

Tesi Doctoral



Universitat Autònoma de Barcelona

**Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular
i
Institut de Biotecnologia i de Biomedicina**

Crystal Structure of Human Granzyme B

**Modelling of the Granzyme B-Cation-Independent
Mannose-6-Phosphate Receptor Complex**

Crystal Structure of Human Pro-Granzyme K

**Crystal Structure of the Procarboxypeptidase
from *Helicoverpa armigera***

Eva Estébanez Perpiñá

München 2002



Universitat Autònoma de Barcelona

**Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular
i
Institut de Biotecnologia i de Biomedicina**

**Memòria presentada per optar al grau de
Doctor en Ciències Biològiques, per la
Universitat Autònoma de Barcelona,
per Eva Estébanez Perpiñá**

Treball Realitzat durant el període 1998-2002 al:



MAX PLANCK INSTITUT FÜR BIOCHEMIE

Abteilung Strukturforschung

Direktor Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Robert Huber FRS

München

Deutschland

**Vist-i-plau del Director de la Tesi
Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Robert Huber FRS**

**Vist-i-plau del Supervisor de la Tesi
Prof. Dr. Wolfram Bode**

**Vist-i-plau del Tutor de la UAB
Dr. Francesc Xavier Avilés i Puigvert**

Table of contents

Abbreviations	8
Amino Acids	9
List of Publications	10
Preface	11
Summary	
Crystal Structure of Human Granzyme B.....	12
Granzyme B and the Cation-Independent Mannose-6-Phosphate Receptor.....	12
Crystal Structure of Human Pro-Granzyme K.....	13
Crystal Structure of a Procarboxypeptidase from <i>Helicoverpa armigera</i>	13
Resumen	
Estructura Tridimensional de la Granzima B Humana.....	14
Granzima B y el Receptor Manosa-6-Fosfato Independiente de Cationes.....	15
Estructura Tridimensional de la Pro-Granzima K Humana.....	15
Estructura Tridimensional de Procarboxipeptidasa de <i>Helicoverpa armigera</i>	16
Resum	
Estructura Tridimensional de la Granzima B Humana.....	17
Granzima B i el Receptor Manosa-6-Fosfat Independent de Cations.....	17
Estructura Tridimensional de la Pro-Granzima K Humana.....	18
Estructura Tridimensional d'una Procarboxipeptidasa d' <i>Helicoverpa armigera</i> ..	19

Introduction

Part 1. Principles of Protein Crystallography

1.1) Protein Crystallography.....	20
1.2) Crystallization Techniques.....	21
1.2.1) Crystallization by Vapor Diffusion Methods.....	21
Fig. 1. Process of Vapour Diffusion.....	21
1.2.2) What is a Protein Crystal.....	22
1.3) Principles of X-ray Crystallography.....	22
Figs. 2 and 3. Scattering.....	23
1.3.1) Braggs's Law.....	24
Fig.4. Braggs's Law.....	24
1.3.2) Ewald's Sphere.....	25
Fig. 5. Ewald's Sphere.....	25
1.4) The Solution of the Phase Problem by Molecular Replacement.....	26
1.4.1) The Patterson Function.....	26
1.4.2) Molecular Replacement.....	26
Fig. 6. Rotation and Translation.....	28

Part 2. Proteinases (Peptidases)

2.1) Introduction to Proteinases (Peptidases)	30
2.1.1) Protease, Proteinase or Peptidase.....	30
Fig. 7. Endopeptidases and Exopeptidases.....	30
2.2) Proteolytic Enzymes are Synthesized as Zymogens.....	31
2.3) Serine Proteinases	
2.3.1) Introduction to Serine Proteinases.....	33
2.3.2) Family S1 (Clan SA).....	34
2.3.3) Catalytic Mechanism.....	34
2.3.3.1. Acylation Step (Fig.9).....	35
2.3.3.2. Deacylation Step(Fig. 10).....	36
2.3.4) Structural Features of Serine Proteases.....	36

2.3.4.1) The His57/Asp102/ Ser195 Catalytic Triad.....	36
Fig. 11. The Catalytic Triad.....	36
2.3.4.2) The Oxyanion Hole.....	37
Fig. 12. The Oxyanion Hole.....	37
2.3.4.3) The Unspecific Main-chain Substrate Binding.....	38
2.3.4.4) The Specificity Pocket.....	38
Fig. 13. Schematic Diagrams of Specificity Pockets of Several Serine Proteinases.....	39
Fig. 14. Schechter and Berger Nomenclature.....	40
2.3.5) Trypsin-like Serine Proteinases Fold.....	40
Fig. 15. Topology Diagrams of Chymotrypsinogen.....	41
2.3.6) Zymogens of Serine Proteinases.....	41
2.4) Granzymes are Serine Proteinases.....	43
2.4.1) Introduction to Granzymes.....	43
2.4.2) Chromosomal Localization.....	43
2.4.3) Cathepsin C Activates Several Granzymes.....	44
2.4.4) Transport and Storage within the Granules.....	44
2.4.5) Granzyme Substrates.....	45
Fig. 16. Schematic Representation of a CTL Binding to a Target Cell..	46
2.5) Carboxypeptidases.....	47
2.5.1) Carboxypeptidase Subfamilies.....	48
2.5.1.1) A/B Subfamily.....	48
Fig. 17. CPA Substrate Preference.....	48
2.5.1.1.1) Crystal Structures of CPs from the A/B Family.....	49
Carboxypeptidase A.....	49
2.5.1.2) N/E Subfamily.....	50
2.5.1.2.1) Crystal Structures of CPs from the Regulatory Family.....	50
2.5.2) The Water-Promoted Pathway.....	51
Figs. 18 and 19. The Water-Promoted Pathway.....	51
2.6) Insect Proteinases.....	52
2.6.1) <i>Helicoverpa armigera</i> Taxonomy and Biology.....	52

Fig. 20. <i>Helicoverpa armigera</i>	52
2.6.2) Insect Pest Management.....	53
Results	55
Article 1. Crystal Structure of Human Granzyme B	
Crystal Structure of the Caspase Activator Human Granzyme B, a Proteinase Highly Specific for an Asp-P1 residue.	
1.1) Introduction.....	55
1.2) Fig.1. Crystal Structure of the Human Granzyme B Dimer.....	58
a) Ribbon Representation of the Granzyme B Molecules A and B	
b) Solid Surface Representation of the Granzyme B Dimer.	
1.3) Fig. 2. Topological and Sequence Comparison with Cathepsin G and Human Chymase.....	59
1.4) Structure Determination and Crystal Packing.....	60
1.5) Fig. 3. Electron Density Omit Map Detail of the Dimer Interface Region.....	61
1.6) Overall Structure of Granzyme B.....	62
1.7) Loops Surrounding the Active Site.....	63
1.8) Active-Site Cleft.....	65
1.9) Probable Peptide Substrate Binding.....	66
1.10) Fig. 4. Probable Interaction of the IETDSG Hexapeptide with Subsites S4 to S2' of Granzyme B.....	67
1.11) Discussion.....	69
1.12) Material and Methods.....	74
1.12.1) Production and Purification of Recombinant Human Granzyme B.....	74
1.12.2) Crystallization.....	75
1.13) Acknowledgements.....	77
1.14) Table 1. Statistics for Data Collection and Refinement.....	78
1.15) Accession Number.....	78

Article 2. Granzyme B and the Mannose-6-Phosphate Receptor

Entering the Cell in Pairs: Is Granzyme B Dimer the Form Internalized by Target Cells?	79
2.1) Is Granzyme B a Dimer?.....	80
2.2) Putative Location and Model of Mannose 6-Phosphate Residues in Human GzmB.	81
2.3) Fig. 1. Putative Location of Mannose 6-Phosphate Residues in Human GzmB.....	82
2.4) The Cation-Independent-Mannose 6-Phosphate Receptor.....	82
2.5) Fig. 2. Three-Dimensional Models of M6P-Binding Domains of Human Cation-Independent Mannose-6-Phosphate Receptor.....	83
2.6) Oligomerization States of CI-MPR.....	85
2.7) Fig. 3. Putative Binding Mode of Granzyme B to CI-MPR.....	86

Article 3. Crystal Structure of Human Pro-Granzyme K

Crystal Structure of Human Pro-Granzyme K Reveals a Novel Mechanism of Zymogen Stabilization	89
3.1) Introduction to Granzyme K.....	89
3.1.1) GzmK Substrate Specificity.....	89
3.1.2) Inhibitors of GzmK.....	89
3.2) Overall Structure of Granzyme K.....	90
3.2.1) Fig.1. Crystal Structure of Human Pro-GzmK.....	91
3.2.2) Fig. 2. Stereoview C Trace of Pro-GzmK in Standard Orientation.....	91
3.3) Electrostatic Surface Potential.....	91
3.3.1) Fig. 3. Solid Surface Representation of Pro-GzmK.....	92
3.4) Fig. 4. Structure-based Amino Acid Sequence Alignment.....	93
3.5) Pro-GzmK Active Site-Cleft.....	94
3.5.1) Fig. 5. Stereoview of Pro-GzmK Active Site Pocket.....	94
3.6) Comparison with Other Serine Proteinases	95
3.6.1) Comparison of Pro-GzmK with Other Serine Proteinase Zymogens	95
3.6.1.1) Fig. 6. Superposition of Pro-GzmK with Pro-complement D and Trypsinogen Around the S1 Pocket.....	97
3.6.2) Comparison of Pro-GzmK with Active Serine Proteinases	

(Granzyme B and Active Complement D).....	97
3.6.2.1) Fig. 7. Superposition of Pro-GzmK with Active CD and GzmB Around the S1 Pocket.....	99
3.6.3) Coagulation Factor IXa and Pro-GzmK: The Role of Residue 219.....	99
3.6.4) Overall Comparison of Pro-GzmK with Human GzmB.....	100
3.6.4.1) Fig. 8. Stereo Ribbon Plot of Pro-GzmK with GzmB.....	100
3.6.4.2) Fig.9. Side to Side Ribbon Plots of Pro-GzmK and GzmB.....	101
3.7) Discussion.....	101
3.8) Material and Methods.....	105
3.8.1) Crystallization of Human Pro-GzmK.....	105
3.8.2) Data Collection and Processing.....	106
3.9) Statistics for Data Collection and Refinement.....	107

Article 4.

Crystal Structure of the Procarboxypeptidase from *H. armigera*

Crystal Structure of a Novel Mid-gut Procarboxypeptidase from the Cotton Pest

***Helicoverpa armigera*.....**

4.1) Introduction to PCPAHa.....	108
4.2) Results and Discussion.....	109
4.2.1) Overall Structure of PCPAHa.....	109
4.2.2) Fig. 1. Stereo Ribbon Plot Representation of the Three-dimensional Structure of PCPAHa.....	110
4.2.3) Activation Segment of PCPAHa	110
4.2.4) Carboxypeptidase Moiety of PCPAHa.....	111
4.2.5) Fig. 2. Topological and Sequence Comparison of PCPAHa and Human PCPA2	
4.2.5.1) Stereo Ribbon Plot Superimposition of PCPAHa and PCPA2..	112
4.2.5.2) Structure-based Amino Acid Sequence Alignment.....	113
4.2.6) Fig. 3. Section Around the PCPAHa S1' Pocket Compared to PCPA2....	115
4.2.7) Probable Interaction with Peptidic Substrates.....	115

4.2.8) Fig. 4. Probable Interaction of the C-terminal Pentapeptide of LCI with the Active Site of PCPAHa.....	116
4.2.9) Fig. 5. Solid Surface Representation of PCPAHa.....	118
4.2.10) The Inhibition Mechanism.....	119
4.3) Conclusions.....	120
4.4) Materials and Methods.....	122
4.4.1) Crystallization and Structure Determination.....	122
4.5) Protein Data Bank Accession Number.....	123
4.6) Acknowledgements.....	124
4.7) Table 1. X-ray Data and Refinement Statistics.....	124
Conclusions and Future Perspectives.....	125
Granzyme B and Pro-Granzyme K.....	125
Procarboxypeptidase from <i>H. armigera</i> PCPAHa.....	127
References.....	128
Agradecimientos-Agraiments-Acknowledgements-Danksagung.....	148
Curriculum Vitae.....	151
Reprints of the Published Articles	

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

**Para Mis Padres
A la Memoria de Mis Yayos**

Abbreviations

Å	Ångström (1 Å= 10 ⁻¹⁰ meters)
CatC	cathepsin C/dipeptidyl peptidase I
CatG	cathepsin G
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CD-MPR	cation-dependent mannose-6-phosphate receptor
CI-MPI	cation-independent mannose-6-phosphate receptor
CPD-2	domain II of duck carboxypeptidase D
CrmA	cytokine response modifier
CTLs	cytotoxic T-lymphocytes
DNA	deoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FD	complement factor D
FPLC	fast-protein liquid chromatography
FIXa	active blood coagulation factor IX
GzmA	granzyme A
GzmB	granzyme B
GzmK	granzyme K
GzmH	granzyme H
<i>H. armigera</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>
HCl	hydrochloric acid
Hepes	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])
KDa	kilo Dalton
LCI	Leech Carboxypeptidase Inhibitor
MAD	multiwavelength anomalous diffraction
MIR	multiple isomorphous replacement
MR	molecular replacement
(MP6)	mannose-6-phosphate
NK cells	natural killer cells
NMR	nuclear magnetic resonance
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis

PEG	polyethylenglycol
PCPA	procarboxypeptidase A
PCPB	procarboxypeptidase B
PCPAHa	procarboxypeptidase A from <i>H. armigera</i>
PCR	polymerase chain reaction
PDB	Protein Data Bank
PI-9	proteinase inhibitor 9
RA	rheumatoid arthritis
rGzmB	recombinant granzyme B
r.m.s	root mean square
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Tris	, , -tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV	ultraviolet

Amino Acids (Three-letter and One-letter Codes)

Ala.....(A).....alanine	Lys.....(K)..... lysine
Arg.....(R)..... arginine	Met.....(M).....methionine
Asn.....(N).....asparagine	Phe.....(F).....phenylalanine
Asp.....(D).....aspartic acid	Pro.....(P).....proline
Cys.....(C).....cysteine	Ser.....(S).....serine
Gln.....(Q).....glutamine	Thr.....(T).....threonine
Glu.....(E).....glutamic acid	Trp.....(W).....tryptophan
Gly.....(G).....glycine	Tyr.....(Y).....tyrosine
His.....(H).....histidine	Val.....(V).....valine
Ile.....(I).....isoleucine	Xaa...any amino acid
Leu.....(L).....leucine	

List of Publications

This is the list of publications related to the dissertation work:

Estébanez-Perpiñá, E., Fuentes-Prior, P., Belorgey, D., Braun, M., Kiefersauer, R., Maskos, K., Huber, R., Rubin, H., and Bode, W. (2000). Crystal Structure of the Caspase Activator Human Granzyme B, a Proteinase highly Specific for an Asp-P1 Residue. *Biological Chemistry*, 381, 1203-1214.

Estébanez-Perpiñá, E., Bayés, A., Vendrell, J., Jongsma, M.A., Bown, D.P., Gatehouse, J.A., Huber, R., Bode, W., Avilés, F.X., and Reverter, D. Crystal structure of a novel midgut procarboxypeptidase from the cotton pest *Helicoverpa armigera*. *Journal of Molecular Biology (JMB)*, 313, pp. 629-638 (2001).

Estébanez-Perpiñá, E., Belorgey, D., Rubin, H., Bode, W., and Fuentes-Prior, P. Entering the Cell in Pairs: Is Granzyme B Dimer the Form Internalized by Target Cells?. In preparation.

Hink-Schauer, C., **Estébanez-Perpiñá, E.**, Wilharm, E., Fuentes-Prior, P., Bode, W. and Jenne, D. Crystal structure of Human pro-Granzyme K at 2.2 Å Resolution reveals a Novel Mechanism of Zymogen Stabilization. In preparation.

Preface

Proteinases are an important subject of study in our group; either in their inactive (zymogen) or active forms. The crystal structures of several serine proteinases i.e. trypsinogen, chymotrypsinogen A, trypsin, chymotrypsin, thrombin, chymase, leukocyte elastase, tissue kallikrein, and cathepsin G, as well as structures from carboxypeptidases i.e. porcine procarboxypeptidase B, porcine procarboxypeptidase A1, human procarboxypeptidase A2, and procarboxypeptidase A1 bovine ternary complex, have been determined in our laboratory.

The proteins whose molecular structures have been solved in the present work are two serine proteinases, pro-granzyme K and granzyme B, belonging to the granzyme family (S1 family, see nomenclature below) and a procarboxypeptidase from the bollworm *Helicoverpa armigera*, which belongs to the metalloprotease family.

The process of zymogen activation in the digestive serine proteases is well understood since many years, and the structural elements underlying it have been described in many of our papers. Until very recently, however, there was no granzyme crystal structure available, neither from an active nor from a zymogen form. It was thus interesting for us to solve the crystal structure of members of this serine proteinase family stored within the cytolytic granules of cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells.

As for the procarboxypeptidase, it is the first insect carboxypeptidase available so far. Being *Helicoverpa armigera* one of the most serious agricultural insect pests world wide, it was attractive to solve its three-dimensional structure for future design of ecologically safe pest control means.

This work is divided in three main parts: Introduction, Results and Discussion, and the Papers derived from it. In the Introduction, an overview of crystallography and proteinases can be found. In Results and Discussion, the crystal structures of human granzyme B, human pro-granzyme K, *H. armigera* procarboxypeptidase (PCPAHa), and the modelling of the interaction between granzyme B with its membrane receptor will be described in full detail. A reprint from the papers derived from this work is presented at the end of the dissertation.

Summary

Crystal Structure of Human Granzyme B

Granzyme B is the prototypic member of the granzymes, a family of trypsin-like serine proteinases localized in the dense cytoplasmic granules of activated natural killer cells and cytotoxic T-lymphocytes. Granzyme B directly triggers apoptosis in target cells by activating the caspase pathway, and has been implicated in the etiology of rheumatoid arthritis. Free human granzyme B expressed in a baculovirus system has been crystallized and its structure has been determined to 3.1 Å resolution, after considerably improving the diffraction power of the crystals by controlled humidity changes. The granzyme B structure reveals an overall fold similar to that found in cathepsin G and human chymase. The guanidinium group of Arg226, anchored at the back of the S1-specificity pocket, can form a salt bridge with the P1-Asp side chain of a bound peptide substrate. The architecture of the substrate binding site of granzyme B appears to be designed to accommodate and cleave hexapeptides such as the Ile-Glu-Thr-Asp_Ser-Gly sequence present in the activation site of pro-caspase-3, a proven physiological substrate of granzyme B. These granzyme B crystals, with fully accessible active sites, are well suited for soaking small synthetic inhibitors, that might be used for a treatment of chronic inflammatory disorders.

Granzyme B and the Cation-Independent Mannose-6-Phosphate Receptor

Granzyme B, together with the caspases and the Bcl-2 family members, plays an important role in eliciting apoptosis in virus-infected and tumor cells. The substrate specificity of Granzyme B is unusual for a serine proteinase, as it cleaves peptide bonds after aspartyl residues. The major structural element responsible for such substrate specificity is Arg226, which is anchored at the back of the S1-specificity pocket. The architecture of the substrate binding site of Granzyme B nicely explains the cleavage of hexapeptides such as the sequences Ile-Glu-Thr-Asp_Ser-Gly and Ile-Glu-Ala-Asp_Ser-Glu present in the activation sites of pro-caspase-3 and Bid, respectively, proven physiological substrates of Granzyme B. Our crystal structure of recombinant human Granzyme B unexpectedly revealed a dimer, mediated by the interdigitation of oligosaccharide chains attached to Asn65 in the two monomers. This finding, together

with observations that binding and uptake of Granzyme B in target cells is effected by the cation-independent mannose-6-phosphate (M6P) receptor, and that receptor dimerization is an essential element of the internalization mechanism, suggest that the glycosylated Granzyme B dimer would be the form preferentially recognized by its receptor. To investigate the probable binding mode of Granzyme B to its cell receptor we have modeled the binding of the Granzyme B dimer to the M6P-receptor domains -3 and -9 that mediate M6P-recognition.

Crystal Structure of Human Pro-Granzyme K

Granzyme K belongs to a family of trypsin-like serine proteinases localized in electron dense cytoplasmic granules of activated natural killer and cytotoxic T-cells. Granzymes A, B and K can trigger the apoptotic death program and are regarded as important immune effectors that contribute to the elimination of tumors and infected host cells. We produced the catalytically inactive variant Ser195Ala for human pro-granzyme K in *E. coli*, which is otherwise identical to its natural precursor. After refolding and crystallization we determined its structure to 2.2 Å resolution. The overall fold of pro-granzyme K is most similar to that found for complement factor D. The N-terminal residues Met14-Gly19 are completely disordered in the crystals and are thus freely accessible to cathepsin C, the dipeptidyl-aminopeptidase that efficiently removes the N-terminal dipeptide Met14-Glu15. In contrast to trypsinogen, the loops 188-195 and 214-228 of the activation domain are less mobile and are thus visible, whereas the loop 94-99 is not defined in the electron density. Furthermore, the residues Ser32, His40 and Asp194 are not arranged as a zymogen triad, as Asp194 adopts a conformation most similar to the active enzyme and is stabilized by electrostatic interactions with Lys188A and Ser190. This mechanism of zymogen stabilization has not been observed before in other serine proteinases.

Crystal Structure of a Procarboxypeptidase from *Helicoverpa armigera*

The cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: *Noctuidae*) is one of the most serious insect pests in Australia, India and China. The larva causes substantial economical losses to legume, fibre, cereal oilseed and vegetable crops. This

pest has proven to be difficult to control by conventional means, mainly due to the development of pesticide resistance. We present here the 2.5 Å crystal structure from the novel procarboxypeptidase (PCPAHa) found in the gut extracts from *H. armigera* larvae, the first one reported for an insect. This metalloprotease is synthesized as a zymogen of 46.6 kDa which, upon *in vitro* activation with Lys-C endoproteinase, yields a pro-segment of 91 residues and an active carboxypeptidase moiety of 318 residues. Both regions show a three-dimensional structure similar to the corresponding structures in mammalian digestive carboxypeptidases, with relevant structural differences being located in the loops between conserved secondary structure elements, including the primary activation site. This activation site contains the motif (Ala)₅Lys at the C-terminus of the helix connecting the pro- and the carboxypeptidase domains. A remarkable feature of PCPAHa is the occurrence of the same (Ala)₆Lys near the C-terminus of the active enzyme. The presence of Ser255 in PCPAHa instead of Ile and Asp found in the pancreatic A and B forms, respectively, enlarges the S1' specificity pocket and influences the substrate preferences of the enzyme. The C-terminal tail of the Leech Carboxypeptidase Inhibitor (LCI) has been modeled into the PCPAHa active site to explore the substrate preferences and the enzymatic mechanism of this enzyme.

Resumen

Estructura Tridimensional de la Granzima B Humana

La granzima B es la enzima prototipo de la familia de serina proteinasas similares a la tripsina llamadas granzimas, las cuales se encuentran en los gránulos citoplasmáticos de las células asesinas (natural killer) y de los linfocitos T citotóxicos (CTLs). La granzima B induce directamente apoptosis en las células diana mediante la activación de las caspasas, y está implicada en la etiología de la artritis reumatoide. Hemos cristalizado y resuelto la estructura tridimensional de la granzima B humana no inhibida a una resolución de 3.1 Å tras haber mejorado considerablemente el poder de difracción de los cristales mediante cambios controlados de humedad. El plegamiento tridimensional de la granzima B es similar al ya observado en catepsina G y quimasa humanas. El grupo guanidinio de Arg226 está situado en el fondo del bolsillo S1 de especificidad y puede formar un puente salino con la cadena lateral del Asp-P1 del substrato. El sitio de unión

del sustrato de la granzima B está diseñado para acomodar y cortar hexapéptidos, como por ejemplo la secuencia Ile-Glu-Thr-Asp_Ser-Gly, que se encuentra en el sitio de activación de la pro-caspasa 3, la cual es un sustrato fisiológico de la granzima B. Los sitios activos de las moléculas de granzima B están plenamente accesibles, así que éstos pueden usarse para el diseño de inhibidores sintéticos con vistas al desarrollo de medicamentos para tratar enfermedades inflamatorias crónicas.

Granzima B y el Receptor Manosa-6-Fosfato Independiente de Cationes

La granzima B, junto con las caspasas y los miembros de la familia Bcl-2, juega un importante papel en la inducción de apoptosis en células tumorales y células infectadas por virus. La especificidad de sustrato de la granzima B es inusual para una serina proteínasa ya que corta enlaces peptídicos que se encuentran tras un residuo de ácido aspártico. El principal elemento estructural responsable de esta especificidad de sustrato es Arg226, situada en el fondo del bolsillo S1 de especificidad. El sitio de unión del sustrato puede acomodar los hexapéptidos Ile-Glu-Thr-Asp_Ser-Gly y Ile-Glu-Ala-Asp_Ser-Glu que se encuentran en el sitio de activación de la pro-caspasa-3 y Bid, respectivamente, los cuales son sustratos fisiológicos de la granzima B. La granzima B recombinante cristalizó como dímero, mediante la interdigitación de las cadenas de oligosacáridos unidas a la cadena lateral de Asn65 de los dos monómeros. Este resultado, junto con las observaciones que la unión y internalización de la granzima B humana a la célula diana está mediada por el receptor manosa-6-fosfato independiente de cationes, y que dicho receptor necesita dimerizar para llevar a cabo su función, nos hicieron proponer que el dímero de granzima B glicosilada es la forma preferentemente reconocida por su receptor. Hemos modelado el modo de unión más probable entre la granzima B dimérica y su receptor fisiológico de membrana, concretamente a los dominios 3 y 9, ya que éstos son los responsables del reconocimiento de los residuos manosa-6-fosfato.

Estructura Tridimensional de la Pro-Granzima K Humana

La granzima K pertenece a la familia de serina proteinasas localizadas en los gránulos citoplasmáticos densos de las células asesinas (natural killer) y de los linfocitos

T citotóxicos (CTLs). Las granzimas A, B y K inducen la muerte celular programada en células tumorales y células infectadas por patógenos intracelulares. Hemos resuelto la estructura tridimensional de la pro-granzima K recombinante a una resolución de 2.2 Å. El plegamiento tridimensional de la pro-granzima K es muy similar al observado en el factor D del complemento. Los residuos N-terminales Met14-Gly19 no están definidos en la estructura tridimensional indicando un alto grado de flexibilidad, siendo estos residuos los que catepsina C, una dipeptidil-aminopeptidasa, elimina cuando se produce el proceso de activación de la pro-granzima K. Los lazos 188-195 y 214-228 están perfectamente definidos, a diferencia de lo que ocurre en la estructura tridimensional del tripsinógeno. Por otra parte, el lazo 94-99 no está definido en la densidad electrónica de la pro-granzima K, pero sí en el tripsinógeno. Los residuos Ser32, His40 y Asp194 no están dispuestos en forma de triada zimogénica, sino que el carboxilato de Asp194 adopta una conformación similar a la de la enzima activa, estabilizada por interacciones electrostáticas con Lys188A y Ser190. Este mecanismo de estabilización del zimógeno no había sido observado anteriormente en otras serina proteinasas.

Estructura Tridimensional de una Procarboxipeptidasa de *Helicoverpa armigera*

Helicoverpa armigera (Hubner) (Lepidoptera: *Noctuidae*) es un gusano que infecta la planta del algodón, y es una de las plagas más nocivas en Australia, India y China. Las larvas de este gusano también causan importantes pérdidas económicas en las cosechas de legumbres, cereales y vegetales. Los diversos métodos utilizados para combatir dicha plaga no han resultado fructíferos debido a que *H. armigera* ha desarrollado resistencia a numerosos pesticidas. Hemos resuelto la estructura tridimensional de una procarboxipeptidasa (PCPAHa) del aparato digestivo de las larvas de *H. armigera*. Esta metaloproteasa es sintetizada como zimógeno de 46.6 kDa, y es procesada *in vitro* por una Lys-C endoproteinasa, generando la enzima activa, la cual está compuesta por un prosegmento (91 residuos) y por el dominio carboxipeptidasa (318 residuos). La estructura tridimensional de PCPAHa es similar a la observada en las procarboxipeptidasas digestivas de mamífero. Las principales diferencias están localizadas en los lazos que conectan los elementos de estructura secundaria conservados, así como el sitio de activación. Éste último contiene el motivo (Ala)₅ Lys en el extremo

C-terminal de la hélice que conecta el prosegmento con el dominio carboxipeptidasa. El hecho de tener una Ser en la posición 255, y no Ile o Asp como ocurre en las carboxipeptidasas pancreáticas del tipo A y B, respectivamente, hace que el bolsillo S1' de especificidad se agrande e influencie la preferencia de sustratos de esta enzima. Hemos modelado la cola C-terminal del inhibidor de carboxipeptidasa de la sanguijuela (Leech Carboxypeptidase Inhibitor, LCI) dentro del sitio activo de la enzima para explorar la preferencia de sustrato de la PCPAHa así como el mecanismo enzimático de esta enzima.

Resum

Estructura Tridimensional de la Granzima B Humana

La granzima B és l'enzim prototípic de la família de serina proteinases similars a la tripsina anomenades granzimes, les quals estan localitzades als grànuls citoplasmàtics de les cèl.lules assassines (natural killer) i del limfòcits T citotòxics. La granzima B induïx apoptosi a les cèl.lules diana activant les caspases, i ha estat implicada en l'etiologia de l'artritis reumatoide. Hem cristal·litzat i resolt l'estructura tridimensional de la granzima B humana a una resolució de 3.1 Å, després d'haver millorat considerablement el poder de difracció dels cristalls mitjançant canvis controlats d'humitat. El plegament tridimensional de la granzima B és similar al ja observat en catepsina G i quimasa humanes. El grup guanidini de l'Arg226 està situat al fons de la butxaca S1 d'especificitat i fa un pont salí amb la cadena lateral de l'Asp-P1 del substrat. El lloc d'unió del substrat de la granzima B està dissenyat per acomodar i tallar hexapèptids, com per exemple la seqüència Ile-Glu-Thr-Asp_Ser-Gly, que es troba al lloc d'activació de la pro-caspasa 3, la qual és un substrat fisiològic de la granzima B. Les molècules de granzima B als cristalls obtinguts tenen els llocs actius plenament accessibles, así que poden ser utilitzats per dissenyar inhibidors sintètics que podrien ser utilitzats en un futur com a medicaments per tractar malalties inflamatòries cròniques.

Granzima B i el Receptor Manosa-6-Fosfat Independent de Cations

La granzima B, junt amb les caspases i els membres de la família Bcl-2, juga un paper important en la inducció d'apoptosi en cèl.lules tumorals i cèl.lules infectades per

virus. L'especificitat de substrat de la granzima B és inusual per una serina proteïnasa perquè talla enllaços peptídics que es troben després d'un residu d'àcid aspàrtic. El principal element estructural responsable d'aquesta especificitat de substrat és Arg226, situada al fons de la butxaca S1 d'especificitat. El lloc d'unió del substrat pot acomodar els hexapèptids Ile-Glu-Thr-Asp_Ser-Gly i Ile-Glu-Ala-Asp_Ser-Glu que es troben al lloc d'activació de la pro-caspasa-3 i Bid, respectivament, els quals són substrats fisiològics de la granzima B. La granzima B recombinant va cristal·litzar com a dímer, mitjançant la interdigitació de les cadenes d'oligosacàrids unides a la cadena lateral d'Asn65 dels dos monòmers. Aquest resultat, junt amb les observacions que la unió i internalització de la granzima B humana a la cèl·lula diana està mediada pel receptor manosa-6-fosfat independent de cations, i que aquest receptor necessita dimeritzar per realitzar la seva funció, van fer-nos proposar que el dímer de granzima B glicosilada és la forma preferentment reconeguda pel seu receptor. Hem modelat el modus d'unió més probable entre la granzima B dimèrica i el seu receptor fisiològic de membrana, concretament als dominis 3 i 9, ja que són els responsables del reconeixement dels residus manosa-6-fosfat.

Estructura Tridimensional de la Pro-Granzima K Humana

La granzima K pertany a la família de serina proteïnases localitzades als grànuls citoplasmàtics densos de les cèl·lules assassines (natural killer) i dels limfòcits T citotòxics (CTLs). Les granzimes A, B i K indueixen la mort cel·lular programada en cèl·lules tumorals i cèl·lules infectades per patògens intracel·lulars. Hem resolt l'estructura tridimensional de la pro-granzima K recombinant a una resolució de 2.2 Å. El plegament tridimensional de la pro-granzima K és molt similar a l'observat al factor D del complement. Els residus N-terminals Met14-Gly19 no estan definits a l'estructura tridimensional indicant un alt grau de flexibilitat; aquests són els residus que la catepsina C, una dipeptidil-aminopeptidasa, elimina quan es produeix el procés d'activació de la pro-granzima K. Els llaços 188-195 i 214-228 estan perfectament definits, a diferència del que ocorre a l'estructura tridimensional del tripsinògen. Contràriament, el llaç 94-99 no està definit en la densitat electrònica de la pro-granzima K, però sí al tripsinògen. Els residus Ser32, His40 i Asp194 no estan disposats en forma de triada zimogènica, sino que

el carboxilat de l'Asp194 adopta una conformació similar a la de l'enzim actiu, estabilitzat per interaccions electrostàtiques amb Lys188A i Ser190. Aquest mecanisme d'estabilització del zimògen no ha estat observat abans en cap altra serina proteinasa.

Estructura Tridimensional d'una Procarboxipeptidasa d'*Helicoverpa armigera*

Helicoverpa armigera (Hubner) (Lepidoptera: *Noctuidae*) és un cuc que infecta la planta del cotó, i és una de les pestes més nocives a Austràlia, Índia i China. Les larves d'aquest cuc causen importants pèrdues econòmiques en les collites de llegums, cereals i vegetals. Els diferents mètodes emprats per combatre aquesta peste no han estat positius perquè *H. armigera* ha desenvolupat resistència a diversos pesticides. Hem resolt l'estructura tridimensional d'una procarboxipeptidasa (PCPAHa) de l'aparell digestiu de les larves d'*H. armigera*. Aquesta metal·loproteasa és sintetitzada com a zimògen de 46.6 kDa, i després d'ésser processat *in vitro* per la Lys-C endoproteïnasa, s'obté l'enzim actiu, el qual està compost per un prosegment (91 residus) i pel domini carboxipeptidasa (318 residus). L'estructura tridimensional de PCPAHa és similar a la ja observada en les procarboxipeptidases digestives de mamífer. Les principals diferències estan localitzades en els llaços que connecten els elements d'estructura secundària conservats, així com el lloc d'activació. Aquest darrer té el motiu (Ala)₅Lys a l'extrem C-terminal de l'hèlix que connecta el prosegment amb el domini carboxipeptidasa. El fet de tenir una Ser en la posició 255, i no Ile o Asp com passa en les carboxipeptidases pancreàtiques del tipus A i B, respectivament, fa que la butxaca S1' d'especificitat s'engrandeixi i influènciï la preferència de substrats d'aquest enzim. Hem modelat la cua C-terminal de l'inhibidor de carboxipeptidasa de la sangonera (Leech Carboxypeptidase Inhibitor, LCI) dins del lloc actiu de l'enzim per explorar la preferència de substrat de la PCPAHa així com el mecanisme enzimàtic d'aquest enzim.