp product, as expected if the 426 bp sequence included the specific rPPII\* cDNA sequence (Fig. 4, lane 3; not shown for lung or adenohipophyseal cell cultures). A second aliquot was digested with the *RsaI* endonuclease, whose sole target is



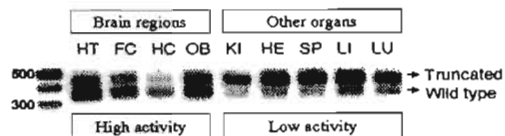
**Fig. 4** Experimental evidence for the presence of RNA coding for PPII\* in rat olfactory bulb. PCR products (from total RNA) were separated by electrophoresis on 1% agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized with a FluorImager (Bio-Rad). Lane 1: molecular mass markers. Lane 2: RNA amplified with primers D and F. Lane 3: seminested PCR, one-tenth of the lane 2 reaction product was submitted to a second PCR amplification with primers D and E. Lanes 4 and 5: RNA amplified with oligonucleotides D and F and incubated without and with *RsaI*, respectively, for 6 h at 37°C. In an independent experiment, the high molecular mass PCR product obtained with primers D and F (as in lane 2) was sequenced; the sequence was identical to that described in Fig. 3(b).

the T2437–A2438 nucleotide bond in PPII\* cDNA; the 339 bp fragment was not digested but the 426 bp band was cut into 280 and 147 bp fragments (Fig. 4, lanes 4 and 5; not shown for lung or adenohipophyseal cell cultures). Finally, to obtain an unequivocal identification of the olfactory bulb 426 bp RT-PCR product, we isolated and sequenced it; the sequence was that of PPII\* cDNA (not shown).

rPPII\* cDNA was generated from a polyA mRNA library (Schauder *et al.* 1994), suggesting that it came from mature mRNAs. Our data show that PPII\* mRNA is expressed in various tissues and that, apart from the exon extension, rat PPII RNAs are fully processed between exons 11 and 15, supporting the notion that rPPII\* RNA sequence is present in a mature RNA. To confirm unequivocally that the RNA containing the insertion was present in the cytosol, we purified total and cytosolic RNA from primary cultures of adenohipophyseal cells. Two rPPII intronic sequences (see Materials and methods) were detected in total RNA but not in cytosolic RNA; therefore, the cytosolic RNA preparation was not contaminated by nuclear RNA. Primer pairs D/F or D/E, designed to amplify mature rPPII or rPPII\* mRNA, respectively, allowed their detection in the cytosolic RNA preparation (not shown).

Rat tissues expressed both forms of PPII mRNAs. However, according to semiquantitative RT-PCR, tissues with low activity (kidney, heart, spleen, liver and lung) presented a two- to threefold higher PPII\* RNA/PPII RNA ratio than those that express higher levels of activity (hypothalamus, frontal cortex, hippocampus and olfactory bulb) (Fig. 5) (Friedman and Wilk 1986; Vargas *et al.* 1992).

The PPII\* specific 90-nucleotide sequence contains two consecutive stop codons (TAG TGA; nucleotides 2494–2499 in rPPII\* cDNA) in phase with the open reading frame (ORF) (Fig. 3b). The putative amino acid sequence encoded by rPPII\* cDNA corresponds to a C-terminally truncated rat pyroglutamyl aminopeptidase II (PPII\*) containing 831 instead of 1025 amino acids. Within this sequence remains the active site motif, as well as 11 (out of 12) potential N-glycosylation sites. However, this protein has lost four of the nine cysteines essential for the expression of activity



**Fig. 5** PPII\* RNA/PPII RNA ratio is increased in rat tissues with lower levels of PPII activity. The figure shows RT-PCR analysis of total RNA from various brain regions and tissues using oligonucleotides D and F as primers. Note that cDNA amounts loaded in each lane were not adjusted per amount of input RNA or amplified internal standard. Left lane, molecular mass markers. HT, hypothalamus; FC, frontal cortex; HC, hippocampus; OB, olfactory bulb; KI, kidney; HE, heart; SP, spleen; LI, liver; LU, lung.

(Papadopoulos *et al.* 2000), but includes four new cysteines in the 20 amino acid C-terminal extension (Fig. 3c). The truncation occurred in a region (amino acids 795–825 for rPPII) predicted to be a loop (loop B; Fig. 1) based on multiple sequence alignments in the C-terminal domain of the M1 family, prediction of secondary structure and the presence of putative N-linked glycosylation sites.

To determine whether rPPII\* is catalytically active, expression vectors were transfected into COS-7 cells. Wild-type rPPII (or His-tag rPPII) was active, as previously shown (Schauder *et al.* 1994) (Figs 6 and 7a), and completely inhibited by 1 mM *o*-phenanthroline (not shown), consistent with PPII properties. A biochemical analysis of the levels of cell-surface activity in COS-7 cells demonstrated that most of the activity was found on the cell surface when cells were transfected with pN3/rPPII or pcDNA3.1/HisA-rPPII (Table 1), in agreement with data from Schauder *et al.* (1994). Transfection of pN3/rPPII\* or pcDNA3.1/HisA-rPPII\* produced no activity (Fig. 7a). This could be due to rPPII\* lacking part of the putative C-terminal domain and/or, to the presence of the 20 amino acid C-terminal sequence. Two expression vectors for rPPII truncated at positions A761

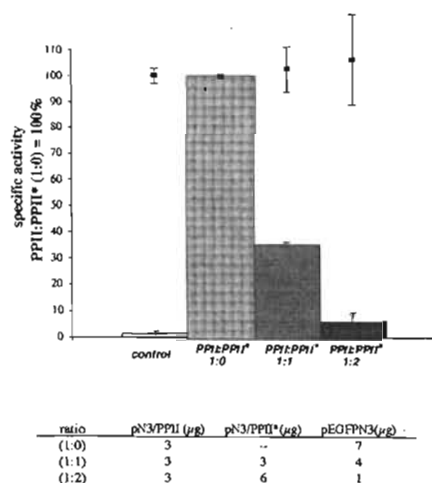
or A882 (rPPII-A761 or rPPII-A882, respectively; Fig. 1) were therefore transfected; as for rPPII\*, they did not induce activity (not shown), suggesting that the 20 amino acid C-terminal sequence was not the primary factor involved in loss of function.

Transfection, in COS-7 cells, of pcDNA3.1/HisA-rPPII generated a 145 kDa protein (reducing SDS-PAGE), whereas that of pcDNA3.1/HisA-rPPII\* generated a 120 kDa protein, in agreement with the expected loss of almost 200 amino acids (Fig. 7b). These molecular masses suggested that PPII and PPII\* contained  $\approx$  25 kDa of glucides in COS-7 cells. The presence of glucides was confirmed by treatment with glucosidases, which generated 120 and 97 kDa bands, respectively (not shown). Bands corresponding to multimers were not detected. Transfection of identical amounts of His-tag rPPII and His-tag rPPII\* plasmids led to similar expression levels (Fig. 7b). Under non-reducing conditions, the molecular mass of each protein corresponded to that of a homodimer (Fig. 7d, lanes 1, 3); monomers were also detected (not shown). Therefore, homodimers were detected only under non-reducing conditions, suggesting that monomers were linked by disulfide bonds, as reported previously for PPII (Papadopoulos *et al.* 2000).

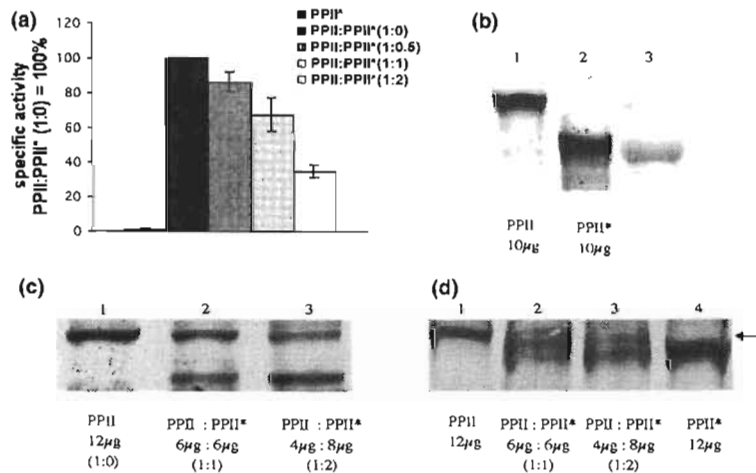
Co-expression, in COS-7 cells, of rPPII with increasing amounts of rPPII\* resulted in a dose-dependent diminution of PPII activity. A 65% decrease was observed with a 1 : 1 molar ratio, and near complete inhibition was observed with a 1 : 2 ratio. By contrast, endogenous APN activity was unchanged (Fig. 6); a high amount of pcDNA3.1/HisA-rPPII\* transfected alone (10  $\mu$ g) did not change endogenous APN activity (111  $\pm$  2 vs. 100% in untransfected cells,  $n = 6$ ). Co-expression of increasing amounts of rPPII-A882 with a constant amount of rPPII expression vector also produced a gradual decrease in PPII activity [PPII:rPPII-A882 1 : 0, 100  $\pm$  5.6%; (1 : 1), 22  $\pm$  0.19%; (1 : 2), 8.8  $\pm$  0.23%,  $n = 3$ ].

To study the underlying mechanism of the dominant-negative behavior, co-transfection studies were complemented with SDS-PAGE and western blot analysis in COS-7 cells. His-tag rPPII activity was profoundly reduced by co-expression of rPPII\*, as observed with co-transfections of untagged proteins (not shown). However, co-expression of His-tag rPPII with His-tag rPPII\* led to a dose-dependent reduction of PPII activity that was less pronounced than observed with untagged proteins: for a 1 : 2 pcDNA3.1/HisA-rPPII:pcDNA3.1/HisA-rPPII\* ratio, the wild-type activity was decreased to 35% of the control values (Fig. 7a). In COS-7 cells, this quantitative variability was correlated with the presence of the His-tag on PPII\* (compare Figs 6 and 7 and data above).

Co-expressions of His-tag rPPII with His-tag rPPII\*, analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions and western blot, revealed that each protein was expressed



**Fig. 6** Effect of rPPII\* expression on rPPII and APN activities in COS-7 cells. Cells ( $8 \times 10^5$  cells per 60 mm dish) were transiently transfected with a total amount of 10  $\mu$ g of expression vectors using 15  $\mu$ L Lipofectamine 2000. A constant amount (3  $\mu$ g) of pN3/rPPII was mixed with various amounts of pN3/rPPII\* and pEGFP-N3 was added to maintain total DNA amount constant (see proportions in Table 1). Control dishes were not transfected. After 24 h in culture, membranes were prepared and PPII (bars) or APN (rectangular dots) activities determined with a fluorometric assay. Data are mean specific activities (in percentage of activities at the rPPII : PPII\* ratio of 1 : 0)  $\pm$  SEM ( $n = 9$  or 6 for PPII or APN, respectively) from three independent transfections. PPII specific activity at the rPPII : PPII\* ratio of 1 : 0 was  $762 \pm 87$  pmol TRH- $\beta$ NA hydrolyzed/min/mg protein ( $n = 9$ ). APN specific activity at the rPPII : PPII\* ratio of 1 : 0 was  $316.33 \pm 53$  pmol Ala- $\beta$ NA hydrolyzed/min/mg protein ( $n = 6$ , from three independent transfections).



**Fig. 7** Effect of His-tag rPPII\* expression on His-tag rPPII activity and expression in COS-7 cells. (a) Cells ( $8 \times 10^5$  cells per 60 mm dish) were transiently transfected using 15  $\mu$ L Lipofectamine 2000. Except for the PPII\* group (10  $\mu$ g pcDNA3.1/HisA-rPPII\*), a constant amount (3  $\mu$ g) of pcDNA3.1/HisA-rPPII was mixed with either 0, 1.5, 3 or 6  $\mu$ g of pcDNA3.1/HisA-rPPII\* (1 : 0, 1 : 0.5, 1 : 1 or 1 : 2 ratio, respectively); pEGFP-N3 was added to maintain total DNA amount constant (12  $\mu$ g). After 24 h in culture, membranes were prepared and PPII activity determined with a fluorometric assay. Data are mean specific activities (in percentage of activities at the rPPII:PPII\* ratio of 1 : 0)  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ) from three independent transfections. PPII specific activity at the rPPII:PPII\* ratio of 1 : 0 was  $240 \pm 32$  pmol TRH- $\beta$ NA hydrolysed/min/mg protein ( $n = 8$ ). (b–d) Amounts of pcDNA3.1/

HisA-rPPII and pcDNA3.1/HisA-rPPII\* transfected alone or together are indicated under each lane. Membrane fractions were subjected to SDS-PAGE in reducing or non-reducing conditions and His-tagged proteins detected by western blot analysis using a monoclonal anti-(poly-His) alkaline phosphatase conjugate. (b) Reducing conditions. Lane 1, His-tag rPPII; lane 2, His-tag rPPII\*; lane 3, molecular mass marker, 117 KDa. (c) Reducing conditions. Lane 1, His-tag rPPII; lane 2, His-tag rPPII : His-tag rPPII\* (1 : 1); lane 3, His-tag rPPII : His-tag rPPII\* (1 : 2). (d) Non-reducing conditions. Lane 1, His-tag rPPII; lane 2, His-tag rPPII : His-tag rPPII\* (1 : 1); lane 3, His-tag rPPII : His-tag rPPII\* (1 : 2); lane 4, His-tag rPPII\*. The arrow indicates the position of the putative heterodimer. These western blots were representative of four experiments made from four independent transfections.

**Table 1** Total and surface PPII activities in COS-7 cells transfected with PPII expression vectors

	Total activity <sup>a</sup>	Remaining activity after trypsin <sup>b</sup>	Surface activity (trypsin) <sup>c</sup>	Surface activity (direct assay) <sup>d</sup>
pEGFPN3 (control)	$0.03 \pm 0.01$	$0.01 \pm 0.01$	0.02	0
pN3/rPPII	$14.5 \pm 0.05$	$3.55 \pm 0.22$	11	$14.3 \pm 0.14$
pcDNA3.1/HisA-rPPII	$10.7 \pm 0.12$	$2.62 \pm 0.14$	8.04	$9.1 \pm 0.06$
pEGFP-N3/rPPII	$10.9 \pm 0.22$	$8.62 \pm 0.12$	2.28	$3.8 \pm 0.09$

Cells ( $10^5$  per dish; 24 well) were transiently transfected with 1.2  $\mu$ g of expression vectors using 1.5  $\mu$ L Lipofectamine 2000 and PPII activity determined after 24 h in culture.

<sup>a</sup>Total membranes were prepared and PPII activity determined with a fluorometric assay ( $n = 2$ ).

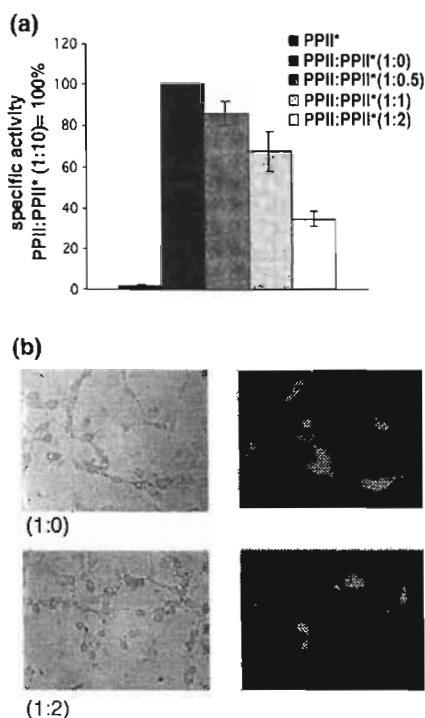
<sup>b</sup>Cells were treated with trypsin (0.01%, 10 min), total membranes prepared and remaining activity determined ( $n = 2$ ).

<sup>c</sup> $a - b$ -values.

<sup>d</sup>Surface activity was determined by incubating intact cells with TRH- $\beta$ NA ( $n = 3$ ). Data are mean activities per dish  $\pm$  SEM or SD ( $n = 3$  or  $n = 2$ ).

according to the relative amounts of transfected vectors (Fig. 7c). Likewise, analysis of co-expression of His-tag rPPII with rPPII\* by SDS-PAGE in reducing conditions and western blot, revealed that rPPII\* expression did not modify His-tag rPPII expression (not shown). Under non-reducing conditions we observed that co-transfection of pcDNA3.1/HisA-rPPII and, pcDNA3.1/HisA-rPPII\* induced a reduction

in the amount of His-tag rPPII homodimers and the appearance of a third band with a molecular mass intermediate between that of His-tag rPPII and His-tag rPPII\* (Fig. 7d, lanes 2 and 3). Because of its intermediate size, this new band was probably a His-tag rPPII-rPPII\* heterodimer. Even with the smallest His-tag rPPII\* amount expressed (rPPII:rPPII\* = 1 : 0.5), a heterodimer was detected (not



**Fig. 8** Effect of His-tag rPPII\* expression on EGFP-tag rPPII activity and subcellular localization in C6 glioma cells. (a) Cells ( $8 \times 10^5$  cells per 60 mm dish) were transiently transfected with a total amount of 12  $\mu$ g of expression vectors using 15  $\mu$ l Lipofectamine 2000. A constant amount (3  $\mu$ g) of pEGFP-N3/rPPII was mixed with either 0, 1.5, 3 or 6  $\mu$ g of pcDNA3.1/HisA-rPPII\* (1 : 0, 1 : 0.5, 1 : 1 or 1 : 2 ratio, respectively); pcDNA3.1/HisA was added to maintain total DNA amount constant. After 24 h in culture, membranes were prepared and PPII activity determined with a fluorometric assay. Data are mean specific activities (in percentage of activities at the EGFP-tag rPPII : His-tag PPII\* ratio of 1 : 0)  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ) from two independent transfections. PPII specific activity at the rPPII:PPII\* ratio of 1 : 0 was  $296 \pm 6$  pmol TRH- $\beta$ NA hydrolyzed/min/mg protein ( $n = 3$ ). (b) Microscopic analysis of EGFP-tag rPPII distribution when expressed alone (ratio 1 : 0; 4  $\mu$ g pEGFP-N3/rPPII and 8  $\mu$ g pcDNA3.1/HisA) or with His-tag rPPII\* (ratio 1 : 2; 4  $\mu$ g pEGFP-N3/rPPII and 8  $\mu$ g pcDNA3.1/HisA-rPPII\*). (Left) Bright field images. (Right) Fluorescence microscopy; original magnification: 40 $\times$ . These images are representative of multiple fields in duplicate plates from two independent transfections.

shown). Therefore, loss of activity was not due to protein degradation and coincided with a decreased amount of His-tag rPPII homodimers and heterodimer formation.

To study the impact of rPPII\* expression on rPPII subcellular localization, we transfected COS-7 cells with pEGFP-N3/rPPII. However, very little fluorescence was detected on the plasma membrane, with the majority localized around the nucleus, possibly in the ER (not shown). This localization pattern was due to an effect of the EGFP tag on protein transport because a biochemical

analysis of the levels of cell surface activity in COS-7 cells transfected with pEGFP-N3/rPPII demonstrated that, contrary to what occurred when cells were transfected with pN3/rPPII or pcDNA3.1/HisA-rPPII, most of the activity was intracellular (Table 1). To overcome this problem, we selected a nervous system cell line (C6 glioma cells) that expressed very low levels of PPII activity ( $1.41 \pm 0.15$  pmol TRH- $\beta$ NA hydrolyzed/min/mg protein;  $n = 3$ ). In C6 glioma cells transfected with pEGFP-N3/rPPII, fluorescence filled the cytoplasm and appeared to extend to the cell surface (Fig. 8b). Co-transfection of pEGFP-N3/rPPII with increasing amounts of pcDNA3.1/HisA-rPPII\* produced a dose-dependent reduction in PPII activity as efficiently as in COS-7 cells (Fig. 8a) but did not modify the distribution of fluorescence (Fig. 8b). Thus, the dominant-negative effect was independent of the presence of a tag or cell type and expression of rPPII\* did not seem to induce rPPII retention in the secretory pathway although a definitive answer will require the use of additional methods.

Intron 14 disrupts the coding sequence in rat, human, and mouse PPII genes at an identical position within each triplet. A similar nucleotide sequence to the PPII\*-specific sequence (> 70% identity) was present in the equivalent intron of mouse or human genomes (Fig. 3b) but not in any other GenBank sequence. An alternative splice site detected near the 5'-end of mouse intron 14 may allow the generation of a truncated protein because one stop codon, in phase with the ORF, was identified upstream from the alternative splice site (Fig. 3b). In the CD-1 mouse brain, a RNA containing the extended version of exon 14 was detected (not shown). No alternative standard splice site was detected in the 5'-end of human intron 14 but, two stop codons in phase with the ORF (Fig. 3b); a RNA containing the extended version of exon 14 was detected in a human cell line (undifferentiated SH-SY5Y cells) that expressed very low levels of PPII activity (not shown). Rat, human and mouse PPII\* had similar predicted extension lengths in the sequence C-terminal to E812, but only partial sequence similarity (Fig. 3c).

## Discussion

Multiple mRNAs for PPII are detected in rat brain and pituitary (Schauder *et al.* 1994; Schomburg *et al.* 1999); their origin and coding properties are unknown. In this study, we demonstrated that an alternative usage of 5' intronic splice sites generated, in rat tissues, cytosolic mRNAs that encoded either the full-length PPII or a C-terminally truncated version. This C-terminally truncated version functioned as a powerful dominant-negative form of the wild-type rPPII, possibly acting through heterodimerization.

We have predicted the presence of a loop (B) in the center of the C-terminal domain; rPPII\* is a rPPII truncated in this loop (Fig. 1). Loop B is implicated in porcine APN receptor function for transmissible gastroenteritis virus (Delmas *et al.*

1994). Moreover, proteolytic fragmentation of porcine APA indicates the presence of two regions susceptible to limited proteolysis, one corresponding to loop A and a second that may correspond to the putative loop B (Hesp and Hooper 1997); the proteolytic fragmentation of PPII shows similar results (Bauer 1994). These data indicate that loop B is exposed on the protein surface. Alignments of APN and PPII C-terminal domains show that the four cysteine residues of this domain are conserved and positioned C-terminal to loop B.

rPPII\* RNA encoded a protein truncated in the putative loop B, i.e. in the center of the C-terminal domain. In COS-7 cells, transfection of an expression vector for rPPII\* produced a 120 kDa protein devoid of any hydrolytic activity against TRH- $\beta$ NA, despite an expression level quantitatively similar to that of rPPII. Furthermore, constructs that encoded a smaller or larger deletion of the putative C-terminal domain were also inactive. These experiments indicated that a complete PPII C-terminal domain was required to generate an active enzyme, in agreement with similar data with APA truncated in loop A (Lee *et al.* 2000). These results are reminiscent of the loss of PPII activity that occurs whenever any cysteine residue is mutated in the C-terminal domain (Papadopoulos *et al.* 2000). Loss of PPII function by truncation in loop B might result from elimination of the intramolecular chaperone activity of the C-terminal domain (Rozenfeld *et al.* 2004).

rPPII\* was able to homodimerize covalently, possibly through C68, as reported for rPPII (Papadopoulos *et al.* 2000). rPPII\* was a dominant-negative form of rPPII because a decrease in activity was observed when both isoforms were co-expressed. Several possibilities could be considered to explain the dominant-negative effect. The truncated protein was not toxic to cells because, for example, APN activity was unaffected. It was unlikely that the truncated protein competed for substrate in the *in vitro* assay because assays were performed at substrate saturation and amounts of rPPII\* produced were similar to those of rPPII. Alternatively, rPPII\* and rPPII could compete for binding to a cellular partner required for activity but data are unavailable to assess this possibility. We favor heterodimerization as the major mechanism by which rPPII\* down regulated PPII activity because, when rPPII\* was co-expressed with rPPII, we observed no significant changes in amounts of rPPII monomers, a decrease in amounts of rPPII homodimers, and the appearance of putative rPPII-PPII\* heterodimers. These data imply that heterodimers were inactive.

Heterodimerization is a general mechanism of action for dominant-negative forms in multimeric proteins. For membrane proteins, dominant-negative actions can occur through ER retention, degradation of heterodimers, and unfolded protein response (Brothers *et al.* 2004; Page *et al.* 2004), as well as non-functional heterodimerization at the cellular surface. A dominant-negative mutant of the melanocortin-4

receptor (Biebermann *et al.* 2003) and the truncated forms of growth hormone and prolactin receptors (Flynn *et al.* 2004) act as dominant-negative forms through non-functional heterodimerization with wild-type receptors at the cell surface. Because rPPII-EGFP subcellular distribution in C6 glioma cells was unaltered by co-expression with rPPII\*, it is possible that non-functional heterodimerization is the molecular basis of the dominant-negative effect, i.e. that when PPII and PPII\* were co-expressed, inactive heterodimers were formed in ER and transported to the cell surface.

All mammalian type II peptidases exist as homodimers, including PPII and APA; most are covalently associated through a single disulfide bond near the transmembrane region except for APN, which forms non-covalent dimers (Hussain *et al.* 1981; Sjöström and Noren 1982). In the M1 family, covalent dimerization is not required for activity (Papadopoulos *et al.* 2000; Ofner and Hooper 2002). Activity is also detected in APN monomers (Feracci and Maroux 1980) but whether the same occurs for PPII is unknown. Because a substantial amount of heterodimer was formed when rPPII\* was expressed in amounts similar to those of rPPII, the truncated form bound to the complete isoform with an affinity similar to that of the interaction between complete monomers; this interaction was specific because APN endogenous activity was not altered. These data suggest that a domain of rPPII\* maintained a tertiary structure competent for specific dimerization, in spite of the truncation-induced possible loss of intramolecular chaperone activity. This hypothesis is consistent with the fact that, in the absence of the C-terminal domain, the catalytic domain of the puromycin-sensitive aminopeptidase is inactive but generates a substrate-binding domain with significant affinity and specificity (Ma *et al.* 2003). These data demonstrated that the region C-terminal to loop B was probably unnecessary for dimerization; this seems different to what is postulated for APN (Sjöström *et al.* 2000).

DNA sequence signals for PPII\* production seem to be evolutionarily conserved because an alternative standard 5' splice site is present in the mouse genome and we detected RNAs bearing the extension in mouse or human cells. Furthermore, semiquantitative analysis of mRNA levels showed that the rPPII\*/rPPII ratio was increased in tissues containing lower rPPII activity (Fig. 5). Finally, in some brain regions, rPPII\* mRNA levels were regulated by amygdala kindling in mirror image to those of rPPII mRNA levels or PPII activity (P. de Gortari *et al.* unpublished). Thus, expression of PPII\* mRNA is not the product of a constitutive but of a regulated splicing event and may have a functional significance. Natural formation of truncated dominant-negative cell surface proteins is a well-known phenomenon in the nervous system. For example, some brain channel isoforms function as dominant-negative regulators (Zarei *et al.* 2001). The regulated production of a PPII splicing isoform leading to the incorporation of an in-frame stop codon may lead to switching off of the expression of the

active PPII isoform and to efficient inhibition of the pre-existing activity. It should be noted that we do not yet have evidence that PPII\* is expressed in tissues because there are no specific antibodies. To the best of our knowledge, this is the first evidence that ectopeptidases have isoforms that function as dominant-negative regulators. It is tempting to speculate that C-terminally truncated forms of the M1 family membrane-bound aminopeptidases may generally function as enzyme inhibitors.

The use of dominant-negative forms is a powerful tool to study the functional role of proteins in the CNS. Our results demonstrate that by taking advantage of the dominant-negative behavior of PPII\*, it should be possible to develop expression vectors aimed at specific elimination of PPII action *in vivo*, an alternative to the use of inhibitors (Kelly *et al.* 2000; Pascual *et al.* 2004) or anti-sense oligonucleotides (Cruz *et al.* 2004).

In conclusion, we have identified an mRNA isoform encoding a C-terminally truncated version of PPII, obtained information about its distribution and the function of the protein. Neither rPPII\* nor other rPPII forms truncated in the C-terminal domain hydrolyzed TRH- $\beta$ NA but they inhibited rPPII activity, possibly due to heterodimerization. Together with previous data on APA and APN, these new results suggest that: (i) expression of C-terminally truncated proteins may be a general feature of the M1 family; (ii) some of these proteins occur through alternative splicing of the pre-mRNA; (iii) these proteins are devoid of peptidase activity and some of these short isoforms may be endogenous inhibitors of aminopeptidase activity.

## Acknowledgements

The authors thank the technical help of F. Romero as well as the computing support from R. Ciria, A. Martínez and A. Ocadiz. This work was partially supported by CONACYT (grants 31729 and 39931) and DGAPA-UNAM (grant IN225602-3).

## References

- Bauer K. (1994) Purification and characterization of the thyrotropin-releasing-hormone-degrading ectoenzyme. *Eur. J. Biochem.* **224**, 387–396.
- Bauer K. and Nowak P. (1979) Characterization of a thyroliberin-degrading serum enzyme catalyzing the hydrolysis of thyroliberin at the pyroglutamyl-histidine bond. *Eur. J. Biochem.* **99**, 239–246.
- Biebermann H., Krude H., Elsner A., Chubakov V., Guderian T. and Grüters A. (2003) Autosomal-dominant mode of inheritance of a melanocortin-4 receptor mutation in a patient with severe early-onset obesity is due to a dominant-negative effect caused by receptor dimerization. *Diabetes* **52**, 2984–2988.
- Bourdais J., Romero F., Urostegui B., Cisneros M., Joseph-Bravo P. and Charli J. L. (2000) [3-Me-His(2)]-TRH combined with dopamine withdrawal rapidly and transiently increases pyroglutamyl aminopeptidase II activity in primary cultures of adenohypophyseal cells. *Neuropeptides* **34**, 83–88.
- Brothers S. P., Comea A., Janovick J. A. and Conn P. M. (2004) Human 'loss-of-function' GnRH receptor mutants retain wild type receptors in the endoplasmic reticulum: molecular basis of the dominant-negative effect. *Mol. Endocrinol.* **18**, 1787–1797.
- Charli J. L., Méndez M., Joseph-Bravo P. and Wilk S. (1987) Specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase do not change the *in vitro* release of TRH or its content in rodent brain. *Neuropeptides* **9**, 373–378.
- Charli J. L., Cruz C., Vargas M. A. and Joseph-Bravo P. (1988) The narrow specificity pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochem. Int.* **13**, 237–242.
- Charli J. L., Méndez M., Vargas M. A., Cisneros M., Assai M., Joseph-Bravo P. and Wilk S. (1989) Pyroglutamyl peptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH released from rat brain slices. *Neuropeptides* **14**, 191–196.
- Charli J. L., Vargas M. A., Cisneros M., de Gortari P., Baeza M. A., Jasso P., Bourdais J., Pérez L., Uribe R. M. and Joseph-Bravo P. (1998) TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology* **6**, 45–57.
- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.
- Cruz R., Chávez-Gutiérrez L., Joseph-Bravo P. and Charli J. L. (2004) 3',5',-Triiodo-L-thyronine reduces efficiency of mRNA knock-down by antisense oligodeoxynucleotides: a study with pyroglutamyl aminopeptidase II in adenohypophysis. *Oligonucleotides* **14**, 176–190.
- Czekay G. and Bauer K. (1993) Identification of the thyrotropin-releasing-hormone-degrading ectoenzyme as a metallopeptidase. *Biochem. J.* **290**, 921–926.
- Delmas B., Gelfi J., Kut E., Sjöström H., Noren O. and Laude H. (1994) Determinants essential for the transmissible gastroenteritis virus-receptor interaction reside within a domain of aminopeptidase-N that is distinct from the enzymatic site. *J. Virol.* **68**, 5219–5224.
- Feracci H. and Maroux S. (1980) Rabbit intestinal aminopeptidase N. Purification and molecular properties. *Biochim. Biophys. Acta* **599**, 448–463.
- Flynn A., Whittington H., Goffin V., Uney J. and Norman M. (2004) A mutant receptor with enhanced dominant-negative activity for the blockade of human prolactin signaling. *J. Mol. Endocrinol.* **32**, 385–396.
- Friedman T. C. and Wilk S. (1986) Delineation of a particulate thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in rat brain by the use of specific inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase. *J. Neurochem.* **46**, 1231–1239.
- Hesp J. R. and Hooper N. M. (1997) Proteolytic fragmentation reveals the oligomeric and domain structure of porcine aminopeptidase A. *Biochemistry* **36**, 3000–3007.
- Heuer H., Schäfer M. K. H. and Bauer K. (1998) The thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme: the third element of the thyrotropin-releasing hormone-signaling system. *Thyroid* **8**, 915–920.
- Hussain M. M., Tranum-Jensen J., Noren O., Sjöström H. and Christiansen K. (1981) Reconstitution of purified amphiphilic pig intestinal microvillus aminopeptidase. Mode of membrane insertion and morphology. *Biochem. J.* **199**, 179–186.
- Kelly J. A., Slatore G. R., Tipton K. F., Williams C. H. and Bauer K. (2000) Kinetic investigation of the specificity of porcine brain thyrotropin releasing hormone-degrading ectoenzyme for thyrotropin releasing hormone-like peptides. *J. Biol. Chem.* **275**, 16 746–16 751.
- Lee H. J., Tomioka M., Takaki Y., Masumoto H. and Saido T. C. (2000) Molecular cloning and expression of aminopeptidase A isoforms from rat hippocampus. *Biochim. Biophys. Acta* **1493**, 273–278.

- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Ma Z., Daquin A., Yao J., Rodgers D., Thompson M. W. and Hersh L. B. (2003) Proteolytic cleavage of the puromycin-sensitive aminopeptidase generates a substrate binding domain. *Arch. Biochem. Biophys.* **415**, 80–86.
- Ofner L. D. and Hooper N. M. (2002) The C-terminal domain, but not the interchain disulphide, is required for the activity and intracellular trafficking of aminopeptidase A. *Biochem. J.* **362**, 191–197.
- Page K. M., Hebllich F., Davies A., Butcher A. J., Leroy J., Bertaso F., Pratt W. S. and Dolphin A. C. (2004) Dominant-negative calcium channel suppression by truncated constructs involves a kinase implicated in the unfolded protein response. *J. Neurosci.* **24**, 5400–5409.
- Papadopoulos T., Heuer H. and Bauer K. (2000) Analysis of the thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme by site-directed mutagenesis of cysteine residues. Cys68 is involved in disulfide-linked dimerization. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2617–2623.
- Pascual I., Gil-Parrado Sh, Cisneros M., Joseph-Bravo P., Diaz J., Possani L., Charli J. L. and Chavez M. (2004) Purification of a specific inhibitor of pyroglutamyl aminopeptidase II from the marine annelide *Hermodice carunculata*. *In vivo* effects in rodent brain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 138–152.
- Rozenfeld R., Muller L., El Messari S. and Llorens-Cortés C. (2004) The C-terminal domain of aminopeptidase A is an intramolecular chaperone required for the correct folding, cell surface expression and activity of this monozinc aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* doi M404369200.
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schauder B., Schomburg L., Köhrle J. and Bauer K. (1994) Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 9534–9538.
- Schmitmeier S., Thole H., Bader A. and Bauer K. (2002) Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone (TRH)-degrading serum enzyme and its identification as a product of liver origin. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1278–1286.
- Schomburg L., Turwitt S., Prescher G., Lohmann D., Horsthemke B. and Bauer K. (1999) Human TRH-degrading ectoenzyme cDNA cloning, functional expression, genomic structure and chromosomal assignment. *Eur. J. Biochem.* **265**, 415–422.
- Sjöström H. and Noren O. (1982) Changes of the quaternary structure of microvillus aminopeptidase in the membrane. *Eur. J. Biochem.* **122**, 245–250.
- Sjöström H., Noren O. and Olsen J. (2000) Structure and function of aminopeptidase N. *Adv. Exp. Med. Biol.* **477**, 25–34.
- Thunnissen M. M., Nordlund P. and Haeggstrom J. Z. (2001) Crystal structure of human leukotriene A(4) hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 131–135.
- Vargas M. A., Cisneros M., Herrera J., Joseph-Bravo P. and Charli J. L. (1992) Regional distribution of pyroglutamyl peptidase II in rabbit brain, spinal cord, and organs. *Peptides* **13**, 255–260.
- Vargas M. A., Joseph-Bravo P. and Charli J. L. (1994) Thyrotropin-releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohipophyseal cells. *Neuroendocrinology* **60**, 323–330.
- Wilk S. and Wilk E. (1989) Pyroglutamyl peptidase II, a thyrotropin releasing hormone degrading enzyme: purification and specificity studies of the rabbit brain enzyme. *Neurochem. Int.* **15**, 81–89.
- Zarei M. M., Zhu N., Alioua A., Eghbali M., Stefani E. and Toro L. (2001) A novel maxiK splice variant exhibits dominant-negative properties for surface expression. *J. Biol. Chem.* **276**, 16 232–16 239.

# ANEXO 2



## Homology modelling and site directed mutagenesis of pyroglutamyl peptidase II. Insights into *omega* versus *amino*peptidase specificity in the M1 family

Lucía Chávez-Gutiérrez,<sup>1</sup> Edna Matta-Camacho,<sup>1</sup> Joel Osuna,<sup>2</sup> Eduardo Horjales,<sup>3</sup> Patricia Joseph-Bravo,<sup>1</sup> Bernard Maigret,<sup>4</sup> and Jean-Louis Charli,<sup>1</sup>

Running Title: Structure-activity study of pyroglutamyl peptidase II

From <sup>1</sup>Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, <sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, <sup>3</sup>Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor., México. <sup>4</sup>Equipe de Dynamique des Assemblages Membranaires, UMR7565, Centre National de la Recherche Scientifique/Université Henri Poincaré 7565, Nancy, France.

Address correspondence to: Jean-Louis Charli, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Mor., 62271, México. Tel: (52)5556227633, Fax: (52)5556227622, E-mail: charli@ibt.unam.mx

Pyroglutamyl peptidase II (PPII) is a highly specific membrane bound ectopeptidase that removes N-terminal pyroglutamate from thyrotropin releasing hormone (pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>). PPII, an *omegapeptidase*, is a member of the M1 metallopeptidase family that includes enzymes such as *aminopeptidase N* (APN). Recognition of the terminal amino group of substrates/inhibitors by M1 *aminopeptidases* is by hydrogen-bonding, to two well conserved residues (for human APN: Q213 and exopeptidase motif E355). The N-terminal recognition mechanism for PPII, which substrate has no free amino terminus, is not known. While one of the conserved residues is present in PPII (E408, exopeptidase motif), the other one is replaced by serine (S269). Given that M1 peptidases specificity variations are likely due to changes in the catalytic region, we constructed three-dimensional models for the catalytic domains of PPII and APN. We found PPII-E408 interacting with PPII-K463 by salt bridge while its counterpart APN-E355 did not participate in a salt bridge. According to our models, the replacements S269Q and K463N, in PPII, should leave E408 in a physicochemical context similar to that found in APN or other

M1 *aminopeptidases* transforming PPII from an *omegapeptidase* to an *aminopeptidase*. This hypothesis was supported by site-directed mutagenesis showing that E408-K463 salt bridge is necessary for PPII activity while the S269Q/K463N PPII mutant displayed alanyl *aminopeptidase* activity. Therefore, recognition of a substrate without a N-terminal charge requires neutralization of the anionic binding site in the M1 metallopeptidases.

The M1 family of the MA clan of metallopeptidases contains zinc exopeptidases that act at the N-terminus of polypeptides (1). These exopeptidases are widely distributed in animal tissues and examples are known in bacteria, cyanobacteria, protozoa, fungi and plants. M1 metallopeptidases play critical roles in maturation, activation and degradation of peptides and therefore into a variety of physiological processes. Moreover, their abnormal expression has been involved in cancer and other pathological conditions such as cardiovascular disorders (2, 3, 4). All members are *aminopeptidases* except for pyroglutamyl peptidase II (PPII, EC 3.4.19.6), an *omegapeptidase* which catalyses the inactivation

of the neuropeptide thyrotropin-releasing hormone (TRH, pGlu-His-ProNH<sub>2</sub>) in the extracellular space (5-9).

TRH, initially characterized as a hypothalamic releasing factor regulating anterior pituitary secretions, is a neurotransmitter or neuromodulator within the central nervous system (CNS), with effects in multiple functions including cognition and locomotion (10-14). Clinical studies have reported beneficial effects of administration of TRH in several diseases but these improvements are of short duration. The rapid inactivation of TRH by PPII in the CNS extracellular space (14, 15) represents a significant drawback in its potential use as a therapeutic agent.

Rat and human PPII cDNAs have been cloned; they encode sequences with a high degree of conservation (16, 17). Purification of the brain enzyme indicates that it is a glycoprotein composed of two identical subunits with a molecular weight of 230 kDa when solubilized with trypsin (18, 19). The primary structure of PPII monomers includes a small intracellular N-terminal fragment, one transmembrane segment, and a large extracellular C-terminal region that presents the exopeptidase and catalytic motifs: G<sub>A</sub>A<sub>G</sub>MEN and HEXXH...<sub>18</sub>E, respectively. For PPII, as for other glucinins, two His residues and the C-terminal Glu within the catalytic motif (<sup>441</sup>-HEXXH...<sub>18</sub>E-<sup>464</sup>) coordinate the Zn<sup>2+</sup> atom while E442 and Y528 were proposed to activate a water molecule and stabilise the transition state, respectively (20). The C68 residue is involved in covalent dimerization but is not necessary for the enzymatic activity; additional C residues may be required to generate or maintain an active structure (21).

PPII is a narrow specificity enzyme hydrolyzing pyroglutamyl from TRH or very closely related tripeptides or tetrapeptides, but not from longer peptides such as luteinizing hormone-releasing hormone, bombesin or neurotensin (22-25). PPII substrates have the general structure pGlu-X-Y, X being a moderately bulky and uncharged residue and Y being Pro, Ala, Trp, Pro-Gly, ProNH<sub>2</sub> (TRH), Pro-β-nafhtylamine (βNA) or Pro-7-amino-4-methyl coumarin (18, 23, 26-28).

Sequence alignments among peptidases of the M1 family revealed that rat PPII shares 34 %

amino acid identity with human *amino*peptidase N (APN; EC 3.4.11.2), 32 % with mouse *amino*peptidase A (APA; EC 3.4.11.7), 31 % with human leukocyte-derived arginine *amino*peptidase (L-RAP; EC 3.4.-) or 29 % with human leukotriene A4 hydrolase (LTA4H; EC 3.3.2.6). This similarity increases remarkably in the region surrounding the active site, whereas the C-terminal domain sequences diverge.

Despite the importance of M1 peptidases in the metabolism of peptides, the structural determinants ensuring their strict exopeptidase action and specificity are poorly explored. Sequence alignment, chemical modification, and site-directed mutagenesis suggest that they use a common catalytic mechanism and that different specificities (neutral *amino*peptidase (APN), acidic *amino*peptidase (APA), arginyl *amino*peptidase (L-RAP) and pyroglutamyl *omega*peptidase (PPII)) are supported by punctual changes near the active site. In the M1 *amino*peptidases, specific recognition of the free amino terminal group of substrates and inhibitors involves hydrogen bonding with two conserved residues. LTA4H, a soluble bifunctional enzyme (epoxide hydrolase and *amino*peptidase) is the only member of the M1 family of metallopeptidases with a crystallographic structure solved (29). The structure of LTA4H complexed with the inhibitor bestatin, reveals that E271, located within the exopeptidase motif, and Q136 are positioned in the active site, and that both make hydrogen bonds to the free amine of the inhibitor, which chemically resembles a peptide substrate, suggesting their participation in the binding of the amino terminal group of substrates. Experimental analysis as well as examination of the x-ray structure of LTA4H-E271Q inactive mutant, indicate that E271 carboxylate is not only involved in the N-terminal recognition but has also a critical role in the *amino*peptidase activity (30). It was proposed that the counterparts of LTA4H-E271, APA-E352 and APN-E350 respectively, interact with the free amino group of substrates and inhibitors via a hydrogen bond, with their negative charge stabilizing the transition state (31, 32). Additionally, APA-E215, counterpart of LTA4H-Q136, is involved in the exopeptidase specificity by interacting with the N-terminal amine of the substrate, contributing together with the exopeptidase motif E352 to the correct

positioning of substrates and inhibitors in the active site (33). In conclusion, alpha-amino group recognition of substrates or inhibitors by M1 aminopeptidases implicates hydrogen bond and charge interaction with a glutamate residue within the exopeptidase motif (anionic binding site) as well as another hydrogen bond with the Glu or Gln residue equivalent to E215-APA or Q136-LTA4H.

In the absence of structural information to understand the *omegapeptidase* specificity of PPII and in order to compare it with that of M1 aminopeptidases, we constructed, by homology modelling, three-dimensional (3D) models for part of PPII and APN ectodomains. In contrast to APN-E350, we found the exopeptidase motif counterpart PPII-E408 in salt bridge with K463; this interaction was not disrupted when the substrate (TRH) was docked into the active site. According to our models, disruption of the salt bridge and replacement of PPII-S269 (counterpart of APA-E215) with Gln should leave E408 carboxylate free and position a new carboxylate group (Q269) to interact with substrates with an amino terminal group. Site-directed mutagenesis experiments supported this theoretical prediction.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Materials

Restriction enzymes and DNA-modifying enzymes were obtained from New England Biolabs (Beverly, MA, USA). DNA purifications were done using QIAGEN (Valencia, CA, USA) kits: QIAquick PCR purification kit, QIAquick gel extraction kit and plasmid Mini and Midi kits. Taq DNA polymerase, pcDNA3.1/HisA expression vector and liposomal transfection reagent Lipofectamine 2000 were from Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). pEGFP-N3 expression vector and anti-EGFP antibody (BD Living Colors) were from CLONTECH (Palo alto, CA, USA). The monoclonal anti-(poly-His)/alkaline phosphatase conjugate (clone HIS-1), phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF), iodoacetamide (IA), pepstatin A (PA) and deoxyribonuclease I (DNase I) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). pBluescript II KS and SK were from Stratagene (La Jolla, CA, USA). The synthetic substrates alanyl- $\beta$ -naphthylamide (Ala- $\beta$ NA), glutamyl- $\beta$ -

naphthylamide (Glu- $\beta$ NA), pyroglutamyl- $\beta$ -naphthylamide (pGlu- $\beta$ NA) and TRH- $\beta$ -naphthylamide (TRH- $\beta$ NA) were from Bachem (Bunderdorf, Switzerland). Nitroblue tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate were from Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, IN, USA). Immobilon-P membranes were from Millipore Corp. (Bedford, MA, USA). For DNA sequencing, we used a Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

### Modelling of PPII, PPII mutants, APN and L-RAP (Lys392) catalytic domains

By homology modelling, 3D models were constructed for the catalytic domains of rat PPII and human APN (residues 263 to 623 and 190 to 567, respectively) using as template the x-ray crystallographic structure of human LTA4H (29). PPII and APN models contained only the region most conserved between PPII or APN and template because we were interested in the study of the structure-function relationship for the active sites.

The method used was similar to that used for APA modelling (34). We aligned the sequences of APN or PPII peptidases with the LTA4H sequence taking into account the multiple alignment between several proteins of the M1 family and the secondary structure of the template; we defined structurally conserved regions (SCRs) for aligned regions, in which we assumed that the secondary structure is conserved, and unaligned regions as loops. Initial models were obtained by transfer of coordinates from the template to PPII or APN sequences in the SCRs; the models were completed by adding the missing loops to connect the SCRs. In each case, we minimized the initial model using the conjugated gradient method, a cut off of 20 Å, keeping the backbone fixed (except for the loops) and the side chains free to move. A second round of minimization was repeated without any restriction. We used the accelrys CFF97 force field. We added a Zn<sup>2+</sup> atom in the corresponding position based on template structure. The minimized model was placed in a water box (dimensions: 80, 95, 80 Å) and five or fifteen water molecules were changed to sodium ions to achieve neutrality for PPII or APN system respectively. To eliminate crashes between sodium

ions and solvent, we deleted water molecules surrounding the ions (radius = 2 Å). The completed systems (protein, Zn<sup>2+</sup>, counter-ions and water molecules) were transferred to NAMD using CHARMM27 force field. Once in NAMD the refinement procedure continued with several energy minimization steps followed by molecular dynamics. We began by fixing the backbone of the protein while side chains, water molecules and ions were variables; in a subsequent step the whole system was relaxed. The dielectric constant was 1. We checked the stability of the models during molecular dynamics; they did not present residual mean square deviations greater than 1.5 Å between their backbone atoms. PPII mutants were modelled by substituting the desired side chain in PPII model followed by energy minimization.

Because of the sequence similarity between L-RAP and LTA4H sequences, the crystal structure of human LTA4H was also chosen as a template for construction of a 3D model of human L-RAP (Lys392) (residues 118 to 494); 3D modelling was performed by using CPHmodels 2.0 homology modelling server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) (35).

#### Docking of TRH in PPII model

To understand the structural basis of TRH recognition by PPII, we performed docking studies. TRH was docked in our PPII model according to the position of bestatin in the template structure (29) and to experimental data about the amino terminal substrate recognition in the MI family (30-33, 36). TRH was placed in the active site of the catalytic domain model using InsightII; water molecules surrounding the peptide in a radius of 2 Å were deleted. The PPII-TRH system was subjected to minimization steps followed by molecular dynamics.

#### Expression plasmids and site-directed mutagenesis

Rat PPII expression vector (pN3/rPPII), rPPII poly-His tagged expression vector (pcDNA3.1/HisA-rPPII) and expression vector of enhanced green fluorescent protein (EGFP) fused in frame to the C-terminus of rPPII (pEGFPN3/rPPII), were constructed as previously described (37). In pcDNA3.1/HisA-rPPII, the rPPII coding sequence was in frame C-terminal to

the poly-His tag. pEGFP-N3 expression vector for EGFP was used as control vector in transfections.

Site-directed mutagenesis was done according to the one-step overlap extension PCR method (38). The PCR amplifications were performed with 35 cycles of denaturation (92 °C, 30 s), annealing (55 °C, 30 s) and extension (72 °C, 1 min). Fragment Xma I/Sac I of rat PPII cDNA was cloned into both pBlueScript II/KS and SK. These vectors served as PCR templates in the presence of one universal primer (T7, 5'-GTAATACGACTCACTCACTATAGGGC-3')

and two mutagenic primers, each one containing the mutagenic substitution into a 20 nucleotides overlapping region. S269Q: 5'-ACTCAGTTTCAACCTACGCATGCCAGGAA G-3' and 5'-ATGCGTAGGTTGAAACTGAGTAACACCGA G-3';

K463N: 5'-GTGTGGTTGAACGAAGGCTTTGCTCACTAC -3' and 5'-AAAGCCTTCGTTCAACCACACATCTTCCCA -3';

K463R: 5'-GTGTGGTTGAGGGAAGGCTTTGCTCACTAC -3' and 5'-AAAGCCTTCCCTCAACCACACATCTTCCCA -3'; K463Q: 5'-GTGTGGTTGCAGGAAGGCTTTGCTCACTAC -3' and 5'-AAAGCCTTCCTGCAACCACACATCTTCCCA -3';

PCR products were digested (Xma I/Sac I), separated by gel electrophoresis and purified using the gel extraction kit (QIAGEN). Each mutant sequence was subcloned back into the wild type, poly-His or EGFP tagged PPII expression vector. Double mutants were constructed sequentially using the same protocol. The presence of the mutation and the absence of non-specific mutations were confirmed by DNA sequencing.

#### Cell culture, transfection, membrane preparation and fluorescence microscopy

COS-7 or C6 glioma cells were cultured and transfected as previously described (37). Cells were collected 48 h post-transfection, and total membranes prepared essentially as described (39). Briefly, cells were homogenized in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 (buffer A), 0.3

$\mu\text{M}$  PMSF,  $1 \mu\text{M}$  IA,  $1 \mu\text{M}$  PA,  $2.5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0.1 \text{ mg/ml}$  DNase I by freezing and thawing on ice (3X). Total membranes were collected by centrifugation ( $90\,000 \text{ g}$ ,  $45 \text{ min}$ ), the pellet was washed once with buffer A,  $1 \text{ M}$  NaCl and centrifugation repeated. Finally, the pellet was homogenized in buffer A and stored at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  until use. Protein concentrations were determined by the Bradford assay (40). For microscopic analysis, cells were observed under an eclipse TE300 microscope (Nikon, Melville NY, USA) equipped with the cool snap software at  $40\times$  magnification. EGFP fluorescence was detected using the EPI-FL filter block (Nikon).

#### SDS-PAGE and Western blot analysis

Membrane preparations were submitted to reducing SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, proteins transferred and poly-His or EGFP tagged PPII (wild type or mutants) detected as described (37). The protein expression levels were estimated by densitometric scanning with a Fluor-S MultiImager (BioRad, Hercules, CA, USA).

#### Peptidase activity determination

PPII activity was determined with the substrate TRH- $\beta\text{NA}$  in a coupled assay in the presence of excess DAPIV and inhibitors of soluble enzymes degrading TRH, essentially as described (39); alanyl and glutamyl aminopeptidases activities were assayed with  $400 \mu\text{M}$  Ala- $\beta\text{NA}$  or  $400 \mu\text{M}$  Glu- $\beta\text{NA}$  in  $100 \text{ mM}$  Tris-HCl, pH 7.5, respectively. To determine pglutamyl peptidase activity we used  $1 \text{ mM}$  N-ethyl maleimide (an inhibitor of pyroglutamyl peptidase I, PPI, EC 3.4.19.3) in  $50 \text{ mM}$   $\text{NaPO}_4$  buffer pH 7.5; the enzymatic reaction was initiated by addition of  $400 \mu\text{M}$  pGlu- $\beta\text{NA}$ . All enzymatic assays were performed under initial velocity conditions, in duplicate or triplicate, and carried out at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; for each independent transfection the mean initial velocity was taken as one determination. Released  $\beta\text{NA}$  was determined in a fluorometer [exc.:  $335 \text{ nm}$ ; em.:  $410 \text{ nm}$ ]. Activities of wild type PPII and mutants were normalized by total protein or PPII expression levels for non-tagged or poly-His tagged proteins, respectively.

## RESULTS AND DISCUSSION

Multiple alignments for the M1 family were performed to study the conservation of the residues involved in the specific recognition of the alpha amino group of substrates or inhibitors. The glutamate within the exopeptidase motif, corresponding to E408 in PPII sequence, was conserved among all known M1 metallopeptidases except for human aminopeptidase O in which an Ala substituted the glutamate residue (41). The second residue (APA-E215, APN-Q213 or LTA4H-Q136) was glutamate or glutamine except for PPII in which it was serine (S269) (Fig. 1A).

Unlike APN and APA substrates, TRH doesn't have an alpha-amino group at the N-terminus, suggesting that the mechanism for positioning TRH in the active site is different. However, replacement of E408 for glutamine leads to a completely inactive enzyme while the E408D mutant has a very low catalytic activity (due to a decreased  $V_{\text{max}}$  value while  $K_{\text{m}}$  is not affected); this indicates that the negative charge and position of carboxylate are crucial for catalysis but not for substrate binding (20). The fact that the second Glu/Gln residue involved in the amino recognition is not conserved in PPII is not surprising, but suggests a different recognition mechanism.

#### Modelling of rat PPII and human APN catalytic domains identify a PPII specific salt bridge

To characterize the structural determinants ensuring the *omegapeptidase* specificity of PPII, 3D models were constructed for PPII and APN catalytic domains based on the crystal structure of LTA4H, which shows the enzyme folded into three domains presenting a deep cleft containing the catalytic site (29).

PPII and APN models consisted of part of a N-terminal region (mainly  $\beta$ -sheets), a globular central domain (or catalytic domain) and part of a C-terminal helical region (Fig. 2). In both models, the N-terminal region was tightly compacted due to hydrogen bonding. The salt bridge interaction involved in the N-terminal domain cohesion (previously described for the APA model (34)) was detected (not shown). The active sites were buried but accessible to the solvent, organized by three alpha helices and two loops that together

presented the residues involved in catalysis. PPII-H441, PPII-E442 and PPII-H445 (or their counterparts in the APN model: APN-H388, APN-E389, APN-H392) were over helix 1; helix 2 presented PPII-E464 (or APN-E411) while helix 3 placed PPII-Y528 (or APN-Y477), the Tyr residue involved in the stabilization of the transition state. Loops 1 and 2 approached PPII-S269 (or APN-Q213) and exopeptidase motif residue PPII-E408 (or APN-E355) to the active site, respectively. The histidine and glutamate residues of the HEXXH...<sub>18</sub>E motif coordinated the Zn<sup>2+</sup> ion in both models (Fig. 2). One water molecule was kept stable around the zinc ion, engaged by two hydrogen bonds with PPII-E408 and PPII-E442 or APN-E389 and APN-E355 side chains (not shown).

Organization of the active site was compared in the two models. In the PPII model, E408 carboxylate was situated at ~3 Å of K463 amine group; this strong salt bridge interaction was specific for the PPII active site (Fig. 2). In the APN model, E355 was interacting by hydrogen bonds with Y278 (not shown) as well as with the solvent, contributing with E389 to place a water molecule around the zinc ion (not shown).

### **Substrate docking suggests a mode of pyroglutamyl-PPII interaction**

When TRH was docked into PPII catalytic pocket, the salt bridge was not disrupted, E408 carboxylate being at 3.4 Å from K463 amine. TRH kept the same orientation as bestatin in LTA4H structure; the pGlu residue was positioned in a similar way as the phenyl ring of bestatin stacked against Y404 from loop 2 (Y267 in LTA4H). Additionally, the pyroglutamyl NH group was hydrogen bonded with the backbone carbonyl group from the exopeptidase motif A406. S269 did not establish any interaction with the substrate (not shown). However, the PPII-S269 residue position may have been affected by frontier effects because loop 1 is at the N-terminal edge of the model.

Taking into account the M1 family multiple alignments, that S269 and K463 residues are conserved within PPII sequences (Fig. 1B), the experimental data for amino terminal recognition by M1 aminopeptidases and the pyroglutamyl TRH position in our model, we propose that PPII-S269 hydroxyl group may interact with TRH pyroglutamyl cetonic group. However,

experimental assessment must be performed to clarify the contribution of loop 1 to *omegapeptidase* specificity.

We hypothesize that while APN-Q215 and -E355 are available to interact with substrates as hydrogen acceptors, PPII-S269 is involved as hydrogen donor in the recognition of the pyroglutamyl residue of TRH whereas, E408 negative charge is neutralized by K463 to assure *omegapeptidase* specificity. Based on these data, we tested whether changing S269 and K463 into their APN counterparts modifies PPII activity and is sufficient to promote *aminopeptidase* specificity in PPII.

### **Mutations of S269 or K463 do not change PPII expression**

In order to study the functional role of K463 in the activity and specificity of PPII, it was replaced, by site-directed mutagenesis, with Asn (the residue commonly present in the family), Arg or Gln. A S269Q mutant and S269/K463 double mutants were also constructed. The impact of these mutations on expression, maturation, and cellular distribution of PPII was determined in COS-7 or C6 glioma cells.

Expression and maturation of recombinant proteins was determined in COS-7 cells transiently transfected with vectors for wild type or mutated His-tagged PPII. Membrane preparations were subjected to SDS-PAGE in reducing conditions and His-tagged proteins were detected by Western blot analysis. Wild type and mutated PPIIs were detected as one band of 145 kDa corresponding to glycosylated PPII monomers. Expression levels were similar in all cases (Fig. 3A) and similar results were obtained in C6 glioma cells (not shown).

Since we predicted that the K463N mutation abrogates E408-K463 salt bridge interaction, we selected it to investigate the subcellular localization of K463-PPII mutants. C6 glioma cells transfected with vectors for wt rPPII-EGFP or rPPII-K463N-EGFP mutant expressed PPII proteins at similar levels (not shown). When analysed by fluorescent microscopy, both proteins displayed the same subcellular distribution, localized mainly at the plasma membrane (Fig. 4).

Additionally, the *aminopeptidase* activity displayed by the double mutants PPII-S269Q/K463N or PPII-S269Q/K463R (see below)

discarded a missfolding problem caused by E408-K463 salt bridge disruption or S269Q mutation. Together, these data show that any change of PPII activity by mutating the S269 or K463 residues was not due to a change in expression or traffic.

#### **Mutations of S269 or K463 residues abolish PPII activity**

To determine the activity of wild type and mutant proteins, C6 glioma or COS-7 cells were transiently transfected with each of the expression vectors (pN3-rPPII wt/mutant or pcDNA3.1/HisA-rPPII wt/mutant). pEGFP-N3 was used as control vector. After 48 h in culture, membranes were prepared and PPII activity determined with a fluorometric assay. Whichever the assay used, the relative effects of mutations were independent of cell type or whether the protein was or was not tagged. However, the absolute values varied (not shown).

Substitutions of K463 with amino acids with different physicochemical properties (Asn or Gln) generated mutants inactive against TRH- $\beta$ NA, suggesting that disruption of the salt bridge was responsible for the loss of activity; however, the K463R substitution also inactivated PPII (Fig. 3A). These contradictory results could be explained if PPII-R463 did not form a salt bridge (the positive charge in the side chains of lysine and arginine may not be localized in the same position). Substitution of K463 by Arg in the PPII model, and subsequent energy minimizations, placed the R463 side chain amine at more than 5 Å from E408 carboxylate and pointing to the solvent, supporting our interpretation (Fig. 5B). An example in which substituting Lys by Arg does not restore the original interaction is a naturally occurring mutation (K183R) in the ectodomain of the human thyrotropin receptor; the K183R change disrupts a salt bridge involved in the specificity of the receptor (42). These results suggest that loss of the E408-K463 interaction may contribute significantly to the loss of PPII activity when either of these residues is mutated. It is probable that during evolution, recognition of a substrate without a N-terminal charge required neutralization. However, other roles for the salt bridge cannot be discarded.

The results for K463 mutants, together with data published for E408 mutants (20), suggest a differential role for the glutamate residue present

in the exopeptidase motif that could relate it to the *omega* and *amino* specificities in the M1 family. For M1 aminopeptidases, the Glu residue within the exopeptidase motif acts together with another Glu/Gln residue (counterpart of PPII-S269) in the binding of NH<sub>2</sub>-terminal group of substrates (30-33, 36). Accordingly, we made the hypothesis that disruption of the E408-K463 salt bridge, leaving E408 free to interact with an amino terminal group and substitution of PPII-S269 to put in place the second carboxylate required for amino recognition should be sufficient to generate an APN-like enzyme from PPII.

Before testing this hypothesis, we evaluated the activity of PPII-S269Q, PPII-S269Q-K463N and PPII-S269Q-K463R with TRH- $\beta$ NA as substrate; none of the mutants was active (Fig. 3A). The assumption we made about an interaction between the pyroglutamyl cetonic group of the substrate and S269 side chain may explain the loss of activity in the S269Q mutant in terms of binding. We propose a correlation between 269-side chain shortening, from Glu/Gln present in *aminopeptidases* to Ser in PPII and the presence of pGlu in the substrate's N-terminal (Fig. 6). However, more experiments are necessary to validate our prediction. The facts that Arg could not replace K463 and that the S269Q change inactivated PPII suggest that this active site has a precise spatial design that may contribute to its high specificity.

#### **Double mutations of S269 and K463 are sufficient to transform PPII into an alanyl aminopeptidase**

The mutants were evaluated for their ability to hydrolyse pGlu- $\beta$ NA, Glu- $\beta$ NA and Ala- $\beta$ NA. Since PPI activity was inhibited and it is a soluble enzyme, pGlu- $\beta$ NA hydrolysis was undetectable in control membranes; as expected, neither PPII nor PPII mutants had detectable activity (not shown).

However, when Ala- $\beta$ NA was used as substrate the PPII-S269Q/K463N and PPII-S269Q/K463R double mutants had a 50 % higher specific activity than that of controls; while S269Q, K463N and K463R specific activities did not differ from control values (Fig. 3B). Since the basal activity was probably due to the action of endogenous neutral peptidases, we used actinonin, a relatively specific APN inhibitor, to minimize it.

The addition of 0.5 mM or 1 mM actinonin, concentrations that do not affect wild type PPII activity (Cruz, R., unpublished), reduced control activity by 65 or 80 %, respectively (not shown) and magnified the specific activity of PPII-S269Q/K463N or PPII-S269Q/K463R with respect to controls. Even in the presence of actinonin, the activities of the single mutants were similar to the control values (Fig. 3B). Since the ratio of the Ala- $\beta$ NA hydrolyzing activity of the double mutants over control activities was increased by the APN inhibitor, the *aminopeptidase* activity of the double mutants was not due to an induction of endogenous APN activity, but to an intrinsic activity of the mutant proteins.

Specific activities were similar for mutants and control preparations when Glu- $\beta$ NA was used as substrate (Fig. 3C); the basal activity was probably due to endogenous APA activity. The inability of double mutants to hydrolyze Glu- $\beta$ NA shows that S1 subsites are different in APA and PPII mutants, providing useful information for its identification in the M1 metallopeptidase family.

These results demonstrate that both changes are necessary to create a significant alanyl-*aminopeptidase* activity. Substitution of S269 by Gln in PPII model did not disrupt the E408-K463 salt bridge (not shown), possibly explaining its inability to hydrolyse Ala- $\beta$ NA. We propose that K463 single mutants were inactive against Ala- $\beta$ NA because the presence of a Ser residue in loop 1 (S269) does not allow the exopeptidase glutamate E408 interaction with the substrate's terminal amine, as showed by data for APA-E215A mutant. APA-E215A mutation produces a change in the position of the inhibitor GluPhos in the active site, such that it does not interact with the exopeptidase glutamate residue (33).

Therefore, in agreement with previous data (30-33, 36), our results imply that loops 1 and 2 participate actively in the exopeptidase specificity. Moreover, we found that the exopeptidase negative charge must be neutralized to enable *omegapeptidase* specificity and that the presence of an anionic binding site promotes *aminopeptidase* specificity.

### **In M1 metallopeptidases the presence of S269 in loop 1 and K463 in helix 2 correlate with *omegapeptidase* specificity**

A detailed search into the sequence databases, including putative M1 metallopeptidases from genomes, revealed that a subset of bacterial peptidase sequences had Lys instead of Asn in the position corresponding to PPII Lys463 (Fig. 5A). Experimental data on the specificity of PepN from *E. coli*, one of these proteins, confirm the *aminopeptidase* nature of the enzyme (43). Likewise, a putative APN sequence from fruit fly has Lys instead of Asn (44). Finally, two human L-RAP sequences differ in residue 392, which corresponds to PPII-K463, being Asn for one sequence [L-RAP-(Asn392)] or Lys for the other [L-RAP-(Lys392)]. There is no information about the L-RAP-(Lys392) specificity but characterization of L-RAP-(Asn392) reveals a preference for substrates with N-terminal arginine (45). We constructed a simplified 3D model for the catalytic domain of L-RAP-(Lys392) that suggested a salt bridge interaction between E200 present in loop 1 (equivalent to PPII-S269 or APN-Q215) and K392. K392 was located at 3.5 and 4 Å from E200 and E337 carboxylates, respectively; these distances suggest that the strongest salt interaction occurred between K392 and E200, leaving E337 charged (the equivalent of APN-355) (Fig. 5B). Multiple alignments, including more than 150 PepN-like bacterial sequences, revealed that, except for PPII, a Lys residue present in helix 2 was always accompanied by a Glu residue in loop 1 (Fig. 5A). The putative interaction between L-RAP-(Lys392) Glu residue in loop 1 and Lys in helix 2 was supported by this correlation. We hypothesize that the same is occurring for PepN sequences with a Lys residue in helix 2. Thus, a hydrogen bonding property in loop 1 and an anionic binding site in loop 2 are maintained, and binding of amino group of substrates and *aminopeptidase* activity unaffected. However, more experimental and theoretical data are required to prove this hypothesis.

Taken together, these results show important correlations for the specificity in the M1 metallopeptidases family. While PPII sequences had Ser and Lys residues localized in positions 269 (loop 1) and 463 (helix 2), almost all M1 *aminopeptidases* had Glu or Gln and Asn, respectively. Unlike the glutamate within the



exopeptidase motif (loop 2), a negative charge in loop 1 was not necessary for aminopeptidase specificity unless a positive charge was present in helix 2, as in PepN or human L-RAP-(Lys392) sequences. In fact, for APA, the substitution of E215 (loop 1) with Gln causes an increment in the  $k_{cat}/K_m$  ratio mainly due to an increase in  $k_{cat}$  (33).

Finally, a very recent study proposes a putative ligand-binding mode for TRH in PPII active site (46) that differs from the orientation that bestatin adopts in the active site of the LTA4H structure. The bestatin's binding mode is the binding orientation proposed for substrates in M1 aminopeptidases based on theoretical and experimental data and our results suggest that TRH binds in the same orientation. Since ligand binding molecular mechanisms are well conserved during evolution of members of the same protein family (47), we consider our proposal in better accordance with the M1 family evolutionary binding mode as demonstrated by the successful substrate specificity change obtained with our designed double mutants.

### Conclusions

On the basis of 3D models for PPII and APN, two members of the M1 family with different substrate specificities, as well as on multiple sequences alignment for the family, we identified in PPII active site two residues that could be implicated in the *omegapeptidase* specificity. One of these is a serine residue specific for PPII (S269) and the second one, K463, creates a putative salt bridge with E408, a salt bridge that is specific for PPII. Site directed mutagenesis studies confirmed this hypothesis and evidenced a critical role of Glu within the exopeptidase motif for *amino* vs. *omegapeptidase* specificity. Moreover, our results demonstrate that the PPII model is a useful tool for investigating the activity and specificity mechanisms in the enzyme and, in comparison with that of other M1 family members, to understand the difference in specificities.

### REFERENCES

1. Barrett, A.J., Rawlings, N.D., and Woessner, J. F. (1998) **Handbook of Proteolytic Enzymes**, Academic Press, San Diego, CA, USA
2. Nanus, D.M. (2003) *Clin. Cancer Res.* **9**, 6307-6309
3. Sato, Y. (2004) *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 772-776
4. Albiston, A.L., Ye, S., and Chai, S.Y. (2004) *Protein Pep. Lett.* **11**, 491-500
5. Charli, J. L., Cruz, C., Vargas, M. A., and Joseph-Bravo, P. (1988) *Neurochem. Int.* **13**, 237-242
6. Charli, J. L., Méndez, M., Vargas, M. A., Cisneros, M., Assai, M., Joseph-Bravo, P., and Wilk, S. (1989) *Neuropeptides* **14**, 191-196
7. O'Cuinn, G., O'Connor, B., and Elmore, M. (1990) *J. Neurochem.* **54**, 1-13
8. Bauer, K., Heuer, H., Ifflander, F., Peters, A., Schmitmeier, S., Shomburg, L., Turwitt, S., and Wilkins, M. (1997) **In Cell-Surface Peptidases In Health And Disease**, Kenny, A.J., and Boustead, C.M., eds., pp. 239-248, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK.
9. Charli, J. L., Vargas, M. A., Cisneros, M., de Gortari, P., Baeza, M. A., Jasso, P., Bourdais, J., Pérez, L., Uribe, R. M., and Joseph-Bravo, P. (1998) *Neurobiology* **6**, 45-57
10. O'Leary, R.M., and O'Connor, B. (1995) *J. Neurochem.* **65**, 953-963
11. Morley, J.E. (1979) *Life Sci.* **25**, 1539-1550
12. Horita, A. (1998) *Life Sci.* **62**, 1443-1448
13. Griffiths, E.C., Baris, C., Visser, T.J., and Klootwijk, W. (1985) *Regul. Pept.* **10**, 145-155
14. Nillni, E.A., and Sevarino, K.A. (1999) *Endocr. Rev.* **20**, 599-648
15. Kelly, J. A. (1995) *Essays Biochem.* **30**, 133-149
16. Schauder, B., Schomburg, L., Köhrle, J., and Bauer, K. (1994) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 9534-9538
17. Schomburg, L., Turwitt, S., Presche, G., Lohmann, D., Horsthemke, B., and Bauer, K. (1999) *Eur. J. Biochem.* **265**, 415-422

18. Wilk, S., and Wilk, E. (1989) *Neurochem. Int.* **15**, 81-89
19. Bauer, K. (1994) *Eur. J. Biochem.* **224**, 387-396
20. Papadopoulos, T., Kelly, J., and Bauer, K. (2001) *Biochemistry* **40**, 9347-9355
21. Papadopoulos, T., Heuer, H., and Bauer, K. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 2617-2623
22. O'Connor, B., and O'Cuinn, G. (1985) *Eur. J. Biochem.* **150**, 47-52
23. Elmore, M.A., Griffiths, E.C., O'Connor, B., and O'Cuinn, G. (1990) *Neuropeptides* **15**, 31-36
24. O'Leary, R.M., and O'Connor, B. (1995) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**, 881-890
25. Gallagher, S. P., and O'Connor, B. (1998) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 115-133
26. Friedman, T. C., and Wilk, S. (1986) *J. Neurochem.* **46**, 1231-1239
27. O'Connor, B., and O'Cuinn, G. (1984) *Eur. J. Biochem.* **144**, 271-278
28. Kelly, J. A., Slator, G. R., Tipton, K. F., Williams, C. H., and Bauer, K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 16746-16751
29. Thunnissen, M. M., Nordlund, P., and Haeggstrom, J. Z. (2001) *Nature Struct. Biol.* **8**, 131-135
30. Rudberg, P., Tholander, F., Thunnissen, M., and Haeggström, J.Z. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 1398-1404
31. Luciani, N., Marie-Claire, C., Ruffet, E., Beaumont, A., Roques, B.P., and Fournié-Zaluski, M.C. (1998). *Biochemistry* **37**, 686-692
32. Vazeux, G., Iturrioz, X., Corvol, P., and Llorens-Cortés, C. (1998). *Biochem. J.* **334**, 407-413
33. Rozenfeld, R., Iturrioz, X., Okada, M., Maigret, B., and Llorens-Cortes, C. (2003) *Biochemistry* **42**, 14785-14793
34. Rozenfeld, R., Iturrioz, X., Maigret, B., and Llorens-Cortes, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 29242-29252
35. Lund, O., Nielsen, M., Lundegaard, C., and Worning, P. (2002) *Abstract at the CASP5 conference A102*
36. Laustsen, P. G., Vang, S., and Kristensen, T. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 98-104
37. Chávez-Gutiérrez, L., Bourdais, J., Aranda, G., Vargas, M.A., Matta-Camacho, E., Ducancel, F., Segovia, L., Joseph-Bravo, P., and Charli, J.L. (2005) *J. Neurochem.* **92**, 807-817
38. Urban, A., Neukirchen, S., and Jaeger, K.E. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 2227-2228
39. Bourdais, J., Romero, F., Urostegui, B., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P., and Charli, J.L. (2000) *Neuropeptides* **34**, 83-88
40. Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
41. Díaz-Perales, A., Quesada, V., Sánchez, L.M., Ugalde, A.P., Suárez, M.F., Fueyo, A., and López-Otín, C. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 14310-14317
42. Smits, G., Govaerts, C., Nubourgh, I., Pardo, L., Vassart, G., and Costagliola, S. (2002) *Mol. Endocrinol.* **16**, 722-735
43. Chandu, D., and Nandi, D. (2003) *Microbiology* **149**, 3437-3447
44. Zhang, H., Tan, J., Reynolds, E., Kuebler, D., Faulhaber, S., and Tanouye, M. (2002) *Genetics* **162**, 1283-1299
45. Tanioka, T., Hattori, A., Masuda, S., Nomura, Y., Nakayama, H., Mizutani, S., and Tsujimoto, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 32275-32283
46. Kelly, J. A., Scalabrino, G. A., Slator, G. R., Cullen, A.A., Gilmer, J.F., Lloyd, D.G., Bennett, G.W., Bauer, K., Tipton, K. F., and Williams C. H. (2005) *Biochem. J.* doi: 10.1042/BJ20041722
47. Nobeli, I., Spriggs, R. V., George, R.A., and Thornton, J. M. (2005) *J. Mol. Biol.* **347**, 415-436

## FOOTNOTES

This work was supported by grant 39931 from CONACYT to J.L.C. *Abbreviations used are:* TRH: thyrotropin-releasing hormone; PPII: pyroglutamyl peptidase II; APN: aminopeptidase N; APA: aminopeptidase A; LTA4H: leukotriene A4 hydrolase; L-RAP: leukocyte-derived arginine aminopeptidase; EGFP: enhanced green fluorescent protein;  $\beta$ NA:  $\beta$ -naphthylamide; SCR: structurally conserved regions; 3D: three-dimensional; rms: residual mean square; PMSF: phenylmethyl-sulfonyl fluoride; IA: iodoacetamide; PA: pepstatin A.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Multiple alignments of M1 family amino acid sequences around the active site. RefSeq accession numbers to are included. The zinc-binding ligands are indicated in bold type. S269, E408 and K463 rat PPII residues are denoted with arrows. A: characteristic motifs of M1 family aminopeptidases are underlined; human APN, mouse APA and human LTA4H residues, counterparts of S269, E408, E442, E464 and Y528 rat PPII, are indicated in the lower part. B: partial PPII sequences for rat, mouse, human, chicken and dog.

Figure 2. Models of rat PPII and human APN catalytic domains and sites. Three dimensional models for the catalytic regions of PPII and APN were generated using as template the human LTA4H x-ray crystal structure in complex with bestatin (upper part). Helices 1 and 2 (H1, H2) present the catalytic motif residues, helix 3 (H3) places the tyrosine residue implicated in the transition state while loops 1 and 2 (L1, L2) approximate the residues implicated in recognition of the NH<sub>2</sub> terminus of substrates and inhibitors. The E408-K463 salt bridge in the active site of PPII is boxed and zinc ions are shown as spheres (lower part).

Figure 3. Expression and *omega* or aminopeptidase activities of wild type PPII and mutants. C6 cells ( $8 \times 10^5$  cells per 60 mm dish) were transiently transfected with expression vectors for each of the following proteins: EGFP (control), PPII, S269Q, K463N, K463R, K463Q, S269Q-K463N and S269Q-K463R mutants; 15  $\mu$ L Lipofectamine 2000 were used. After 48 h in culture, membranes were prepared. Data are mean specific activities (in % of wild type rPPII activities)  $\pm$  SEM from 3 independent transfections, except for panel C with 2 independent transfections. A: PPII activity was determined with TRH- $\beta$ NA as substrate. Data were identical if assay time was increased up to 8 hours. Wild-type rPPII specific activity was  $268 \pm 4.6$  pmol TRH- $\beta$ NA hydrolysed/ min mg protein. Western blot: membrane fractions were subjected to SDS-PAGE in reducing conditions and His-tagged proteins detected by Western blot analysis using a monoclonal anti-poly-His alkaline phosphatase conjugate (data shown correspond to a representative transfection). Expression levels were normalized by wild type PPII expression (data are mean  $\pm$  SEM, n=3). B: alanyl aminopeptidase activity was determined using Ala- $\beta$ NA as substrate without or with actinonin; control specific activity was  $75.8 \pm 12$  pmol Ala- $\beta$ NA hydrolysed/min mg protein C: glutamyl aminopeptidase specific activity was determined using Glu- $\beta$ NA as substrate; control specific activity was  $12.3 \pm 4$  pmol Glu- $\beta$ NA hydrolysed/min mg protein.

Figure 4. Cellular localization of wt-rPPII-EGFP and K463N-rPPII-EGFP mutant. Transiently transfected C6 glioma cells expressing rPPII-GFP or K463N-rPPII-GFP were analysed by microscopy. Left panels: bright field images; right panels: fluorescence microscopy; original magnification: 40 X.

Figure 5. A: Multiple alignment of APN and human L-RAP sequences around the active site. Characteristics motifs are boxed. The alignment shows that presence of Lys in helix 2 implicates a Glu in loop 1 in APN and L-RAP sequences (in bold type). B: comparison of active site organization in wild-type human APN, rat PPII-K463R mutant and human L-RAP (Lys392). Helices 1, 2 and 3 (H1, H2 and H3) constitute the active site. Loop 1 side chains residues shown are: Q213 (APN), S269 (PPII- K463R mutant) and E200 (human LRAP (Lys392)); loop 2 side chain glutamate (within the exopeptidase motif) is also shown. In PPII K463R mutant, the R463 amine is 5.4 Å away from E408 carboxylate (line). In L-RAP (Lys 392), E200-K392 salt bridge is boxed.

Figure 6. Schematic representation for the putative interaction between terminal amino or pGlu from substrates and loop 1 of *amino* or *omegapeptidases*, respectively. The shortening by two bonds of the Ser side chain with respect to glutamine or glutamate correlates with the two bonds between oxygen and nitrogen in pGlu.

**A**

			S269	E408		K463	
			↓	↓		↓	
PPII	RAT	Q10836	QFSPT--YLLAW--AAMENWGLSIF--VIVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGF--IAYKKG	531			
APN	HUMAN	P15144	QMCAA--YLLAF--GAMENWGLVTY--VIAHELHQWFGNLVTIEWWDLWLNEGF--ISYSKG	480			
APA	MOUSE	P16406	DHEPT--YLVCF--GAMENWGLVTY--VVAHELHQWFGNTVTMDWDDDLWLNEGF--ISYSKG	474			
A-LAP	RAT	Q9JJ22	QFEPT--YLVAF--GAMENWGLTTY--TVSHELHQWFGNLVTMEWDDLWLNEGF--VSYEKG	430			
P-LAP	HUMAN	NP_005566	QFEPL--YLVAF--GAMENWGLLTF--IIAHELHQWFGNLVTMKWDDLWLNEGF--LSYFKG	552			
L-RAP	HUMAN	AB109031	DFEPT--YLVAY--GAMENWGLITY--VIAHELHQWFGNLVTMEWWDIWLNEGF--VSYNKG	458			
APE2	YEAST	NP_012765	QMEPT--YLVAF--GAMENWGLVTY--VVQHELHQWFGNLVTMDWWEGLWLNEGF--ISYSKG	394			
AP1	YEAST	NP_011913	QMEAT--YLVAF--GAMENWGLVTY--VIQHELHQWFGNLVTMDWWEGLWLNEGF--ISYSKG	389			
PSA	HUMAN	P55786	QFEAT--YLVAF--GAMENWGLVTY--VVGHELHQWFGNLVTMEWWTWLWLNEGF--ISYSKG	371			
APB	HUMAN	Q9H4A4	QGQAV--YLIAL--GGMENPCLTFV--VIAHEI <del>SHSWTGNLVTNKTWDHFWLNEGH</del> --TPYEKG	417			
LTA4	HUMAN	P09960	QCQAI--YLIAL--GGMENPCLTFV--VIAHEI <del>SHSWTGNLVTNKTWDHFWLNEGH</del> --VPYEKG	388			

exopeptidase

catalytic motifs

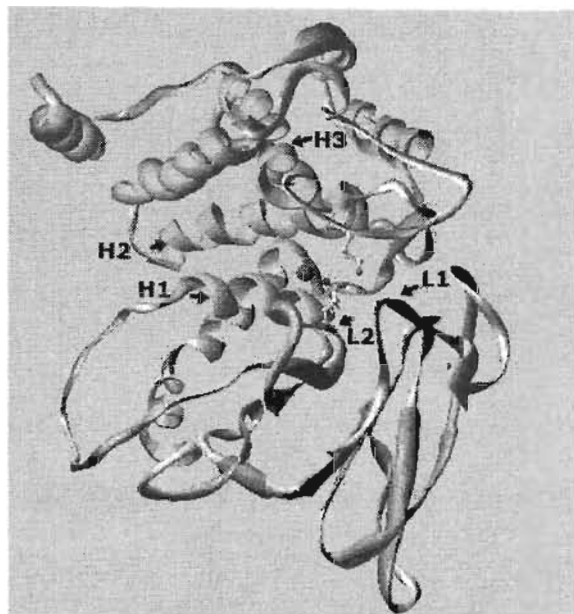
		S269	E408	E442	E464	Y528
PPII	rat	S269	E408	E442	E464	Y528
APN	human	Q213	E355	E389	E411	Y477
APA	mouse	E215	E352	E386	E408	Y471
LTA4	rat	Q136	E271	E296	E318	Y383

**B**

			↓	↓	↓
Rat	Q10836	QFSPT--YLLAW--AAMENWGLSIF--VIVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGF--IAYKKG			
Mouse	Q8K093	QFSPT--YLLAW--AAMENWGLSIF--VIVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGF--IAYKKG			
Human	Q9UKU6	QFSPT--YLLAW--AAMENWGLSIF--VIVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGF--IAYKKG			
Chicken	XP_425442	QFSPT--YLLAW--AAMENWGLSVF--VIVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGL--IAYKKG			
Dog	XP_538287	QFSPT-----AAMENWGLSIF--VIVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGF--IAYKKG			

Figure 1

## rPPII



## hAPN

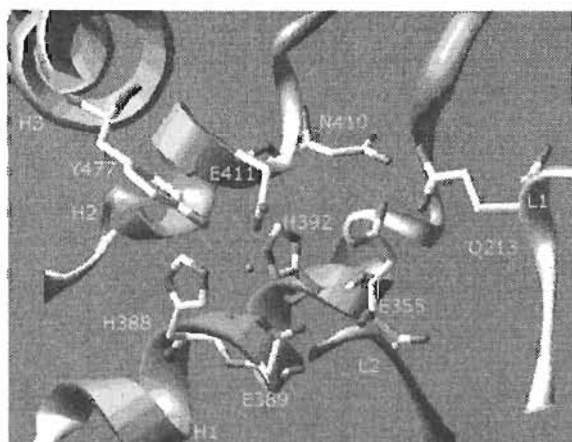
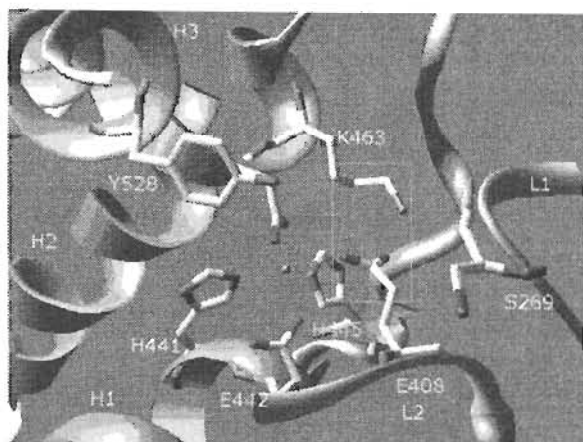
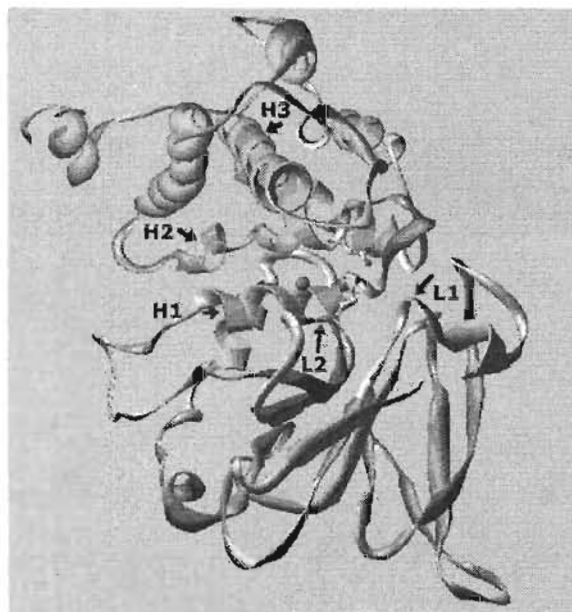


Figure 2

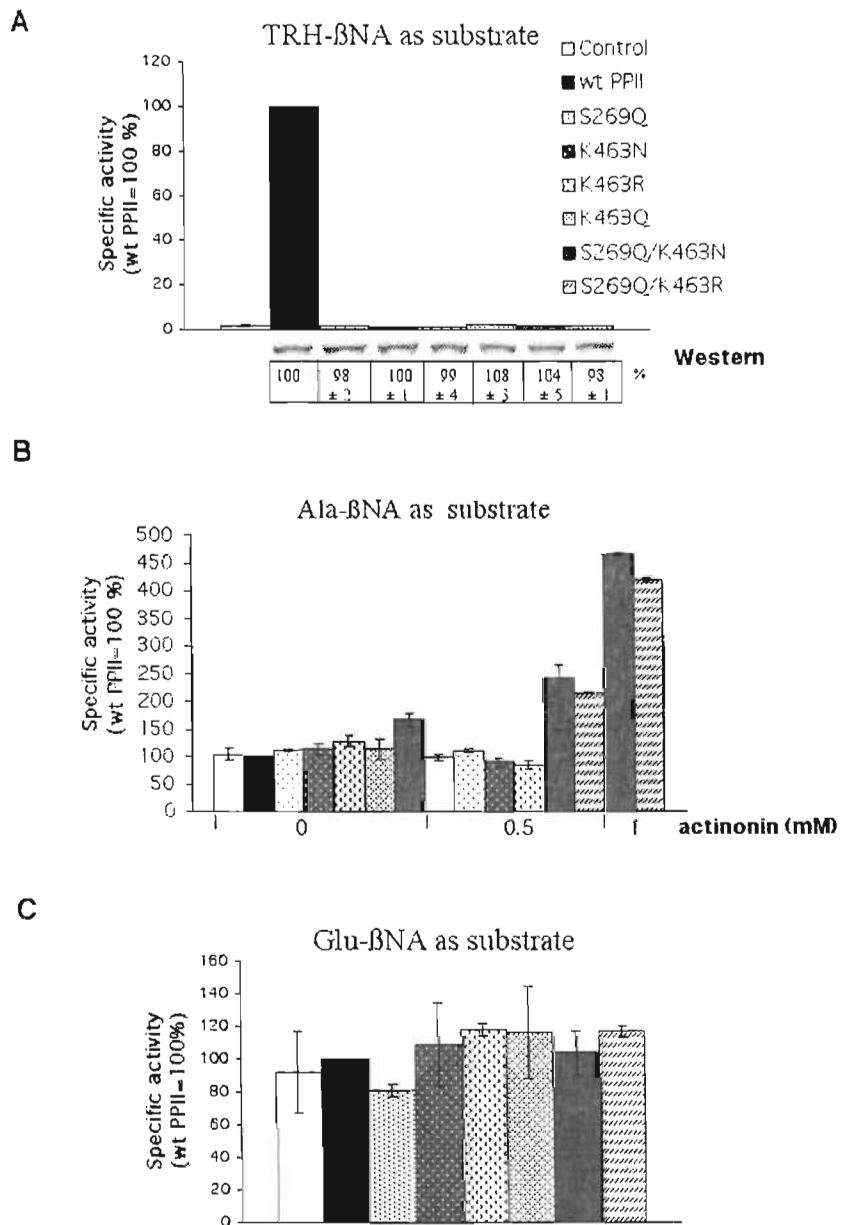
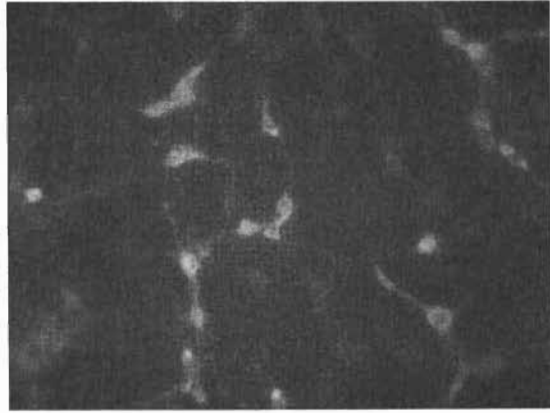
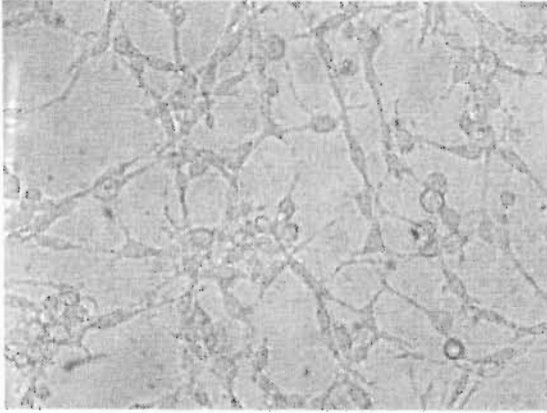


Figure 3

PPII-EGFP



PPII-K463N-EGFP

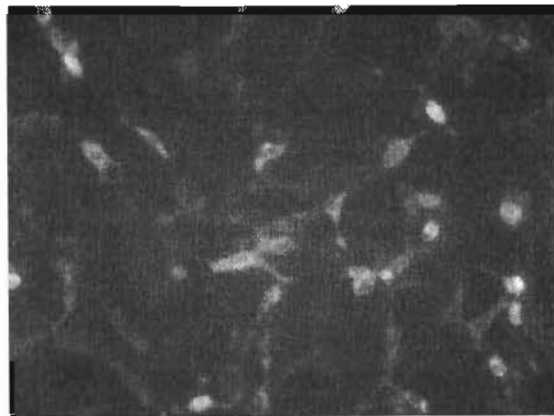
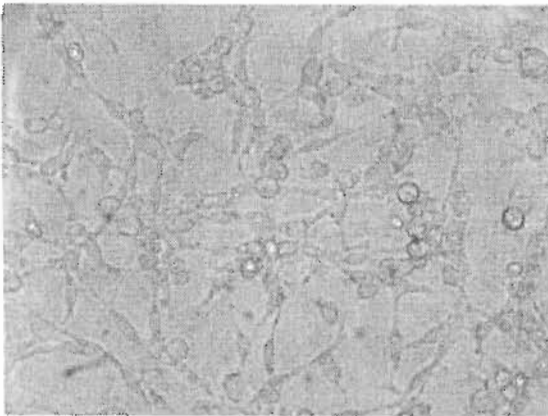


Figure 4

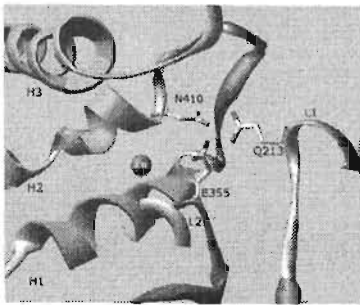


**A**

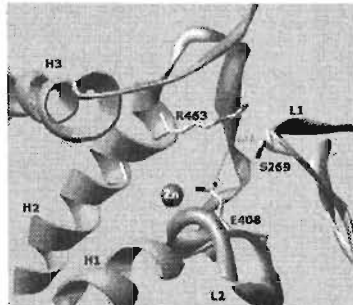
**APN**

human	TQMQA ---	DFNAGAMENWGLVTYRENSLLFPDPLSSSSSNKERVVTVIAHELAHQWFGNLVTIEWWNDLWLN	412
pig	TQMQS ---	DFNAGAMENWGLVTYRENALLFDPOSSSISNKERVVTVIAHELAHQWFGNLVTLAWWNDLWLN	407
cat	THMQA ---	DFNAGAMENWGLVTYRESALLYDRQSSSSGNQERVVTVIAHELAHQWFGNLVLEWVWVNDLWLN	411
Helicoverpa	TQFQA ---	DFGAGAMENWGLLTYREAYILYDEQHTSSNFQI IAYILSHEIAHMWFGNLVTNAWVWVNDLWLN	402
Lac_delbrueckii	TQFET ---	DFGAGAMENWGLVTYREAYLLDPDNTLEMKKLVATPVVTHELAHQWFGDLVTMEWVWVNDLWLN	312
Streptococcus	TQFES ---	DFSSGAMENWGLITYREIYLLVD-ENSTVQSRQQVALVIAHEIAHQWFGNLVTMKWVWVNDLWLN	316
Methanosarcina	TQCQQ ---	NSDFGGMENVGNTTITNRI MPFP-QITDPAFEYMI RVKVEHEYYHNQNGSEVTGRSPFEIWLNE	367
M. acetivorans	TQCQQ ---	NSDFGGMENVGNTTITNRI MPFP-QITDPAFEYMI RVKVEHEYYHNQNGSEVTGRSPFEIWLNE	387
Spodoptera_litura]	TQFQP ---	DFGAGAMENWGMVNYREAYLLYDPANTNLVNKIPIATIMAHGKWFGLVTCFVWVWVNDLWLN	379
Aedes	TQFES ---	DFAAAGAMENWGLVTYREALIYNSTKSPMGQLKRTASIIAHEYGHQFFGNLVSPKVVVWVNDLWLN	369
Leptospira	TDFEP ---	EFNMGAMENVGAVTFSEHYIFRSPRIYSEYLGR--ANTIYHEMVMWFGNLVTMKWVWVNDLWLN	323
Bifidobacterium	SQFEV ---	EYNAGAMENIGMVTIRDSYVFES--KVTDALAERRVTVLHELAMWFGDYVTMKWVWVNDLWLN	338
E_Coli (PepN)	TQCEA ---	FFNMGAMENKGLNIFNSKYVLARTDTATDKDYLDIERVIGHEYFHNWVGNRVTCRDWFQLSLKE	321
Yersinia	TQCEA ---	FFNMGAMENKGLNVFNSKYVLAKAETATDKDYLNIEAVIGHEYFHNWVGNRVTCRDWFQLSLKE	321
Photobacterium	TQCEA ---	FFNMGAMENKGLNVFNSKYVLANSKTATDTDYQIEAVIGHEYFHNWVGNRVTCRDWFQLSLKE	327
Nitrosomonas	TQCEA ---	DFNMGAMENKGLNIFNTSCVLAHPASTTDTAFQRVVIAHEYFHNWVGNRVTCRDWFQLSLKE	332
Brucella	TQCEA ---	DFNMGAMENKGLNIFNDKVVLDAPETVTDADYAGIEAVIAHEYFHNWVGNRVTCRDWFQLSLKE	330
B_bacteriovorus	TQCEA ---	DFNAGAMENKGLNIFNSRVLVLDANSATDVDVPHSIESVVAHEYFHNWVGNRVTLRDWFQLSLKE	319
<b>L-RAP</b>			
human	TDFEP ---	DFAPGAMENWGLITYRETSLLFPDKTSSASDKLWVTRVIAHELAHQWFGNLVTMEWVWVNDLWLN	

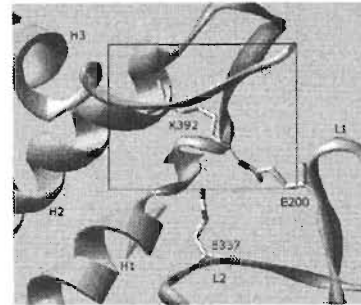
**B**



**Human APN**  
Gln, loop 1;  
Glu, loop 2;  
Gln, Helix 2.



**PII K463R**  
Ser, loop 1;  
Glu, loop 2;  
Arg, Helix 2.



**Human L-RAP (Lys392)**  
Glu, loop 1;  
Glu, loop 2;  
Lys, Helix 2.

Figure 5

AMINOPEPTIDASES

OMEGAPEPTIDASE

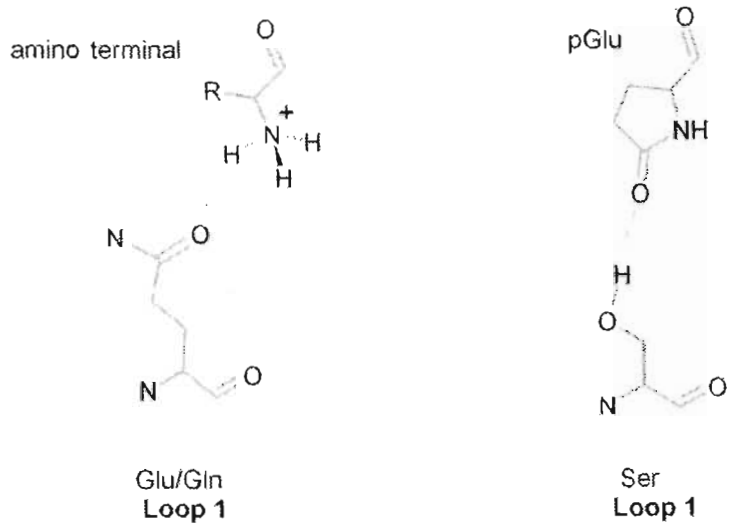


Figure 6