



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**Caracterización estructural y funcional de dos  
metalo-carboxipeptidasas de la familia M14  
con especificidad de sustrato tipo ácido:  
carboxipeptidasa citosólica 6 y  
carboxipeptidasa O humanas**

**María del Carmen García Guerrero**

**2017**





Universitat Autònoma  
de Barcelona

**Caracterización estructural y funcional de dos  
metalo-carboxipeptidasas de la familia M14  
con especificidad de sustrato tipo ácido:  
carboxipeptidasa citosólica 6 y  
carboxipeptidasa O humanas**

**Tesis doctoral presentada por María del Carmen García Guerrero para la  
obtención del título de Doctor en Bioquímica, Biología molecular y  
Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.**

Institut de Biotecnologia i Biomedicina  
Unitat d'Enginyeria de Proteïnes i Proteòmica

Tesis supervisada por:  
Dr. Francesc Xavier Avilés i Puigvert, Dr. Javier García Pardo y  
Dra. Julia Lorenzo Rivera

María del Carmen García Guerrero

Dr. Francesc Xavier  
Avilés i Puigvert

Dr. Javier García Pardo

Dra. Julia Lorenzo Rivera

*Bellaterra, Junio de 2017*



**“Daría todo lo que sé,  
por la mitad de lo que ignoro”**

**René Descartes**



## **AGRADECIMIENTOS**

A la gente que confió en mí...

A quienes han estado a mi lado incondicionalmente...

A las personas que no dejaron nunca que me rindiese...

A mi pequeña, sobretodo a ella...

A todos, ¡mil gracias!





## ***TABLA DE CONTENIDOS***

---



# TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS .....	11
LISTADO DE ABREVIATURAS .....	21
PREFACIO .....	27
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>31</b>
<b>1. Proteasas</b> .....	<b>33</b>
1.1. Clasificación de las proteasas.....	35
1.1.1. Clasificación de las proteasas según el tipo de reacción catalizada .....	35
1.1.2. Clasificación de las proteasas según la clase catalítica .....	37
1.1.3. Clasificación de las proteasas en función de la localización del enlace peptídico a hidrolizar en la cadena polipeptídica.....	39
1.1.4. Clasificación de las proteasas en base a su homología.....	41
1.2. La especificidad de sustrato en las proteasas .....	42
1.3. Carboxipeptidasas.....	43
1.4. Metalo-carboxipeptidasas .....	44
1.4.1. Subfamilia M14A.....	47
1.4.1.1. Carboxipeptidasas A1, A2 y B.....	48
1.4.1.2. Carboxipeptidasa A3 .....	50
1.4.1.3. Carboxipeptidasa A4 .....	50
1.4.1.4. Carboxipeptidasa U .....	51
1.4.1.5. Carboxipeptidasa A5 .....	53
1.4.1.6. Carboxipeptidasa A6 .....	53
1.4.1.7. Carboxipeptidasa O .....	54
1.4.2. Subfamilia M14B.....	56
1.4.3. Subfamilia M14C.....	60
1.4.4. Subfamilia M14D.....	61
1.4.4.1. Carboxipeptidasa citosólica 1 .....	65
1.4.4.2. Carboxipeptidasa citosólica 2.....	66
1.4.4.3. Carboxipeptidasa citosólica 3.....	67
1.4.4.4. Carboxipeptidasa citosólica 4 .....	68
1.4.4.5. Carboxipeptidasa citosólica 5 .....	68
1.4.4.6. Carboxipeptidasa citosólica 6 .....	69

1.5. Estructura de las metalo-carboxipeptidasas de la familia M14 .....	70
1.5.1. El pro-segmento N-terminal .....	70
1.5.2. El pro-dominio N-terminal .....	73
1.5.3. El dominio catalítico carboxipeptidasa .....	74
1.5.4. El centro activo .....	76
1.5.5. Mecanismo catalítico de las metalo-carboxipeptidasas .....	78
1.6. La especificidad de sustrato en las metalo-carboxipeptidasas .....	80
1.7. Inhibidores de metalo-carboxipeptidasas .....	82
1.7.1. Inhibidores proteicos endógenos .....	83
1.7.2. Inhibidores proteicos exógeno .....	85
1.7.2.1. <i>Inhibidores de carboxipeptidasas de plantas del género Solanum</i> .....	87
1.7.2.2. <i>Inhibidor del parásito intestinal Ascaris</i> .....	88
1.7.2.3. <i>Inhibidor de la sanguijuela Hirudo medicinalis</i> .....	89
1.7.2.4. <i>Inhibidores de las garrapatas Rhipicephalus bursa y H. longicornis</i> .....	90
1.7.2.5. <i>Inhibidor de Nerita versicolor</i> .....	90
1.7.2.6. <i>Inhibidor de Sabellastarte magnifica</i> .....	91
<b>2. Introducción a los microtúbulos</b> .....	<b>93</b>
2.1. Estructura y heterogeneidad de los microtúbulos .....	93
2.2. Dinámica de los microtúbulos .....	94
2.3. El código de la tubulina .....	94
2.3.1. La superfamilia de la tubulina .....	95
2.3.2. Modificaciones post-traduccionales de la tubulina .....	98
2.3.2.1 <i>Detirosinación de la <math>\alpha</math>-tubulina</i> .....	99
2.3.2.2. <i>Generación de <math>\Delta 2</math>- y <math>\Delta 3</math>-<math>\alpha</math>-tubulina</i> .....	99
2.3.2.3. <i>Acetilación de la <math>\alpha</math>-tubulina y <math>\beta</math>-tubulina</i> .....	100
2.3.2.4. <i>Fosforilación de la <math>\alpha</math>-tubulina y <math>\beta</math>-tubulina</i> .....	101
2.3.2.5. <i>Poliaminación de la <math>\alpha</math>-tubulina y <math>\beta</math>-tubulina</i> .....	101
2.3.2.6 <i>Glutamilación de la <math>\alpha</math>-tubulina y <math>\beta</math>-tubulina</i> .....	102
2.3.2.7. <i>Glicilación de la <math>\alpha</math>-tubulina y <math>\beta</math>-tubulina</i> .....	104
2.3.3. Proteínas interactoras de microtúbulos .....	105
<b>3. Introducción a la digestión proteica</b> .....	<b>107</b>
3.1. Etapa gástrica .....	107
3.2. Etapa intestinal I.....	107
3.2.1. Fase luminal del intestino delgado.....	109
3.2.2. Fase borde en cepillo de los enterocitos .....	110
3.2.3. Fase intracelular de los enterocitos .....	111

<b>OBJETIVOS</b> .....	115
<b>CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DE LA CCP6 HUMANA</b> .....	119
<b>1. Introducción</b> .....	121
<b>2. Materiales y métodos</b> .....	123
2.1. Producción recombinante de la CCP6 humana en células HEK293 F .....	123
2.2. Producción recombinante de la CCP6 humana en <i>E. coli</i> .....	124
2.3. Producción recombinante de la CCP6 humana en células Sf9 .....	125
2.4. Análisis de la expresión de la CCP6 humana .....	126
2.5. Purificación de la CCP6 humana .....	127
2.6. Ensayo de actividad <i>in vitro</i> de la CCP6 humana purificada .....	128
2.7. Modelo estructural de la CCP6 humana .....	129
2.8. Análisis de las modificaciones post-traduccionales de la tubulina .....	129
2.9. Inmunocitoquímica .....	131
2.10. Análisis de la actividad glutamilasa de varias TTLLs .....	132
2.11. Poliglutamilación de la tubulina endógena de células HEK293 F .....	132
2.12. Purificación de la tubulina poliglutamilada endógena de células HEK293 F .....	133
2.13. Ensayo de la cinética de deglutamilación de la tubulina poliglutamilada .....	134
2.14. Actividad de la CCP6 humana frente a telosquinas recombinantes con diferentes residuos C-terminales .....	135
2.15. Ensayos de inhibición de la CCP6 humana .....	135
<b>3. Resultados y discusión</b> .....	137
3.1. Producción y purificación de la CCP6 humana .....	137
3.1.1. Sistema de expresión basado en células de mamífero .....	137
3.1.2. Sistema de expresión bacteriano .....	140
3.1.3. Sistema de expresión basado en células de insecto infectadas por baculovirus .....	145
3.2. Modelo estructural de la CCP6 humana .....	149
3.3. La CCP6 humana y modificaciones post-traduccionales de la tubulina .....	153
3.4. Preferencia de sustrato de la CCP6 humana por las subunidades de la tubulina poliglutamilada artificialmente con TTLLs. ....	157
3.4.1. Modificación <i>in vitro</i> de los niveles de poliglutamilación de la tubulina .....	158
3.4.2. Ensayo cinético de deglutamilación de la tubulina modificada .....	160
3.5. Especificidad de sustrato de la CCP6 humana por residuos acídicos .....	165
3.6. Estudios de inhibición de la CCP6 humana .....	168

<b>CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DE LA CPOΔC HUMANA</b> .....	<b>173</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>175</b>
<b>2. Materiales y métodos</b> .....	<b>178</b>
2.1. Producción recombinante de la CPOΔC humana .....	178
2.2. Producción purificación de la CPOΔC humana .....	179
2.3. Análisis del grado de pureza de la CPOΔC humana purificada .....	180
2.4. Producción y purificación del NvCI .....	180
2.5. Determinación de los parámetros cinéticos de la CPOΔC humana .....	181
2.6. Estudio del estado oligomérico de la CPOΔC humana .....	182
2.7. Cristalización y adquisición de datos .....	182
2.8. Determinación de la estructura 3D y refinamiento .....	183
2.9. Código de acceso .....	183
2.10. Alineamiento de las metalo-carboxipeptidasas digestivas M14A.....	184
2.11. Cálculo de la constante de inhibición para inhibidores de unión fuerte.....	184
2.12. Cálculo de la constante de inhibición para el NvCI .....	185
2.13. Especificidad de sustrato de la CPOΔC humana .....	186
2.14. Proteólisis C-terminal del EGF por la CPOΔC humana .....	186
<b>3. Resultados y discusión</b> .....	<b>188</b>
3.1. Producción y purificación de la CPOΔC humana en células de mamífero.....	188
3.2. Estudio de la actividad enzimática de la CPOΔC humana .....	190
3.3. Determinación de la estructura cuaternaria CPOΔC humana.....	191
3.4. Estructura 3D de la CPOΔC humana en complejo con el NvCI .....	193
3.5. Análisis de la estructura tridimensional de la CPOΔC humana.....	195
3.6. Análisis del centro activo de la CPOΔC humana.....	196
3.7. Comparación del centro activo de la CPOΔC humana con o sin NvCI unido .....	198
3.8. Especificidad de sustrato de las metalo-carboxipeptidasas digestivas M14A.....	199
3.9. Determinantes estructurales de la inhibición de la CPOΔC humana por el NvCI .....	204
3.10. Cálculo de la constante de inhibición para inhibidores de unión fuerte.....	208
3.11. Cálculo de la constante de inhibición para el NvCI .....	209
3.12. Comparación de los determinantes estructurales de la inhibición del NvCI en la CPOΔC y CPA4 humanas .....	211
3.13. Estudio de la preferencia de sustrato acídica de la CPOΔC humana .....	214
3.14. Proteólisis C-terminal del EGF por la CPOΔC humana.....	218

<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	223
<b>CONCLUSIONES</b> .....	235
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	241



## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Representación esquemática de los principales puntos de corte en un sustrato polipeptídica para las exopeptidasas y endopeptidasas .....	40
<b>Figura 2.</b>	Representación esquemática del modelo de Schechter y Berger para la nomenclatura de la interacción proteasa-sustrato.....	43
<b>Figura 3.</b>	Representación esquemática de la arquitectura de dominios y el mecanismo de activación de los miembros de la subfamilia M14A de las MCPs .....	48
<b>Figura 4.</b>	Comparación de la arquitectura de dominios de la CPO respecto al resto de peptidasas M14A .....	54
<b>Figura 5.</b>	Representación esquemática de la arquitectura de dominios de los miembros de la subfamilia M14B de las MCPs humanas .....	57
<b>Figura 6.</b>	Representación esquemática de la arquitectura de dominios de los miembros de la subfamilia M14D de las MCPs humanas .....	62
<b>Figura 7.</b>	Representación esquemática de las modificaciones post-traduccionales catalizadas por las MCP de la subfamilia M14D .....	63
<b>Figura 8.</b>	Estructura tridimensional de la PCPA4 humana.....	72
<b>Figura 9.</b>	Estructura tridimensional de la CCP de Pseudomonas aeruginosa.....	74
<b>Figura 10.</b>	Morfología del dominio catalítico carboxipeptidasa en las MCPs de la familia M14 ..	75
<b>Figura 11.</b>	Estructura del dominio catalítico carboxipeptidasa en las MCPs de la familia M14...	76
<b>Figura 12.</b>	Representación esquemática del centro activo de las funelinas.....	77
<b>Figura 13.</b>	Representación esquemática de los dos mecanismos catalíticos propuestos para la CPA bovina .....	80
<b>Figura 14.</b>	Esquema de los subsitios de unión al sustrato en el centro activo de las MCPS .....	81
<b>Figura 15.</b>	Estructura tridimensional de la latexina en complejo con la CPA4 humana .....	84
<b>Figura 16.</b>	Estructuras tridimensional de los inhibidores exógenos proteicos en complejo con MCPs de la subfamilia M14A.....	85
<b>Figura 17.</b>	Alineamiento secuencial y estructural del extremo terminal de los inhibidores exógenos proteicos .....	86

<b>Figura 18.</b> Heterogeneidad de las colas C-terminales en los isotipos de la $\alpha$ - y la $\beta$ -tubulina humanas .....	96
<b>Figura 19.</b> Representación esquemática de la localización de la cola C-terminal de la tubulina en los microtúbulos .....	97
<b>Figura 20.</b> Modificaciones post-traduccionales de la tubulina .....	98
<b>Figura 21.</b> Glutamilasas y deglutamilasas de la tubulina .....	103
<b>Figura 22.</b> Esquema de la interrelación entre las endopeptidasas y exopeptidasas digestivas en el intestino delgado .....	109
<b>Figura 23.</b> Representación simplificada de las vellosidades y microvellosidades del epitelio en el intestino delgado .....	110
<b>Figura 24.</b> Análisis de la expresión de la CCP6 humana en células de mamífero HEK293 .....	138
<b>Figura 25.</b> Determinación de la actividad deglutamilasa de la CCP6 humana purificada producida en células de mamífero HEK293 F .....	140
<b>Figura 26.</b> Análisis de la expresión de la CCP6 humana producida en <i>E. coli</i> .....	142
<b>Figura 27.</b> Determinación de la actividad deglutamilasa de la hCCP6 purificada producida en <i>E. coli</i> .....	143
<b>Figura 28.</b> Estudio de la expresión de la CCP6 humana en células de insecto Sf9 infectadas por AcMNPV recombinantes.....	147
<b>Figura 29.</b> Determinación de la actividad deglutamilasa de la CCP6 humana purificada producida en células de insecto Sf9 infectadas por AcMNPV recombinantes .....	149
<b>Figura 30.</b> Modelo estructural de la CCP6 humana .....	150
<b>Figura 31.</b> Análisis de los residuos importantes del centro activo de la CCP6 humana .....	153
<b>Figura 32.</b> Modificaciones post-traduccionales generadas por la CCP6 humana en la región C-terminal de la tubulina .....	155
<b>Figura 33.</b> Estudio de la actividad deglutamilasa de la CCP6 humana mediante inmunocitoquímica .....	156
<b>Figura 34.</b> Estudio de la actividad glutamilasa de versiones truncadas de TTLs y su efecto cooperador en la poliglutamilación simultánea de la subunidad $\alpha$ y $\beta$ de la tubulina. ....	159

<b>Figura 35.</b>	Purificación de la tubulina poliglutamilada endógena de células HEK293 F.....	161
<b>Figura 36.</b>	Ensayo in vitro de la cinética de deglutamilación de la subunidad $\alpha$ y $\beta$ de la tubulina por la CCP6 y la CCP1 humanas.....	162
<b>Figura 37.</b>	Estudio de la procesividad de la CCP6 humana por glutámicos C-terminales, y de su capacidad de hidrolizar aspárticos en el extremo C-t.....	166
<b>Figura 38.</b>	Estudio de la inhibición de la CCP6 humana.....	170
<b>Figura 39.</b>	Construcción del mutante soluble CPO $\Delta$ C humana.....	188
<b>Figura 40.</b>	Expresión y purificación de la CPO $\Delta$ C humana .....	189
<b>Figura 41.</b>	Reacción de hidrólisis del péptido FA-EE.....	190
<b>Figura 42.</b>	Determinación de la estructura cuaternaria de la CPO $\Delta$ C humana .....	192
<b>Figura 43.</b>	Estructura tridimensional de la CPO $\Delta$ C humana en complejo con el NvCI .....	194
<b>Figura 44.</b>	Estructura tridimensional de la CPO $\Delta$ C humana.....	195
<b>Figura 45.</b>	Representación esquemática de los residuos del centro activo de la CPO $\Delta$ C humana. ....	197
<b>Figura 46.</b>	Organización espacial de los residuos del centro activo en la CPO $\Delta$ C humana .....	197
<b>Figura 47.</b>	Conformación “abierta” y “cerrada” de la CPO $\Delta$ C humana .....	198
<b>Figura 48.</b>	Comparación de los residuos del centro activo en la conformación “abierta” y “cerrada” de la CPO $\Delta$ C humana.....	199
<b>Figura 49.</b>	Alineamiento estructural de las MCPs digestivas de la subfamilia M14A .....	200
<b>Figura 50.</b>	Alineamiento secuencial de las MCPs digestivas de la subfamilia M14A .....	201
<b>Figura 51.</b>	Comparación de los residuos del centro activo en las MCPs digestivas de la subfamilia M14A.....	202
<b>Figura 52.</b>	Características de los bolsillos de especificidad S1” en las MCPs digestivas de la subfamilia M14A.....	203
<b>Figura 53.</b>	Interacción del NvCI con la CPO $\Delta$ C humana .....	204
<b>Figura 54.</b>	Sitio de interacción primario del NvCI.....	205
<b>Figura 55.</b>	Sitio de interacción secundario del NvCI .....	206

<b>Figura 56.</b>	Tipo de inhibición de la actividad enzimática de la CPOΔC humana por el NvCI.....	210
<b>Figura 57.</b>	Comparación de las interacciones del NvCI con la CPA4 y la CPOΔC humanas .....	211
<b>Figura 58.</b>	Comparación del sitio de interacción primario del NvCI entre la CPA4 y la CPOΔC humanas.....	212
<b>Figura 59.</b>	Comparación del sitio de interacción secundario del NvCI entre la CPA4 y la CPOΔC humanas.....	213
<b>Figura 60.</b>	Especificidad de sustrato tipo-O de la CPOΔC humana .....	215
<b>Figura 61.</b>	Especificidad de sustrato tipo-A y tipo-B de la CPOΔC humana .....	216
<b>Figura 62.</b>	Docking de los péptidos sintéticos con un glutámico o aspártico C-t en el centro activo de la CPOΔC humana .....	217
<b>Figura 63.</b>	Proteólisis C-terminal del EGF por la CPOΔC humana.....	219

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Clasificación de las enzimas en clases en base a la reacción química catalizada.....	36
<b>Tabla 2.</b>	Clasificación de las hidrolasas en subclases. ....	36
<b>Tabla 3.</b>	Clases catalíticas de proteasas y ejemplos. ....	38
<b>Tabla 4.</b>	Clasificación de las peptidasas en sub-subclases .....	41
<b>Tabla 5.</b>	Clasificación de las carboxipeptidasas.....	45
<b>Tabla 6.</b>	Clasificación de las carboxipeptidasas humanas.....	46
<b>Tabla 7.</b>	Resumen de los aminoácidos en los subsitios del centro activo determinantes de la especificidad de sustrato en las MCPs. ....	78
<b>Tabla 8.</b>	Principales proteasas del EC en los enterocitos del intestino delgado. ....	113
<b>Tabla 9.</b>	Residuos conservados en las hCCPs importantes para la actividad enzimática. ....	152
<b>Tabla 10.</b>	Constantes cinéticas para la hidrólisis del FA-EE por la CPOΔC humana. ....	191
<b>Tabla 11.</b>	Estadística de la adquisición de datos y del refinamiento.....	193
<b>Tabla 12.</b>	Interacciones entre los sitios de interacción primario y secundario en el NvCI y la CPOΔC.....	207
<b>Tabla 13.</b>	Constantes de inhibición para varios inhibidores proteicos frente a la CPOΔC humana.	209

## ***LISTADO DE ABREVIATURAS***

---



## LISTADO DE ABREVIATURAS

ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ACI	Inhibidor de carboxipeptidasas de <i>Ascaris suum</i> y <i>Ascaris lumbricoides</i>
ACLP	Proteína similar a carboxipeptidasa aórtica
AcMNPV	Nucleopoliedrovirus multicápside de <i>Autographa californica</i>
AF	Ácido fólico
AGTPBP1	Proteína de unión a ATP/GTP-1
APA	Aminopectidasa A
APB	Aminopectidasa B
APN	Aminopectidasa N
APP	Aminopectidasa P
BC	Borde en cepillo
BcCCP	Carboxipeptidasa citosólica de <i>Burkholderia cenocepacia</i>
bCPA	Carboxipeptidasa A bovina
BmCCP	Carboxipeptidasa citosólica de <i>Burkholderia mallei</i>
BP	Péptido bioactivo
BVS	Baculovirus
Bz-L-Glu	N-(4-Aminobenzoil)-L-Glu
BZS	Ácido bencilsuccinico
CBB	Cuerpo basal
CCP	Carboxipeptidasa citosólica
CCP1	Carboxipeptidasa citosólica 1
CCP2	Carboxipeptidasa citosólica 2
CCP3	Carboxipeptidasa citosólica 3
CCP4	Carboxipeptidasa citosólica 4
CCP5	Carboxipeptidasa citosólica 5
CCP6	Carboxipeptidasa citosólica 6
cCPO	Carboxipeptidasa O del pez cebra
cGAS	Enzima sintasa de GMP-AMP cíclico
COFRADIC	Cromatografía Dlagonal FRAccional Combinada
CP	Carboxipeptidasa
CPA1	Carboxipeptidasa A1
CPA2	Carboxipeptidasa A2
CPA3	Carboxipeptidasa A3
CPA4	Carboxipeptidasa A4



CPA5	Carboxipeptidasa A5
CPA6	Carboxipeptidasa A6
CPB	Carboxipeptidasa B
CPD	Carboxipeptidasa D
CPE	Carboxipeptidasa E
CPG	Carboxipeptidasa G
CPM	Carboxipeptidasa M
CPN	Carboxipeptidasa N
CPO	Carboxipeptidasa O
CPO $\Delta$ C	Variante soluble de la CPO
CPP	Carboxipeptidasa P
CPT	Carboxipeptidasa de <i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
CPU	Carboxipeptidasa U
CPX1	Carboxipeptidasa X1
CPX2	Carboxipeptidasa X2
CPZ	Carboxipeptidasa Z
DAN	Diazoacetil-DL-norleucina metil-éster
DCI	3,4-dicloroisocumarina
DEAE	Dietilaminoetil
DeTyr-Tubulina	Tubulina detirosinada
DFP	Diisopropilfluorofosfato
Disc	Dominio similar a discoidina-1
DPPIV	Dipeptidil peptidasa IV
ECI	Inhibidor de carboxipeptidasas endógeno
ECM	Matriz extracelular
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico humano
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico humano
EK	Enteroquinasa
EPNP	1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi)-propano
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas
GAG	Glicosaminoglicano
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GCII	Glutamato carboxipeptidasa II
GEMSA	Ácido guanidino-etilmercaptosuccinico

GFP	Proteína verde fluorescente
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HA	Hemaglutinina
HaCA42	Carboxipeptidasa O de <i>Helicoverpa armigera</i>
HaCPA	Carboxipeptidasa A de <i>Helicoverpa armigera</i>
hCCP6	Carboxipeptidasa citosólica 6
hCCP	Carboxipeptidasa citosólica humana
hCPO	Carboxipeptidasa O humana
HEK293	Células embrionarias de riñón humano 293
HITCI	Inhibidor de carboxipeptidasas de <i>Haemaphysalis longicornis</i>
HMGB	Proteínas del grupo de alta movilidad
HZCPB	Carboxipeptidasa B de <i>Helicoverpa zea</i>
IAA	Ácido iodoacético
IAM	Iodoacetamida
ImaPCI	Inhibidor de carboxipeptidasa de patata ( <i>S. tuberosum</i> ) variedad Imilla morada
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
$K_{cat}$	Constante catalítica
$K_i$	Constante de inhibición o constante de equilibrio de disociación
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
LCI	Inhibidor de carboxipeptidasas de <i>Hirudo medicinalis</i>
M14	Familia M14 de las metalo-carboxipeptidasas
M14A	Subfamilia M14A de las metalo-carboxipeptidasas
M14B	Subfamilia M14B de las metalo-carboxipeptidasas
M14C	Subfamilia M14C de las metalo-carboxipeptidasas
M14D	Subfamilia M14D de las metalo-carboxipeptidasas
MAPs	Proteínas interactoras de microtúbulos
mCCP	Carboxipeptidasa citosólica de ratón
MCP	Metalocarboxipeptidasa
MOI	Multiplicidad de infección
MTOC	Centro organizador de microtúbulos
NEM	N-etilmaleimida
Nna1	Proteína nuclear del sistema nervioso inducida por axotomía
NvCI	Inhibidor de carboxipeptidasas de <i>Nerita versicolor</i>
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo
MCPI	Inhibidor de carboxipeptidasas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )
MDCK	Células epiteliales de riñón canino Madin-Darby

MLCK1	Quinasa de la cadena ligera de la miosina
MPT	Modificación post-traducciona
MT	Microtúbulo
NAG	N-acetilglucosamina
OP	1,10-fenantrolina
PaCCP	Carboxipeptidasa citosólica de <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>
PCI	Inhibidor de carboxipeptidasas de patata ( <i>S. tuberosum</i> )
PCP	Pro-carboxipeptidasa
pCPB	CPB porcina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Banco de datos de Proteínas
PEI	Polietilenimina
PI-PLC	Fosfatidilinositol-fosfolipasa C
PMSF	Fenil-metil-sulfonilo
Poli-E	PoliGlutámico
Poli-G	PoliGlicina
PS	Péptido señal
RARRES1	Receptor en respuesta al ácido retinoico 1
rmsd	Raíz cuadrada de la varianza
SdCCP	Carboxipeptidasa citosólica de <i>Shewanella denitrificans</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SmCI	Inhibidor de carboxipeptidasas de <i>Sabellastarte magnifica</i>
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SmCP	Carboxipeptidasa de <i>Sabellastarte magnifica</i>
TCI	Inhibidor de carboxipeptidasas de <i>Rhipicephalus bursa</i>
TRAD1	Proteína 1 contenedora del dominio de dedo de zinc tipo TRAF
TTL	Dominio similar a transtirretina / Tirosina ligasa
TLL	Ligasa similar a la tirosina ligasa
Tyr-tubulina	Tubulina tirosinada
$V_{max}$	Velocidad máxima
+TIPs	Proteínas de unión a los extremos positivos de los microtúbulos
YFP	Proteína amarilla fluorescente

## ***PREFACIO***

---



## **PREFACIO**

La presente tesis consta de dos trabajos de investigación independientes enmarcados en el campo de estudio de las metalo-carboxipeptidasas (MCPs) y, en particular, de dos miembros de la familia M14 de las MCPs: la carboxipeptidasa citosólica 6 (hCCP6) y la carboxipeptidasa O (hCPO) humanas. Aunque ambas tienen una localización y funciones celulares muy distintas, presentan una preferencia de sustrato común por residuos ácidos C-terminales que ha sido poco estudiada hasta la fecha.

La primera parte de esta tesis corresponde a una introducción general que permitirá ubicar al lector en el ámbito de las proteasas y, con especial énfasis, de las MCPs. En ésta, se detallan varios aspectos relacionados con la clasificación de las MCPs de la familia M14, sus características estructurales, mecanismos de activación y de inhibición, así como las funciones biológicas que llevan a cabo los miembros de esta familia. Debido a que la hCPO y la hCCP6 pertenecen a las subfamilias M14A y M14D de las MCPs, respectivamente, se aporta una extensa revisión general con la información disponible hasta el momento para cada uno de los miembros de estas subfamilias, con el objetivo de proporcionar una visión lo más completa posible del contexto relacionado con ambas proteínas. Además, para facilitar al lector la interpretación de los resultados obtenidos en este trabajo, hemos querido incluir una breve introducción al mundo de los microtúbulos y de la digestión proteica, ya que la función de la hCCP6 se relaciona con la modificación de la tubulina que forma parte de los microtúbulos y la hCPO con la hidrólisis de péptidos y proteínas en el epitelio intestinal procedentes de la dieta y otras fuentes endógenas.

A continuación de la introducción inicial, este trabajo continúa con la descripción de los principales objetivos planteados específicamente para la caracterización de la hCCP6 y la hCPO. Los resultados obtenidos en cada caso se han agrupado en dos capítulos bien diferenciados.

En el capítulo I de resultados presentamos la caracterización bioquímica y funcional de la hCCP6, como proteína modelo de los miembros de la subfamilia M14D con especificidad sustrato tipo ácido. Este trabajo contribuye notablemente al conocimiento acerca de la función y estructura de la enzima, a la vez que asienta las bases para establecer nuevas líneas de investigación que ayuden a comprender los mecanismos de regulación existentes *in vivo* para modular los niveles de poliglutamilación en la tubulina que forma parte de los microtúbulos celulares y la identificación de nuevos sustratos endógenos para la hCCP6. En este trabajo, han participado el Dr. Carsten Janke (*Centre de recherche de l'Institut Curie*, París) y la Dra. Olivia Tort (*Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)*, Barcelona) aportando varias construcciones recombinantes y colaborando en el diseño de algunos de los experimentos.

## ***Prefacio***

En el capítulo II de resultados describimos la primera estructura tridimensional de la hCPO. Gracias a este trabajo, hemos podido comprender mejor las características estructurales que determinan la preferencia de la hCPO por la hidrólisis de enlaces peptídicos C-terminales de residuos ácidos, estableciendo el primer modelo estructural para el estudio de la especificidad enzimática ácida en las MCPs M14. Además, la resolución de la estructura de la hCPO en complejo con el inhibidor de carboxipeptidasas de *Nerita versicolor* (NvCI), nos ha permitido conocer en detalle el mecanismo de acción de este inhibidor de la hCPO. Finalmente, en este capítulo se presentan distintas aproximaciones bioquímicas que se han llevado a cabo para caracterizar la actividad de esta nueva enzima digestiva e investigar su rol funcional en su localización intestinal en humanos. Este trabajo se ha realizado en colaboración con el Dr. David Reverter (Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Barcelona), el Dr. Peter Lyons (Department of Biology, Andrews University, Berring Springs) y el Prof. Dr. Rober Huber (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany).

Finalmente, en esta tesis se incluye una extensa discusión acerca de los resultados obtenidos en el capítulo I y II, seguido de las conclusiones más relevantes del trabajo de investigación realizado. No podían faltar tampoco las referencias bibliográficas consultadas, que se incluyen en el último apartado de la tesis.

## ***INTRODUCCION***

---





### **1. PROTEASAS**

Las proteasas (también conocidas como “peptidasas”, “enzimas proteolíticas” o “proteinasas”) agrupan un conjunto de enzimas estructural y funcionalmente diversas. Estas enzimas tienen la habilidad común de catalizar la escisión de los enlaces peptídicos e isopeptídicos de proteínas y fragmentos de proteínas en un proceso denominado proteólisis [1].

Las proteasas están presentes en todos los seres vivos de la naturaleza, así como en los virus, y constituyen la familia de enzimas más numerosa presente en los seres humanos [2]. El análisis bioinformático del genoma humano ha permitido identificar hasta la fecha más de 650 genes codificantes (>2% de los genes del genoma) para proteasas y proteasas homólogas inactivas. Este hecho refleja la importancia de los procesos proteolíticos en la biología humana [3]. Las proteasas homólogas inactivas son proteínas que han perdido residuos claves para su actividad proteolítica, pero que podrían tener un papel importante en la regulación de la activación de otras proteasas y de su acceso a sustratos e inhibidores. Aunque son abundantes en algunas familias de proteasas y están evolutivamente conservadas, poco se conoce acerca de su relevancia biológica [4].

Inicialmente, las proteasas fueron descritas como enzimas inespecíficas relacionadas con el catabolismo proteico que participan en procesos como la degradación de proteínas de la dieta o en la destrucción de tejidos [5]. Sin embargo, el trabajo pionero de Davie y Neurath sobre la activación del tripsinógeno [6], continuado posteriormente por Davie y Ratnoff [7] y McFarlane [8], permitió también el reconocimiento de las proteasas como enzimas altamente selectivas, con una elevada especificidad frente a un número limitado de sustratos [9].

La proteólisis constituye un tipo de modificación post-traducciona (MPT) que afecta a todas y cada una de las proteínas desde su síntesis a su degradación. Por ejemplo, interviene en la escisión de la Met iniciadora de las proteínas citoplasmáticas (N-formilmetionina en procariotas) recién sintetizadas, la escisión de péptidos señales de secreción y de exportación a orgánulos específicos, el procesamiento de pro-péptidos de zimógenos, la producción de proteínas y péptidos a partir de proteínas precursoras, la liberación de ectodominios de proteínas asociadas a membrana, la degradación de las proteínas a sus aminoácidos componentes para su reciclaje, la destrucción de proteínas potencialmente letales o tóxicas de parásitos y patógenos, etc. [5],[10],[11].

La actividad de las proteasas debe ser estrictamente regulada por su naturaleza irreversible para prevenir la escisión inadecuada de sus sustratos y otras moléculas. La regulación de la expresión génica (cambios epigenéticos en las regiones promotoras de los genes de proteasas, control de la estabilidad del ARN mensajero (mARN), su traducción y

## Introducción

degradación por proteínas de unión a ARN o microARNs...), la compartimentación espacio-temporal, variaciones en las condiciones físico-químicas (pH, ambiente redox...), generación de MPTs (glicosilación, fosforilación, unión de cofactores...) y el bloqueo de la actividad por inhibidores endógenos son algunos de los mecanismos más comunes que han aparecido a lo largo de la evolución para el control de la actividad de las proteasas *in vivo*.

Las proteasas tienen un papel clave en multitud de procesos biológicos esenciales, que incluyen la proliferación, diferenciación y migración celular, morfogénesis, renovación tisular, respuesta inmune, ovulación, fertilización, desarrollo embrionario, angiogénesis, neurogénesis, hemostasia sanguínea, nutrición, autofagia, senescencia, necrosis y apoptosis, entre otros muchos procesos [5],[12]. Debido a su gran relevancia biológica, deficiencias o alteraciones funcionales en proteasas subyacen como responsables del desarrollo de enfermedades humanas importantes como la artritis, el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares [13]. La mayoría de las enfermedades proteolíticas son debidas a alteraciones en la actividad enzimática de proteasas relacionadas con sus sustratos, inhibidores, factores reguladores y sistemas de transporte. Sin embargo, recientemente se han catalogado 129 enfermedades hereditarias que son causadas por desórdenes genéticos asociados a mutaciones en genes de proteasas (principalmente mutaciones recesivas de pérdida de función) y alteraciones epigenéticas que provocan cambios en los patrones de expresión espacio-temporal de las proteasas implicadas [14].

Muchos microorganismos infecciosos, virus y parásitos utilizan proteasas como factores de virulencia, y el veneno de animales contiene comúnmente proteasas para efectuar la destrucción de tejidos o evadir la respuesta inmune del huésped. Por consiguiente, las proteasas, sus sustratos e inhibidores son de gran interés biomédico por su utilidad como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de enfermedades, y a su vez, constituyen valiosas dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos que permitan el tratamiento de enfermedades [5]. Actualmente, las proteasas se emplean en varias aplicaciones a nivel industrial, como son la fabricación de detergentes, el tratamiento de cuero, la fabricación y procesamiento de alimentos, el tratamiento de residuos, etc. Además, estas moléculas se han convertido en herramientas indispensables en el sector biotecnológico para la obtención de fragmentos de anticuerpos recombinantes, escisión de etiquetas de afinidad de proteínas recombinantes de interés biomédico, síntesis y secuenciación de péptidos, la digestión proteolítica en técnicas proteómicas, entre otras aplicaciones [15].

El gran número de proteasas identificadas hasta la fecha, y su relevancia en la biología humana, patología y el desarrollo tecnológico han hecho necesario la introducción de nuevos términos para el estudio global de la proteólisis y su complejidad.

## **Introducción**

Se define el “degradoma” como el conjunto completo de proteasas que son expresadas en un determinado momento por una célula, tejido u organismo. La caracterización del degradoma impulsó el nacimiento de una nueva disciplina científica para su estudio denominada “degradómica”, que agrupa todas las aproximaciones genómicas y proteómicas disponibles para la identificación de los genes que codifican para proteasas, su caracterización estructural y funcional [5].

La secuenciación del genoma humano ha posibilitado el estudio en profundidad del degradoma humano facilitando la clasificación de los genes codificantes para las proteasas conocidas, el descubrimiento de nuevas proteasas y la identificación de las causas genéticas de las enfermedades proteolíticas hereditarias. Asimismo, la disponibilidad de los genomas completos de numerosos modelos animales para el estudio de los procesos biológicos y patológicos humanos han acelerado la caracterización estructural y funcional del degradoma humano gracias a la existencia de genes ortólogos para la mayoría de las proteasas humanas [9],[12]. Sin embargo, aproximadamente un tercio de las proteínas humanas no han sido todavía clasificadas, de manera que el estudio de estas proteínas huérfanas permitirán, probablemente, caracterizar nuevas enzimas con mecanismos catalíticos y diseños estructurales inusuales que expandan progresivamente las dimensiones del degradoma humano conocido [10].

### **1.1 Clasificación de las proteasas**

Debido a la elevada complejidad de los degradomas en los seres vivos y su continua expansión, es fundamental un sistema estandarizado para la clasificación y nomenclatura de las proteasas. Las clasificaciones existentes para las enzimas proteolíticas se basan principalmente en los siguientes criterios: el tipo de reacción catalizada, la clase catalítica, la localización del enlace peptídico a escindir en la cadena polipeptídica y la homología estructural.

#### **1.1.1 Clasificación de las proteasas según el tipo de reacción catalizada**

El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (*NC-IUBMB*, abreviatura en inglés) propuso en 1961 el sistema numérico EC para solventar la trivialidad existente en la comunidad científica para la clasificación y nomenclatura de las enzimas. En el sistema numérico EC las enzimas se designan con un código numérico que identifica de forma inequívoca a cada enzima, encabezado con EC y seguido de 4 dígitos separados por puntos. El primer dígito representa la clase, el segundo la subclase, el tercero la sub-subclase o subgrupo y el cuarto dígito corresponde al número particular de la enzima según el orden que ocupa en la clasificación [16].

## Introducción

El *NC-IUBMB* reconoce 6 clases de enzimas, en función de la reacción química que catalizan (**tabla 1**).

**Tabla 1. Clasificación de las enzimas en clases en base a la reacción química catalizada.**

Clase	Reacción catalizada	Reacción típica
EC 1 <b>Oxidoreductasas</b>	Reacciones de oxidación-reducción mediante la transferencia de e <sup>-</sup> o hidrógeno desde un sustrato donador (reductor) a uno aceptor (oxidante)	$AH_2 + B = A + BH_2$ $AH_2 + B^+ = A + BH + H^+$
EC 2 <b>Tranferasas</b>	Reacciones de transferencia de un grupo químico desde un sustrato donador a uno aceptor	$AX + B = A + BX$
EC 3 <b>Hidrolasas</b>	Reacciones de hidrólisis que provocan la ruptura de enlaces químicos por la acción de moléculas de H <sub>2</sub> O	$AB + H_2O = AH + BOH$
EC 4 <b>Liasas</b>	Reacciones no hidrolíticas y no oxidativas de formación/rotura de enlaces químicos mediante la adición/sustracción de grupos químicos a dobles enlaces	$A=B + X-Y = \begin{matrix} A-B \\   \quad   \\ X \quad Y \end{matrix} + H_2O$ $A=B + X-Y = \begin{matrix} A-B \\   \quad   \\ X \quad Y \end{matrix} + CO_2$
EC 5 <b>Isomerasas</b>	Reacciones de isomerización a través del reordenamiento de átomos en una misma molécula	$A = B$
EC 6 <b>Ligasas</b>	Reacciones de unión covalentes de 2 sustratos acoplados a la hidrólisis de nucleótidos trifosfato	$A + B + XTP = AB + XDP + P$ $A + B + XTP = AB + XMP + PP$

Las peptidasas son definidas por el *NC-IUBMB* como “hidrolasas que actúan en enlaces peptídicos” y, por tanto, pertenecen a la subclase EC 3.4 de hidrolasas (**tabla 2**).

**Tabla 2. Clasificación de las hidrolasas en subclases.**

Subclase	Tipo de enlace sobre el que actúan
EC 3.1	Éster
EC 3.2	Glicosilo
EC 3.3	Éter
EC 3.4	Peptídico
EC 3.5	C-N (No peptídico)
EC 3.6	Anhidro
EC 3.7	C-C
EC 3.8	Haluro
EC 3.9-3.13	N-P, N-S, C-P, S-S, C-S

## Introducción

En la literatura científica es habitual utilizar los términos proteasas, peptidasas, enzimas proteolíticas y proteinasas de manera indistinta. Dado que la terminología para referirse a las enzimas proteolíticas genera confusión entre la comunidad científica, el *NC-IUBMB* recomendó en el año 1984 el uso del término peptidasa para designar específicamente a todas aquellas hidrolasas que actúan sobre enlaces peptídicos. Por lo tanto, los términos proteasa, proteinasa y enzima proteolítica se reservan para una designación global de las enzimas que catalizan la escisión de enlaces peptídicos, independientemente del mecanismo.

### 1.1.2 Clasificación de las proteasas según la clase catalítica

Aunque la hidrólisis de enlaces peptídicos está favorecida termodinámicamente, es una reacción extremadamente lenta. La estabilidad cinética del enlace peptídico es debido a su carácter parcial de doble enlace, de manera que el átomo de carbono del grupo carbonilo es menos electrófilo y menos susceptible al ataque nucleofílico. Por consiguiente, para promover la escisión del enlace peptídico es necesario la acción de un catalizador enzimático que facilite el ataque nucleofílico de un grupo carbonilo normalmente no reactivo [17]. Las peptidasas promueven la escisión de enlaces peptídicos mediante 2 mecanismos catalíticos principales: la catálisis covalente y la catálisis ácido-base general.

En la catálisis covalente, un nucleófilo o electrófilo potente localizado en el centro activo de la enzima ataca al grupo carbonilo no reactivo del sustrato. Este nucleófilo se une de forma transitoria al sustrato con un enlace C-O simple, formando un intermediario acil-enzima covalentemente unido. Finalmente, el intermediario de la reacción se descompone en el producto carboxilato resultante y la enzima libre regenerada por la hidrólisis mediante una molécula de agua nucleofílica. En cambio, en el mecanismo de catálisis ácido-base no se forman intermediarios covalentes durante la reacción, sino que directamente una molécula de agua activada (desprotonada) realiza el ataque nucleofílico al grupo carbonilo del enlace peptídico a escindir [17].

En función de la naturaleza del grupo nucleofílico que participa en la catálisis, las enzimas proteolíticas se clasifican en 7 clases catalíticas (**tabla 3**) y una clase que agrupa las proteasas que presentan un mecanismo de catálisis desconocido, siendo las serin- y metalo-peptidasas las clases más representadas. Hasta la fecha no se ha descrito ningún miembro de las clases catalíticas glutamil-peptidasa y asparagín-liasa en mamíferos, y solo se han descubierto unos pocos homólogos en virus, arqueas y bacterias [18],[19].

## Introducción

**Tabla 3. Clases catalíticas de proteasas y ejemplos.**

Mecanismo catalítico	Clase catalítica	Ejemplos
<b>Catálisis covalente</b>	Serín-peptidasas	Tripsina, quimotripsina
	Cisteín-peptidasas	Papaína, catepsina K, caspasas
	Treonín-peptidasas	Proteasoma
<b>Catálisis ácido-base</b>	Aspartil-peptidasas	Pepsina, catepsina E
	Glutamil-peptidasas	Eqolisina
	Metallo-peptidasas	Carboxipeptisa A, Termolisina
-	Asparagín-liasas	Autotransportador Tsh <i>E. coli</i>
<b>Desconocido</b>	Desconocido	Endopeptidasa gpr, Proteasa IV

En la catálisis covalente el nucleófilo de la reacción corresponde a un grupo funcional ionizable localizado en la cadena lateral de un aminoácido conservado del centro activo. En las cisteín-peptidasas se trata del grupo sulfhidrilo de la cadena lateral de una Cys reactiva, mientras que en las serín- y treonín-peptidasas corresponde al grupo hidroxilo de la cadena lateral de una Ser o Thr, respectivamente. En cambio, en la catálisis ácido-base el nucleófilo de la reacción se trata de una molécula de agua activada por el grupo carboxilo de la cadena lateral de los aminoácidos Asp y Glu en las aspartil- y glutamil-peptidasas, respectivamente, o por 1 o 2 iones metálicos divalentes (zinc, cobre, manganeso, níquel o cobalto) coordinados en el centro activo de las metallo-peptidasas.

En el 2011 se reconoció la existencia de proteasas que catalizan la escisión de enlaces peptídicos mediante una reacción distinta de la hidrólisis y se agruparon en una nueva clase catalítica denominada asparagín-liasas [20],[21]. Según la nomenclatura establecida por el *NC-IUBMB* las “enzimas que escinden enlaces C-C, C-O, C-N y otros enlaces por reacciones distintas de la hidrólisis y de la oxidación” se denominan liasas. El mecanismo catalítico de las asparagín-liasas se desconoce, pero se ha determinado que una Asn de la proteína efectúa el ataque nucleofílico de su propio enlace peptídico C-terminal (C-t) para la formación de una succinimida estable que se auto-escinde de la cadena principal. Por consiguiente, estas proteasas corresponden a liasas capaces de escindir enlaces peptídicos (EC 4.3), y no a hidrolasas peptídicas como las otras 6 clases catalíticas descritas.

La clasificación de las peptidasas en clases catalíticas es de gran utilidad para deducir el pH óptimo de trabajo y los inhibidores de una peptidasa concreta, ya que las peptidasas de la misma clase comparten dichas propiedades.

## Introducción

Las treonín- y metalo-peptidasas presentan un pH óptimo neutro, las serín-peptidasas neutral-básico, y las aspartil-, glutamíl- y cisteín-peptidasas tienen un pH óptimo ácido. Sin embargo, existen excepciones como la meprina B, que es una metalo-peptidasa con un pH óptimo ácido; la renina, que es una aspartil-peptidasa con un pH óptimo neutro; o las caspasas, cisteín-peptidasas con un pH óptimo neutro. Las aspartil-peptidasas son generalmente inhibidas por pepstatina, 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi)-propano (EPNP) y diazoacetil-DL-norleucina metil-éster (DAN). Las cisteín-peptidasas por quelantes de tioles, como el ácido iodoacético (IAA), iodoacetamida (IAM) y N-etilmaleimida (NEM). Las serín-peptidasas son inactivadas por la acción del diisopropilfluorofosfato (DFP), fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) y 3,4-dicloroisocumarina (DCI). Por último, la actividad proteolítica de las metalo-peptidasas es bloqueada por agentes quelantes de cationes metálicos como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y la 1,10-fenantrolina (OP) [19].

### 1.1.3 Clasificación de las proteasas en función de la localización del enlace peptídico a hidrolizar en la cadena polipeptídica

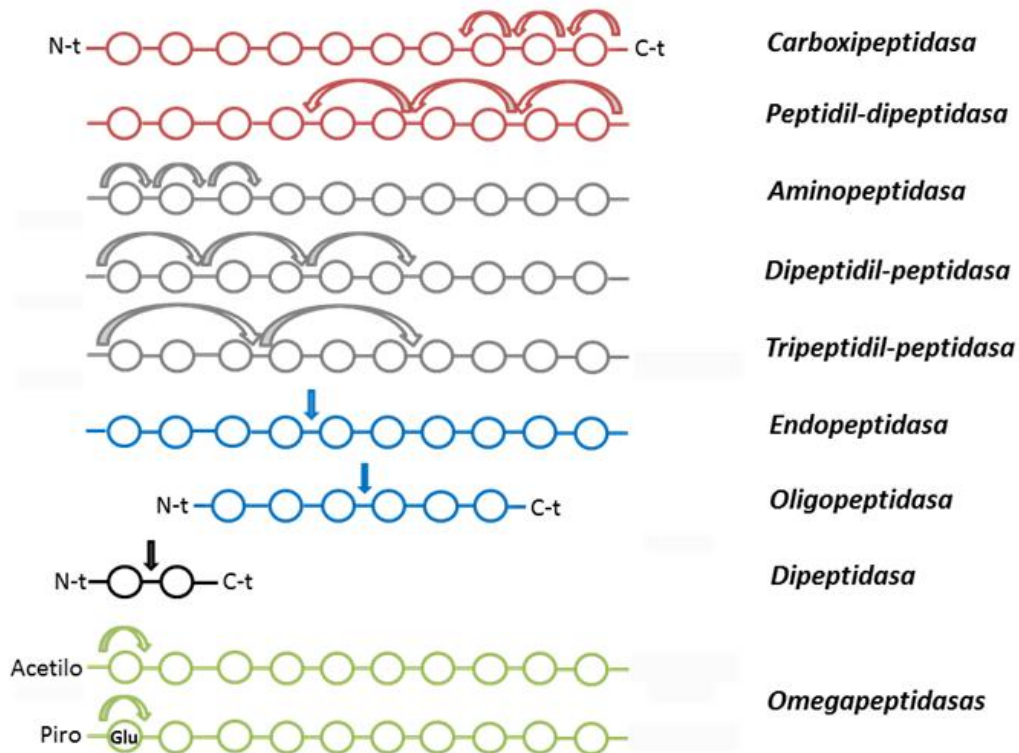
Las peptidasas catalizan esencialmente la misma reacción de hidrólisis de enlaces peptídicos, aunque muestran selectividad respecto a los enlaces peptídicos que hidrolizan. Por consiguiente, el *NC-IUBMB* clasifica las peptidasas en exopeptidasas y endopeptidasas, en función de la localización en la cadena polipeptídica del enlace peptídico sobre el que actúan (**figura 1**). El *NC-IUBMB* agrupa a las endopeptidasas y exopeptidasas, a su vez, en distintas sub-subclases en función de la clase catalítica a la que pertenecen (**tabla 4**).

Las exopeptidasas catalizan específicamente la hidrólisis de enlaces peptídicos en los extremos libres de la cadena polipeptídica. Las exopeptidasas que actúan en el extremo N-terminal (N-t) libre de la cadena, liberando un único aminoácido, un dipéptido o un tripéptido se denominan aminopeptidasas (EC 3.4.11), dipeptidil-peptidasas y tripeptidil-peptidasas (EC 3.4.14), respectivamente. Aquellas exopeptidasas que actúan en el extremo C-t libre de la cadena y que liberan un único residuo o un dipéptido se denominan carboxipeptidasas (CPs) (EC 3.4.16, 3.4.17 y 3.4.18) o peptidil-dipeptidasas (EC 3.4.15), respectivamente. Se clasifican también como exopeptidasas las proteasas específicas para dipéptidos denominadas dipeptidasas (EC 3.4.13) o las que eliminan residuos terminales que son sustituidos, ciclados o unidos por enlaces isopeptídicos (enlaces peptídicos de los que unen grupos  $\alpha$ -carboxílicos con  $\alpha$ -amino) denominadas omega peptidasas (EC 3.4.19), como la acilaminoacilpeptidasa y la piroglutamilpeptidasa (**figura 1, tabla 4**).



## Introducción

Las endopeptidasas, en cambio, hidrolizan enlaces peptídicos internos de las proteínas e incluyen las serín-endopeptidasas (EC 3.4.22), las aspartil-endopeptidasas (EC 3.4.23), las metalo-endopeptidasas (EC 3.4.24), las treonín-endopeptidasas (EC 3.4.25) y aquellas endopeptidasas que no pueden asignarse a ninguno de estos grupos (EC 3.4.99). Las endopeptidasas que actúan en sustratos peptídicos de menor tamaño que las proteínas se denominan “oligopeptidasas” (figura 1, tabla 4).



**Figura 1. Representación esquemática de los principales puntos de corte en un sustrato polipeptídico para las exopeptidasas y endopeptidasas.** Los sustratos se muestran como círculos encadenados de distintos colores (rojo para las exopeptidasas que actúan en el extremo C-t, azul para las exopeptidasas que actúan en el extremo N-t, gris para las endopeptidasas, negro para las dipeptidasas y verde para las omegapeptidasas) unidos por guiones, en el que cada círculo representa un aminoácido. Se indican también la modificación del extremo N-t del sustrato con un grupo acetilo y un piroglutamilo (PiroGlu).

Las recomendaciones del NC-IUBMB para la clasificación numérica individual de todas las peptidasas conocidas se encuentra en el siguiente link:

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/>, cuya última actualización está fechada en diciembre de 2016.

**Tabla 4. Clasificación de las peptidasas en sub-subclases.**

Sub-subclase	Tipo de peptidasa
EC 3.4.11	Aminopeptidasas
EC 3.4.13	Dipeptidasas
EC 3.4.14	Dipeptidil-peptidasas y tripeptidil-peptidasas
EC 3.4.15	Peptidil-dipeptidasas
EC 3.4.16	Serín-carboxipeptidasas
EC 3.4.17	Metalocarboxipeptidasas
EC 3.4.18	Cisteín-carboxipeptidasas
EC 3.4.19	Omega peptidasas
EC 3.4.21	Serín-endopeptidasas
EC 3.4.22	Cisteín-endopeptidasas
EC 3.4.23	Aspartil-endopeptidasas
EC 3.4.24	Metal-endopeptidasas
EC 3.4.25	Treonín-endopeptidasas
EC 3.4.99	Endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido

#### **1.1.4 Clasificación de las proteasas en base a su homología**

El sistema numérico EC del *NC-IUBMB* clasifica cada una de las peptidasas conocidas en 13 sub-subclases, y sólo 5 de éstas incluyen el total de las numerosas endopeptidasas existentes. Por consiguiente, es inevitable agrupar conjuntamente peptidasas que son muy diferentes y, lo que es más importante, sin tener en cuenta las características estructurales que reflejen sus relaciones evolutivas. Para solventar esta problemática, Barrett y Rawlings establecieron en 1993 el sistema MEROPS para la clasificación y nomenclatura de las proteasas.

El sistema MEROPS es un método jerárquico organizado en 5 niveles de superior a inferior que incluye el tipo catalítico, clan, familia, subfamilia y proteasas individuales con un identificador único (MEROPS *ID*) [22]. La agrupación de las distintas proteasas se basa en su homología secuencial y estructural en la “unidad peptídica”, que es la secuencia que contienen todos los residuos del centro activo de la enzima necesarios para su actividad. Aquellas proteasas de un mismo tipo catalítico que presentan una similitud estadísticamente significativa entre sus unidades peptídicas pertenecen a una misma familia y, a su vez, familias que comparten una estructura terciaria similar en la unidad peptídica se agrupan en un mismo clan.

## Introducción

El clan constituye un orden jerárquico superior y agrupa todas aquellas familias relacionadas evolutivamente que comparten un ancestro común, aunque hayan divergido hasta tal punto que sea necesario clasificarlas en más de una familia [19]. Algunas familias se dividen también en subfamilias debido a evidencias filogenéticas que demuestran una divergencia ancestral dentro de la familia.

Cuando no hay disponible ninguna estructura cristalina para los miembros de una familia, es posible asignar una familia a un clan según el orden de los residuos del centro activo en la secuencia proteica. Las familias y subfamilias se estructuran alrededor de una “proteasa de referencia” bien caracterizada bioquímicamente para la que se suele conocer su secuencia, estructura terciaria y especificidad. De forma análoga, los clanes se construyen en base a un plegamiento de referencia compartido por todos los miembros que integran un determinado clan.

En el sistema MEROPS el nombre de cada familia consta de una letra mayúscula que representa el tipo catalítico (Aspartil- (A), Cisteín- (C), Glutamil- (G), Metallo- (M), Serín- (S), Treonín- (T) peptidasas, Asparagín–liasas (N) y tipo catalítico desconocido (U)), seguido de un número arbitrario. Las subfamilias se nombran asignando una letra mayúscula tras el nombre de la familia. Los clanes se denominan de una forma similar a las familias, con la letra mayúscula indicando el tipo catalítico, seguida de otra letra mayúscula asignada también de forma arbitraria. Por último, cada proteasa individual de una familia o subfamilia tiene un identificador particular inequívoco denominado MEROPS *ID*, que consiste en el nombre de la familia, seguido de un punto y un número de 3 dígitos. Además, en el sistema MEROPS existen identificadores especiales para peptidasas homólogas inactivas (fam.9\*), pseudogenes (fam.P\*) y proteasas compuestas o complejos proteicos (Xfam-\*) [19].

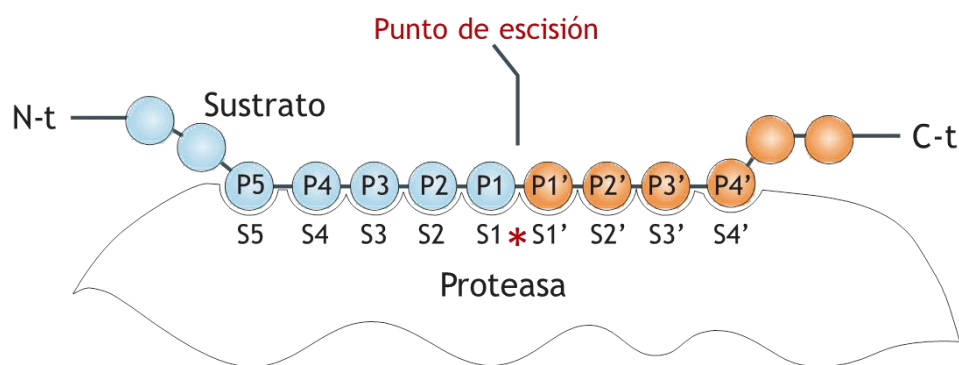
La presentación del sistema MEROPS para la clasificación y nomenclatura de las proteasas culminó en el año 1996 con la creación de la versión web de la base de datos MEROPS (<https://merops.sanger.ac.uk>). Actualmente hay descritas un total 264 familias de proteasas y de 62 clanes, según la versión 11.0. En 2004 fue ampliada para incluir también a los inhibidores conocidos de proteasas siguiendo los mismos principios aplicados para la clasificación jerárquica de las proteasas [22]. En resumen, la base de datos MEROPS se ha consolidado como una base de datos de referencia entre los investigadores para la obtención de información integrada de proteasas, sus sustratos e inhibidores.

### 1.2 La especificidad de sustrato en las proteasas

Schechter y Berger elaboraron en 1967 un modelo conceptual para explicar la especificidad de sustrato de las proteasas y las interacciones que tienen lugar en el centro activo de la enzima para el reconocimiento específico del sustrato proteico [23].

## Introducción

Según este modelo, los residuos de unión a sustrato que revisten la superficie del centro activo de la enzima definen subsitios o bolsillos de especificidad (S) contiguos capaces de acomodar la cadena lateral de un único aminoácido del sustrato en cada posición. El enlace peptídico entre las posiciones P1-P1' del sustrato corresponde al punto de escisión por la acción de la proteasa y, empleando este punto como referencia, los residuos se numeran de forma correlativa P1...Pn hacia el extremo N-t y P1'...Pn' hacia el extremo C-t. Por analogía, los respectivos subsitios en la proteasa se numeran S1...Sn hacia el extremo N-t del sustrato y S1'...Sn' hacia el extremo C-t (**figura 2**). Así pues, la estructura del centro activo define la especificidad de sustrato de una proteasa determinando los aminoácidos capaces de encajar en la región de unión del centro activo.



**Figura 2. Representación esquemática del modelo de Schechter y Berger para la nomenclatura de la interacción proteasa-sustrato.** La figura muestra los subsitios del centro activo de la proteasa (S1...Sn y S1'...Sn') acomodando la cadena lateral de los correspondientes residuos del sustrato (P1...Pn y P1'...Pn'). El enlace peptídico a escindir (asterisco rojo) por la proteasa se etiqueta como el punto de escisión. Los extremos N-t y C-t del sustrato proteico son indicados.

La región de reconocimiento del sustrato en el centro activo de las proteasas no debe considerarse como una estructura rígida. Se ha descrito un fenómeno de cooperación entre subsitios para la interacción de los residuos del sustrato, de manera que la unión de un residuo a un subsitio favorece la ocupación del contiguo por el siguiente residuo del sustrato [24]. No es habitual encontrar más de 4 bolsillos de especificidad a cada lado del punto de escisión en las endopeptidasas. Sin embargo, en las CPs y en las aminopeptidasas no se definen subsitios más allá de la posición S1' y S1, respectivamente, debido a la ubicación terminal del enlace peptídico a escindir [23].

### 1.3 Carboxipeptidasas

La proteólisis en la región C-t de proteínas es una MPT muy importante que genera, en la mayoría de casos, nuevas proteínas truncadas con funciones biológicas distintas a la proteína nativa [25].

## Introducción

El procesamiento C-t de proteínas suele afectar a la actividad, estabilidad o localización proteica, y es orquestado principalmente por las enzimas CPs [26], [27].

Las CPs son exopeptidasas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en el extremo C-t de péptidos y proteínas, liberando un único residuo en cada ciclo hidrolítico. En base a su mecanismo catalítico, se clasifican en: (1) serín-carboxipeptidasas (EC 3.4.16), que contienen una Ser reactiva en el centro activo que pertenece a la triada Ser/His/Asp característica de las serín-proteasas, (2) metalo-carboxipeptidasas (MCPs) (EC 3.4.17), que poseen 1 o 2 iones divalente metálicos coordinado en el centro activo que participa directamente en la catálisis, y (3) cisteín-carboxipeptidasas, que contienen una Cys nucleofílica en el centro activo (EC 3.4.18) (**tabla 4**). Según la base de datos MEROPS, un total de 9 familias incluyen enzimas con actividad CP [1],[28] (**tabla 5**).

### 1.4 Metalo-carboxipeptidasas

Las MCPs forman parte de todos los seres vivos de la naturaleza, desde bacterias a mamíferos. Únicamente los virus carecen de estas enzimas proteolíticas. Son enzimas esenciales para la vida que intervienen en multitud de procesos celulares y biológicos, tales como la degradación de proteínas de la dieta, el procesamiento de pro-hormonas y neuropéptidos, la regulación de la dinámica de los microtúbulos (MTs) el desarrollo embrionario, la regulación de la hemostasia sanguínea y de los procesos inflamatorios, entre otros muchos [29]. Según la base de datos MEROPS, un total de 6 familias incluyen MCPs (**tabla 5**), aunque tan solo 3 están representadas en los seres humanos. Actualmente, más de 25 genes codifican para MCPs activas en el genoma humano, la mayoría de ellas pertenecientes a la familia M14 (**tabla 6**).

Las MCPs de la familia M14 pertenecen al clan MC y se agrupan en las subfamilias M14A, M14B, M14C, M14D en base a la conservación secuencial de los motivos que contienen los ligandos de unión a zinc y a su homología estructural. La carboxipeptidasa A bovina (bCPA) fue la primera MCP identificada y se aisló hace más de 80 años a partir de extractos de páncreas. Desde entonces, el número de MCPs pancreáticas y extra-pancreáticas pertenecientes a esta familia ha ido incrementándose considerablemente, en paralelo al número de estructuras tridimensionales (3D) resueltas. Entre los miembros de una misma subfamilia existe una identidad secuencial del 25-63%, mientras que en la comparación entre 2 subfamilias, esta identidad secuencial desciende hasta el 15-25% [30].

Los miembros de la familia M14 contienen un dominio catalítico CP común que alberga el centro activo de la enzima con todos los residuos necesarios para la catálisis y la unión al sustrato conservados.

## Introducción

Además, se localiza un ion de zinc por molécula esencial para la catálisis tetra-coordinado con 2 His, un Glu y una molécula de agua. Una de las His y el Glu forman parte del motivo de unión a zinc His-X-X-Glu característico de esta familia, mientras que el tercer ligando corresponde a una His que se encuentra a más de 100 residuos hacia el C-t de este motivo (**tabla 5**).

**Tabla 5. Clasificación de las carboxipeptidasas.**

Clase catalítica	Familia MEROPS	Proteasa de referencia	Residuos catalíticos característicos
Metalocarboxipeptidasas	<b>M2</b>	Enzima convertidora de angiotensina unidad peptídica 1 (ACE1) - <i>H. sapiens</i>	HEXXH...H
	<b>M14</b> Subfamilia A	Carboxipeptidasa A1 (CPA1) - <i>H. sapiens</i>	HXXE...H
	<b>M14</b> Subfamilia B	Carboxipeptidasa E (CPE) - <i>Bos taurus</i>	
	<b>M14</b> Subfamilia C	Gamma-D-glutamyl-(L)-meso-diaminopimelico peptidasa I - <i>L. sphaericus</i>	
	<b>M14</b> Subfamilia D	Carboxipeptidasa citosólica 6 (CCP6) - <i>H. sapiens</i>	
	<b>M15</b>	Zinc D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa - <i>S. albus</i>	HXXXXXD...H
	<b>M20</b> Subfamilia A	Glutamato carboxipeptidasa - <i>Pseudomonas sp.</i>	HXD...D...EE...E...H
	<b>M20</b> Subfamilia D	Carboxipeptidasa Ss1 - <i>S. solfataricus</i>	DXD...D...EE...H
	<b>M28</b> Subfamilia B	Glutamato carboxipeptidasa II - <i>H. sapiens</i>	HXD...D...EE...D...H
	<b>M28</b> Subfamilia D	Amino peptidasa ES-62 - <i>A. viteae</i>	
	<b>M32</b>	Carboxipeptidasa Taq - <i>T. aquaticus</i>	HEXXH...H
Serín-carboxipeptidasas	<b>S10</b>	Carboxipeptidasa Y - <i>S. cerevisiae</i>	Triada catalítica S/D/H
	<b>S28</b>	Carboxipeptidasa lisosomal Pro-X - <i>H. sapiens</i>	
Cisteín-carboxipeptidasas	<b>C1</b> Subfamilia A	Papaína - <i>C. papaya</i>	Diada catalítica C/H

Adaptada de [2] y [31].

En la subfamilia M14A, los ligandos de unión a zinc se localizan en los motivos His- $X_{aa}$ -Arg-Glu- $X_{bb}$  ( $X_{aa}$  es Ser o Ala y  $X_{bb}$  es Trp o His) y  $X_{aa}$ -His- $X_{bb}$ -Tyr-Ser- $X_{cc}$  ( $X_{aa}$  es un residuo hidrofóbico,  $X_{bb}$  es Ser o Thr, y  $X_{cc}$  es Gln o Glu). En la subfamilia M14B, los motivos de unión a zinc corresponden a His-Gly- $X_{aa}$ -Glu- $X_{bb}$  ( $X_{aa}$  es Asp o Asn y  $X_{bb}$  es un residuo no cargado) y  $X_{aa}$ -His-Gly-Gly- $X_{aa}$ - $X_{bb}$  ( $X_{aa}$  es cualquier aminoácido pequeño y  $X_{bb}$  es hidrofóbico o Arg). En la subfamilia M14D, el primer motivo corresponde a la secuencia His-Pro-Gly-Glu- $X_{bb}$  ( $X_{bb}$  es una Ser o Thr) y el segundo motivo a la secuencia  $X_{aa}$ -His- $X_{bb}$ -Tyr-Ser- $X_{cc}$  ( $X_{aa}$  es cualquier residuo alifático o aromático,  $X_{bb}$  es una Gly, Ser o Ala y  $X_{cc}$  una Ser o Ala) en eucariotas y a la secuencia  $X_{aa}$ -His-Gly-Asp-Glu ( $X_{aa}$  es cualquier residuo alifático) en procariontes [32].

## Introducción

Por último, las MCPs de la familia M14 también pueden clasificarse en función de su especificidad de sustrato en MCPs tipo-A, tipo-B, tipo-O. En las tipo-A se incluyen aquellas MCPs que hidrolizan aminoácidos hidrofóbicos C-t. A su vez, se distinguen las MCPs con una preferencia por la hidrólisis de aminoácidos alifáticos y aromáticos pequeños C-t (tipo-A1) o residuos aromáticos voluminosos (tipo-A2). Las MCPs tipo-B tienen preferencia por la hidrólisis de aminoácidos básicos C-t y, finalmente, las MCPs tipo-O hidrolizan aminoácidos acídicos C-t.

**Tabla 6. Clasificación de las carboxipeptidasas humanas.**

Clase catalítica	Familia MEROPS	Proteasa	Motivos característicos	
Metalocarboxipeptidasas	M2	Enzima convertidora de angiotensina unidad peptídica 1 (ACE1) y 2 (ACE2)	HEXXH...H	
	M14 Subfamilia A	Carboxipeptidasa A1 (CPA1)		
		Carboxipeptidasa A2 (CPA2)		
		Carboxipeptidasa A3 (CPA3)		
		Carboxipeptidasa A4 (CPA4)		
		Carboxipeptidasa A5 (CPA5)		
		Carboxipeptidasa A6 (CPA6)		
		Carboxipeptidasa B (CPB)		
		Carboxipeptidasa U (CPU)		
		Carboxipeptidasa O (CPO)		
		Carboxipeptidasa E (CPE)		
	M14 Subfamilia B	Carboxipeptidasa D (CPD)		HXXE...H
		Carboxipeptidasa M (CPM)		
		Carboxipeptidasa N (CPN)		
Carboxipeptidasa Z (CPZ)				
Proteína similar a carboxipeptidasa X1 (CPX1)				
Proteína similar a carboxipeptidasa X2 (CPX2)				
M14 Subfamilia D	Proteína similar a carboxipeptidasa aórtica (ACLPL)			
	Carboxipeptidasa citosólica 1 (CCP1)			
	Carboxipeptidasa citosólica 2 (CCP2)			
	Carboxipeptidasa citosólica 3 (CCP3)			
	Carboxipeptidasa citosólica 4 (CCP4)			
	Carboxipeptidasa citosólica 5 (CCP5)			
M28 Subfamilia B	Carboxipeptidasa citosólica 6 (CCP6)			
	Glutamato carboxipeptidasa II			
M28 Subfamilia D	Glutamato carboxipeptidasa III		HXD...D...EE...D ...H	
	Carboxipeptidasa Q			
Serín-carboxipeptidasas	S10	Serín-carboxipeptidasa A	Triada catalítica S/D/H	
	S28	Carboxipeptidasa lisosomal Pro-X		
Cisteín-carboxipeptidasas	C1 Subfamilia A	Catepsina X	Diada catalítica C/H	

Adaptada de [2] y [31]

### 1.4.1 Subfamilia M14A

La subfamilia M14A de las MCPs (también conocida como la de las CPs digestivas o “tipo A/B”) está formada por un total de 9 miembros en mamíferos: carboxipeptidasa A1 (CPA1), carboxipeptidasa A2 (CPA2), carboxipeptidasa A3 (CPA3), carboxipeptidasa A4 (CPA4), carboxipeptidasa A5 (CPA5), carboxipeptidasa A6 (CPA6), carboxipeptidasa B (CPB), carboxipeptidasa U (CPU) y carboxipeptidasa O (CPO) (**tabla 6**). Además, esta subfamilia incluye también la MCP del anélido marino *Sabellastarte magnifica* (SmCP) [33] y la MCP de la bacteria *Thermoactinomyces vulgaris* (CPT) [34]. Ortólogos de estas MCPs están presentes en muchos organismos, como por ejemplo las bien caracterizadas CPA (HaCPA) y CPO (HaCA42) del insecto *Helicoverpa armigera* [35],[36],[37],[38], y la CPB en el insecto *Helicoverpa zea* (HzCPB) [39].

Las MCPs de esta subfamilia son proteínas monoméricas que contienen uno o más puentes disulfuro en su estructura terciaria y que, generalmente, son secretadas extracelularmente en su forma soluble. Son estructuralmente muy uniformes, con un peso molecular ( $M_w$ ) de entre 34-36 kDa para las formas activas de todos sus miembros. La cadena polipeptídica se estructura en un péptido señal (PS) de secreción de 15-22 residuos localizado en el extremo N-t, seguido de un pro-segmento o pro-región de 90-95 residuos de extensión y del dominio catalítico CP conservado de 300-310 residuos (**figura 3**).

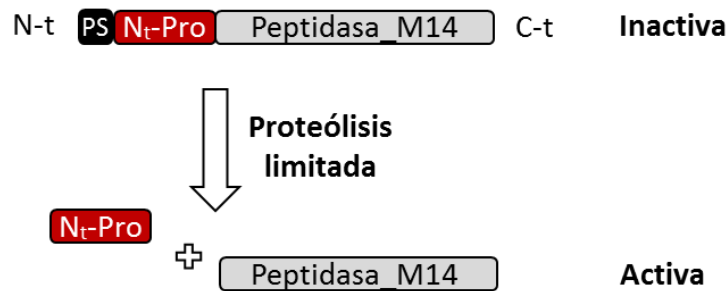
Los miembros de la subfamilia M14A (excepto CPA3, CPA6 y CPO) son sintetizados y secretados como pro-carboxipeptidasas (PCPs), es decir, como precursores totalmente inactivos o con una reducción significativa de su actividad proteolítica respecto a la forma activa [40]. Como describiremos más adelante, el pro-segmento actúa como un potente inhibidor autólogo de la propia enzima bloqueando el acceso de los sustratos al centro activo. Además, estudios de plegamiento/desplegamiento del dominio de activación demuestran que éste se comporta como una unidad de plegamiento independiente *in vitro* que podría funcionar *in vivo* como una chaperona intramolecular de asistencia al plegamiento del dominio catalítico adyacente durante su síntesis. En efecto, su presencia es necesaria para la expresión heteróloga y la estabilidad de las PCPs [30].

La producción de proteasas como zimógenos constituye un mecanismo de regulación bien conocido para mantener las enzimas en latencia hasta su activación en el lugar y momento adecuados. La activación del zimógeno se produce extracelularmente a través de la escisión del pro-segmento mediante proteólisis limitada por una endoproteasa específica con especificidad de sustrato tipo-B, como la tripsina o las proproteínas convertasas [41] (**figura 3**). La secuencia de reconocimiento para la endoproteasa se localiza en el extremo C-t de la hélice- $\alpha$  del pro-segmento e incluye una o varias Arg.



## Introducción

La homogeneidad estructural de los miembros de la subfamilia M14A, sin embargo, no se refleja en términos de especificidad de sustrato. Las MCPs CPA1-CPA6 presentan una especificidad de sustrato tipo-A, la CPB y CPU tienen una preferencia de sustrato tipo-B y la CPO es la única MCP de la subfamilia M14A con una especificidad de sustrato tipo-O. Curiosamente, la SmCP [33] y la CPT [34] son enzimas que presentan una especificidad de sustrato mixta tipo-A+O y tipo-A+B, respectivamente.



**Figura 3. Representación esquemática de la arquitectura de dominios y el mecanismo de activación de los miembros de la subfamilia M14A de las MCPs.** Las MCPs contienen una pro-región o pro-segmento (N<sub>t</sub>-Pro, en granate) adyacente al dominio catalítico CP (Peptidasa\_M14, en gris), que bloquea el acceso al centro activo de la enzima y la mantiene inactiva. La escisión y liberación de dicha pro-región mediante proteólisis limitada permite la obtención de la enzima en su forma activa. El PS de secreción (en negro) y los extremos N-t y C-t de la cadena polipeptídica son indicados. Figura extraída de [42].

### 1.4.1.1 Carboxipeptidasas A1, A2 y B

La CPA1, CPA2 y CPB se agrupan bajo el sobrenombre de MCPs pancreáticas o digestivas, y corresponden a las primeras MCPs identificadas y mejor caracterizadas a nivel bioquímico y funcional. En mamíferos, las MCPs pancreáticas corresponden a proteínas monoméricas de ~35 kDa no glicosiladas con una elevada identidad secuencial. No obstante, bóvidos y cerdos carecen de la CPA2.

Los precursores inactivos son sintetizados en las células acinares del páncreas exocrino y almacenados en forma de zimógenos estables en sus gránulos apicales [43]. Las PCPs digestivas constituyen ~20% del total de zimógenos pancreáticos, siendo la PCPA el componente principal [44]. La activación se produce mediante proteólisis limitada por tripsina tras la liberación del contenido de los gránulos en el duodeno intestinal [45]. Las enzimas activas participan en la degradación de las proteínas y péptidos procedentes de la dieta y de fuentes endógenas a través de sus especificidades de sustrato C-t complementarias [45]. Por otro lado, la CPB también se localiza en los gránulos secretores de insulina de las células-β del páncreas y se cree que podría participar en la maduración/producción de la insulina [46].

## ***Introducción***

La PCPA1 y la PCPA2 se pueden encontrar en forma monomérica o formando complejos con otros zimógenos de serín-proteasas (quimotripsinógenos B (CTGB), C (CTGC) y la proproteína E (PPE)), mientras que la PCPB se presenta únicamente en su forma monomérica. Así pues, se ha identificado el complejo binario PCPA1/PPE en humanos y cerdos, PCPA2/CTGC en rata, PCPA1/CTGB en ballena, PCPA1/CTGC en vaca y, finalmente, el complejo ternario PCPA1/CTCG/PPE en varios rumiantes [45]. La asociación oligomérica es la forma de presentación mayoritaria de la PCPA1 y PCPA2, y su función se asocia a la modulación/coordinación de la activación proteolítica de las subunidades del complejo [47].

En la estructura 3D del complejo ternario aislado de vaca (código de acceso al Banco de Datos de Proteínas (PDB): 1PYT) se observa que el pro-segmento de activación de la PCPA1 se ubica en el centro de las 3 subunidades del complejo, inaccesible a cualquier otra proteasa. En contraste, los sitios de activación de los zimógenos de las serín-proteasas están expuestos y son presumiblemente susceptibles al ataque triptico. Así pues, el CTGB y la PPE se activarían en primer lugar, provocando una ligera debilitación o distorsión del complejo que facilitaría el acceso de la tripsina a los sitios de activación. Se ha propuesto también que la formación de dichos complejos protegería a la PCP del ambiente ácido presente en la entrada del duodeno [48].

Aunque la localización habitual de las MCPs digestivas corresponde al páncreas o al tracto intestinal, también se detectan en sangre en determinadas condiciones fisiopatológicas. Los niveles séricos de PCPB y CPB están incrementados en personas que sufren rechazo de páncreas trasplantado y pancreatitis aguda [49], y los de PCPA y CPA en personas con cáncer pancreático [50],[51].

Las PCPs pancreáticas fueron las primeras MCPs descritas y han sido objeto de numerosos estudios en los últimos 40 años. La bCPA constituye la enzima prototipo para el estudio de las proteasas de zinc y ha participado en todo tipo de estudios estructurales, cinéticos, de estabilidad y plegamiento que han permitido realizar grandes avances en la comprensión del mecanismo catalítico de las MCPs y en la identificación, caracterización y desarrollo de inhibidores. La CPB porcina (pCPB) se ha empleado como enzima modelo para el estudio y diseño de inhibidores para otra MCP tipo-B de esta subfamilia con un gran interés farmacológico denominada CPU. En consecuencia, decenas de estructuras 3D han sido resueltas para las PCPs y CPs pancreáticas humanas, bovinas y porcinas en su forma aislada o en complejo con pequeños ligandos e inhibidores orgánicos, sintéticos y proteicos.

### 1.4.1.2 *Carboxipeptidasa A3*

La CPA3 fue descubierta en 1980 por Everitt y Neurath en los gránulos secretores de los mastocitos del peritoneo de rata [52]. Posteriormente, otros investigadores corroboraron su presencia en mastocitos de distintas fuentes [53],[54].

La CPA3 es una proteína de 36 kDa sintetizada como un precursor inactivo que se almacena en los gránulos secretores en su forma activa [52]. Su activación podría ocurrir dentro del compartimento granulado por una proteasa aún no bien definida que se ha relacionado con las catepsinas lisosomales. Concretamente, la catepsina E [55] y la presencia de glicosaminoglicanos (GAGs) aniónicos parecen ser elementos claves en el proceso de activación [56]. La CPA3 forma un macrocomplejo con el proteoglicano serglicina en los gránulos y son secretados conjuntamente cuando el mastocito es degranulado. Tras su liberación, el complejo tiende a asociarse a los GAGs de la matriz extracelular (ECM) debido a la presencia de parches básicos en la superficie de la molécula que le confieren una elevada carga positiva.

La función biológica de la CPA3 no se conoce exactamente, aunque se ha sugerido un posible papel protector frente a péptidos tóxicos, tales como las toxinas de los venenos de serpientes y la endotelina-1. También se ha descrito que la CPA3 es capaz de hidrolizar un gran número de péptidos bioactivos *in vitro*, incluyendo la neurotensina, neuromedina N, etc. aunque la relevancia biológica de este hecho tampoco ha sido determinada. Finalmente, la degranulación de los mastocitos por mecanismos mediados por IgE sugieren un papel de la CPA3 en procesos alérgicos [57]. Estudios con ratones deficientes en el gen codificante para CPA3 demuestran que esta enzima es imprescindible para la generación de mastocitos fenotípicamente maduros. Sin embargo, los mastocitos inmaduros no tienen defectos asociados con la degranulación *in vitro* o la anafilaxis cutánea pasiva *in vivo* [58].

### 1.4.1.3 *Carboxipeptidasa A4*

La CPA4 es una proteína N-glicosilada con un  $M_w$  teórico de ~36 kDa que fue descubierta por Huang y colaboradores (col.) en 1999 en la búsqueda de genes inducidos por el tratamiento con butirato sódico en líneas celulares humanas de cáncer de próstata PC-3, DU145 y BPH1. Se determinó que el gen codificante para la CPA4 estaba sobreexpresado en estas líneas, apuntando a una posible conexión con el cáncer de próstata.

Tanco y col. demostraron que la CPA4 interviene en el procesamiento de neuropéptidos y factores de crecimiento en los tejidos que se localiza, como por ejemplo la neurotensina, graninas y varias encefalinas [59].

## **Introducción**

La CPA4 se expresa a niveles muy bajos en muchos tejidos humanos, como por ejemplo el páncreas, próstata, ovario, testículos, intestino, cerebro, corazón, riñón, músculo, etc. Sin embargo, se ha determinado su sobreexpresión en el útero de mujeres embarazadas y tejido fetal, apuntando a la importancia de esta MCP durante el desarrollo embrionario [60].

Estudios en pacientes con hiperplasia benigna de próstata muestran que mutaciones o anomalías en la impronta genómica del gen de la CPA4 se correlaciona con la agresividad del cáncer de próstata [61]. Ross y col. estudiaron también la asociación de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en el gen de la CPA4 y con el cáncer de próstata, demostrando que el *SNP* G303C rs2171492 está asociado con un incremento en el riesgo de sufrir esta enfermedad en hombres jóvenes [62]. Además, se ha demostrado la vinculación de esta MCP con otros tipo de cáncer como el hepatocarcinoma o el cáncer pancreático, en los que se cree que la CPA4 juega un papel muy importante en el establecimiento de microambientes adecuados que promueva la angiogénesis tumoral y la proliferación de células madre cancerígenas [63]. Estos resultados, junto con la vinculación de la CPA4 al cáncer de próstata, demuestran que podría ser secretada en varios tipos de cáncer y tener un rol muy importante en la progresión de tumores [64].

Varias estructuras 3D para la CPA4 se encuentran depositadas en el PDB, tanto para su precursor inactivo (PDB: 2BOA) como para su forma catalíticamente activa en complejo con un hexapéptido (PDB: 2PCU) y varios inhibidores (PDB: 2BO9, 4BD9 y 4A94).

### **1.4.1.4 Carboxipeptidasa U**

La CPU (también conocida como “carboxipeptidasa R” (CPR), “inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina” (TAFI) o “carboxipeptidasa plasmática B” (pCPB)) fue identificada a principios de los años 90 por Hendriks y col., y se trata de una proteína de ~36 kDa secretada por el hígado y las plaquetas [65] que circula por el plasma en forma de precursor inactivo. A diferencia de los otros miembros de la subfamilia M14A, la CPU tiene un pro-segmento altamente N-glicosilado que incrementa el  $M_w$  del zimógeno inactivo hasta los 60 kDa debido a los glicanos unidos. Cuando TAFI se activa por proteólisis limitada del residuo Arg92 por trombina, plasmina o por el complejo de trombina/trombomodulina en la superficie endotelial vascular [66], se obtiene la unidad catalítica activa denominada CPUa [67].

La CPU es termolábil y presenta una vida media dependiente de temperatura limitada a pocos minutos. Esta inestabilidad térmica constituye un mecanismo de auto-regulación de la actividad enzimática y es debida a una región altamente dinámica que se encuentra oculta en el zimógeno, interaccionando con el segmento de activación.

## ***Introducción***

La liberación del pro-segmento provoca un cambio conformacional en la CPUa que expone la Arg302 en la región dinámica para su escisión contrarreloj por trombina y la consecuente inactivación de la MCP [68],[69],[70]. La estabilidad térmica de la CPUa puede incrementarse por la unión de pequeños sustratos o inhibidores [70].

La CPUa cataliza la eliminación de Lys C-t del coágulo de fibrina parcialmente digerido, impidiendo la conversión del plasminógeno a plasmina por el activador tisular del plasminógeno (tPA). La plasmina degrada los coágulos de fibrina, una de las proteínas claves en la regulación cruzada entre la coagulación y la fibrinólisis [71]. Por consiguiente, la CPUa reduce la fibrinólisis mediante la disminución de la tasa de activación del plasminógeno [72],[73]. Por otro lado, la CPU también participa en la modulación de los procesos inflamatorios mediante la inactivación de los péptidos inflamatorios bradiquinina y las anafilotoxinas C3a y C5a. Otras funciones biológicas han sido descritas para esta MCP relacionadas con la migración celular, presión sanguínea y reparación tisular [74].

Desequilibrios en el mecanismo de regulación de la hemostasis sanguínea causan enfermedades asociadas a la hiperfibrinólisis (incrementa el riesgo de hemorragia) o hipofibrinólisis (incrementa el riesgo de trombosis) [75]. Otras patologías se han vinculado con la CPU, incluyendo la diabetes, la hipertensión, el cáncer, la enfermedad hepática crónica, etc. Por ejemplo, niveles plasmáticos de CPU significativamente elevados se han determinado en el cáncer gástrico [76], el cáncer de mama [77],[78], el cáncer de pulmón [79] y en el mieloma múltiple [80]. En el cáncer de mama, la plasmina degrada componentes de la matriz extracelular, lo que favorece la migración y la invasión de las células cancerígenas. Por consiguiente, la CPU atenúa la metástasis de las células cancerígenas gracias a la inhibición de la activación del plasminógeno [81]. Finalmente, estudios recientes demuestran que la CPU tiene un efector protector contra la erosión ósea en la artritis reumatoide inactivando la anafilotoxina C5a y, también, en la osteoartritis [82].

La CPU constituye una MCP de gran interés farmacológico y biomédico para la prevención de enfermedades trombóticas, por lo que numerosos estudios se han realizado para su profunda caracterización bioquímica y funcional. Por consiguiente, varias estructuras 3D se han resuelto para la CPU, tanto para el precursor inactivo (PDB: 3DGV, 3D66) como para la CPUa en complejo con inhibidores (PDB: 5HVF, 5HVG, 5HVH, 4P10, 3OSL, 3LMS, 3DU4, 3D67, 4P10) que regulen su actividad. También hay disponible estructuras de mutantes estables de la CPU (PDB: 3D68, 4P10).

### 1.4.1.5 *Carboxipeptidasa A5*

La CPA5 es, sin duda, el más desconocido de los miembros de la subfamilia M14A. Fue descubierta, junto a la CPA6 y la CPO, por Wei y col. en 2002 en una búsqueda bioinformática de MCPs con similitud a las PCPs humanas. El conocimiento acerca de esta MCP sigue siendo muy limitado en la actualidad, con pocos estudios disponibles en la literatura científica. Se trata de una proteína con un Mw teórico de ~35 kDa sintetizada como un zimógeno inactivo, aunque se desconoce si es secretada en su forma activa o activada extracelularmente. Se expresa principalmente en los testículos y la pituitaria, pero nada se sabe acerca de su función biológica [83].

### 1.4.1.6 *Carboxipeptidasa A6*

La CPA6 es una proteína N-glicosilada con un Mw teórico de ~36 kDa con la peculiaridad de que el zimógeno es activado por la endoproteasa furina u otra proproteína convertasa similar en la vía secretora constitutiva y exocitada como una enzima catalíticamente activa. Tras su secreción se une a la ECM a través de una región rica en residuos básicos de la superficie de la molécula presente en el lado opuesto al centro activo para su correcta orientación respecto a la ECM.

Se expresa abundantemente en el bulbo olfatorio del cerebro en el ratón adulto, y también a bajos niveles en el epidídimo. En cambio, en el tejido embrionario su distribución es más amplia, encontrándose en muchos tejidos neuronales, huesos, piel, estómago, ojos, etc. La CPA6 es capaz de hidrolizar residuos C-t de un gran número de péptidos bioactivos. El procesamiento C-t de los neuropéptidos Met- y Leu-encefalina y neurotensina los inactiva, mientras que en la angiotensina I provoca su conversión a la forma biológicamente activa denominada angiotensina II. Por tanto, la función de la CPA6 se relaciona con la regulación de neuropéptidos a nivel extracelular en el bulbo olfatorio y otras regiones del cerebro [84]. Por otro lado, su expresión durante el desarrollo embrionario también sugiere la posibilidad de que intervenga en el procesamiento de proteínas y péptidos involucrados en morfogénesis, como por ejemplo las proteínas Wnt [85].

La CPA6 se relaciona con el síndrome de Duane, un trastorno del movimiento ocular causado por la inervación inadecuada del músculo recto lateral. Esta conexión se describió por primera vez en un paciente con una translocación *de novo* en el brazo 8q13 del cromosoma 8 que interrumpía la secuencia codificante del gen de la CPA6. Dos pacientes más con esta enfermedad mostraban deleciones/translocaciones en esta misma posición cromosómica, reforzando la vinculación entre mutaciones en el gen codificante de la CPA6 y el síndrome de Duane [86].

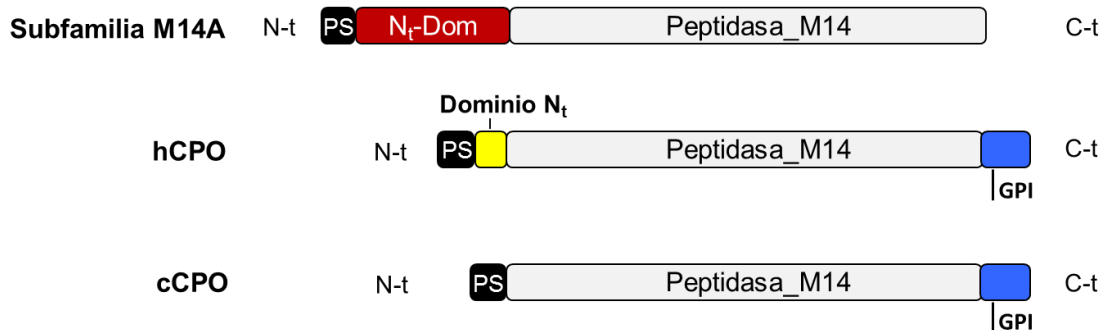
## Introducción

La expresión de CPA6 en la región ocular afectada en dicho síndrome apoyaría también las evidencias genéticas existentes del papel de la CPA6 en el origen de esta enfermedad. Recientemente se han publicado varios estudios que demuestran la vinculación entre mutaciones y fenómenos de impronta genómica en el gen de la CPA6 y otras enfermedades como la epilepsia [87],[88], las convulsiones febriles [87],[88] y el carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal [89].

### 1.4.1.7 Carboxipeptidasa O

El análisis bioinformático del genoma humano en busca de MCPs con homología a las PCPs humanas (hPCPs) identificó un nuevo miembro denominado CPO, con unas características bioquímicas únicas respecto a los otros miembros de la subfamilia M14A [83].

La CPO está presente en la mayoría de vertebrados, incluyendo mamíferos, aves y peces. Sorprendentemente, ningún ortólogo se ha descrito en rata y el genoma de ratón contiene únicamente un pseudogen para la CPO. El alto grado de conservación evolutiva para esta MCP en la mayoría de vertebrados sugiere que su función es biológicamente relevante, pero su ausencia en rata y ratón confirma que no es esencial para la vida [90].



**Figura 4. Comparación de la arquitectura de dominios de la CPO respecto al resto de peptidasas M14A.** Esquema de los dominios estructurales de la CPO humana (hCPO) en representación de los ortólogos de mamífero y aves, y de la CPO del pez cebra (cCPO) en representación de los peces. Los ortólogos de la CPO tienen en común con las MCPs de la subfamilia M14A, el PS de secreción (en negro) y el dominio catalítico CP (Peptidasa\_M14, en gris). Sin embargo, carecen del N<sub>t</sub>-Dom y contienen una secuencia C-t (en azul) escindida post-traduccionalmente para la unión covalente de una molécula de GPI, que no presenta ningún otro miembro de esta subfamilia. Los extremos N-t y C-t de la cadena polipeptídica son indicados.

## Introducción

La CPO es una proteína N-glicosilada con un  $M_w$  teórico de ~40 kDa, que carece del pro-segmento N-t característico de los miembros de la subfamilia M14A. En su lugar, los ortólogos de la CPO en mamíferos y aves presentan un pequeño dominio conservado N-t de 20-28 residuos, con baja homología secuencial al pro-segmento de la CPA1 humana (hCPA1), que no es escindido de la proteína madura catalíticamente activa.

Curiosamente, esta pequeña secuencia N-t está totalmente delecionada en peces, lo que sugiere que la CPO no parece requerir de ninguna extensión N-t para su plegamiento y funcionalidad. El rol de dicho dominio N-t se desconoce, aunque se cree que podría tener un efecto inhibitorio parcial de la actividad enzimática, dado que la CPO del pez cebra es más activa que su homóloga humana. Además, los ortólogos de la CPO comparten una serie de elementos comunes que incluyen el PS de secreción, el dominio catalítico CP localizado a continuación del dominio N-t (o a continuación del PS en el caso de los peces) y una secuencia C-t de reconocimiento para su escisión y reemplazo por una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) [83],[90] (**figura 4**).

El PS dirige a la proteína a través de la vía de secreción, donde se modifica post-traduccionamente mediante N-glicosilación y lipidación C-t, para su posterior secreción y anclaje a la membrana extracelular. El tratamiento de la membrana plasmática de células epiteliales de riñón canino Madin-Darby (MDCK) que expresan CPO de forma estable con la enzima fosfatidilinositol-fosfolipasa C (PI-PLC) solubiliza la proteína, confirmando la unión periférica de la CPO a la membrana mediada por GPI [90].

En las células de mamífero, las proteínas modificadas por GPI se localizan principalmente concentradas en regiones denominadas balsas lipídicas, que corresponden a microdominios especializados en las membranas que intervienen fundamentalmente en la dinámica de éstas y sus componentes, en la señalización celular y en la interacción huésped-patógeno [91]. Lyons y col. han localizado la CPO asociada a balsas lipídicas en la membrana apical de los enterocitos del íleon intestinal, aunque probablemente también se encuentre en otros tramos del intestino delgado [90],[92].

La CPO presenta una especificidad de sustrato tipo-O no descrita en ningún otro miembro de la subfamilia M14A en mamíferos. Ensayos de actividad enzimática *in vitro* muestran que la CPO hidroliza de forma eficiente los Glu C-t del péptido sintético 3-(2-furil)acriloil-Glu-Glu (FA-EE) y de la tubulina [90]. Por su patrón de expresión en el tracto digestivo, localización celular y especificidad de sustrato, la CPO se ha presentado como una nueva MCP digestiva que participa en la hidrólisis de residuos ácidos C-t procedentes de las proteínas y péptidos de la dieta y de otras fuentes endógenas, complementando así las especificidades de sustrato tipo-A y tipo-B de las MCPs pancreáticas.



## Introducción

La CPO se encuentra muy expresada en el epitelio del intestino delgado en humanos. Sin embargo, su presencia también ha sido detectada, principalmente, en riñón, testículo, ovario, tejido adiposo e hígado [93], sugiriendo una función reguladora en el procesamiento C-t de proteínas y péptidos en estos tejidos. En un estudio reciente se ha identificado la co-localización de la CPO con gotas lipídicas presentes en el citosol de células MDCK que expresan CPO de forma estable, aunque su función en esta localización se desconoce.

Estas gotas lipídicas citoplasmáticas constituyen un reservorio intracelular de lípidos y son el componente mayoritario del tejido adiposo. Mediante un análisis proteómico de dicho tejido, Brasaemle y col. han demostrado la existencia de proteínas que contienen Glu y Asp C-t en estas gotas lipídicas, que podrían ser potenciales sustratos para la CPO [94].

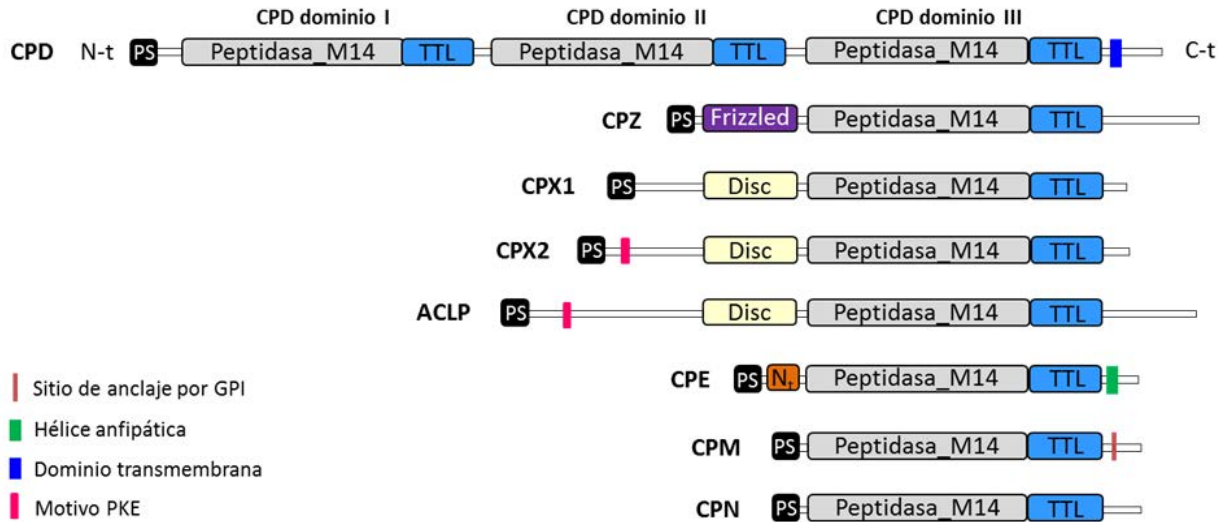
### 1.4.2 Subfamilia M14B

La subfamilia M14B de las MCPs (también conocida como la de las “MCPs reguladoras” o “tipo N/E”) está formada por un total de 8 miembros en mamíferos, aunque solo 5 son catalíticamente activos: carboxipeptidasa N (CPN), carboxipeptidasa E (CPE), carboxipeptidasas M (CPM), carboxipeptidasa D (CPD) y carboxipeptidasa Z (CPZ). Existe un subgrupo de MCPs M14B que presentan una identidad secuencial considerable (33-54%) en sus dominios catalíticos con estos miembros activos de la subfamilia M14B, pero que son inactivos frente a sustratos típicos de CPs debido a que carecen de residuos claves en el centro activo para la actividad enzimática. Las MCPs de la subfamilia M14B de mamíferos mantienen una identidad secuencial del 35-50%, que disminuye al 15-20% si las comparamos con los miembros de la subfamilia M14A [95]. Además, presentan una amplia distribución taxonómica y se han identificado ortólogos en muchos otros organismos.

Los miembros de la subfamilia M14B corresponden a glicoproteínas monoméricas u oligoméricas sintetizadas en su forma activa, con uno o más puentes disulfuro que estabilizan su estructura. Son muy heterogéneos estructuralmente y carecen del pro-segmento N-t conservado en la subfamilia M14A, por lo que la regulación de su actividad subyace principalmente en su localización/compartimentación. En su lugar, todos ellos tienen en común un dominio de ~80 residuos con homología estructural a la transtirretina conocido como dominio similar a transtirretina (TTL), adyacente al C-t del dominio catalítico CP de 300-310 residuos de extensión. Todos sus miembros contienen secuencias extras de extensión variable al N-t y/o C-t de la unidad catalítica (formada por el dominio catalítico CP + el dominio TTL), como son el dominio *Frizzled* N-t en la CPZ, los dominios similares a discoidina-1 (Disc) en la región N-t en las MCPs inactivas, un pequeño pro-dominio N-t en la CPE e incluso repeticiones en tándem de la unidad catalítica en el caso de la CPD.

## Introducción

Además, la CPD, CPE y CPM contienen en sus extremos C-t estructuras o secuencias para su MPT que permitan su anclaje o interacción con membranas. Los únicos ejemplos de MCPs oligoméricas o con multidominios pertenecen a esta subfamilia (**figura 5**).



**Figura 5. Representación esquemática de la arquitectura de dominios de los miembros de la subfamilia M14B de las MCPs humanas.** Todos los miembros contienen un PS N-t (en negro), un dominio catalítico CP (Peptidasa\_M14, en gris) y un dominio C-t adicional con homología a transtirretina (TTL, en azul). Adicionalmente, contienen otras secuencias al N-t y C-t, como por ejemplo la región rica en Cys homóloga a los receptores *Frizzled* presente en CPZ (*Frizzled*, en violeta), los dominios con similitud a la Discoidina-1 en CPX1, CPX2 y ACLP (Disc, en amarillo) y una pequeña secuencia de repetición PKE en CPX2 y ACLP (en rosa). La CPD contiene 3 repeticiones en tándem de la unidad catalítica M14B, un dominio transmembrana corto y una cola citoplasmática. La CPE contiene una hélice anfipática C-t y un pequeño pro-dominio N-t ( $N_t$ , en naranja) adyacente al dominio catalítico CP. Por último, la CPM está modificada pos-traduccionalmente con una molécula de GPI en su extremo C-t. Los extremos N-t y C-t de la cadena polipeptídica son indicados.

Se desconoce la función del dominio TTL, pero deleciones en cualquier porción de este dominio provoca la inactivación de la enzima. De forma análoga al pro-segmento en la subfamilia M14A, se ha propuesto que actuaría como un dominio de asistencia al plegamiento. Recientemente, García-Pardo y col. demostraron que el dominio TTL presenta una propensión intrínseca a la agregación en conformaciones tipo amiloide en condiciones casi nativas debido a la existencia de, al menos, una cadena- $\beta$  preformada altamente amiloidogénica en todos los miembros de la subfamilia M14B. La existencia de estas estructuras con tendencia a la agregación constituye un riesgo potencial para la célula, pero son necesarias para la formación de interfaces intermoleculares que promuevan la formación de complejos funcionales. Por consiguiente, se ha propuesto que el dominio TTL podría actuar también como un elemento necesario para la oligomerización de la enzima y/o unión a otras proteínas o membranas [96].

## ***Introducción***

En contraste con su variabilidad estructural, todos los miembros de la subfamilia M14B tienen una especificidad de sustrato común tipo-B estricta, con ligeras diferencias en la preferencia por residuos Arg o Lys C-t. Las MCPs de la subfamilia M14B ejercen su función en la vía de secreción o tras la secreción al exterior celular y se relacionan, principalmente, con el procesamiento de neuropéptidos, hormonas peptídicas y proteínas del complemento, y la modulación de interacciones proteína-proteína y célula-proteína.

De las 5 peptidasas M14B con actividad catalítica, la CPE y CPN fueron las primeras en ser descubiertas y son las mejor caracterizadas como enzimas que participan en el procesamiento de neuropéptidos.

La CPE se expresa exclusivamente en tejidos neuroendocrinos, y está involucrada en las biosíntesis de la mayoría de neuropéptidos y factores de crecimiento [97],[98]. Éstos son sintetizados inicialmente como pequeñas proteínas precursoras, que son procesados por pro-hormonas convertasas para generar productos intermedios con residuos básicos C-t. A continuación, la CPE elimina la Arg o Lys C-t para la obtención final del péptido bioactivo [99]. Concretamente, la CPE se localiza en la vía de secreción regulada formando parte de las vesículas secretoras (pH 5-6), donde existe en su forma soluble (~50 kDa) o como proteína periférica asociada a membrana (~54 kDa) gracias a una hélice anfipática C-t de ~30 residuos [100],[101].

La CPN se sintetiza en grandes cantidades por el hígado y secretada a la sangre, donde circula como un complejo heterotetramérico (dímero de heterodímeros) de 280 kDa compuesto por 2 subunidades catalíticas de 48-55 kDa, y 2 subunidades reguladoras/no catalíticas de 83 kDa, tremendamente N-glicosiladas [102],[103]. Las subunidades reguladoras transportan y estabilizan las subunidades catalíticas a 37°C en la circulación sanguínea para evitar su eliminación de la sangre por filtración glomerular hasta que sea necesaria su activación [103]. La escisión proteolítica entre la Arg457-Ser458 en la subunidad reguladora de la CPN por la plasmina o la tripsina provoca la liberación de un péptido de 13 kDa que induce la disociación del tetrámero en 2 heterodímeros de 142 kDa activos [104]. El complejo activo de la CPN escinde la Arg C-t de la bradiquinina, calidina, anafilotoxinas del complemento (C3a y C5a) y fibrinopéptidos inflamatorios. Por consiguiente, la CPN se asocia con procesos inflamatorios y se considera el mayor inhibidor de anafilotoxinas plasmático constitutivamente activo y estable [105],[106].

La CPM se localiza extracelularmente unida a la membrana plasmática, aunque formas solubles se han identificado también en varios órganos y fluidos biológicos, como el plasma seminal, el líquido amniótico y la orina [107]. Los niveles más elevados de CPM se encuentran en el tejido adiposo, pulmón y las microvellosidades de la placenta, aunque también se localiza en riñón, vasos sanguíneos, intestino, cerebro y nervios periféricos [108].

## Introducción

Debido a su amplia distribución y localización en la membrana plasmática, la CPM podría participar en multitud de procesos que incluyen la regulación de la activación de precursores peptídicos en la superficie celular, degradación de proteínas y péptidos extracelulares o el procesamiento extracelular de pro-hormonas [95],[109]. Se ha demostrado que varios péptidos biológicamente activos, tales como la bradiquinina, anafilotoxinas o encefalinas, son sustratos naturales de la CPM.

Aunque la función de esta enzima no se comprende completamente, numerosos estudios demuestran la participación de la CPM en la regulación de procesos inflamatorios, la respuesta inmune, la placentación, la osteogénesis y la adipogénesis. Otras muchas funciones para la CPM han sido revisadas en el sistema nervioso central y periférico, hematopoyético, reproductivo, excretor, cardiovascular, pulmonar, etc., lo que incrementa la complejidad a la hora de elucidar la relevancia fisiológica de la CPM [110].

La CPZ es una enzima de secreción de ~70 kDa principalmente localizada en la matriz extracelular, que está muy expresada en la placenta en humanos [111] y rata [112], y está ampliamente distribuida también en los tejidos embrionarios de ratón durante la embriogénesis [100]. Contiene en la región N-t un dominio rico en Cys exclusivo denominado *Frizzled*, que presenta un 20-35% de identidad secuencial con las proteínas *Frizzled* de *D. melanogaster* y mamíferos. Estas proteínas son receptores para las proteínas de señalización de la familia *Wingless/Wnt* [113], que son glicoproteínas reguladoras con un papel muy importante durante el desarrollo embrionario. Se ha demostrado la unión de CPZ a Wnt-4 y la hidrólisis de una Arg C-t en ésta [114], por lo que la función de CPZ se relaciona con el crecimiento y la diferenciación tisular durante el desarrollo embrionario [114].

La CPD es una proteína que existe en diferentes formas, siendo la de 180 kDa la forma mayoritaria. Se localiza en la red trans-Golgi de las células neuroendocrinas, y recircula hacia la superficie celular a través de vesículas secretoras inmaduras y regresa a la red trans-Golgi mediante vesículas endosómicas. La CPD constituye la MCP de la familia M14 de mayor tamaño y la única proteína multidominio y transmembrana de esta familia [30]. Contiene 3 repeticiones en tándem (dominios) de la unidad catalítica formada por el dominio catalítico CP y el dominio TTL, seguidas de una secuencia transmembrana de 20 residuos y una cola citoplasmática de ~60 residuos C-t que es imprescindible para la retención de la CPD en la red trans-Golgi [115]. Mientras que el dominio I y II son activos y difieren ligeramente en sus propiedades enzimáticas, el dominio III es inactivo debido a que carece de residuos críticos para la actividad enzimática, y se ha sugerido que podría tener una actividad hidrolasa distinta o actuar como una proteína estructural [100].

## Introducción

La CPD está presente en todos los tejidos y constituye la MCP de la familia M14 con la distribución más ubicua descrita, lo que es consistente con la importancia del rol que desempeña en el procesamiento de un gran número de proteínas que transitan por la vía de secreción [116]. La CPD parece estar involucrada en el procesamiento específico de proteínas para la producción de receptores, factores de crecimiento y neuropéptidos, procesados previamente por endopeptidasas furina, pro-hormona convertasas o similares en la red trans-Golgi. Cuando se localiza en la superficie celular, la CPD hidroliza péptidos con Arg C-t que se liberan como sustrato para la síntesis de óxido nítrico por la óxido nítrico sintasa, un importante regulador de procesos celulares que incluyen la neurotransmisión, la vasodilatación y la progresión y supervivencia tumoral [100],[117].

Las MCPs inactivas carboxipeptidasa X1 (CPX1), carboxipeptidasa X2 (CPX2) y proteína similar a carboxipeptidasa aórtica (ACLP) son secretadas extracelularmente y se unen a la ECM, donde ejercen su función. Presentan una distribución muy similar en tejidos embrionarios, siendo notable su presencia en cartílago y estructuras esqueléticas, además de otros tejidos ricos en colágeno [118]. Aunque su función se desconoce, se ha propuesto que estas MCPs inactivas podrían tener un papel estructural durante el desarrollo embrionario, funcionando como proteínas de unión de otras proteínas en la ECM a través de su dominio discoidina, o bien como proteínas puente para la unión de 2 proteínas, con un sitio de unión en el dominio catalítico inactivo y otro sitio de unión en el dominio discoidina [119].

### 1.4.3 Subfamilia M14C

La subfamilia M14C incluye la enzima bacteriana  $\gamma$ -D-glutamil-(L)-meso-diaminopimélico peptidasa I de *Bacillus sphaericus*, una enzima de 45 kDa involucrada en el metabolismo del peptidoglicano de la pared bacteriana durante el proceso de esporulación. Esta MCP está estructurada en un dominio N-t de 100 residuos formado por 2 segmentos peptídicos similares repetidos en tándem, adyacente al dominio catalítico conservado en la familia M14. El dominio N-t no presenta homología con el pro-segmento N-t de la subfamilia M14A, y su función se asocia al reconocimiento de alguna proteína específica indeterminada de la pared. Esta MCP constituye un miembro excepcional de la familia M14, ya que se trata de una omegapeptidasa (EC 3.4.19) bifuncional con actividad CP y peptidil-dipeptidasa, que cataliza la eliminación del meso-diaminopimelato C-t del sustrato L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-(L)meso-diaminopimelato o el dipéptido C-t meso-diaminopimelato-D-Ala del sustrato L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-(L)meso-diaminopimelato-(L)-D-Ala [120].

### 1.4.4 Subfamilia M14D

La subfamilia M14D (también conocida como “carboxipeptidasas citosólicas” (CCPs)) constituye la última subfamilia reconocida para las MCPs de la familia M14. Fue descrita hace 10 años simultáneamente por 2 grupos de investigación que, mediante estudios filogenéticos, estructurales y bioquímicos, evidenciaron la divergencia de las CCPs respecto a los otros miembros de la familia M14 [32],[121]. A diferencia de las MCPs de las subfamilias M14A y M14B, que realizan su función en la vía de secreción o tras su secreción extracelular, las CCPs son intracelulares. Se localizaron inicialmente en el citosol [121], aunque estudios posteriores confirmaron su presencia en otras localizaciones intracelulares [32].

Los miembros de la subfamilia M14D están ampliamente distribuidos en los organismos eucariotas (a excepción de plantas y hongos, en los que solo se encuentran en los linajes basales), restringidos a un número reducido de bacterias y ausentes en arqueas. El número de genes codificantes para CCPs varía entre diferentes organismos, siendo de 1 único gen proteobacterias, 2 en nemátodos, 4 en peces, 6 en anfibios, aves y mamíferos, y hasta 32 genes en el protozoo ciliado *Paramecium tetraurelia* [32]. Así pues, el genoma humano y de ratón codifica para 6 parálogos denominados CCP1-CCP6 (hCCPs o mCCPs, respectivamente), según el orden en el que fueron descubiertos. Además, para cada CCP existen múltiples variantes generadas por empalme alternativo.

Las MCPs de la subfamilia M14D corresponden a proteínas monoméricas con un  $M_w$  entre 58-138 kDa, sintetizadas en su forma activa y que no contienen puentes disulfuro ni glicosilaciones en su estructura. Tienen en común el dominio catalítico CP de ~300 residuos de extensión y un pro-dominio N-t adyacente de ~150 residuos, conservado en todas las CCPs y exclusivo de esta subfamilia de enzimas (**figura 6**). La función del pro-dominio N-t no se conoce con certeza, pero Rodríguez de la Vega y col. sugieren que actuaría como un dominio de asistencia al plegamiento del dominio catalítico CP adyacente, de forma análoga al pro-segmento N-t y el dominio TTL en las MCPs de la subfamilia M14A y M14B, respectivamente [32]. Alternativamente, se ha hipotetizado que podría tener una función reguladora limitando el acceso al centro activo de la enzima, o actuar como un elemento de unión de otras proteínas, tal y como se ha sugerido para el dominio N-t de la MCP de la subfamilia M14C.

Los miembros de la subfamilia M14D de eucariotas superiores son muy heterogéneos estructuralmente y contienen dominios y extensiones N-t y C-t adicionales (**figura 6**). La mayoría no comparten homología con otros dominios conocidos y apenas han sido caracterizados.

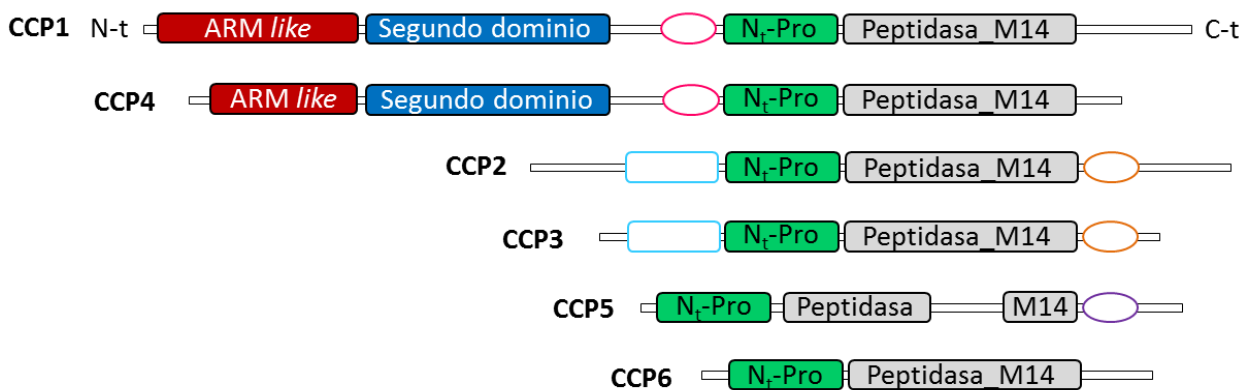
## Introducción

Es posible que algunos de estos dominios y extensiones N-t y C-t tengan una función reguladora en la localización específica en determinadas estructuras celulares y en la interacción con otras proteínas o ácidos nucleicos para realizar su función.

El análisis filogenético de las CCPs muestra una estrecha relación evolutiva entre algunas de ellas que permiten su agrupación en clados. Así pues, CCP1 y CCP4 pertenecen al clado M14D3; CCP2 y CCP3 se incluyen en el clado M14D4; y CCP5 y CCP6 corresponden al clado M14D2. Las CCPs de un mismo clado presentan una arquitectura de dominios y secuencia primaria similar [68].

Las CCPs bacterianas pertenecen al clado M14D1b y son proteínas más sencillas y uniformes desde el punto de vista estructural que la mayoría de CCPs eucariotas. Constan básicamente del dominio catalítico CP, el pro-dominio N-t adyacente de ~150 residuos y unas pequeñas extensiones N-t y C-t. No obstante, aunque la PaCCP es una proteína monomérica, las CCPs bacterianas de *Shewanella denitrificans* (SdCCP), *Burkholderia mallei* (BmCCP) y *Burkholderia cenocepacia* (BcCCP) constituyen proteínas oligoméricas.

Además, algunas CCPs bacterianas muestran un PS de secreción en su extremo N-t que sugiere que podrían ser secretadas al exterior celular, mientras que las CCPs de eucariotas no contienen ningún PS, confirmando su localización intracelular.

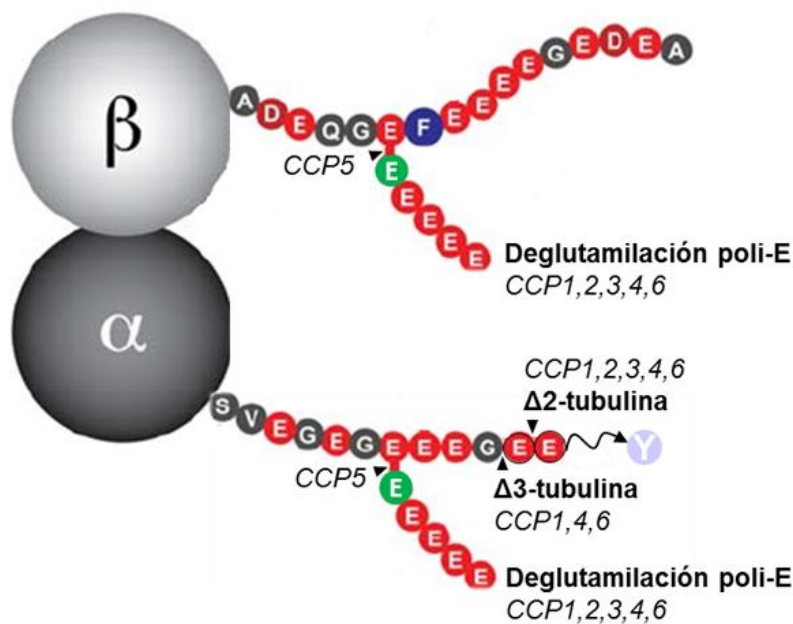


**Figura 6. Representación esquemática de la arquitectura de dominios de los miembros de la subfamilia M14D de las MCPs humanas.** Todas las CCPs contienen un dominio catalítico CP (Peptidasa\_M14, en gris) y un pro-dominio N-t (Nt-Pro, en verde), además de otros dominios y extensiones N-t y C-t. Se indica el dominio similar a armadillo (ARM-like, en granate) perteneciente a la familia PfamB = 52974 y el segundo dominio (en azul) de la familia pFamB 63034. Los demás dominios representados están pobremente definidos y no presentan homología con otros dominios conocidos. Círculo rosa = familia PfamB 18501; recuadro cian = familia PfamB 12725; círculo naranja = familia PfamB 9161; círculo lila = familia PfamB 28944. Los extremos N-t y C-t de la cadena polipeptídica son indicados.

## Introducción

En contraste con su heterogeneidad estructural, los miembros de la subfamilia M14D de mamíferos presentan una especificidad de sustrato común tipo-O, con una preferencia por la hidrólisis de enlaces peptídicos de residuos ácidos C-t. Desde el punto de vista molecular, las CCPs han sido caracterizadas como deglutamilasas de la tubulina que forma parte de los MTs, y de otros sustratos. Sin embargo, para sus homólogos bacterianos PaCCP y BcCCP no se ha identificado hasta la fecha ningún sustrato *in vivo* ni *in vitro* a pesar de los múltiples esfuerzos realizados, y se desconoce su posible rol en la célula bacteriana.

Se ha demostrado que las CCPs catalizan la escisión de los Glu codificados genéticamente en el extremo C-t de la  $\alpha$ -tubulina previamente detirosinada generando  $\Delta 2$ - y  $\Delta 3$ - $\alpha$ -tubulina, y la deglutamilación de la cadena lateral de Glu generada post-traduccionamente en la región C-t de la  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina (**figura 7**). Sin embargo, las CCPs difieren en sus preferencias por la longitud de la cadena lateral de Glu y en sus propiedades cinéticas [122].



**Figura 7. Representación esquemática de las MPTs catalizadas por las MCPs de la subfamilia M14D.** Las CCPs son deglutamilasas de la tubulina con distintas especificidades de sustrato que catalizan la eliminación de las cadenas laterales de Glu generados post-traduccionamente en la cola C-t de las subunidades  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, y los Glu codificados genéticamente en el extremo C-t de la  $\alpha$ -tubulina detirosinada, generando  $\Delta 2$ - y  $\Delta 3$ -tubulina. La CCP5 es la única enzima capaz de eliminar el primer Glu (E, círculo verde) del punto de ramificación de la cadena lateral de poli-E. La Tyr escindida por alguna CP aún sin identificar en el extremo C-t de la  $\alpha$ -tubulina se representa como un círculo lila. Los aminoácidos son indicados en el código de una letra y coloreados según sus propiedades bioquímicas. La secuencia C-t de la  $\alpha$ - y la  $\beta$ -tubulina corresponde a los isotipos  $\beta 1a$  y  $\beta 1b$ , respectivamente. Figura adaptada de [123].



## Introducción

Además de la tubulina, algunas CCPs actúan también sobre otros sustratos con extensiones de residuos acídicos C-terminales codificados en su secuencia primaria, como la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK1), la teloquina [124],[125] y las proteínas del grupo de alta movilidad (HMGB) [27], entre otros muchos potenciales sustratos que aún no han podido ser evaluados. Estudios recientes demuestran que la hCCP1 y mCCP3 son capaces de hidrolizar también Asp C-t, revelando una nueva actividad deaspartilasa no descrita hasta la fecha para los miembros de esta subfamilia [125].

Estudios filogenéticos indican que la función ancestral de las CCPs está asociada a los cilios y los cuerpos basales (CBBs). De hecho, la distribución taxonómica de los genes codificantes para CCPs en eucariotas se correlaciona positivamente con la presencia de CBBs. Experimentos de localización subcelular de las CCPs humanas en las líneas celulares NIH-3T3 y HeLa ubican las CCPs asociadas a los MTs del huso mitótico, axones neuronales, centriolos, cuerpos basales y axonemas de cilios y flagelos, confirmando la correlación ancestral de las CCPs con los cilios y CBBs deducidas bioinformáticamente. Asimismo, estos resultados indican que de forma temprana en la evolución, los mecanismos de señalización y tráfico de las CCPs fueron transferidos desde los CBBs a los MTs del huso mitótico, centriolos y axones neuronales para adquirir nuevas funciones en el ciclo celular, la axogénesis y la regeneración neuronal [68].

La poliglutamilación es una MPT presente en los MTs del huso mitótico, axones neuronales, centriolos, cuerpos basales y axonemas de cilios y flagelos. La presencia de enzimas de glutamilasas en estas localizaciones intracelulares modulan los niveles de glutamilación de los MTs y la generación de  $\Delta 2$ - y  $\Delta 3$ -tubulina, regulando la interacción entre los MTs y sus proteínas interactoras, la axogénesis, la estabilidad del centrosoma y otros procesos relacionados con la división celular, y la funcionalidad sensorial y motora de cilios y flagelos [124].

En humanos varias patologías de causa desconocida han sido genéticamente mapeadas a regiones asociadas a CCPs, como por ejemplo la paraplejia espástica-19 (CCP1), la paraplejia espástica-41 (CCP2), la ataxia espinocerebelar-32 (CCP3), la disquinesia ciliar primaria (CCP4), retinitis pigmentosa (CCP5) y distonia-9 (CCP6). Además, mutaciones en el gen *AGBL1* codificante para la CCP4 se relaciona con la distrofia de *Fuchs*, un desorden genético degenerativo que afecta al endotelio de la córnea [126],[127]. La expresión recombinante de la forma patogénica truncada de CCP4 en células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293 T) muestra una localización nuclear impropia de la proteína salvaje [126].

### 1.4.4.1 Carboxipeptidasa citosólica 1

La CCP1 (también denominada proteína nuclear del sistema nervioso inducida por axotomía (NNA1) o proteína de unión a ATP/GTP-1 (AGTPBP1)) fue el primer miembro descubierto y el más estudiado de la subfamilia M14D de las MCPs, en gran parte debido al descubrimiento temprano del ratón *pcd* y su bien caracterizado fenotipo [128]. Se identificó en el 2000 por Harris y col. en la búsqueda de mARNs sobreexpresados en las neuronas motoras de la médula espinal de ratones con el nervio ciático pinzado o transectado quirúrgicamente. Se constató que los niveles del mARN de la CCP1 estaban incrementados durante la axogénesis y la reinervación del nervio ciático axotomizado [129].

Los ortólogos de CCP1 son las MCPs de la subfamilia M14D de mayor tamaño, alcanzando los 1200 residuos de longitud. Contienen largas extensiones N-t con motivos muy conservados pertenecientes a las familias PfamB (motivos proteicos conservados con función desconocida) 52974, 63034, y 18501, presumiblemente relacionados con la interacción proteína-proteína y proteína-ADN (**figura 6**). Además, contiene una secuencia de exportación nuclear (NES) que permite su unión al receptor de exportación nuclear CRM1 y su consecuente translocación al citoplasma, y una secuencia de importación nuclear (NLS) [130].

La CCP1 cataliza la formación de  $\Delta 2$ - y  $\Delta 3$ - $\alpha$ -tubulina y la deglutamilación de las cadenas largas de poli-E generados post-traduccionalmente en la región C-t de la  $\alpha$ - y la  $\beta$ -tubulina (**figura 7**). En concreto, la CCP1 presenta preferencia por las cadenas largas de poli-E ( $\geq 3$  Glu consecutivos), aunque también puede hidrolizar extensiones de  $\geq 2$  Glu C-t de sus sustratos.

Además, CCP1 también es capaz de hidrolizar los Glu codificados genéticamente en la secuencia primaria C-t de las proteínas MLCK1 y teloquina [124]. Recientemente, Tanco y col. han identificado 5 nuevos potenciales sustratos para CCP1, incluyendo proteínas ribosomales, HMGB y factores de transcripción y de traducción, que apuntan a una posible función de CCP1 en el proceso de transcripción y remodelación de la cromatina acorde a su localización nuclear. Todas estas proteínas contienen extensiones de longitud variable de residuos ácidos consecutivos en su región C-t, demostrando la capacidad de CCP1 de hidrolizar residuos Asp C-t, aunque de forma menos eficiente que Glu [27]

La CCP1 se expresa en la mayoría de tejidos, siendo especialmente abundante en el sistema nervioso central y en testículos [121],[125]. A nivel subcelular se localiza en el citoplasma y el núcleo, mostrando una distribución granular en el núcleo de las células interfásicas y en división. Su función nuclear se desconoce, aunque podría estar relacionada con procesos de reparación del ADN.

## Introducción

La función de CCP1 en su localización citoplasmática se asocia con el ensamblaje y la elongación de MTs a nivel del CBB para la formación del axonema de los cilios y flagelos, a la reinervación y axogénesis, y a la división celular.

En *C. elegans* la pérdida de función de Ccpp-1 provoca la deterioración progresiva del axonema ciliar que forma parte de los órganos sensoriales anfidio y fasmidio, sugiriendo que es necesaria para el mantenimiento de la integridad estructural de los cilios y no para la ciliogénesis [131]. Además, la reducción de la expresión de CCP1 mediada por RNA de interferencia en líneas celulares humanas provoca una reducción de la longitud de los cilios celulares [68],[132]. Ccpp-1 regula también la localización ciliar de las proteínas motoras quinesina-3 y policistina PKD-2 en las neuronas sensoriales de *C. elegans* [133].

Numerosos estudios en el ratón atáxico *pcd* debido a la pérdida de función de la CCP1 indican que esta MCP es esencial para la supervivencia y función neuronal de las células de Purkinje del cerebelo, las neuronas mitrales del bulbo olfatorio y determinadas neuronas talámicas, para la prevención de la degeneración de los fotorreceptores de la retina, la espermatogénesis y la motilidad de los espermatozoides [124],[128],[134]. En humanos no se ha correlacionado ninguna mutación en el gen de la CCP1 con la enfermedad atáxica de los ratones *pcd* [126],[127]. Sin embargo, en oveja se ha descrito un fenotipo similar por una mutación en el dominio catalítico (R970P) del ortólogo de la CCP1 ovina, en el que las ovejas afectadas presentan una profunda tetraplejia a la semana de edad [135].

### 1.4.4.2 Carboxipeptidasa citosólica 2

Los ortólogos de CCP2 presentan un tamaño que varía entre los 400-1000 residuos dependiendo de la presencia o no de extensiones N-t y C-t en las diferentes isoformas de la enzima. Contienen 2 motivos bien conservados que pertenecen a las familias pFamB 12725 y 9161 en la región N-t y C-t, respectivamente (**figura 6**).

La CCP2 cataliza la formación de  $\Delta 2$ - $\alpha$ -tubulina y la deglutamilación de las cadenas largas de poli-E generados post-traduccionalmente en la región C-t de la  $\alpha$ - y la  $\beta$ -tubulina (**figura 7**). Tort y col. demostraron su capacidad de catalizar la deglutamilación de la región C-t de la MLCK1 y teloquina, y advirtieron de una leve actividad deaspartilasa en CCP2 [125].

La CCP2 se expresa, principalmente, en los testículos, la tráquea y el pulmón, aunque también se detecta en cerebelo, bulbo olfatorio y riñón [121],[125]. A nivel subcelular, CCP2 co-localiza con la  $\gamma$ -tubulina de los centriolos en todas las fases del ciclo celular y con la tubulina poliglutamilada de los cuerpos basales en células HeLa ciliadas.

## Introducción

La expresión mayoritaria de CCP2 en tejidos que contienen células ciliadas móviles sugiere un rol especializado de esta MCP en el ensamblaje o la funcionalidad de los cilios. Recientemente, Tort y col. demostraron su importancia durante el proceso de ciliogénesis [125].

El ratón deficiente en el gen *Agbl2* codificante para CCP2 y el doble deficiente para los genes *Agbl2* y *Agbl3* codificantes para CCP2 y CCP3, respectivamente, son ratones viables que no muestran alteraciones fenotípicas obvias. No obstante, el ratón doble deficiente muestra niveles incrementados de poliglutamilación en la tubulina de los testículos y los espermatozoides [125].

### 1.4.4.3 Carboxipeptidasa citosólica 3

Los ortólogos de CCP3 tienen un tamaño que varía entre los 400-1000 residuos dependiendo de la presencia o no de extensiones N-t y C-t en las diferentes isoformas de la enzima. Contienen los 2 motivos bien conservados presentes en CCP2 de las familias pFamB 12725 y 9161 en la región N-t y C-t, respectivamente (**figura 6**).

La CCP3 cataliza la formación de  $\Delta 2$ - $\alpha$ -tubulina y la deglutamilación de las cadenas largas de poli-E generados post-traduccionalmente en la región C-t de la  $\alpha$ - y la  $\beta$ -tubulina (**figura 7**). Asimismo, también cataliza la deglutamilación de la región C-t de la MLCK1 y teloquina [125]. Sorprendentemente, ensayos de deglutamilación *in vitro* en presencia de teloquinas modificadas en su extremo C-t con distintas extensiones y combinaciones de residuos ácidos C-t, demostraron que CCP3 es capaz de hidrolizar Glu y Asp con la misma eficiencia y preferencia, demostrando así una nueva actividad enzimática para la subfamilia M14D diferente de la deglutamilación [125].

La CCP3 se expresa principalmente en los testículos, tráquea y pulmón, aunque también se expresa a niveles moderados en el ojo, el tejido adiposo y el riñón [121],[125]. La elevada expresión de CCP3 en tejidos que contienen células ciliadas móviles sugiere un rol importante de esta enzima en el ensamblaje o la funcionalidad de los cilios. De la misma forma que la CCP2, Tort y col. demostraron la participación de esta enzima en el proceso de ciliogénesis.

El ratón deficiente en el gen *Agbl3* codificante para CCP3 y el doble deficiente para los genes *Agbl2* y *Agbl3* codificantes para CCP2 y CCP3, respectivamente, son ratones viables que no muestran alteraciones fenotípicas obvias, aunque en el último caso los niveles de poliglutamilación en la tubulina de los testículos y los espermatozoides están incrementados [125].

### 1.4.4.4 *Carboxipeptidasa citosólica 4*

Los ortólogos de CCP4 tienen un tamaño y arquitectura similar a la CCP1, alcanzando los ~1000 residuos de extensión (**figura 6**). Contienen largas extensiones N-t con motivos muy conservados pertenecientes a las familias PfamB (motivos proteicos conservados con función desconocida) 52974, 63034, y 18501, presumiblemente relacionados con la interacción proteína-proteína y proteína-ADN (**figura 6**).

La CCP4 genera  $\Delta 2$ - y  $\Delta 3$ - $\alpha$ -tubulina y deglutamila las cadenas largas de poli-E generados post-traduccionalmente en la región C-t de la  $\alpha$ - y la  $\beta$ -tubulina (**figura 7**). Además, también es capaz de hidrolizar los Glu codificados genéticamente en la secuencia primaria C-t de las proteínas MLCK1 y telocquina [124]. Concretamente, la CCP4 es capaz de hidrolizar  $\geq 2$  Glu C-t de sus sustratos, sin demostrar preferencia alguna por la longitud de la cadena [122].

La CCP4 se expresa principalmente en la tráquea, el músculo y el ojo, y su mRNA es indetectable en la mayoría de órganos. Su localización tan restringida sugiere una función muy especializada en estos tejidos [121],[125]. La función de los ortólogos de CCP4 se ha predicho bioinformáticamente y se asocia al ensamblaje y la elongación de MTs a nivel del CBB para la formación del axonema de los cilios y flagelos.

En el pez cebra hay descrito un ortólogo del gen de CCP4, pero el mRNA correspondiente a la expresión del gen no se ha detectado. La ausencia del mRNA codificante para CCP4 podría ser debido a que se expresa a niveles muy bajos, en un determinado tipo celular o que realmente corresponda a un pseudogen.

En *C. elegans* no existe el ortólogo de CCP4, y en ratón no se han realizado todavía estudios de caracterización funcional *in vivo* basados en la reducción de la expresión y/o deficiencia del gen codificante para la CCP4. Por consiguiente, no disponemos de estudios experimentales que confirmen el rol funcional de CCP4 en las células.

### 1.4.4.5 *Carboxipeptidasa citosólica 5*

Los ortólogos de CCP5 tienen una extensión entre 700-800 residuos, con un extenso dominio catalítico adyacente a un dominio rico en Pro característico que pertenece a la familia pFamB 28944. Es el único miembro de la familia M14 de las MCPs que presenta 2 inserciones en el dominio catalítico, cuya relevancia funcional se desconoce. La más pequeña presenta 20 residuos de longitud y se localiza en el bucle  $\beta 2$ - $\beta 3$ , mientras que la mayor tiene 80 residuos y afecta al bucle  $\alpha 5$ - $\beta 5$  (**figura 6**).

## Introducción

Kimura y col. en 2010 fueron los primeros en demostrar que CCP5 hidroliza específicamente el primer Glu ramificado de la cadena de poli-E generada post-traduccionalmente en la región C-t de la  $\alpha$ - y la  $\beta$ -tubulina. La CCP5 es la única CCP capaz de hidrolizar el enlace isopeptídico formado entre el grupo  $\gamma$ -carboxilo del Glu del punto de ramificación y el grupo amino del Glu ramificado [124] (**figura 7**).

La CCP5 se expresa principalmente en testículos y parece tener un papel importante en la fisiología reproductiva de los ratones macho [121],[125]. Se localiza en el núcleo de las células HeLa interfásicas, el huso mitótico y el cuerpo medio formado durante la citocinesis en la división celular. El papel nuclear de CCP5 se desconoce, pero en su localización citoplasmática parece jugar un papel importante en la división celular y en la meiosis durante la espermatogénesis. Además, su función se relaciona también con funciones motoras asociadas a la motilidad de los cilios y a la ciliogénesis.

La Ccp5 es la principal deglutamilasa en los cilios del pez cebra y desempeña un papel muy importante en la ciliogénesis [136]. La reducción de la expresión del gen codificante para Ccp5 provoca la curvatura del cuerpo del pez, la formación de quistes en los conductos del protonefridio e hidrocefalia, debido al agrandamiento de los ventrículos cerebrales por la parálisis de los cilios del epéndimo y la acumulación de fluido cerebroespinal [137],[138],[139]. El ratón deficiente en el gen *Agbl5* codificante para CCP5 es estéril y presenta una afectación restringida a los testículos que consiste en una espermatogénesis defectuosa. Finalmente, otro estudio relacionado con el ratón deficiente para CCP5 reveló una nueva función para esta MCP en la regulación de la respuesta innata al ADN viral mediante el control de los niveles de glutamilación de la enzima sintasa de GMP-AMP cíclico (cGAS) [140].

### 1.4.4.6 Carboxipeptidasa citosólica 6

Los ortólogos de CCP6 constituyen las MCPs de la subfamilia M14D en eucariotas más simples, con un tamaño que varía entre los 400-500 residuos de extensión. Básicamente, están formadas por el pro-dominio N-t y el dominio catalítico CP, y unas pequeñas extensiones al N-t y C-t de la proteína (**figura 6**).

La CCP6 genera  $\Delta 2$ - y  $\Delta 3$ - $\alpha$ -tubulina y deglutamila preferentemente cadenas largas de poli-E generados post-traduccionalmente en la región C-t de la  $\alpha$ - y la  $\beta$ -tubulina [122] (**figura 7**). La CCP6 es capaz de hidrolizar también los Glu codificados genéticamente en la secuencia primaria C-t de las proteínas MLCK1 y teloquina [124].

## **Introducción**

La CCP6 se expresa principalmente en el sistema nervioso central, testículos y riñón, siendo también detectable su presencia en el ojo y la tráquea [121],[125]. Co-localiza con la  $\gamma$ -tubulina de los centriolos en las células interfásicas y mitóticas, y con la proteína golgina GM130 en el aparato de Golgi. Además, se ha detectado CCP6 en los cuerpos basales de las células ciliadas NIH-3T3 [68]. La función ancestral de los ortólogos de CCP6 se relaciona con el ensamblaje de los CBBs y la motilidad flagelar, además de una función sensorial asociada a los cilios primarios. En *C. elegans* se ha demostrado que la Ccp-6 es necesaria para la axogénesis y reinervación de los axones de neuronas axotomizados [141].

El ratón deficiente en el gen *Agbl4* codificante para CCP6 presenta megacariocitos subdesarrollados y plaquetas disfuncionales debido a una megacariopoyesis defectuosa, que provoca trombocitosis y tiempos de sangrado prolongados. Por consiguiente, se ha propuesto que CCP6 es esencial en el proceso de maduración de los megacariocitos en la médula ósea [142]. Otro estudio realizado con el ratón deficiente en el gen *Agbl4* reveló una nueva función para CCP6 relacionada con la regulación de la respuesta innata al ADN viral mediante el control de los niveles de glutamilación de cGAS. La poliglutamilación del sensor de ADN viral cGAS impide la unión del ADN exógeno a la proteína y, por consiguiente, la deficiencia de CCP6 incrementa la susceptibilidad a la infección por virus de ADN [140]. Finalmente, un estudio muy reciente vincula la CCP6 con el cáncer, ya que se ha demostrado que los pacientes con adenocarcinoma renal presentan una disminución en la expresión de CCP6 que conduce a la acumulación de la proteína DNAJC7 poliglutamilada. La co-chaperona DNAJC7 representa un nuevo sustrato para CCP6 y se ha propuesto como biomarcador sanguíneo para la detección temprana del cáncer renal [143].

## **1.5 Estructura de las metalo-carboxipeptidasas de la familia M14**

### **1.5.1 El pro-segmento N-terminal**

Los miembros de la subfamilia M14A son sintetizados como PCPs (excepto la CPO) y contienen un pro-segmento N-t característico adyacente al dominio catalítico CP. La estructura del pro-segmento se determinó inicialmente a partir de las primeras estructuras 3D para las PCPs digestivas PCPA [144], PCPA2 [41] y PCPB [145]. Posteriormente se obtuvieron también las estructuras 3D para la PCPU y la PCPA4. A pesar de la elevada variabilidad secuencial para algunos de sus miembros, la topología estructural del pro-segmento es muy similar y está conservada, con sutiles diferencias, en todas las PCPs de la subfamilia M14A [30].

## Introducción

El pro-segmento se estructura en una unidad globular independiente de ~80 residuos denominada dominio de activación, y una larga hélice- $\alpha$  de ~100 residuos ubicada al C-t de la región globular denominada segmento de conexión (**figura 8**). La función de éste último, como su nombre indica, es conectar el dominio de activación del pro-segmento al dominio catalítico de la enzima [146].

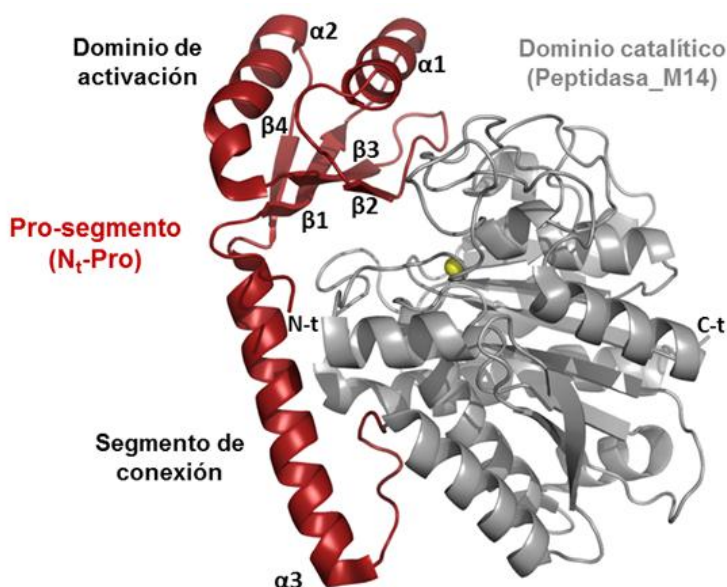
El dominio de activación presenta un plegamiento antiparalelo- $\alpha$ /antiparalelo- $\beta$  ( $\alpha\alpha\beta$ ), que consiste, básicamente, en 2 capas formando un sándwich abierto de una hoja- $\beta$  antiparalela (cadenas  $\beta 1$ -  $\beta 4$ ) y 2 hélices- $\alpha$  ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ) con la topología: (N-t)  $\beta 1 \rightarrow \alpha 1 \rightarrow \beta 2 \rightarrow \beta 3 \rightarrow \alpha 2 \rightarrow \beta 4$  (C-t), conectadas entre sí mediante bucles cortos [144] (**figura 8**). Además, la CPB y CPU presentan una hélice $_{3-10}$  adicional formada por 4 residuos, que se localiza en el bucle entre las cadenas  $\beta 2 \rightarrow \beta 3$  [145]. La estructura se mantiene por un núcleo hidrofóbico formado por las cadenas laterales de unos 20 residuos apolares, mientras que los demás residuos de la región globular forman parte de las estructuras secundarias definidas [43]. Estas características estructurales confieren al dominio de activación una estructura terciaria muy estable en su forma aislada a pesar de la ausencia de puentes disulfuro, acorde con su resistencia proteolítica [147].

El acceso al centro activo en las PCPs se bloquea mediante interacciones específicas entre residuos del bucle  $\beta 2 \rightarrow \beta 3$  del segmento de activación con residuos importantes para el reconocimiento del sustrato en los subsitios de especificidad S2, S3 y S4 del centro activo de la enzima, dificultando así la unión de sustratos. Las interacciones entre el AspA36 y la Arg71 del subsitio S2 del centro activo, y el TrpA38 con la Tyr198 y la Phe279 de los subsitios S2 y S3, respectivamente, están conservadas en todas las PCPs y son de gran relevancia para la oclusión del centro activo [145]. Sin embargo, los subsitios S1 y S1" solo están parcialmente ocluidos en la PCPA1, PCPA2, PCPA4 y PCPU, lo que explica la actividad hidrolítica remanente detectada para todas ellas frente a pequeños sustratos capaces de difundir y unirse a estos subsitios libres del centro activo.

En la PCPB la inactivación de la enzima es completa gracias a la presencia de la hélice $_{3-10}$  que cubre parcialmente los subsitios S1" y S1 del zimógeno y bloquea de forma más eficiente el centro activo [41],[145]. Además, el Asp41A del pro-segmento de la PCPB establece un puente salino con la Arg145 del subsitio S1 del centro activo que refuerza la hermeticidad bolsillo catalítico. Esta interacción no se encuentra en la PCPA1, PCPA2, PCPA4, ya que el residuo equivalente a la posición Asp41A de la PCPB corresponde en todas ellas a una Pro [60].



## Introducción



**Figura 8. Estructura tridimensional de la PCPA4 humana.** Representación en cintas de la hPCPA4 (PDB: 2BOA) mostrando el pro-segmento N-t (N<sub>t</sub>-Pro, en rojo) estructurado en el dominio de activación y el segmento de conexión. El dominio de activación bloquea el acceso al centro activo contenido en el dominio catalítico CP (Peptidasa\_M14, en gris) de la enzima y la mantiene inactiva. El segmento de conexión une el dominio de activación al dominio catalítico. Los extremos N-t y C-t de la cadena polipeptídica son indicados. Los elementos de estructura secundaria en el pro-segmento están numerados. El ion de zinc catalítico se muestra como una esfera amarilla. Imagen generada con PyMOL [148].

La PCPU presenta, curiosamente, una actividad hidrolítica intrínseca significativa frente a péptidos largos a pesar de contener la hélice<sub>3-10</sub> en el pro-segmento. Esto es posible debido a 2 motivos principales: 1) el Asp41A de la PCPB está sustituido por una Val en la PCPU, incapaz de establecer un puente salino y 2) el pro-dominio está rotado 12° respecto a la posición en la misma orientación en la PCPB que lo aleja 1,2 Å del dominio catalítico y, por tanto, se forma un canal abierto que permite el acceso parcial al solvente [149],[150].

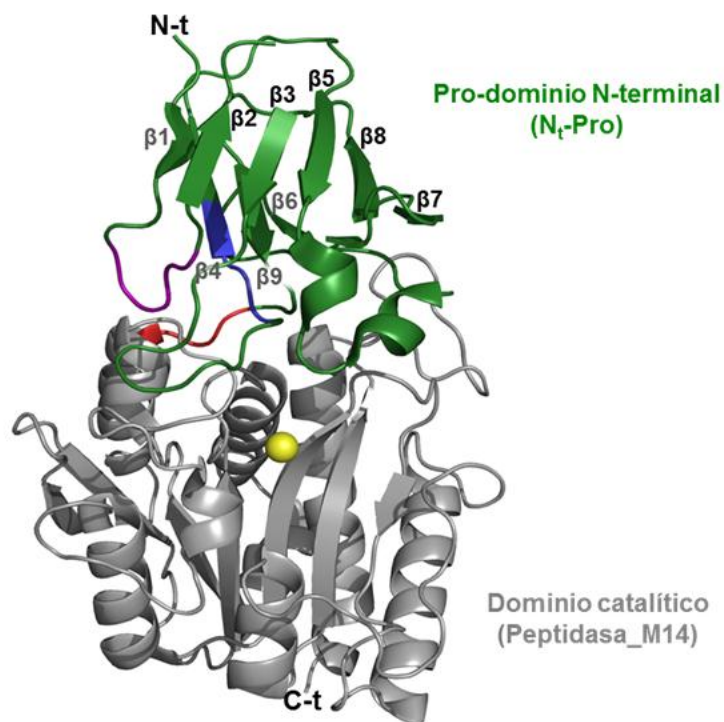
### 1.5.2 El pro-dominio N-terminal

Los miembros de la subfamilia M14D contienen un pro-dominio N-t conservado adyacente al dominio catalítico CP, que no presenta homología secuencial ni estructural con el pro-segmento N-t de las funelinas de la subfamilia M14A [32].

Hasta la fecha no se ha obtenido la estructura 3D para ninguna CCP de mamífero, de manera que el plegamiento del pro-dominio N-t se ha deducido a partir de las estructuras para las CCPs bacterianas de los microorganismos *Pseudomonas Aeruginosa* (PDB: 4A37; PaCCP), *Burkholderia cenocepacia* (PDB: 4B6Z; BcCCP), *Burkholderia mallei* (PDB: 3K2K; BmCCP) y *Shewanella denitrificans* (PDB: 3L2N; SdCCP). Las CCPs bacterianas constituyen un buen modelo para el estudio de las CCPs humanas (hCCPs) debido a que conservan una gran homología estructural para el pro-dominio N-t y el dominio catalítico CP, según los modelos obtenidos para las 6 hCCPs [151].

El pro-dominio N-t tiene una extensión de ~100 residuos y presenta un plegamiento  $\beta$ -sándwich formado por un total de 9 cadenas- $\beta$ , que no había sido descrito anteriormente en ninguna otra proteína. Consiste en 2 hojas- $\beta$  opuestas mantenidas por un núcleo hidrofóbico, constituidas por 4 cadenas- $\beta$  anti-paralelas ( $\beta$ 1- $\beta$ 4- $\beta$ 9- $\beta$ 6) y 5 cadenas- $\beta$  mixtas ( $\beta$ 2- $\beta$ 3- $\beta$ 5- $\beta$ 8- $\beta$ 7) conectadas entre sí mediante bucles (**figura 9**). Además, contiene 3 motivos muy conservados que parecen ser importantes para su correcto plegamiento y posicionamiento respecto al dominio catalítico. El motivo I (F[E,D]SGNL) es el que se ubica más próximo al extremo N-t, en el bucle entre las cadenas- $\beta$ 1 y  $\beta$ 2. La sustitución de G596R en el motivo I provoca la acumulación de la proteína motora quinesina KLP-6 en los cilios sensoriales *C. elegans*, demostrando su importancia para la correcta funcionalidad de las CCPs [133]. El motivo II (W[F,Y][Y,H,N][F,Y]) se localiza a 60 residuos del motivo I formando parte de la cadena- $\beta$ 4 y contribuye de forma significativa a la formación del núcleo hidrofóbico junto a otros residuos aromáticos. El motivo III ([F,Y]P[F,Y][S,T]Y) se localiza en el extremo C-t del pro-dominio, próximo al N-t de la cadena- $\alpha$ 1 del dominio catalítico, y representa la frontera entre el pro-dominio N-t y el dominio catalítico CP [152] (**figura 9**).

La CCP1 de mamíferos, anfibios y peces contienen, además, un motivo de unión a ATP/GTP conservado (a 20 residuos hacia el N-t del motivo III) que no presentan los demás miembros de la subfamilia M14D. Se ha descrito que este motivo de unión a nucleótidos trifosfato no es esencial para la actividad de la enzima. Sin embargo, ensayos de actividad enzimática *in vitro* de la hCCP1, hCCP3 y la CCP6 de *C. elegans* en presencia de ADP y ATP demuestran que estos últimos tienen un efecto activador, a pesar de que ni CCP3 ni CCP6 contienen el motivo de unión a ATP/GTP [32]. Por otro lado, Bereznik y col. concluyeron que el GTP no incrementa la actividad de la hCCP1 [134].

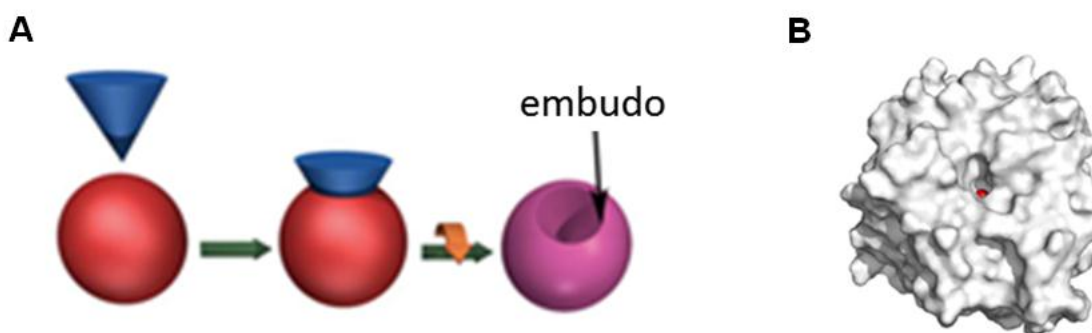


**Figura 9. Estructura tridimensional de la CCP de *Pseudomonas aeruginosa*.** Representación en cintas de la estructura de la PaCCP (PDB: 4A37) en la que se muestra el dominio catalítico CP (Peptidasa\_M14, en gris) y el pro-dominio N-t (N<sub>t</sub>-Pro, en verde). Los motivos conservados en el N<sub>t</sub>-Pro se muestran en color lila (motivo I), en azul (motivo II) y en rojo (motivo III). Los extremos N-t y C-t de la cadena polipeptídica son indicados. Los elementos de estructura secundaria en el N<sub>t</sub>-Pro están numerados. El ion de zinc catalítico del centro activo de muestra como una esfera amarilla. Imagen generada con PyMOL [148].

La orientación del pro-dominio N-t respecto al dominio catalítico bloquea parcialmente la entrada al centro activo, dejando un pequeño canal abierto accesible al solvente. Múltiples residuos conservados en el pro-dominio N-t de las CCPs bacterianas y de eucariotas están en contacto directo a través de interacciones polares, hidrofóbicas y de van der Waals con el dominio catalítico CP. De especial interés son la Tyr64 en PaCCP, que ocluye directamente el sub-sito S2 del centro activo y el núcleo hidrofóbico formado por el Trp38, Trp82 y Phe110, y la interficie polar formada por Arg28, Asp30 y Arg84 [151].

### 1.5.3 El dominio catalítico carboxipeptidasa

El análisis del número creciente de estructuras 3D disponibles para las MCPs de la familia M14 en mamíferos muestra que estas enzimas comparten una estructura terciaria similar en el dominio catalítico CP. Sus dimensiones máximas son de ~50 x ~40 x ~40 Å, y presenta una morfología que recuerda al volumen de una esfera a la que se le ha extraído un cono, formando una cavidad en forma de embudo en su superficie. Por este motivo a las MCPs de la familia M14 se las denomina “funelinas” (del inglés, “*funnelins*”) [153] (**figura 10-A**).



**Figura 10. Morfología del dominio catalítico carboxipeptidasa en las MCPs de la familia M14.** (A) Representación esquemática del modelo conceptual propuesto por Gomis-Rüth para la descripción morfológica de las funelinas, en la que se presenta una estructura esférica con una cavidad en forma de embudo en su superficie (en magenta) resultante de la intersección de un cono (en azul) con una esfera (en rojo). (B) Representación en superficie de la hCPA4 mostrando la estructura globular compacta para el dominio catalítico, con la apertura en forma de embudo en su superficie y el ion de zinc catalítico (esfera roja) situado en la base de la cavidad. Figura adaptada de [153].

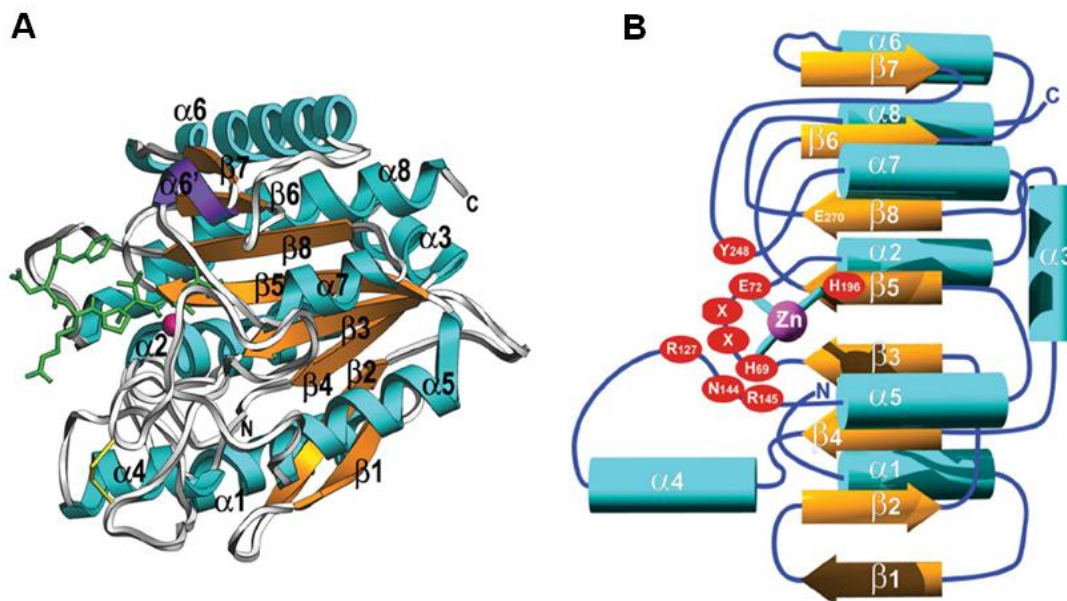
El dominio catalítico presenta una extensión de 300-310 residuos y un plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa con una topología consenso  $\alpha_8/\beta_8$ . Básicamente, consiste en una hoja- $\beta$  central formada por un *mix* de 8 cadenas- $\beta$  ( $\beta_1$ - $\beta_8$ ) paralelas y antiparalelas con una conectividad +1, +2, -1X, -2X, -2, +1X, -2, sobre las que se distribuyen 8 hélices- $\alpha$  formando una estructura globular compacta (**figura 10-B y 11-A**). El núcleo de la hoja- $\beta$  está formado por 4 cadenas- $\beta$  co-planares paralelas ( $\beta_3$ - $\beta_5$  y  $\beta_8$ ), flanqueadas por 2 cadenas- $\beta$  paralelas por la parte superior ( $\beta_6$ - $\beta_7$ ) y una horquilla- $\beta$  ( $\beta_1$ - $\beta_2$ ) por la parte inferior, responsable del giro de  $120^\circ$  entre la primera y la última cadena- $\beta$ . Adicionalmente, todos los miembros de la subfamilia M14A presentan a continuación de la cadena- $\beta_7$  una hélice- $\alpha$  muy corta denominada hélice- $\alpha_6''$  [153] (**figura 11-A**).

El centro activo se ubica en la base de la cavidad en forma de embudo de la enzima y está delimitado por los extremos C-t de las cadenas- $\beta_3$ ,  $\beta_5$  y  $\beta_8$  centrales de la hoja- $\beta$  y la región N-t de las hélices- $\alpha_2$  y  $\alpha_5$  [30]. La entrada al centro activo la componen los bucles L $\beta_8\alpha_8$ , L $\beta_5\beta_6$ , L $\beta_7\alpha_7$ , L $\beta_3\alpha_2$  y L $\alpha_4\alpha_5$ , donde se localizan los residuos que interaccionan con el pro-segmento de las PCPs y la región de interacción secundaria para los inhibidores proteicos de la subfamilia M14A de las MCPs [153] (**figura 11-B**).

Las estructuras 3D disponibles para los miembros de la subfamilia M14A, M14B y M14D muestran una magnífica superposición entre las estructuras secundarias de sus dominios catalíticos, observándose diferencias básicamente en la longitud de los bucles que las conectan. Las MCPs M14B contienen bucles más extensos que los miembros de la subfamilia M14A, restringiendo el acceso al centro activo.

## Introducción

Dicha diferencia explicaría la incapacidad de los inhibidores proteicos para los miembros de la subfamilia M14A de inhibir a los miembros de la subfamilia M14B [154].



**Figura 11. Estructura del dominio catalítico carboxipeptidasa en las MCPs de la familia M14.** (A) Representación en cintas de la estructura 3D de la hCPA4 activa en complejo con un hexapéptido (PDB: 2PCU), mostrando el plegamiento  $\alpha\beta$  hidrolasa típico del dominio catalítico en las funelinas. El hexapéptido se representa en barras de color verde, la hélice- $\alpha 6$  se muestra en color púrpura y el ion de zinc catalítico corresponde a la esfera magenta. (B) Representación esquemática de la topología consenso  $\alpha 8/\beta 8$  definida para el plegamiento  $\alpha\beta$  hidrolasa, con una hoja- $\beta$  central ( $\beta 1$ - $\beta 8$ ) flanqueada por un total de 8 hélices- $\alpha$  ( $\alpha 1$ - $\alpha 8$ ). Los aminoácidos indicados corresponden al conjunto de residuos idénticos en todos los miembros de la familia M14 de las MCPs (HXXE+R+NR+H+Y+E), numerados acorde a su posición en la secuencia aminoacídica de la bCPA activa. El ion de zinc se muestra como una esfera de color lila coordinado con la His196 en la hélice- $\beta 5$  y la His69 y E72 en el bucle  $L\beta 3\alpha 2$ . En ambas figuras, las hélices- $\alpha$  y las cadenas- $\beta$  se muestran numeradas y coloreadas en cian y naranja, respectivamente. Figura adaptada de [153].

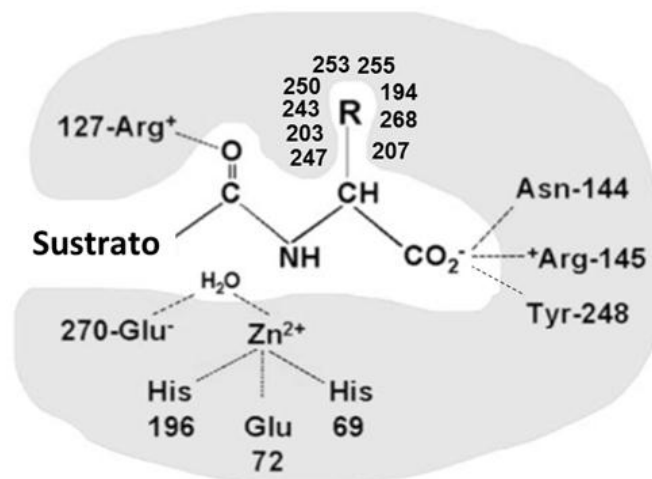
### 1.5.4 El centro activo

El centro activo contiene los residuos de coordinación al zinc, catalíticos y de unión a sustrato idénticos en todas las MCPs de la familia M14 (**figura 12**) localizados, principalmente, en los bucles  $L\beta 8\alpha 8$ ,  $L\beta 5\beta 6$ ,  $L\beta 7\alpha 7$ ,  $L\beta 3\alpha 2$  y  $L\alpha 4\alpha 5$  que delimitan la entrada del centro activo (**figura 11-B**). Dichos residuos se ubican en 5 subsitios de la MCP y se numeran empleando el sistema numérico de la bCPA empleado por convención, asignando la posición 1 al primer residuo de la bCPA tras eliminar el pro-segmento N-t (activa).

Las funelinas contienen un ion de zinc por molécula esencial para la catálisis localizado en la base del centro activo. En el subsitio catalítico S1, el ión metálico se encuentra pentacoordinado con los átomos  $N\delta 1$  de la His69 y His196,  $O\epsilon 1$  y  $O\epsilon 2$  del Glu72 y una molécula de agua (en la enzima sin sustrato unido), formando un tetraedro ligeramente distorsionado.

## Introducción

La His69 y el Glu72 forman parte del motivo HXXE característico de las MCPs de la familia M14 (**tabla 6**) y se localizan en el L $\beta$ 3 $\alpha$ 2 del dominio catalítico, mientras que la His196 se encuentra ubicada en el extremo de la hélice  $\beta$ 5, a más de 100 residuos de distancia [153].



**Figura 12. Representación esquemática del centro activo de las funelinas.** Se muestran los residuos de coordinación con el zinc, catalíticos y de unión a sustrato idénticos para todas las MCPs de la familia M14 necesarios para la actividad catalítica. Los aminoácidos cuyas cadenas laterales delimitan el bolsillo de especificidad S1<sup>o</sup> también se indican. La cadena lateral del residuo P1<sup>o</sup> C-t se representa como "R". Los aminoácidos están numerados acorde a la numeración estándar de la bCPA. Figura adaptada de [59].

El residuo C-t en posición P1<sup>o</sup> que se escinde de la cadena polipeptídica del sustrato se acomoda en el subsitio S1<sup>o</sup> del centro activo de las funelinas. Los residuos Arg145, Tyr248 y Asn144, idénticos en todas las MCPs de la familia M14, fijan y neutralizan el carboxilo unido al carbono- $\alpha$  del residuo C-t del sustrato, mientras que los residuos que integran el bolsillo de especificidad acomodan su cadena lateral (**figura 12**).

El bolsillo de especificidad está delimitado por las cadenas laterales de los residuos equivalentes a las posiciones 194, 203, 207, 243, 247, 250, 253, 255 y 268 en la bCPA activa, generalmente conservados entre los miembros de la familia M14, con pequeñas variaciones acorde a su especificidad de sustrato (**figura 12**).

El subsitio S1 incluye también los residuos catalíticos Arg127 y Glu270, idénticos para todos los miembros de la familia M14 de las MCPs (**figura 12**). La Arg127 contribuye a la polarización del grupo carbonilo del enlace peptídico a escindir y a la estabilización del intermediario tetraédrico cargado negativamente de la reacción, mientras que el Glu270 interviene en el intercambio de protones necesario para la catálisis ácido/base. Otros residuos importantes en el subsitio S1 son: Tyr198, Ser199, Ile247, Tyr248 y Phe279.

## Introducción

El subsitio S2 está formado por los residuos Arg71, Arg127, Asp142, Ser197, Tyr198 y Ser199, involucrados en la unión y la torsión de los sustratos peptídicos. Finalmente, los subsitios S3, formado por la Phe279, y el S4, formado por Gln122, Arg124, Lys128, han sido definidos para la unión de sustratos más largos, aunque las posiciones de los residuos asignadas son hipotéticas [155] (**tabla 7**).

**Tabla 7. Resumen de los aminoácidos en los subsitios del centro activo determinantes de la especificidad de sustrato en las MCPs.**

Sub-sitio	Residuos
S1'	Ser194, Leu 203, Gly207, Ile243, Ile247, Ala250, Gly253, Ser254, Ile255 y Thr268
S1	Arg127, Tyr198, Ser199, Ile247, Tyr248, Glu270 y Phe279
S2	Arg71, Arg127, Asp142, Ser197, Tyr198 y Ser199
S3	Phe279
S4	Gln122, Arg124, Lys128

### 1.5.5 Mecanismo catalítico de las metalo-carboxipeptidasas

La bCPA representa la enzima prototipo para el estudio de las MCPs dependiente de zinc, siendo una de las enzimas mejor caracterizadas a nivel bioquímico y funcional. En 1967 Lipscomb y col. determinaron la estructura 3D de la bCPA mediante cristalografía de rayos-X a una resolución de 2 Å [156]. Desde entonces, numerosas estructuras 3D de la bCPA en complejo con inhibidores, análogos de sustratos y del estado de transición han sido resueltas, contribuyendo junto a otras aproximaciones bioquímicas, biofísicas y bioinformáticas, a la elucidación del mecanismo catalítico de las MCPs de la familia M14 [157],[158].

En la bCPA el ion de zinc catalítico está tetra-coordinado con la His69, el Glu72, la His196 y una molécula de agua que, a su vez, esta última está formando un puente de hidrógeno con la cadena lateral del Glu270 prevenir su desplazamiento por pequeños aniones.

La unión del sustrato en los subsitios de reconocimiento del centro activo promueve, principalmente, un reordenamiento en la cadena lateral de la Tyr248 y el desplazamiento de 12Å de su anillo aromático. El giro de la Tyr248 de 120° desde su posición “arriba” (“*up*”) en contacto con el solvente a su posición “abajo” (“*down*”), permite la fijación del grupo carboxilo libre del residuo P1” y del nitrógeno del grupo amida del residuo P1 del sustrato

## Introducción

[156],[159]. La conformación “abajo” de la Tyr248 es, por tanto, característica en las estructuras de funelinas con el centro activo ocupado por sustratos e inhibidores [159].

La relevancia de la Tyr248 durante la catálisis, sin embargo, sigue siendo un asunto debatido, ya que mutaciones dirigidas de la Tyr248 por Phe o Ala en varios miembros de la subfamilia M14A no afecta a la actividad catalítica [160],[161], mientras que en otros la Tyr es esencial. Asimismo, algunos MCPs de la subfamilia M14D contienen una Phe en la posición equivalente a la posición Tyr248 de la bCPA y son catalíticamente activos [32],[162].

Una vez el sustrato está unido al centro activo, es posible iniciar el proceso catalítico que conduce a la escisión del enlace peptídico C-t del residuo P1". A pesar de que los residuos involucrados en la unión al sustrato y la catálisis del centro activo están claramente definidos, el mecanismo catalítico de la CPA sigue siendo objeto de debate tras 50 años de estudio. Numerosos estudios cinéticos y cristalográficos respaldan 2 principales mecanismos denominados mecanismo anhidro y mecanismo promovido por agua, aunque actualmente el segundo es el mecanismo catalítico más probable, generalmente aceptado por la comunidad científica, para la CPA [157].

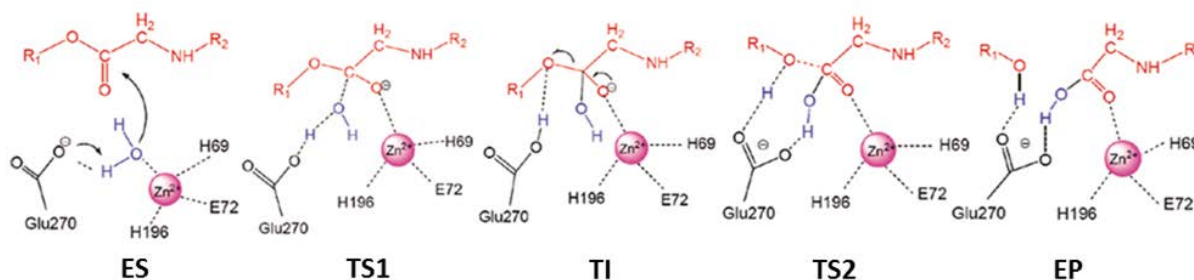
El mecanismo anhidro se trata de un mecanismo de catálisis covalente en el que el Glu270 a través del grupo carboxilo de su cadena lateral realiza el ataque nucleofílico al carbono del grupo carbonilo que forma el enlace peptídico, formándose un intermediario covalente acil-enzima que es escindido en una segunda etapa por una molécula de agua para generar el producto [153] (**figura 13**).

El mecanismo promovido por agua, en cambio, se trata de un mecanismo de catálisis ácido-base general en el que el ataque nucleofílico lo realiza la molécula de agua coordinada al ion de zinc, tras ser desprotonada (ión  $\text{OH}^-$ ) por el Glu270. Se genera un intermediario tetraédrico cargado negativamente, estabilizado por el ion de zinc y el grupo guanidino de la Arg127, que se colapsa seguidamente en los correspondientes productos mediante la protonación del nitrógeno del grupo amida del enlace peptídico por el Glu270, restaurando así la maquinaria catalítica para el siguiente evento hidrolítico. Por consiguiente, el Glu270 actúa simultáneamente durante este proceso como un ácido/base general, promoviendo el intercambio de protones [153].

Mutagénesis dirigida del Glu270 por residuos no ácidos generan proteasas inactivas o con una actividad catalítica residual, reforzando el papel clave de este residuo en la catálisis (**figura 13**).



### Mecanismo anhídrido



### Mecanismo promovido por agua



**Figura 13. Representación esquemática de los dos mecanismos catalíticos propuestos para la CPA bovina.** ES= complejo enzima-sustrato; TS1= estado de transición 1; AC= intermediario covalente acil-enzima; TI= intermediario tetraédrico; TS2= estado de transición 2; EP= complejo enzima-producto. La cadena polipeptídica del sustrato se muestra en rojo, la molécula de agua en azul y el ion de zinc catalítico corresponde a la esfera rosa ( $Zn^{2+}$ ).

## 1.6 La especificidad de sustrato en las metalo-carboxipeptidasas

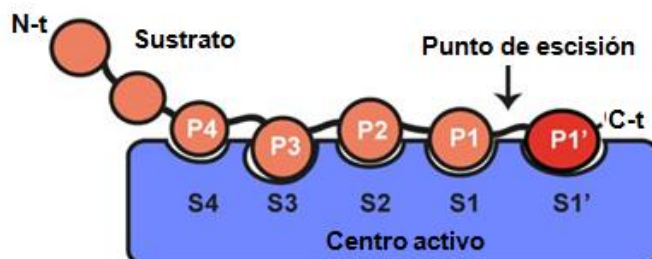
El centro activo en las MCPs de la familia M14 se localiza bastante próximo a la superficie de la molécula, lo que explica la capacidad de las funelinas de hidrolizar una gran variedad de proteínas y péptidos. No obstante, para que esto suceda es imprescindible el reconocimiento específico entre el sustrato y la proteasa.

Los sustratos de CPs presentan una región C-t con una conformación prácticamente extendida para las posiciones P4, P3, P2, P1 y P1" capaz de acceder al centro activo e interactuar con unos pocos residuos de los subsitios S4, S3, S2, S1 y S1" de la CP, según la nomenclatura establecida por Schechter y Berger (ver apartado 1.2) (figura 14).

Las interacciones entre el sustrato y la enzima en las posiciones situadas al N-t del punto de corte del sustrato son bastante débiles, contribuyendo a una amplia especificidad de sustrato. Sin embargo, los subsitios S1" y S1 son los más importantes para definir la especificidad de sustrato de la mayoría de funelinas.

## Introducción

El bolsillo de especificidad S1'' corresponde al subsitio de reconocimiento primario que determina la especificidad de sustrato en las MCPs de la familia M14. En concreto, el aminoácido en la posición equivalente a la I255 de la bCPA, situado en el fondo del bolsillo de especificidad S1'', constituye el residuo determinante de la preferencia de sustrato en las MCPs de la subfamilia M14A.



**Figura 14. Esquema de los subsitios de unión al sustrato en el centro activo de las carboxipeptidasas**, basado en el modelo que describe la especificidad de sustrato de las proteasas propuesto por Schechter y Berger en 1967 [23]. En las CPs se hidroliza el enlace peptídico C-t entre los residuos en posición P1 y P1'', liberándose el residuo P1''. El subsitio S1'' corresponde a la posición de reconocimiento primario que determina la especificidad de sustrato en las MCPs de la familia M14. Figura extraída de [125].

Las funelinas de la subfamilia M14A presentan, en la posición equivalente al residuo I255 de la bCPA, un residuo hidrofóbico en las tipo-A (Ile en CPA1, CPA2 y CPA4; Leu en CPA3, Val en CPA5 y Met en CPA6) y un Asp en las tipo-B (CPB y CPU), acorde a las distintas preferencias de sustrato en esta subfamilia. Curiosamente, en la CPT el residuo responsable de la amplia especificidad de sustrato tipo-A+B es una Thr [153].

Las MCPs de la subfamilia M14B presentan una Gln (CPE, CPD-I, CPD-II, CPN, CPM) o una Ser (CPZ) en esta misma posición I255 de la bCPA, en vez de un Asp como en las MCPs tipo-B de la subfamilia M14A. No obstante, todas ellas tienen un Glu conservado en la posición equivalente al residuo 207 de la bCPA activa, que corresponde al residuo determinante de la especificidad de sustrato tipo-B para los miembros de esta subfamilia.

La especificidad de sustrato de la CPO y los 6 miembros de la subfamilia M14D en humanos y ratón, serán estudiadas en detalle en el capítulo I y II de la presente tesis.

### 1.7 Inhibidores de metalo-carboxipeptidasas

Las MCPs de la familia M14 son enzimas fundamentales en el control de una gran variedad de procesos fisiológicos y la desregulación de su actividad o localización se ha asociado con varias enfermedades en los seres humanos [163]. El uso de inhibidores de proteasas constituye una herramienta prometedora en el desarrollo de estrategias terapéuticas para un gran número de enfermedades. La acción de muchas proteasas está regulada por inhibidores endógenos cuya principal función es la prevención de la proteólisis no deseada. Sin embargo, un único inhibidor endógeno de MCPs de la familia M14 ha sido descrito en mamíferos, de manera que la mayoría de inhibidores disponibles para los miembros de esta familia corresponden a inhibidores sintéticos de bajo peso molecular, metabolitos secundarios producidos por microorganismos, algas y plantas, e inhibidores proteicos exógenos [159].

Los inhibidores sintéticos más populares corresponden al ácido bencilsuccinico (BZS) y el ácido guanidino-etilmercaptosuccinico (GEMSA). Ambos constituyen potentes inhibidores que inhiben selectivamente a las MCPs tipo-A y tipo-B, respectivamente. En su estructura contienen un ácido carboxílico que permite el anclaje de la molécula en el subsitio S1" del centro activo de la enzima, y un anillo aromático (BZS) o grupo guanidino (GEMSA) que se acomoda en el bolsillo de especificidad S1" [159]. Por otro lado, los agentes quelantes 1,10-fenantrolina (OP) y el EDTA son empleados de forma habitual para la inhibición de cualquier MCP de la familia M14, cuyo mecanismo de acción consiste en extraer el ion de zinc catalítico del centro activa de la enzima, inactivándola. Otros inhibidores sintéticos han sido desarrollados e incluyen moléculas químicamente heterogéneas como tioles, imidazoles, péptidos miméticos fosforados, ureas, sulfamidas y compuestos orgánicos aromáticos, algunos de ellos comercializados como inhibidores de proteasas con interés biomédico [159].

Un gran número de metabolitos secundarios biológicamente activos aislados de diferentes fuentes naturales han sido caracterizados como inhibidores de MCPs. Por ejemplo, la ocratoxina A, el ácido (S)-2-hidroxisuccinico (inhibidores de la CPA) y la histargina (inhibidor de la CPB) son inhibidores aislados de bacterias. Por otro lado, el hinoquitol, la 2-piridina (inhibidores de CPA) y el ácido lisianadioico (inhibidor de CPB) corresponden a ejemplos de inhibidores aislados de plantas [159].

En contraste con la gran variedad estructural y funcional de inhibidores descritos para endoproteasas, solo unos pocos inhibidores proteicos han sido descritos para las MCPs de la familia M14 y, todos ellos, inhiben específicamente a los miembros de la subfamilia M14A, independientemente de su especificidad de sustrato.

## Introducción

La mayoría actúan sobre MCPs accesibles en el espacio extracelular y han sido identificadas de diferentes fuentes exógenas. Los inhibidores proteicos de la subfamilia M14A corresponden a inhibidores reversibles competitivos de unión fuerte con una constante de inhibición ( $K_i$ ) del orden de nanomolar (nM) o inferior, a excepción de la latexina que presenta un mecanismo de inhibición no competitivo.

La aplicación biotecnológica de los inhibidores proteicos de MCPs es menos evidente que en el caso de los inhibidores sintéticos de bajo peso molecular. Sin embargo, como la mayoría de ellos se comportan como pseudosustrato, son de gran utilidad en el estudio de los determinantes estructurales para el diseño de moléculas más pequeñas con poder terapéutico que puedan aplicarse en el control de los procesos trombóticos, inflamación, invasión tumoral, etc. [163].

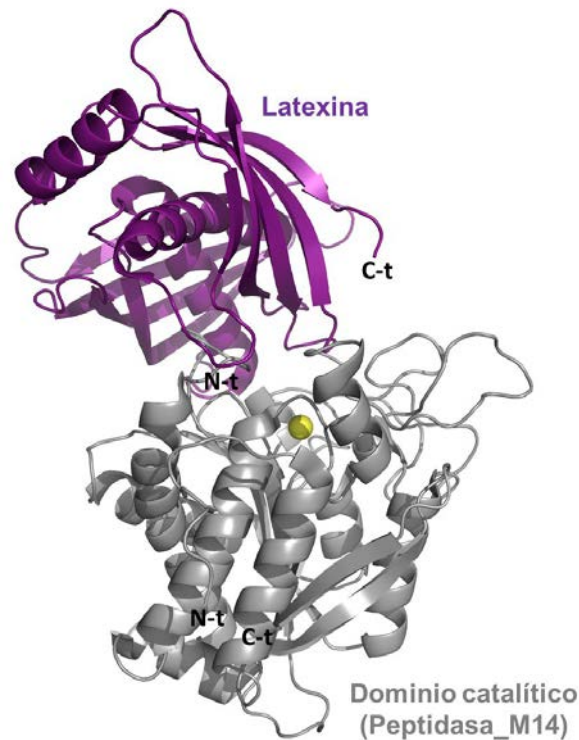
### 1.7.1 Inhibidores proteicos endógenos

La latexina (también conocida como “inhibidor de carboxipeptidasas endógeno” (ECI)) es el único inhibidor endógeno de MCPs identificado hasta la fecha en vertebrados y el inhibidor proteico de mayor tamaño de las MCPs. Se trata de una proteína monomérica citosólica con un  $M_w$  de ~25 kDa que fue identificada en la neocorteza lateral del cerebro de rata, aunque también se expresa en corazón, próstata, ovario, riñón, páncreas y colon.

En la estructura cristalina de la latexina de ratón (PDB: 1WNH) y humana en complejo con la hCPA4 (PDB: 2BO9) se observan 2 sub-dominios topológicamente idénticos con una arquitectura similar a las cistatinas. Cada sub-dominio está constituido por una hélice- $\alpha$  envuelta por una hoja- $\beta$  curva antiparalela, formada por 4 cadenas- $\beta$  en el sub-dominio N-t y 5 cadenas- $\beta$  en el sub-dominio C-t. Los sub-dominios están orientados uno respecto al otro mediante la confrontación de sus respectivas hélices- $\alpha$  y se unen a través de una tercera hélice- $\alpha$  que actúa como segmento de conexión (**figura 15**).

La latexina interacciona con el centro activo de la enzima mimetizando la unión del dominio de activación del pro-segmento de las PCPs (**figura 15**). Concretamente, el inhibidor se posiciona en la parte superior de la entrada al centro activo a través de la interficie entre sus 2 sub-dominios, de forma que el bucle  $\beta 7$ - $\beta 8$  penetra en la enzima interaccionando con los residuos Asp237A-Pro282A en la hCPA4, bloqueando el centro activo. A pesar de que la región de interacción entre ambas proteínas es grande, solo unos pocos contactos se establecen entre residuos de los subsitios S1" y S2 del centro activo, lo que explica la flexibilidad de la latexina para inhibir todas las MCPs de la subfamilia M14A [30],[60],[164].

## Introducción



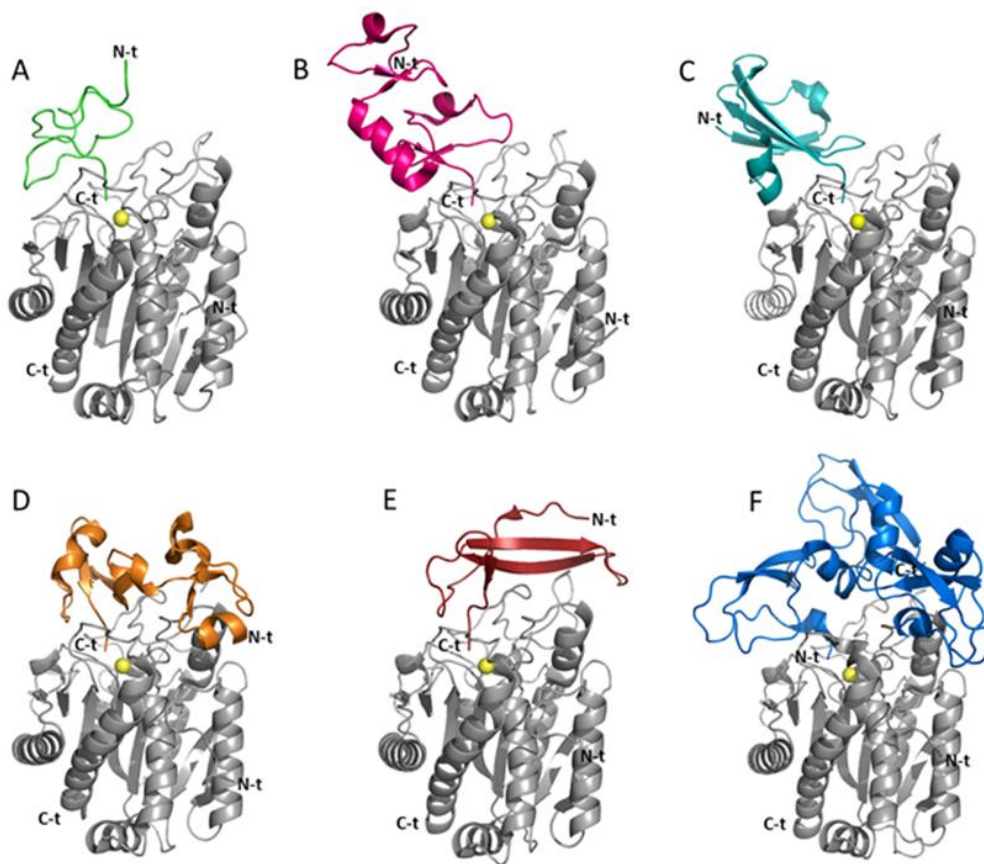
**Figura 15. Estructura tridimensional de la latexina en complejo con la CPA4 humana.** Representación en cintas de la estructura de la latexina en complejo con la hCPA4 (PDB: 2BO9). El dominio catalítico CP (Peptidasa\_M14) de la proteasa se muestra en color gris, el ion de zinc catalítico como una esfera amarilla y la latexina en color púrpura. La latexina mimetiza la unión del pro-segmento en los miembros de la subfamilia M14A de las MCPs (excepto en la CPO), ocluyendo la entrada al centro activo. Los extremos N-t y C-t de la hCPA4 y de la latexina son indicados. Imagen generada con PyMOL [148].

El ratón deficiente en el gen codificante para la latexina muestra una menor sensibilidad al dolor [165] y el ratón deficiente en el gen codificante para la presenilina-1 presenta una disminución de la expresión de latexina en el cerebro, lo que vincularía a este inhibidor con la enfermedad de Alzheimer [60]. En un estudio muy reciente se ha demostrado una reducción significativa en los niveles de expresión de este inhibidor en pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas [166].

La latexina comparte ~30% de homología secuencial y una gran homología estructural con el receptor en respuesta al ácido retinoico 1 (RARRES1). Aunque la función del RARRES1 se desconoce, se ha propuesto que actuaría como un gen supresor de tumores [167],[168],[169] y como un inhibidor de la CCP2, aunque su función inhibitoria de CPs no ha podido ser corroborada hasta la fecha por ningún otro grupo de investigación [167].

### 1.7.2 Inhibidores proteicos exógenos

Los inhibidores proteicos de MCPs de la subfamilia M14A han sido aislados y caracterizados de diferentes organismos evolutivamente distantes, e incluye los inhibidores de CPs de *Solanum tuberosum* (patata) (PCI) [170],[171] (**figura 16-A**), de *Solanum tuberosum* variedad Imilla morada (imaPCI) [172], de *Solanum lycopersicum* (tomate) (MCPI) [173],[174] de los parásitos intestinales *Ascaris suum* [175],[176] y *Ascaris lumbricoides* [177],[178] (ACI) (**figura 16-B**), de la sanguijuela *Hirudo medicinalis* (LCI) [179] (**figura 16-C**), de las garrapatas *Rhipicephalus bursa* (TCI) [180] (**figura 16-D**) y *Haemaphysalis longicornis* (HITCI) [181], del molusco *Nerita versicolor* (NvCI) [182] (**figura 16-E**) y del anélido marino *Sabellastarte magnifica* (SmCI) [183] (**figura 16-F**).

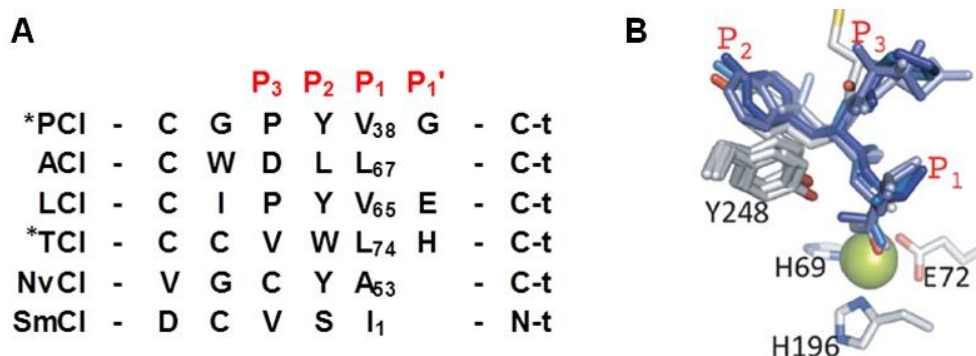


**Figura 16. Estructuras tridimensional de los inhibidores exógenos proteicos en complejo con MCPs de la subfamilia M14A.** Representación en cintas de las estructuras 3D depositadas en el PDB para los inhibidores PCI, ACI, LCI, TCI, NvCI y SmCI en complejo con MCPs de la subfamilia M14A. (A) Complejo PCI-bCPA (PDB: 4CPA); (B) Complejo ACI-hCPA1 (PDB: 3FJU); (C) Complejo LCI-hCPA2 (PDB: 1DTD); (D) Complejo TCI-bCPA (PDB: 1ZLH); (E) Complejo NvCI-hCPA4; (F) SmCI-hCPA4 (PDB: 4BD9). En todos los casos, el dominio catalítico CP (Peptidasa\_M14) de la proteasa se muestra en color gris, el ion de zinc catalítico como una esfera amarilla y los inhibidores en diferentes colores. El mecanismo de inhibición se basa en la interacción competitiva de la cola C-t del inhibidor con subsitios específicos del centro activo, afectando a residuos claves para la actividad enzimática. En el SmCI el mecanismo de inhibición es análogo, pero participa la cola N-t. Los extremos N-t y C-t de los inhibidores y las MCPs también son indicados. Imagen generada con PyMOL [148].

## Introducción

Se trata de proteínas globulares pequeñas (39-75 residuos) con una estructura terciaria muy estable mantenida por varios puentes disulfuro, acorde a su resistencia a agentes desnaturizantes y la digestión por endoproteasas. La mayoría presentan un mecanismo de inhibición basado en la interacción de los 2-4 residuos del extremo C-t con el centro activo de la enzima, de forma análoga a la unión del sustrato. Dicha interacción constituye el sitio de interacción o inhibición primario de la enzima (**figura 16**).

La oclusión de los subsitios S1 y S2 mediante interacciones específicas con residuos claves para la actividad enzimática es suficiente para inhibir completamente la enzima. Generalmente, el residuo C-t del inhibidor es escindido por la enzima y el nuevo residuo C-t se coordina con el ion de zinc catalítico y establece interacciones específicas con residuos de los subsitios S1 y S1". Además, los complejos enzima-inhibidor son estabilizados mediante contactos secundarios en otras regiones distantes del centro activo de la enzima [184].



**Figura 17. Alineamiento secuencial y estructural del extremo terminal de los inhibidores exógenos proteicos.** (A) Alineamiento secuencial de la cola N-t del SmCI y las colas C-t del resto de inhibidores, mostrando los residuos en las posiciones P3, P2, P1 y P1" responsables de la interacción primaria con la enzima. \*PCI = la secuencia C-t de los inhibidores MCPI e imaPCI son idénticas a la del PCI y se omiten por simplicidad. \*TCI = la secuencia C-t del TCI y HITCI son idénticas y se omiten también por simplicidad. Los códigos Uniprot para los inhibidores corresponden a P01075 (PCI), P01076 (MCPI), P19399 (ACI), P81511 (ACI), A8C364 (HITCI), Q5EPH2 (TCI), P86912 (NvCI), P84875 (SmCI). Figura extraída de [185]. (B) Representación en barras de los aminoácidos de la cola C-t inhibitoria del PCI, ACI, LCI, TCI y NvCI. El ion de zinc catalítico se muestra como una esfera amarilla y los residuos del centro activo de las MCPs responsables de su coordinación son representados en barras y numerados. Figura extraída de [182].

Las colas C-t de los diferentes inhibidores exógenos proteicos muestran una elevada homología secuencial (**figura 17-A**) e idénticas conformaciones en los residuos P1 y P2 (**figura 17-B**), representando un claro ejemplo de evolución convergente dirigida por la arquitectura del centro activo de la proteasa diana. La posición P1 está ocupada por residuos alifáticos, mientras que en la posición P2 hay una preferencia por residuos aromáticos (excepto Ser en SmCI y Leu en ACI) [182].

## Introducción

En el SmCI, la hidrofobicidad del residuo P1 se mantiene y, en general, la estructura de la cola N-t se conserva respecto a los inhibidores “clásicos” C-t.

### 1.7.2.1 *Inhibidores de carboxipeptidasas de plantas del género Solanum*

Tres inhibidores de MCPs han sido aislados de plantas de la familia *Solanaceae*: el PCI, el imaPCI y el MCPI. Su expresión en la planta se induce en respuesta al daño tisular y su función se ha asociado a la inhibición de MCPs digestivas como mecanismo de defensa frente a depredadores [39],[186].

El PCI fue el primer inhibidor proteico exógeno descrito y, durante años, el más estudiado. Se trata de una proteína monomérica sub-localizada en las vacuolas de las células parenquimáticas de las hojas y tallos [186] y es sintetizado en forma de precursor, con un PS de secreción N-t de 29 residuos, una pro-región N-t de 27 residuos y los 39 residuos de la proteína madura [171]. El PCI pertenece a la superfamilia de proteínas *T-knot*, denominadas así por su particular patrón de puentes disulfuro [187].

Su estructura 3D ha sido resuelta en solución acuosa por resonancia magnética nuclear (RMN) (PDB: 1H20) y mediante cristalografía de rayos-X en complejo con la bCPA (PDB: 4CPA). La proteína madura se está estabilizada por 3 puentes disulfuro y se estructura en un núcleo globular integrado por 27 residuos que apenas presenta estructura secundaria (**figura 16**). Del extremo N-t sobresalen 7 residuos, cuya función se desconoce, y del extremo C-t 5 residuos, de los que 4 intervienen directamente en la inhibición primaria de las MCPs.

La cola C-t del PCI está formada por los residuos Pro36-Tyr37-Val39-Gly39 y establece contactos con residuos de los subsitios S3, S2, S1 y S1" de la enzima (**figura 17-A**). El residuo C-t Gly39 es escindido por la proteasa y permanece unido en el centro activo [188]. La Val38 es un residuo clave en la estabilización del complejo enzima-sustrato [189] y, tras la escisión de la Gly39, constituye el nuevo residuo C-t del inhibidor, que se coordina con el ion de zinc e interacciona con otros residuos de los subsitios S1 y S1". Los residuos del inhibidor que participan en la formación del sitio de interacción secundario con la enzima son la His15, Trp22, Phe23, Trp28, Asn29 y Ser30, siendo los residuos hidrofóbicos los principales responsables de la estabilización del complejo enzima-inhibidor [184]. A pesar de que el PCI es un potente inhibidor de las MCPs de la subfamilia M14A, Bayés y col. descubrieron que la HzCPB es resistente a la inhibición por PCI [39].

El PCI constituye una buena proteína modelo para el estudio del plegamiento de proteínas ricas en puentes disulfuro, cuya producción representa, habitualmente, una problemática en el sector biotecnológico [146].



## Introducción

Por consiguiente, el plegamiento, desplegamiento y estabilidad de esta proteína ha sido extensamente estudiado. Por otro lado, se ha descrito que el PCI se comporta como un antagonista del Factor de Crecimiento Epidérmico humano (hEGF), con el que compite por su unión al receptor de EGF (EGFR) inhibiendo su activación y la proliferación celular inducida por este factor de crecimiento. Asimismo, se demostró que el PCI era capaz de suprimir el crecimiento de varias líneas celulares de adenocarcinoma pancreático humano *in vitro* e *in vivo*, proponiéndose su potencial aplicabilidad como agente antitumoral [187].

El inhibidor imaPCI corresponde a una isoforma natural del PCI recientemente caracterizado que comparte una homología secuencial y estructural extraordinaria con el PCI. Del mismo modo que el PCI, también es sintetizado como un precursor monomérico estabilizado por 3 puentes disulfuro que contiene un PS de secreción, un pro-segmento N-t de 27 residuos y los 39 residuos que forman parte de la proteína madura. La cola C-t presenta una extensión de 7 residuos C-t, idénticos en el PCI [190]. La principal diferencia entre ambos inhibidores corresponde únicamente a los residuos Leu23, Thr29 y Ala30 del imaPCI maduro, localizados en la región de interacción secundaria. Se ha demostrado que el triple mutante natural del PCI (Phe23Leu, Asn29Thr, Ser30Ala) presenta  $K_i$  superiores frente a MCPs de la subfamilia M14A, deduciéndose que los residuos en esta posición son claves para la eficiente interacción del inhibidor con la proteasa. Por consiguiente, distintas variantes de PCI con capacidades inhibitorias diferentes podrían ser sintetizadas en las patatas [190].

El MCPI es un inhibidor que apenas ha sido caracterizado y que comparte una identidad secuencial muy elevada con su homólogo PCI. Se trata de una proteína monomérica estabilizada por 3 puentes disulfuro que es sintetizada en forma de precursor. Consta de un PS de secreción, un pro-segmento N-t de 32 residuos y los 38 residuos que forman parte de la proteína madura [174]. La cola C-t presenta una extensión de 8 residuos con una secuencia idéntica al PCI que, presumiblemente, inhibe a las MCPs de la subfamilia M14A mediante su interacción primaria con el centro activo de la enzima [191].

### 1.7.2.2 *Inhibidor del parásito intestinal Ascaris*

Los parásitos gastrointestinales del género *Ascaris* producen inhibidores para protegerse de las proteasas digestivas del huésped (pepsina, tripsina, quimotripsina, elastasa, catepsinas y MCPs) y evadir la respuesta inmune. El inhibidor ACI es una proteína monomérica que contiene 67 residuos en su forma madura y es secretado extracelularmente gracias a la presencia de un PS de 20 residuos [176],[178]. Su localización en los tejidos del parásito muestra que el inhibidor se expresa en los intestinos y el exoesqueleto, además de en los ovarios y el útero de las hembras [175].

## Introducción

La estructura 3D de ACI ha sido resuelta en complejo con la hCPA1 (PDB: 3FJU), una de sus potenciales proteasa diana *in vivo*. Presenta un plegamiento similar a la latexina y consiste en un dominio N-t y C-t estructuralmente similares, unidos por una hélice- $\alpha$  que actúa de segmento de conexión. Cada dominio contiene una horquilla- $\beta$  formada por 2 cadenas- $\beta$  antiparalelas y estabilizada por 2 puentes disulfuro (**figura 16**). En conjunto, la estructura se mantiene por un de total 5 puentes disulfuro [175].

La cola C-t de ACI está formada por Asp65-Leu66-Leu67 y ocupa los correspondientes subsitios S3, S2 y S1 en la enzima (**figura 17-A**), de manera que el carboxilo de la Leu67 C-t se coordina con el ion de zinc. En este caso, ningún residuo del inhibidor ocupa la posición S1" de la enzima. La estabilización del complejo inhibitorio involucra también los residuos Glu37, Phe39, Ile57, Asn59, Lys60, Trp64 y Leu67 del dominio C-t, que participan en la formación del sitio de interacción secundario de la enzima-inhibidor [175].

### 1.7.2.3 Inhibidor de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*

El LCI se trata de una proteína monomérica formada por 66 residuos en su forma madura, que es sintetizada con un PS de secreción de 15 residuos. El LCI es secretado extracelularmente por la sanguijuela y participa en el mantenimiento de la sangre en su estado líquido durante la ingesta y la digestión a través de la inhibición de la CPU, evitando así la formación de coágulos sanguíneos [179]. Se ha propuesto el uso del LCI en la prevención o tratamiento de enfermedades trombóticas y el desarrollo parasitario [179].

La estructura 3D del inhibidor se ha resuelto en solución acuosa mediante RMN (PDB: 1DTV, 1ZFI) y cristalografía de rayos X en complejo con la hCPA2 (PDB: 1DTD). El LCI se pliega en un único dominio globular compacto estabilizado por 4 puentes disulfuro y formado por una hoja- $\beta$  antiparalela compuesta de 5 cadenas- $\beta$  y una hélice- $\alpha$  corta (**figura 16**). El 45% de los residuos del LCI forman parte de elementos de estructura secundaria, un elevado porcentaje en comparación con otros inhibidores [179].

La cola C-t del LCI está formada por la Pro63-Tyr64-Val65-Glu66 y ocluye los subsitios S3, S2, S1 y S1" de la enzima (**figura 17-A**). El Glu66 es escindido por la enzima y atrapado en su centro activo, de manera que la Val65 corresponde al nuevo residuo C-t del inhibidor y se coordina al ion de zinc catalítico y otros residuos del subsitio S1 y S1". La región de interacción secundaria involucra residuos de los bucles  $\beta$ 1- $\beta$ 2,  $\beta$ 3- $\alpha$ 1 y de la hélice  $\alpha$ 1, entre los que cabe destacar la Tyr11, Pro13 y Trp41 por su importancia en la estabilización del complejo.

### 1.7.2.4 Inhibidores de las garrapatas *Rhipicephalus bursa* y *Haemaphysalis longicornis*

Los inhibidores TCI y HITCI se trata de proteínas monoméricas de 75 y 77 residuos, respectivamente, que contienen un PS de secreción de ~20 residuos [180],[181]. Del mismo modo que el LCI del hematófago *Hirudo medicinalis*, el TCI y el HITCI inhiben la CPU para mantener la sangre en un estado líquido durante la ingesta y la digestión [180]. Por consiguiente, ambos presentan una potencial aplicabilidad en la prevención o tratamiento de enfermedades trombóticas y el desarrollo parasitario [192].

Se ha resuelto la estructura 3D del TCI en solución acuosa por RMN (PDB: 2JTO, 2K2X) y en complejo con la hCPB (PDB: 1ZLI), la bCPA (PDB: 1ZLH), la bTAF1a (PDB: 3D4U, 3OSL) y hTAF1a (PDB: 3LMS) mediante cristalografía de rayos X. EL TCI y el HITCI son proteínas homólogas bidominio constituidas por un dominio N-t y C-t topológicamente similares, que están unidos por un bucle muy corto. El dominio N-t consta de una hélice- $\alpha$  corta seguida de una hoja- $\beta$  antiparalela formada por 3 cadenas- $\beta$  y estabilizada por 3 puentes disulfuro. El dominio C-t también está formado por una hoja- $\beta$  antiparalela constituida por 3 cadenas- $\beta$  y estabilizada por 3 puentes disulfuro (**figura 16**). En total, 6 puentes disulfuro mantienen la estructura extraordinariamente estable de este inhibidor [193].

El sitio de interacción primario del inhibidor corresponde a la cola C-t Val72-Trp73-Leu74-His75, que se une a los correspondientes subsitios S3, S2, S1, S1" del centro activo de la enzima (**figura 17-A**). La His75 es escindida por la MCP, pero no permanece retenida en el centro activo, y Leu74 C-t se coordina con el ion de zinc y otros residuos del subsitio S1 de la enzima. El inhibidor también establece contactos secundarios a través de residuos de su dominio C-t con regiones próximas al centro activo que participan en la eficiente formación y estabilización del complejo, entre los que destacan los residuos Glu46 y Arg52. El TCI y el HITCI presentan un sitio de unión secundario adicional no identificado en ningún inhibidor exógeno proteico de MCPs de la familia M14. Esta interacción involucra al dominio N-t del inhibidor, que se une a un exosito de la proteasa correspondiente al subsitio S4 a través de los residuos Asn1, Cys10, Ser28 y Thr29 [192].

### 1.7.2.5 Inhibidor de *Nerita versicolor*

El NvCI es el primer inhibidor de MCPs aislado y caracterizado de un organismo marino. Se trata de una proteína monomérica de 53 residuos que inhibe a las MCPs de la subfamilia M14A con  $K_i$  del orden de picomolar (pM) (excepto para CPA2, nM), siendo el inhibidor más potente identificado hasta la fecha [182].

## Introducción

La estructura 3D del NvCI en complejo con la CPA4 (PDB: 4A94) ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X y se observa un plegamiento globular estabilizado por 3 puentes disulfuro formado, básicamente, por 2 cadenas- $\beta$  antiparalelas centrales conectadas por 3 bucles, y 2 extensiones cortas N-t y C-t (**figura 16**).

La inhibición de la enzima subyace en la interacción primaria de la cola C-t del inhibidor Tyr52-Ala53 con los subsitios S2, S1 del centro activo (**figura 17-A**). El NvCI no contiene ningún residuo en posición P1" que interaccione con el subsitio S1" de la enzima, de manera que la Ala53 se coordina directamente con el ion de zinc y otros residuos del subsitio S1. Además, el residuo equivalente al Glu163 de la hCPA4 localizado en el subsitio S3 en las peptidasas M14A, establece puentes de hidrógeno adicionales con las cadenas laterales de la Cys51 y la Tyr52 del inhibidor, excepto en la CPA2. Se ha sugerido que esta interacción podría tener un rol clave en la estabilización del complejo NvCI-MCPs y en la reducción de la  $K_i$  en 3 órdenes de magnitud respecto a los otros inhibidores exógenos proteicos. El sitio de interacción secundario del NvCI está formado básicamente por residuos de las cadenas- $\beta$  del inhibidor con regiones distantes al centro activo de la enzima, entre los que se incluyen los residuos Ile10, Asp11, Glu37, Cys38, Gln39 y la His40. La región de interacción secundaria es mucho más extensa que en otros complejos enzima-inhibidor (excepto en el TCI), contribuyendo sustancialmente a la estabilización del complejo y, probablemente, también participe en la reducción de la  $K_i$  [182].

### 1.7.2.6 Inhibidor de *Sabellastarte magnifica*

El SmCI es un nuevo inhibidor proteico aislado y caracterizado recientemente de otro organismo marino, y constituye el inhibidor exógeno proteico de mayor tamaño. Se trata de un inhibidor multidominio N-glicosilado perteneciente a la familia BPTI/Kunitz, que consta de una única cadena polipeptídica de 165 residuos de extensión. El SmCI presenta la peculiaridad de ser un inhibidor bifuncional muy potente capaz de inhibir simultáneamente 2 clases mecanísticas: MCPs y serín-proteasas de la familia S1, como la tripsina y la elastasa pancreática. Sin embargo, a diferencia de los otros inhibidores proteicos exógenos de MCPs, no es capaz de inhibir MCPs tipo-B [185].

La estructura 3D para el inhibidor en complejo con la hCPA4 (PDB: 4BD9) ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X. Se observa una pequeña extensión N-t seguida de 3 dominios BPTI/Kunitz en tándem (D1, D2, D3) unidos por 2 bucles, aunque tan solo el dominio D1-D2 presenta capacidad inhibitoria de MCPs [183]. El bucle entre el dominio D1 y D2 está formado por una única Gly, lo que favorece una extensa interficie de contacto entre ambos dominios. El bucle entre los dominio D2 y D3, en cambio, está formado por 8 residuos.

## ***Introducción***

Cada dominio globular está estabilizado por 3 puentes disulfuro y se plega en una hoja- $\beta$  antiparalela central seguido de una hélice- $\alpha$  C-t, de manera que el SmCI contiene un total de 9 puentes disulfuro en su estructura. El extremo N-t de los dominios D1 y D2 carece de estructura secundaria, mientras que en el D3 se observa una hélice- $\alpha$  N-t (**figura 16**) [185].

El SmCI presenta un mecanismo de inhibición competitivo atípico, análogo al de los inhibidores proteicos exógenos "clásicos" C-t, que consiste en la unión de la cola N-t Val3-Ser2-Ile1 al centro activo de la proteasa diana y la oclusión los subsitios S2 y S3 (**figura 17-A**). La cola N-t del inhibidor no presenta ningún residuo en posición P1", de manera que la Ile1 N-t se coordina con el ion de zinc indirectamente a través de una molécula de agua y establece interacciones con residuos de los subsitios S1 y S2. La región de interacción secundaria del SmCI es muy extensa e incluye múltiples contactos de los 3 dominios del inhibidor con la proteasa en regiones distantes del centro activo, aunque el bucle entre los dominio D2 y D3 constituye el principal sitio de interacción secundaria entre el inhibidor y la enzima [185].

## **2. INTRODUCCIÓN A LOS MICROTÚBULOS**

Los MTs son el componente de mayor tamaño del citoesqueleto en las células eucariotas y juegan un papel clave en diversas funciones celulares, tales como el soporte estructural, la morfogénesis, la organización espacial del contenido celular, la polaridad celular, la segregación de cromosomas durante la división celular, el tráfico intracelular, la secreción y la motilidad de cilios y flagelos [194]. Alteraciones en las funciones de los MTs están asociadas a procesos fisiopatológicos como el cáncer, ciliopatías y enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Huntington, el Alzheimer, el Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la paraplejia espástica hereditaria [195].

### **2.1 Estructura y heterogeneidad de los microtúbulos.**

Los MTs en eucariotas están formados por tubulina, una proteína heterodimérica de ~100 kDa compuesta de las subunidades  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina. La tubulina representa el 3-4% del contenido proteico de las células, llegando a alcanzar hasta un 20% en las neuronas del cerebro [196].

Los heterodímeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina solubles constituyen la “unidad básica” de los MTs y polimerizan a temperatura fisiológica en presencia de guanósín trifosfato (GTP) por adición de dímeros en uno o ambos extremos del protofilamento lineal. La interacción lateral no covalente de 13 protofilamentos forma un MT hueco cilíndrico con un diámetro externo de 25 nm. Además, pueden asociarse lateralmente formando dobletes (en axonemas de cilios y flagelos) o tripletes (en centriolos del centrosoma y cuerpos basales) [197]. Recientemente, Pilhofer y col. descubrieron MTs en bacterias del género *Prostheco bacter* constituidos por los homólogos bacterianos de la  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina denominados BtubA y BtubB. Los MTs bacterianos están formados sólo por 5 protofilamentos tienen un diámetro externo de 7,6 nm [198].

Los MTs son estructuras polarizadas que contienen un extremo de crecimiento muy lento formado por  $\alpha$ -tubulina (extremo negativo), y el extremo opuesto compuesto de  $\beta$ -tubulina, altamente dinámico y de crecimiento muy rápido (extremo positivo). El extremo negativo se estabiliza mediante su anclaje a los denominados centros organizadores de MTs (MTOC), unas estructuras celulares en las que ocurre la nucleación de los MTs. Los MTOCs son exclusivos de las células eucariotas e incluyen los centriolos, los cuerpos basales y el cuerpo polar del huso en levaduras (equivalente al centrosoma de las células animales) [197]. Recientemente, se ha definido el aparato de Golgi como un nuevo MTOC [199].

## ***Introducción***

Los MTs realizan sus diversas funciones celulares organizándose en estructuras más complejas con distintas geometrías y comportamientos dinámicos. Así pues, los MTs forman parte la red radial citoplasmática, los centriolos del centrosoma, los cuerpos basales y axonemas de cilios y flagelos, y el cuerpo medio durante la división celular [197].

### **2.2 Dinámica de los microtúbulos**

En la célula se produce un recambio continuo de la red de MTs. La vida media de un MT individual es de 10 minutos, mientras que la vida media de una molécula de tubulina es de más de 20 horas. Por consiguiente, cada molécula de tubulina participa en la formación y despolimerización de muchos MTs durante su periodo de vida. Tanto la  $\alpha$ - como la  $\beta$ -tubulina unen GTP, pero solo el nucleótido trifosfato unido a la subunidad- $\beta$  se hidroliza a GDP durante o poco después de la polimerización.

Esta hidrólisis debilita la afinidad de la tubulina por la unión de moléculas adyacentes, favoreciendo de este modo la despolimerización. El hecho de que un MT crezca o se contraiga está determinado por la velocidad de adición de tubulina con respecto a la velocidad de hidrólisis de GTP. Mientras las nuevas moléculas de tubulina unidas a GTP se incorporen más rápidamente que el GTP sea hidrolizado, el MT mantendrá una “tapa” de GTP en su extremo positivo que permitirá la adición de nuevos dímeros y el crecimiento de los MTs. Sin embargo, si la velocidad de polimerización se ralentiza, el GTP unido a la tubulina en el extremo positivo del MT se hidrolizará a GDP y se iniciará la despolimerización y contracción del MT [200].

Un aspecto esencial de los MTs es que son estructuras muy dinámicas que están continuamente polimerizando y despolimerizando en la célula. Los MTs presentan un comportamiento característico denominado “inestabilidad dinámica” que consiste en alternancias rápidas y bruscas de periodos de crecimiento y acortamiento repentino de los MTs. Además, los MTs experimentan otro fenómeno dinámico denominado “recambio rotatorio” en el que ocurre una pérdida continua de tubulina unida a GDP desde el extremo negativo y su reemplazo mediante la adición de moléculas de tubulina unidas a GTP en el extremo positivo del mismo MT [200].

### **2.3 El código de la tubulina**

La diversidad de MTs funcionalmente distintos emerge de la heterogeneidad molecular de la tubulina promovida por la expresión de diferentes isotipos de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina y la generación de MPTs en el heterodímero de tubulina [123].

## Introducción

La complejidad genética y química de la tubulina constituye la base del denominado “código de la tubulina” por analogía al “código de las histonas” que gobierna el empaquetamiento de la cromatina y la transcripción génica. Según esta hipótesis, enzimas especializadas (“escritores”) cifrarían el código generando MPTs en la cola C-t de los diferentes isotipos de la tubulina. Estas MPTs representarían señales químicas para proteínas interactoras (“lectores”) de los MTs, que son capaces de interpretar el código y ejecutar funciones celulares específicas [194]. Considerando la diversidad de isotipos de la tubulina, la gran variedad de MPTs y las infinitas combinaciones posibles que pueden coexistir en una única cola C-t, el número de potenciales señales distintas encriptadas en el código de la tubulina es enorme y sumamente complejo de descifrar [201],[202].

### 2.3.1 La superfamilia de la tubulina

La implicación de los MTs en un amplio conjunto de estructuras y funciones celulares sugirió la “hipótesis de la multitubulina”, que afirma que diferentes isotipos de tubulina serían necesarios para las variadas y especializadas funciones de los MTs [203].

En eucariotas superiores, tanto la  $\alpha$ - como la  $\beta$ - tubulina contienen varios isotipos producidos a partir de genes diferentes. En los seres humanos, 8 genes codifican para distintos isotipos de  $\alpha$ -tubulina y 9 genes para distintos isotipos de  $\beta$ -tubulina (**figura 18**). En cambio, en organismos como *T. thermophila* y las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe*, tan solo 1 o 2 genes codifican para cada subunidad de la tubulina. Aunque algunos isotipos están restringidos a células especializadas ( $\beta$ IIa y  $\beta$ IIb están enriquecidos en cerebro y células epiteliales;  $\beta$ III en células neuronales específicas;  $\beta$ IVa en estructuras flagelares y ciliadas;  $\beta$ VI en plaquetas y células hematopoyéticas, etc.), en la mayoría de tejidos se expresan varios isotipos que podrían combinarse para crear diferentes  $\alpha\beta$ -heterodímeros. Por consiguiente, los MTs pueden contener mezclas de isotipos o estar formados básicamente de un único isotipo, de manera que las diferentes combinaciones posibles permiten generar sub-poblaciones de MTs con propiedades únicas [204],[205].

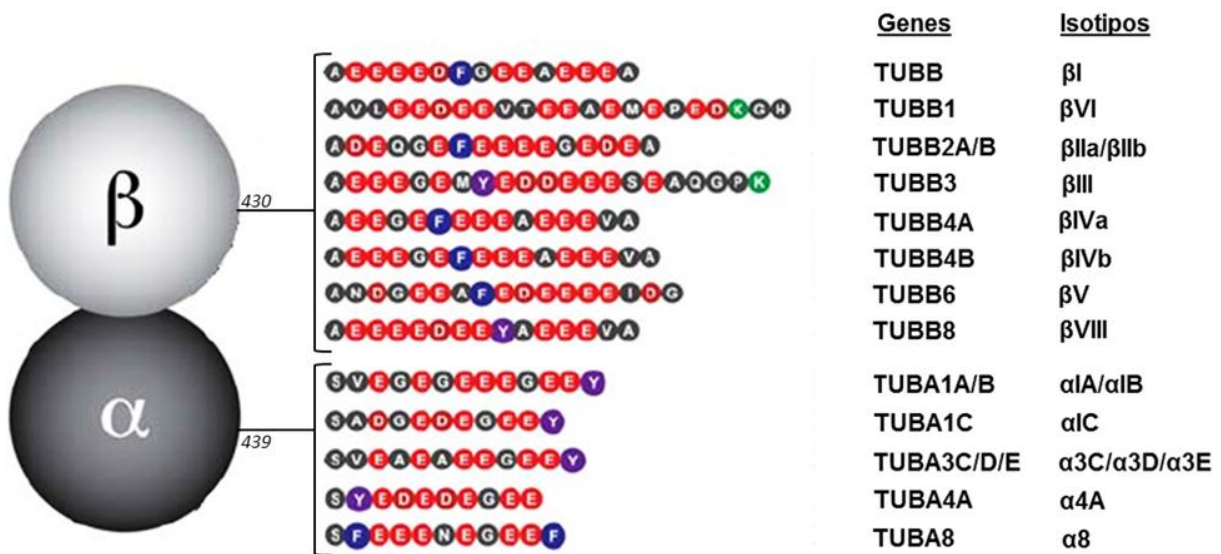
El análisis secuencial de las variantes isotópicas de la  $\alpha$  y la  $\beta$ -tubulina revela que todas ellas están muy conservadas en sus primeros ~400 residuos, presentando una variabilidad limitada fundamentalmente a la composición y longitud de su región C-t ácida.

Los isotipos de la  $\alpha$ -tubulina tienen una cola C-t con una extensión de 10-12 residuos y se caracterizan por presentar una Tyr C-t codificada genéticamente (**figura 18**). No obstante, el isotipo  $\alpha$ 4A representa una isoforma constitutivamente detirosinada, cuya expresión supondría un incremento en el conjunto de MTs detirosinados en ausencia de MPTs, y el isotipo  $\alpha$ 8 presenta una Phe C-t en vez de una Tyr.



## Introducción

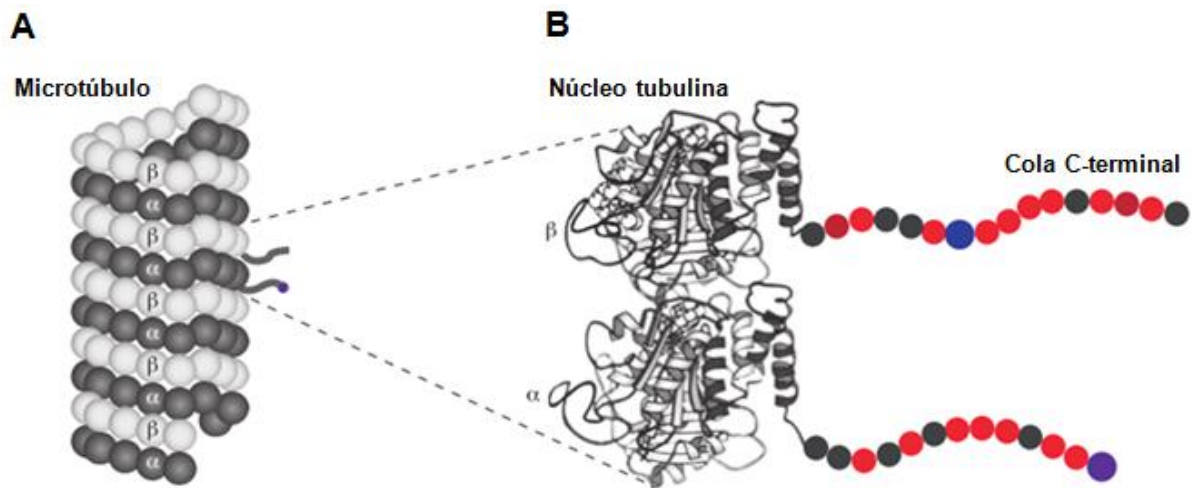
El isotipo  $\alpha 8$  conserva las propiedades químicas aromáticas para el aminoácido C-t posiblemente de una forma permanente, ya que la enzima que cataliza la detirosinación de la tubulina no es capaz de escindir la Phe C-t o lo hace de forma ineficiente.



**Figura 18. Heterogeneidad de las colas C-terminales en los isotipos de la  $\alpha$ - y la  $\beta$ -tubulina humanas.** Representación esquemática del heterodímero de tubulina mostrando la secuencia aminoacídica de las colas C-terminales a partir del último residuo incluido en el dominio globular compacto de la tubulina. Los aminoácidos son indicados en el código de una letra y coloreados según sus propiedades bioquímicas. La nomenclatura de los distintos isotipos y los genes que las codifican se muestran a la derecha de la imagen. Figura adaptada de [202].

Los isotipos de  $\beta$ -tubulina, en cambio, tienen una cola C-t más extensa formada por 16-22 residuos y mucho más. Se caracterizan por carecer del residuo aromático C-t codificado genéticamente en los isotipos de la  $\alpha$ -tubulina y, en su lugar, la mayoría contienen una Ala C-t, a excepción de  $\beta VI$  (His),  $\beta III$  (Lys),  $\beta V$  (Gly) (**figura 18**).

Las diferentes  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulinas mantienen una identidad secuencial superior al 90% respecto a los otros miembros de su mismo isotipo, excepto TUBB1 que comparte una identidad del 78% con los demás isotipos de  $\beta$ -tubulina. El hecho de que los genes codificantes para los distintos isotipos de la tubulina sean de los genes eucariotas mejor conservados refleja la importancia de la preservación de su estructura terciaria para el correcto ensamblaje de los MTs (**figura 19-A**). Nogales y col. desarrollaron un modelo atómico del heterodímero de  $\alpha\beta$ -tubulina empleando aproximaciones de cristalografía electrónica y determinaron que los monómeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina consisten en un núcleo globular compacto casi idéntico con colas C-t altamente desestructuradas y cargadas negativamente proyectadas hacia la superficie externa del MT [206] (**figura 20-B**).



**Figura 19. Representación esquemática de la localización de la cola C-terminal de la tubulina en los microtúbulos.** (A) Los MTs son estructuras poliméricas constituidas de 13 protofilamentos lineales de tubulina, una proteína heterodimérica de 100 kDa compuesta de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (esferas gris oscuro y gris claro, respectivamente). (B) Ampliación de un heterodímero de tubulina mostrando la estructura terciaria prácticamente idéntica de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  y su plegamiento en un núcleo globular compacto conservado y una cola C-t desestructurada de longitud y composición variable. Figura extraída de [202].

Dada que la cola C-t representa la mayor fuente de variación entre los diferentes isotipos de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina, se ha propuesto que esta región es responsable de su especificidad funcional. La longitud de las colas C-t varía entre los diferentes isotipos y podría influenciar la interacción entre los MTs y las proteínas asociadas a MTs (MAPs). Además, está enriquecida en aminoácidos cargados negativamente que regularían la interacción electrostática con enzimas que catalizan modificaciones post-traduccionales [123],[207].

Además de la  $\alpha$ - y la  $\beta$ -tubulina (y sus respectivos isotipos) existen otras tubulinas denominadas  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta\epsilon$ ,  $\zeta$  y  $\kappa$  que, en conjunto, constituyen la superfamilia de la tubulina. Las tubulinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  están presentes en todos los eucariotas y, en algunos casos, son las únicas tubulinas existentes (*S. cerevisiae*, *A. thaliana*, *C. elegans* y *D. melanogaster*). En cambio, el protozoo *T. brucei* presenta al menos 6 tubulinas de la superfamilia ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ). Curiosamente, todas estas tubulinas han sido identificadas en los centrosomas y cuerpos basales. La  $\gamma$ -tubulina corresponde a la tubulina mejor estudiada tras la  $\alpha$  y la  $\beta$ -tubulina, con las que comparte un 30% de identidad secuencial. Se localiza en los MTOCs en las células interfásicas, siendo un componente clave para la nucleación y la estabilidad de los MTs. En las células mitóticas, la  $\gamma$ -tubulina se localiza en los centrosomas, en los MTs del huso mitótico y en el cuerpo medio durante la citocinesis. Los otros miembros de la superfamilia de la tubulina han sido vagamente y poco o nada se conoce acerca de su función y/o relevancia biológica [208].



## Introducción

Otras MPTs se han identificado en la tubulina (palmitoilación, sumoilación, ubiquitinación, S-nitrosilación, glicosilación, arginilación y metilación) [210], pero apenas han sido estudiadas y se desconoce su potencialidad en la regulación de la dinámica y funcionalidad de los MTs [123].

### 2.3.2.1 *Detirosinación de la $\alpha$ -tubulina*

La detirosinación de la subunidad  $\alpha$ -tubulina fue la primera MPT descrita en la tubulina en 1973. Consiste en la eliminación proteolítica de la Tyr C-t codificada genéticamente en la mayoría de isoformas de la  $\alpha$ -tubulina por una CP aún desconocida tras la incorporación del heterodímero de tubulina al MT en formación (**figura 20**).

La detirosinación es una MPT reversible, de manera que los heterodímeros de  $\alpha\beta$ -tubulina detirosinados solubles pueden retirosinarse de nuevo en su subunidad  $\alpha$  mediante la acción de la enzima denominada tubulina tirosina (Tyr) ligasa (TTL). En las células, la TTL retirosina de forma rápida y eficiente todos los dímeros solubles de tubulina, de manera que MTs polimerizados de corta edad están constituidos casi exclusivamente de tubulina tirosinada ("Tyr-tubulina").

El ciclo de tirosinación/detirosinación opera en la mayoría de eucariotas excepto en levaduras, en las que la Tyr C-t es reemplazada por Phe. Su relevancia funcional se desconoce, pero los MTs que contienen tubulina detirosinada ("deTyr-tubulina" o "Glu-tubulina") son, generalmente, más estables y resistentes a la despolimerización inducida por frío o nocodazol [211]. Aunque los MTs polimerizados no son estabilizados por la detirosinación de la  $\alpha$ -tubulina *per se*, éstos son menos susceptibles a la despolimerización por la interacción de moléculas reguladoras de la dinámica de los MTs.

Los MTs citosólicos en interfase, los MTs del cono de crecimiento axonal y los de las neuritas de las neuronas están enriquecidos en tirosinación, mientras que los MTs del cinetocoro, del cuerpo medio y los axones neuronales están principalmente detirosinados [210],[212]. El ratón deficiente en el gen que codifica para la TTL presenta una enorme acumulación de Glu-tubulina y  $\Delta 2$ - $\alpha$ -tubulina, muriendo al poco de nacer con problemas respiratorios, ataxia y una morfología neuronal profundamente alterada [213].

### 2.3.2.2 *Generación de $\Delta 2$ - y $\Delta 3$ - $\alpha$ -tubulina*

La  $\alpha$ -tubulina detirosinada (-GEE) en el MT puede sufrir una segunda proteólisis que elimina el Glu codificado genéticamente terminal de forma irreversible generando  $\Delta 2$ - $\alpha$ -tubulina (-GE) (**figura 20**). La generación de  $\Delta 2$ - $\alpha$ -tubulina requiere la detirosinación previa de la  $\alpha$ -tubulina, por lo que los niveles de  $\Delta 2$ - $\alpha$ -tubulina están indirectamente regulados por

## Introducción

el ciclo de tirosinación/detirosinación. La  $\Delta 2$ - $\alpha$ -tubulina puede representar más del 35% de la tubulina total en el cerebro, pero su relevancia funcional no está clara. Dada la naturaleza irreversible de esta MPT, se ha propuesto que la generación de  $\Delta 2$ - $\alpha$ -tubulina mantendría a los MTs en un estado de detirosinación permanente que los protegería frente a la despolimerización [213].

La  $\Delta 2$ - $\alpha$ -tubulina está restringida a MTs muy estables como los de los axones de las neuronas diferenciadas y los axonemas de cilios y flagelos. Además, la formación de  $\Delta 2$ - $\alpha$ -tubulina ocurre en las etapas finales de la diferenciación funcional, en la que los MTs son excluidos de la dinámica de los MTs de polimerización-despolimerización. Por consiguiente, la generación de  $\Delta 2$ - $\alpha$ -tubulina parece tener un papel relevante en la estabilidad de los MTs.

Las enzimas responsables de la generación de  $\Delta 2$ - $\alpha$ -tubulina pertenecen a la subfamilia M14D de las MCPs o CCPs (ver **apartado 1.4.4**). Asimismo, estas enzimas son capaces de generar  $\Delta 3$ - $\alpha$ -tubulina (-G), una nueva MPT generada mediante la eliminación del Glu C-t de la  $\Delta 2$ - $\alpha$ -tubulina y cuya relevancia biológica se desconoce completamente [124] (**figura 20**).

### 2.3.2.3 Acetilación de la $\alpha$ -tubulina y $\beta$ -tubulina

La Lys40 de la  $\alpha$ -tubulina expuesta en la superficie de la luz del MT es la principal diana para la modificación por acetilación. Se ha identificado también la acetilación de la Lys252 de la  $\beta$ -tubulina en el heterodímero soluble por la acetiltransferasa San, inhibiendo probablemente su incorporación al MT [123],[214] (**figura 20**). Otros potenciales sitios de modificación se han identificado por espectrometría de masas (MS) en las subunidades  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, pero aún no han sido validados.

La N-acetiltransferasa 1 ( $\alpha$ TAT1) y la proteína elongadora 3 (ELP3) son las principales acetiltransferasas responsables de la modulación de los niveles de  $\alpha$ -tubulina acetilada en Lys40 en las células animales. La supresión de la actividad de  $\alpha$ TAT1 impide la acetilación de los MTs, aunque la regulación y la especificidad de sustrato de esta enzima se desconocen. Ratones deficientes en el gen codificante para  $\alpha$ TAT1 son menos fértiles debido a problemas en la morfología y motilidad de los espermatozoides. La deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina acetilada en la Lys40 del dímero soluble es catalizada por la histona deacetilasa 6 (HDAC6) y sirtuina 2 (SIRT2) [210],[215].

Los MTs acetilados están enriquecidos en formaciones de MTs muy estables como los axones neuronales y los cuerpos basales de cilios y flagelos, aunque también se detecta en MTs del huso mitótico y el cuerpo medio durante la división celular. Estudios recientes sugieren que la acetilación de la tubulina promueve la ciliogénesis, el desarrollo de las neuritas neuronales y el transporte intracelular regulando el tráfico de motores moleculares.

## Introducción

Sin embargo, la función de esta MPT en todas estas poblaciones de MTs sigue siendo muy incierta. Finalmente, la acetilación de la tubulina ocurre con cierto retraso tras el ensamblaje del MT, propiedad que se emplea como indicador de la edad del polímero [215].

### 2.3.2.4 Fosforilación de la $\alpha$ -tubulina y $\beta$ -tubulina

La fosforilación de la tubulina es una MPT poco caracterizada cuya relevancia funcional se desconoce. La  $\alpha$ -tubulina se fosforila en una Tyr no identificada cerca de su extremo C-t por la tirosina quinasa de bazo (Syk) y en la Ser165 por la proteína quinasa C (PKC) [216], mientras que la fosforilación de la  $\beta$ -tubulina ocurre en la Ser172 por el complejo Cdk1/ciclinaB [217] (**figura 20**). La fosforilación de la subunidad  $\beta$ -tubulina tiene lugar en la tubulina soluble de células mitóticas, inhibiendo la incorporación de los heterodímeros al polímero en crecimiento. Por consiguiente, la fosforilación en Ser172 podría regular la dinámica de los MTs durante la división celular [201],[207].

### 2.3.2.5 Poliaminación de la $\alpha$ -tubulina y $\beta$ -tubulina

La poliaminación de la tubulina se ha caracterizado muy recientemente como una MPT irreversible que consiste en la adición covalente de poliaminas (putrescina, espermina y espermidina) a distintas Gln de las subunidades  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina solubles o tras su incorporación al MT por la enzima transglutaminasa (TG). La principal diana para la poliaminación es la Gln15 en la subunidad- $\beta$  (**figura 20**).

La poliaminación es la únicas MPTs que introduce cargas positivas en las tubulina, modificando su punto isoeléctrico (pI). Los sitios de poliaminación están próximos a las interfaces de polimerización y, posiblemente, afecta a la incorporación de los heterodímeros de tubulina y la estabilidad de los MTs.

La tubulina poliaminada está particularmente enriquecida en las neuronas y su función se relaciona con el crecimiento de las neuritas, diferenciación neuronal y estabilidad de los MTs *in vitro* [210],[218]. La tubulina neuronal, los MTs polimerizados y los MTs estabilizados por taxol son sustratos para la TG y su poliaminación previene la despolimerización frente al frío, al tratamiento con calcio y fármacos antimitóticos. Además, la inhibición de la síntesis de poliaminas con difluorometilornitina (DFMO) o la delección de TG2 (la principal TG citoplasmática) reduce la estabilidad de los MTs *in vitro*.

Esta MPT puede tener un efecto neuroprotector contribuyendo a mantener la estabilidad de las estructuras axonales, pero puede desencadenar condiciones patológicas cuando la desregulación de la hiperestabilidad de los MTs implica una reducción de la plasticidad y alteración de la función sináptica [210].

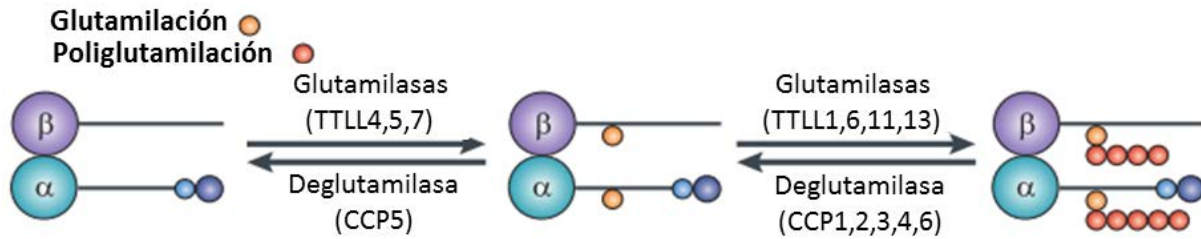
### 2.3.2.6 Glutamilación de la $\alpha$ -tubulina y $\beta$ -tubulina

La glutamilación es una MPT reversible evolutivamente conservada desde los protistas a los mamíferos que genera cadenas laterales de Glu de longitud variable (1-20 unidades) en el grupo  $\gamma$ -carboxilo de Glu concretos de la secuencia primaria de la tubulina y otras proteínas (**figura 20, 21**).

La glutamilación de la tubulina ocurre en la región C-t de sus subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  tras la incorporación del heterodímero al MT y se realiza en 2 pasos bioquímicamente distintos denominados reacción de iniciación y reacción de elongación. En la reacción de iniciación el grupo  $\alpha$ -amino de un Glu entrante se une covalentemente mediante un enlace isopeptídico (amida) al grupo  $\gamma$ -carboxilo del Glu de la cadena principal. Las subsiguientes reacciones de elongación añaden Glu adicionales para formar la cadena de poli-E, formando un enlace peptídico entre el grupo  $\alpha$ -carboxilo del último Glu incorporado y el grupo  $\alpha$ -amino del Glu entrante (**figura 21**).

Los niveles de glutamilación en la célula dependen de la actividad balanceada de las enzimas que incorporan y eliminan Glu a la región C-t de la tubulina. Las enzimas que catalizan la glutamilación se denominan glutamilasas y forman parte de una familia proteica denominada "ligasas similares a la TTL" (TTLL), que incluye también a las glicilasas de la tubulina y a la TTL [219],[220],[221],[222]. Las enzimas que catalizan la deglutamilación generada por las glutamilasas son las denominadas CCPs [124] (ver **apartado 1.4.4**) (**figura 21**).

Se han identificado 7 glutamilasas activas en la familia TTLL con diferentes especificidades de sustrato y preferencia por la iniciación o elongación de la cadena de Glu, sugiriendo que los patrones de glutamilación de los diferentes subtipos de MTs están directamente determinados por las especificidades de las enzimas involucradas en su generación [221]. Las TTLL4, TTLL5 y TTLL7 tienen preferencia por la reacción de iniciación, mientras que TTLL6, TTLL11 y TTLL13 prefieren catalizar la elongación de la cadena de poli-E. Por otro lado, las TTLL5, TTLL6, TTLL11 y TTLL13 actúan preferiblemente sobre la subunidad  $\alpha$  de la tubulina, mientras que TTLL4 y TTLL7 sobre la subunidad  $\beta$  (**figura 21**). Curiosamente, la TTLL7 puede catalizar *in vitro* indistintamente la reacción de iniciación y elongación sobre la  $\beta$ -tubulina [223], de igual modo que la TTLL6 y TTLL11 también son capaces de iniciar nuevas cadenas en la subunidad  $\alpha$ -tubulina. Por otro lado, la TTLL1 es la principal glutamilasa neuronal y cataliza la elongación de la subunidad  $\alpha$  formando parte de un complejo del que depende su actividad enzimática [219].



**Figura 21. Glutamilasas y deglutamilasas de la tubulina.** La generación de cadenas laterales de poli-E en la cola C-t de la  $\alpha$ - y la  $\beta$ -tubulina se inicia con la adición del primer Glu de la cadena al Glu de ramificación de la secuencia primaria por las enzimas TTLL4, 5, y 7. La elongación de la cadena la realizan la TTLL1, 6, 11 y 13. La reacción inversa es catalizada por enzimas deglutamilasas. La CCP1, 2, 3, 4 y 6 eliminan los Glu unidos mediante enlaces peptídicos de la cadena de poliglutamatos, pero solo CCP5 es capaz de hidrolizar el enlace isopeptídico del Glu ramificado. TTLL = ligasa similar a TTL; CCP = carboxipeptidasa citosólica. Figura extraída de [194].

La glutamilación (y otras poli-modificaciones como la glicilación) no constituye un mecanismo de regulación ON/OFF, sino que genera un amplio rango de señales funcionales que permiten un ajuste muy fino y regulado de la señal. Los múltiples patrones de glutamilación posibles generan mayor o menor densidad de cargas negativas en la región C-t del heterodímero de la tubulina dependiendo de la longitud variable de la cadena de Glu, la presencia de varios Glu en la secuencia primaria C-t de la tubulina susceptibles de ser glutamilados y la modificación selectiva de los distintos isotipos de la subunidad  $\alpha$ - como la  $\beta$ -tubulina [224].

La glutamilación es generalmente reconocida como una MPT que afecta a la tubulina, pero no se encuentra restringida a ésta. Proteínas como la proteína de ensamblaje del nucleosoma 1 (NAP1), la proteína de ensamblaje del nucleosoma 2 (NAP2) [225], las fosfoproteínas ácidas nucleares A, B y E de la familia 32 (ANP32A, B y E), SET, nucleofosmina B23, nucleolina, el factor nuclear 45 (NF45) y la proteína 1 rica en Pro, Leu y Glu (PELP1) son también modificadas por glutamilación. Muchos de estos sustratos están relacionados con la remodelación de la cromatina, por lo que se ha propuesto que la glutamilación de los MTs y de proteínas relacionadas con la cromatina permitiría la coordinación entre la dinámica del huso mitótico y los cambios en la estructura de la cromatina durante la mitosis [226].

Los MTs citoplasmáticos de las células interfásicas presentan niveles muy bajos de glutamilación, la zona de transición de los MTs ciliares están monoglutamylados y los MTs estables como los que se encuentran en neuronas, centriolos, axonemas y cuerpos basales están muy poliglutamylados. No obstante, los niveles de poliglutamylación también son local y temporalmente elevados durante la división celular en los MTs dinámicos del huso mitótico y el cuerpo medio [209],[224].



## Introducción

La glutamilación es esencial para la motilidad de cilios y flagelos, la estabilidad de los centrosomas y el crecimiento neuronal. El ratón deficiente para el gen de la *Tll1* presenta alteraciones en el batido de los cilios móviles del epitelio de la tráquea, lo que origina la acumulación de moco y tos. De forma análoga, la TLL6 es un importante regulador del batido de los cilios de las células ependimales de los ventrículos cerebrales, esencial para el correcto flujo de líquido cefalorraquídeo. En *Tetrahymena*, la sobreexpresión de Tll6Ap provoca la estabilización de los MTs citoplasmáticos y la desestabilización de los MTs del axonema de los cilios [209].

Numerosos estudios confirman que la alteración en los patrones de glutamilación de la tubulina deslocaliza motores moleculares, afecta al tráfico intracelular, la transmisión sináptica y provoca degeneración [221]. Además, publicaciones recientes apuntan a una potencial asociación de niveles de glutamilación alterados con la tumorigénesis y la resistencia a fármacos quimioterapéuticos dirigidos a MTs, de manera que la regulación de la actividad de las enzimas poliglutamilasas y deglutamilasas se está convirtiendo en una incipiente diana farmacológica en la terapia contra el cáncer [227],[228].

### 2.3.2.7 Glicilación de la $\alpha$ -tubulina y $\beta$ -tubulina

La glicilación es una MPT reversible que genera cadenas laterales de Gly de longitud variable en el grupo  $\gamma$ -carboxilo de residuos concretos de Glu presentes en la secuencia primaria de la tubulina y otras proteínas (**figura 20**). La glicilación podría regular la poliglutamilación al competir por la modificación de Glu en la región C-t del heterodímero de tubulina. De hecho, se ha demostrado experimentalmente que los niveles de poliglutamilación se incrementan tras la depleción de la poliglicilación [220].

La glicilación de la tubulina ocurre en la región C-t de sus subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  tras la incorporación del heterodímero al MT y se realiza en 2 pasos bioquímicamente distintos también denominados reacción de iniciación y reacción de elongación. En la reacción de iniciación el grupo  $\alpha$ -amino de una Gly entrante se une covalentemente mediante un enlace isopeptídico (amida) al grupo  $\gamma$ -carboxilo del Glu de la cadena principal. Las subsiguientes reacciones de elongación añaden Gly adicionales para formar la cadena de poliglicinas (poli-G) formando un enlace peptídico entre el grupo  $\alpha$ -carboxilo de la última Gly incorporada y el grupo  $\alpha$ -amino de la Gly entrante [229]. Por otro lado, además del heterodímero de tubulina, también se ha descrito la glicilación de otras proteínas identificadas como sustratos de las glutamilasas, incluyendo NAP1, NAP2, ANP32A, ANP32B, SET y nucleolina, incrementando el potencial biológico de esta MPT [220].

## Introducción

La glicilación es catalizada por unas enzimas denominadas glicilasas pertenecientes a la familia TTLL y, hasta la fecha, se han identificado 3 glicilasas activas con diferentes especificidades de sustrato y preferencia por la iniciación o elongación de la cadena de Gly. La TTLL3 y TTLL8 son las enzimas que catalizan la reacción de iniciación e incorporan la primera Gly del punto de ramificación de la cadena, mientras que la TTLL10 cataliza la elongación de la cadena de poli-G [220]. Las enzimas deglicilasas que eliminan las cadenas de Gly laterales no han sido aún identificadas en humanos. En *Giardia duodenalis*, las deglicilasas dipeptidasa 1 (gDIP1) y dipeptidasa 2 (gDIP2) de la subfamilia M20C de las MCPs deglicilan la tubulina *in vitro* [230].

La glicilación en mamíferos está restringida a los MTs de los axonemas de cilios móviles y flagelos, mientras que en protistas su localización es más amplia y se extiende a diferentes estructuras citoplasmáticas formadas por MTs [123]. En los seres humanos, la TTLL10 es inactiva debido a 2 mutaciones que afectan al dominio TTL, de manera que las proteínas humanas susceptibles de ser gliciladas únicamente pueden ser monogliciladas. No obstante, la ausencia de cadenas de poli-G no afecta a la motilidad de cilios y flagelos.

Su función se relaciona con el mantenimiento del axonema de los cilios y flagelos móviles, y la proliferación celular [210]. La delección de la glicilasa de *Drosophila* dmTTLL3B provoca un significativo descenso de la viabilidad y esterilidad en las moscas supervivientes, debido a la desestructuración del axonema de los espermatozoides en las últimas etapas de la espermatogénesis [220]. Mutaciones en TTLL3 se han correlacionado con el cáncer de mama y colorrectal [231] y el ratón deficiente en el gen codificante para TTLL3 elimina por completo la glicilación de la tubulina en el colon, lo que provoca una reducción en los cilios primarios y estimula la carcinogénesis en colon.

### 2.3.3 Proteínas interactoras de microtúbulos

Muchas de las funciones y la dinámica de los MTs están mediadas por un complejo y variado conjunto de proteínas interactoras de MTs que reconocen las MPTs generadas en el  $\alpha$ -heterodímero de la tubulina. A pesar de los progresos realizados en los últimos años, poco se conoce acerca de la regulación y de los efectos de las MPTs en la atracción y la actividad de las proteínas interactoras de MTs [202],[232]. Hay 3 clases principales las proteínas interactoras de MTs: las MAPs, las proteínas de unión a los extremos positivos de los MTs (+TIPs) y los motores moleculares.

Las MAPs son proteínas asociadas de forma estable a los MTs y cuya función se relaciona con la estabilidad y la organización de los MTs, especialmente en las células neuronales. Las MAPs incluyen, entre otras muchas, las proteínas estabilizadoras de MTs Tau, MAP1 y MAP2, y las proteínas desestabilizadoras katanina y espastina, [194].

## Introducción

*In vitro*, Tau, MAP1B y MAP2 se unen preferentemente a los MTs con niveles de poliglutamilación moderados (~3 Glu), mientras que MAP1A se une a largas cadenas de poli-E (~6 Glu) [233]. La espastina y la katanina también prefieren MTs decorados en su superficie con largas cadenas de poli-E, promoviendo el corte de los MTs y la generación de nuevos extremos positivos y negativos [234],[235]. La espastina también tiene afinidad por MTs detirosinados y acetilados, catalizando de igual modo su escisión [234],[236]. Por otro lado, la poliglutamilación de los MTs favorece la interacción de SEPT2 e impide la unión del inhibidor del transporte intracelular de vesículas MAP4, promoviendo así el tráfico post-Golgi de vesículas [237].

Las +TIPs son un tipo especializado de MAPs que se unen de forma transitoria al extremo positivo de los MTs y modulan la dinámica de los MTs y la interacción con otras estructuras celulares. La detirosinación de la tubulina se correlaciona negativamente con la asociación de la proteína conectora citoplasmática-170 (CLIP-170) y la p150glued a los MTs. Estas proteínas contienen un dominio CAP-Gly que reconoce la  $\alpha$ -tubulina sin modificar y permite su unión con el MT, de manera que la detirosinación de la tubulina provoca la deslocalización de las proteínas CLIP-170 y p150Glued [238],[239]. Las proteínas motoras comprenden quinesinas y dineínas, y emplean la energía procedente de la hidrólisis del ATP para el transporte de moléculas a lo largo de los MTs, el movimiento de cilios y flagelos, la separación de los cromosomas durante la división celular y la despolimerización de los MTs.

La detirosinación de la tubulina impide la unión de proteínas motoras despolimerizadoras de los MTs, como la quinesina asociada al cinetocoro (MCAK) y el miembro 2A de la familia de las quinesina (KIF2A), incrementando así su longevidad. En cambio, el miembro 5 de la familia de las quinesina (KIF5) se une preferentemente a MTs detirosinados, favoreciendo el transporte intracelular. La acetilación de la  $\alpha$ -tubulina regula positivamente la interacción de la dineína y KIF5 a los MTs, estimulando el transporte anterógrado y retrogrado de vesículas sinápticas. Finalmente, la reducción de los niveles de glutamilación en los MTs axonales disminuye la afinidad del miembro 17 de la familia de las quinesinas (KIF17) y del 1A (KIF1A) por los MTs, afectando al tráfico de vesículas sinápticas y la transmisión sináptica [240].

### **3. INTRODUCCIÓN A LA DIGESTIÓN PROTEICA**

Las proteínas procedentes de la ingesta de alimentos y de fuentes endógenas deben ser degradadas a sus aminoácidos componentes previamente a su distribución sistémica a través del torrente sanguíneo. La digestión proteica en humanos se compone de una etapa gástrica y de una etapa intestinal en las que tiene lugar la degradación enzimática de las proteínas y péptidos a aminoácidos libres y péptidos de pequeño tamaño absorbibles por células especializadas del intestino. La culminación de la degradación de los péptidos pequeños a nivel celular, permite completar el conjunto de aminoácidos libres que deberán ser transportados a la circulación sanguínea para su distribución.

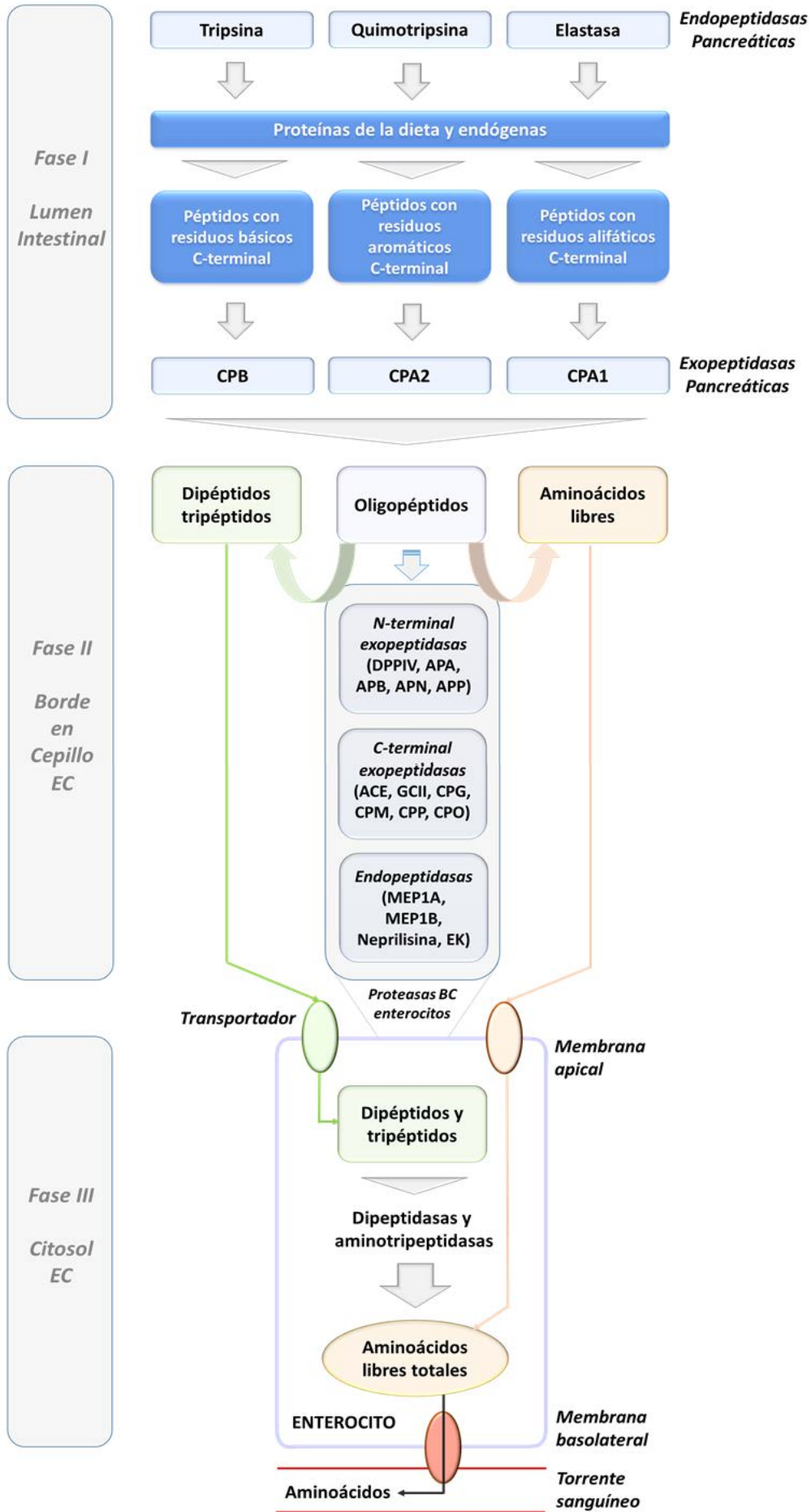
#### **3.1 Etapa gástrica**

En esta primera etapa, el ambiente ácido del estómago favorece la desnaturalización de las proteínas y la acción de las enzimas proteolíticas. La pepsina es la principal proteasa presente en el jugo gástrico y se trata de una aspartil-endoproteasa sintetizada y secretada como un precursor inactivo denominado pepsinógeno por las células principales de las glándulas oxínticas gástricas. La conversión del pepsinógeno a pepsina se produce por el contacto con el ácido clorhídrico secretado por las células parietales del estómago. La pepsina degrada las proteínas en fragmentos peptídicos grandes mediante la hidrólisis de enlaces peptídicos internos del extremo amino de residuos hidrofóbicos, preferiblemente aromáticos [241].

#### **3.2 Etapa intestinal**

La siguiente fase de la digestión proteica es la fase intestinal, que se inicia con el vertido del contenido estomacal al duodeno intestinal a través de la válvula pilórica. Consta de 3 fases bien estudiadas y que se pueden definir según la localización en la que tiene lugar el proceso digestivo. Durante esta etapa, se consigue la degradación total de los fragmentos de proteínas a aminoácidos libres. En la **figura 22** se muestra un esquema de las distintas etapas intestinales y de las principales enzimas que participan en cada una de ellas.

# Introducción



**Figura 22. Esquema de la interrelación entre las endopeptidasas y exopeptidasas digestivas en el intestino delgado.** Resumen de la digestión proteica en la luz intestinal (fase I), el borde en cepillo de los enterocitos (fase II) y en el citosol de los enterocitos (III). En cada fase intervienen proteasas con especificidades de sustrato distintas que generan productos empleados por las proteasas de la siguiente fase como sustrato. La acción combinada de las distintas proteasas intestinales permite la degradación completa de las proteínas endógenas y procedentes de la dieta a aminoácidos libres. Los aminoácidos son exportados desde el enterocito al torrente sanguíneo a través de transportadores especializados para su distribución sistémica. CPA1, carboxipeptidasa A1; CPA2, carboxipeptidasa A2; CPB, carboxipeptidasa B; DPPIV, dipeptidil peptidasa IV; APA, aminopeptidasa A; APB, aminopeptidasa B; APN, aminopeptidasa N; APP, aminopeptidasa P; ACE, enzima convertidora de angiotensina (1 y 2); GCII, glutamato carboxipeptidasa II; CPG, carboxipeptidasa G; CPM, carboxipeptidasa M; CPP, carboxipeptidasa P; CPO, carboxipeptidasa O; MEP1A, meprina A; MEP1B, meprina B; EK, enteroquinasa; EC, enterocito; BC, borde en cepillo.

### 3.2.1 Fase luminal del intestino delgado

La degradación de los fragmentos de proteína generados por la pepsina gástrica prosigue en la luz del intestino delgado y está orquestada por las proteasas pancreáticas. Estas enzimas son sintetizadas como zimógenos en las células acinares del páncreas exocrino, donde se almacenan en los gránulos secretores hasta el momento de su liberación al duodeno intestinal [242],[243].

Las células enteroendocrinas I y S del duodeno secretan, respectivamente, las hormonas peptídicas colecistoquinina y secretina en respuesta a la entrada del quimo procedente del estómago, estimulando la secreción pancreática. El jugo pancreático tiene un pH alcalino debido a su gran contenido en bicarbonato y contiene precursores de serín-endoproteasas (tripsinógeno, quimotripsinógeno, pro-elastasa) y MCPs (PCPs), entre otras enzimas digestivas [244]. La mezcla del quimo procedente del estómago con las secreciones pancreáticas neutraliza el pH y permite la activación de las proteasas pancreáticas.

La enzima enteroquinasa es una serín-endoproteasa presente en el borde en cepillo de los enterocitos del duodeno intestinal que cataliza la conversión del tripsinógeno a tripsina [245]. La activación de la tripsina promueve la activación de los demás zimógenos pancreáticos PCPA1, PCPA2, PCPB y quimotripsinógeno [246].

Las endoproteasas y exopeptidasas pancreáticas se complementan a través de sus diferentes especificidades de sustrato para realizar una eficiente degradación de los fragmentos de proteínas en oligopéptidos, dipéptidos y aminoácidos libres. La quimotripsina genera oligopéptidos con residuos aromáticos C-t que son hidrolizados seguidamente por la CPA2. La elastasa produce oligopéptidos con residuos alifáticos C-t para su posterior hidrolisis por la CPA1. Finalmente, la tripsina genera oligopéptidos que contienen residuos básicos C-t capaces de ser escindidos por la CPB.

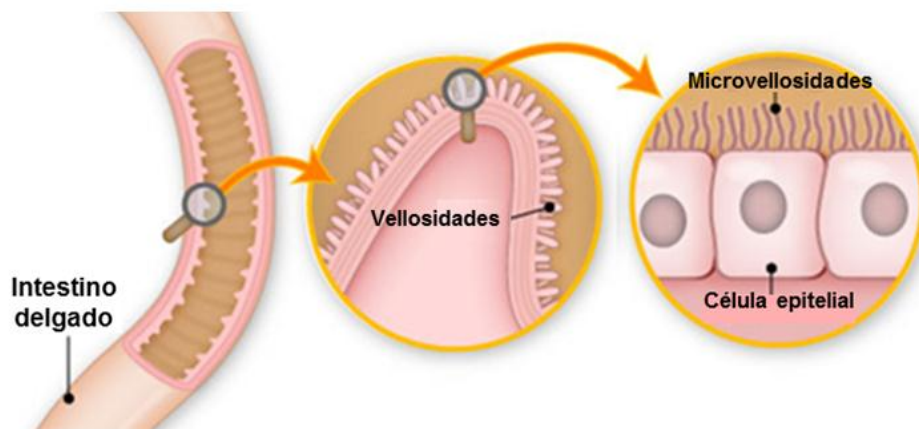
## Introducción

Los productos de degradación de las proteasas pancreáticas corresponden a aminoácidos libres hidrofóbicos y básicos, oligopéptidos de hasta 6 residuos, tripéptidos y dipéptidos ricos en Pro, Glu y Asp [242]. Los aminoácidos libres son directamente absorbidos por los enterocitos, mientras que los oligopéptidos, tripéptidos y dipéptidos deben proseguir su degradación enzimática en el borde en cepillo antes de ser transportados al interior de los enterocitos (**figura 22**).

### 3.2.2 Fase borde en cepillo de los enterocitos

Dado que el jugo pancreático no contiene actividad aminopeptidasa apreciable y las especificidades de sustrato de las proteasas pancreáticas no cubren el amplio abanico de aminoácidos que forman parte de las proteínas, la digestión final de los dipéptidos, tripéptidos y oligopéptidos procedentes de la fase luminal depende de enzimas presentes en los enterocitos del intestino delgado (**figura 22**).

Las vellosidades de la luz del intestino delgado están tapizadas por una monocapa de células epiteliales constituida en un 80% por un tipo celular denominado enterocito. Los enterocitos son células polarizadas con 2 superficies bien diferenciadas y funcionalmente distintas que intervienen en la digestión y absorción de péptidos y aminoácidos de la luz intestinal. La superficie apical presenta un borde en cepillo (BC) formado por microvellosidades y es el lugar donde se localizan las denominadas enzimas digestivas del BC [247] (**figura 23, tabla 8**).



**Figura 23. Representación simplificada de las vellosidades y microvellosidades del epitelio del intestino delgado.** El epitelio intestinal constituye la capa más externa de la mucosa del intestino delgado y se encuentra plegada formando las vellosidades intestinales. La monocapa de células epiteliales que recubre las vellosidades son células polarizadas que presentan una membrana apical con el borde en cepillo debido a la presencia de microvellosidades en su superficie. Las vellosidades y las microvellosidades intestinales incrementan de forma sorprendente la superficie de digestión y absorción de nutrientes.

Figura adaptada de [https://online.science.psu.edu/bisc004\\_activewd001/node/1805](https://online.science.psu.edu/bisc004_activewd001/node/1805).

## **Introducción**

Las proteasas del BC se localizan a lo largo de todo el intestino delgado, pero están distribuidas de forma desigual. Sus patrones de expresión, secreción y actividad sugieren que la importancia de estas enzimas es mayor en el yeyuno y el íleon intestinal que en el duodeno, a excepción de la enteroquinasa que se expresa únicamente en el duodeno [248].

Las enzimas proteolíticas del BC son glicoproteínas que se concentran en balsas lipídicas de la membrana apical con sus centros catalíticos proyectados extracelularmente hacia la luz del intestino [249], aunque isoformas solubles se han detectado en el citosol de los enterocitos [243]. Su unión a la membrana parece desempeñar un rol protector frente a la proteólisis por las proteasas intestinales y se produce mediante secuencias hidrofóbicas transmembrana o moléculas de GPI unidas covalentemente al extremo C-t de la proteína [250]. Se ha sugerido que esta localización próxima de las enzimas digestivas a la superficie celular del BC facilita el transporte directo de los productos de la digestión enzimática al interior del enterocito.

Una proporción de estas enzimas digestivas unidas a membrana se independizan formando vesículas. Dichas vesículas se concentran habitualmente en el espacio periapical, aunque pueden diseminarse por la luz intestinal e incluso ser solubilizadas por la acción de las secreciones biliares para la liberación de las proteasas. Cabe decir que el prominente glicocálix que recubre el borde en cepillo retrasa la difusión de gran parte de estas vesículas, incrementando así la hidrólisis local de los sustratos proteicos en una posición próxima a la membrana apical que maximice su transporte al citosol del enterocito [243].

La superficie luminal de los enterocitos es especialmente rica en actividad aminopeptidasa, complementando funcionalmente la actividad CP presente en el jugo pancreático. Además, también se localizan enzimas con actividad dipeptidasa, endopeptidasa y CP, como la CPO humana [248],[251] (**tabla 8**). Las proteasas digestivas del BC participan en la última etapa de la digestión de los productos de la fase luminal generando aminoácidos libres, dipéptidos y tripéptidos que puedan ser transportados al citosol de los enterocitos mediante sistemas de transporte específicos.

### **3.2.3 Fase intracelular de los enterocitos**

Los tripéptidos, dipéptidos y aminoácidos libres generados por las proteasas digestivas del BC son transportados al interior del enterocito. Las dipeptidasas y tripeptidasas citoplasmáticas hidrolizan los dipéptidos y tripéptidos, respectivamente, a aminoácidos libres. Concretamente, la aminotripeptidasa escinde aminoácidos del extremo N-t de los tripéptidos y la iminopeptidasa (prolidasa) hidroliza la Pro o la hidroxiprolina N-t de dipéptidos [252],[253].



## ***Introducción***

La Pro es un residuo especialmente resistente a la hidrólisis por las proteasas intestinales, de manera que la mayoría de tripéptidos y dipéptidos generados en el BC y transportados al citosol del enterocito aún contienen este aminoácido y son degradados por la acción de la iminopeptidasa [254] (**figura 22**).

Otras peptidasas intracelulares en el enterocito participan en la degradación de los péptidos transportados, pero apenas han sido caracterizadas. Con la fase intracelular culmina el proceso de digestión enzimática de las proteínas a sus aminoácidos componentes para, finalmente, ser transportados a través de transportadores específicos de la membrana basolateral a la circulación portal hepática para su distribución sistémica [255]. Sin embargo, aunque la mayoría de aminoácidos libres absorbidos por los enterocitos y transportados a través de la membrana basolateral (LBM) entran intactos en la circulación portal, otros como el Glu, el Asp, la Gln y la Arg, sufren una importante conversión metabólica en otros compuestos y sus concentraciones en sangre son muy bajas [256],[257].

Por último, cabe mencionar que, aunque la digestión proteica es un proceso muy eficiente, ciertos péptidos bioactivos (PBs) son muy resistentes a la proteólisis en el ambiente gástrico e intestinal, y pueden realizar sus acciones localmente en el sistema gastrointestinal. Otros, penetran intactos la mucosa intestinal empleando vías paracelulares a través de las uniones estrechas entre las células epiteliales, la difusión pasiva a través de los enterocitos, la endocitosis y el transporte mediado por transportadores específicos, como por ejemplo el PepT1 [258]. Una vez absorbidos, son distribuidos a través de la circulación portal hepática para ejercer una amplia variedad de funciones fisiológicas en el cuerpo humano. Algunas de las funciones relacionadas con los PBs son: antihipertensivos, antimicrobianos, antioxidantes, agentes antitrombóticos, motilidad, secreción y absorción intestinal, inmunomoduladores, etc. [259].

Muchos de los PBs proceden de proteínas de origen animal o vegetal, que encriptan éstos péptidos en su estructura para su posterior liberación tras la proteólisis enzimática en el intestino. Algunos de los productos que contienen estas proteínas precursoras de PBs son la leche, el queso, gelatina, huevos, carne, pescado, el trigo, el arroz, la soja, etc. [260]. Sin embargo, los PBs también pueden ser producidos de forma endógena, como por ejemplo el EGF que es secretado por las glándulas salivales y las glándulas de Brunner del duodeno intestinal [261].

## Introducción

**Tabla 8. Principales proteasas del EC en los enterocitos del intestino delgado.**

Enzima	Número EC	Nombre alternativo	Especificidad de sustrato
<b><i>Exopeptidasas: N-t</i></b>			
Aminopeptidasa A	EC 3.4.11.7	Glutamil-peptidasa; Aspartato aminopeptidasa	Asp y Glu N-t
Aminopeptidasa B	EC 3.4.11.6	Arginil-aminopeptidasa	Lys y Arg N-t
Aminopeptidasa N	EC 3.4.11.2	Alanil-aminopeptidasa (de membrana)	Residuos N-t, pref. Ala
Aminopeptidasa P	EC 3.4.11.9	Prolina aminopeptidasa	Residuos N-t, incluido X <sub>aa</sub> -Pro
Aminopeptidasa W	EC 3.4.11.16	X-Trp aminopeptidasa	Residuos N-t unidos a Trp (Tyr o Phe)
Dipeptidil peptidasa IV	EC 3.4.14.5	Dipeptidil-aminopeptidasa IV	Residuos N-t de X <sub>aa</sub> -Pro
γ-glutamil transferasa	EC 2.3.2.2	γ-glutamil transpeptidasa	γ-glutamato N-terminal
<b><i>Exopeptidasas: C-t</i></b>			
Carboxipeptidasa G	EC 3.4.19.9	γ-glutamil carboxipeptidasa	γ-glutamato C-terminal
Carboxipeptidasa M	EC 3.4.17.12	Carboxipeptidasa urinaria B Carboxipeptidasa renal B	Lys y Arg C-t
Carboxipeptidasa P	EC 3.4.17.16		Residuos C-t de X <sub>aa</sub> -Pro
Carboxipeptidasa O	EC 3.4.17.-	Metalo-carboxipeptidasa C	Glu y Asp C-t
Enzima convertidora angiotensina-1	EC 3.4.15.1	Peptidil-dipeptidasa A; peptidasa P	Residuos C-t de X <sub>aa</sub> -Y <sub>aa</sub> X <sub>aa</sub> ≠ Pro; Y <sub>aa</sub> ≠ Glu y Asp
Enzima convertidora angiotensina-2	EC 3.4.17.23		Residuos C-t (Phe o Leu)
Glutamato carboxipeptidasa II	EC 3.4.17.21	Dipeptidil-peptidasa del íleon	Glu C-t de péptidos Ac-Asp-Glu, Asp-Glu and Glu-Glu
<b><i>Endopeptidasas</i></b>			
Meprina A	EC 3.4.24.18	Endopeptidasa-2; PABA	Enlace C-t de residuos hidrofóbicos
Meprina B	EC 3.4.24.63		Especificidad amplia
Nepilisin	EC 3.4.24.11	Endopeptidasa-24.11; Endopeptidasa neutral	Enlace N-t de residuos hidrofóbicos
Enteroquinasa	EC 3.4.21.9	Enteropeptidasa	Activación tripsinógeno (Lys6-Ile7)
<b><i>Dipeptidasas</i></b>			
Dipeptidasa I	EC 3.4.13.19	Dipeptidasa de membrana	Dipéptidos con una especificidad amplia

Adaptada de [300].



## ***OBJETIVOS***

---



### OBJETIVOS

El laboratorio de Ingeniería de Proteínas y Proteómica del Instituto de Biotecnología y Biomedicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, cuenta con una amplia experiencia investigadora en el estudio de las MCPs y de sus inhibidores.

En este contexto, el objetivo general de esta tesis consiste en profundizar en el conocimiento existente acerca de la estructura, actividad enzimática y función de dos MCPs de la familia M14 con especificidad de sustrato tipo ácido: la hCCP6 y la hCPO humanas.

Para cada capítulo, nos hemos propuesto los siguientes objetivos específicos:

#### Capítulo I

- Producir de forma recombinante la hCCP6 en su conformación nativa, en su forma soluble y estable, y en cantidades suficientes que nos permitan llevar a cabo estudios estructurales. Para ello, se evaluarán diferentes sistemas de expresión de proteínas recombinantes: *E. coli*, células de insecto Sf9 infectadas por baculovirus o células de mamífero HEK293 F.
- Purificar la hCCP6 recombinante obtenida en estos sistemas de expresión y verificar la presencia de actividad enzimática *in vitro* usando tubulina purificada de cerebro porcino como sustrato.
- Modelar la estructura de la hCCP6 empleando como referencia la estructura 3D de la PaCCP, con el fin de identificar los residuos del centro activo relacionados con la actividad enzimática, y aquellos importantes para determinar la especificidad de sustrato tipo ácido de la hCCP6.
- Elucidar la preferencia de sustrato de la hCCP6 por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina, usando como sustrato tubulina artificialmente poliglutamilada *in vitro* en ambas subunidades por la TTLL6.
- Estudiar la especificidad de sustrato y procesividad de la hCCP6 por residuos ácidos C-t, usando teluquinas recombinantes modificadas con extensiones de longitud variable de Glu o Asp C-t.
- Identificar moléculas capaces de inhibir eficazmente la actividad enzimática de la hCCP6 *in vitro*.

### Capítulo II

- Construir una variante de la hCPO ( $hCPO\Delta C$ ) sin su región C-t (modificada por GPI), para facilitar la producción recombinante de la proteína en su forma soluble.
- Expresar la  $hCPO\Delta C$  en células de mamífero HEK293 F, con el fin de obtener grandes cantidades de la proteína recombinante, y en su conformación nativa y estable.
- Purificar la proteína recombinante obtenida y estudiar la actividad enzimática de la  $hCPO\Delta C$  usando el sustrato sintético FA-EE.
- Determinar las constantes de inhibición ( $K_i$ ) para los complejos de la  $hCPO\Delta C$  con distintos inhibidores exógenos proteicos de MCPs, incluido el NvCI.
- Obtener la estructura tridimensional de la  $hCPO\Delta C$  en complejo con el inhibidor NvCI mediante cristalografía de rayos X.
- Estudiar los residuos del centro activo de la  $hCPO\Delta C$  a partir de su estructura cristalina e identificar las características estructurales que determinan su preferencia de sustrato por residuos ácidos C-t.
- Investigar los elementos estructurales importantes para la inhibición de la  $hCPO\Delta C$  por el NvCI.
- Estudiar la preferencia de sustrato de la  $hCPO\Delta C$  frente a residuos ácidos C-t, empleando como sustrato modelo dos péptidos sintéticos con Glu o Asp en posición C-t
- Estudiar la capacidad de la  $hCPO\Delta C$  para degradar el EGF en presencia de otras MCPs digestivas (CPA y CPB), como modelo de péptido bioactivo presente *in vivo* en el tracto gastrointestinal.

# ***CAPITULO I***

---

## ***Caracterización de la CCP6 humana***





### 1 INTRODUCCIÓN

Las metalo-carboxipeptidasas (MCPs) son enzimas dependientes de zinc que catalizan la hidrólisis secuencial de aminoácidos C-t de péptidos y proteínas [30]. Según la base de datos MEROPS, la familia más numerosa de MCPs corresponde a las proteasas de la familia M14 [262]. En el año 2007, se identificó una nueva subfamilia de MCPs de la familia M14 denominada M14D o carboxipeptidasas citosólicas (CCPs) [32],[68]. Desde entonces, el estudio de estas peptidasas se ha limitado principalmente a la caracterización funcional de las CCPs de ratón y de otros organismos modelo, mediante ensayos *in vitro* de actividad enzimática y el uso de animales deficientes en genes codificantes para las distintas CCPs. En la actualidad, la información estructural y funcional relativa a estas enzimas sigue siendo muy limitada, especialmente para las CCPs humanas.

El genoma humano y de ratón codifica para 6 CCPs denominadas CCP1-CCP6 (en adelante, hCCPs o mCCPs) según el orden en el que fueron descubiertas, y corresponden a proteínas multidominio de gran tamaño con una gran heterogeneidad estructural. No obstante, las CCPs tienen en común un pro-dominio N-t con un plegamiento  $\beta$ -sándwich exclusivo de esta subfamilia, yuxtapuesto al dominio catalítico CP, este último con un plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa conservado en todos los miembros de la familia M14 de las MCPs. En contraste con su heterogeneidad estructural, las CCPs de mamíferos presentan una especificidad de sustrato común tipo-O, con una clara preferencia por la hidrólisis de enlaces peptídicos de residuos ácidos C-t.

A nivel molecular, las CCPs se definen como enzimas con actividad de glutamilasa que catalizan la escisión de los Glu codificados genéticamente en el extremo C-t de la  $\alpha$ -tubulina previamente detirosinada generando  $\Delta 2$ - y  $\Delta 3$ - $\alpha$ -tubulina, y la de glutamilación de la cadena lateral de Glu generada post-traduccionalmente en la región C-t de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina. Además de modificar la tubulina, las CCPs también son capaces de actuar sobre otros sustratos endógenos como las proteínas MLCK1 y la telocquina [124],[125]. Aunque su actividad de glutamilasa ha sido vastamente estudiada, la capacidad de estas enzimas de hidrolizar Asp C-t en sustratos proteicos no ha sido explorada hasta hace muy poco. Recientemente se ha demostrado que la hCCP1 [27] y mCCP3 [125] corresponden a enzimas con actividad de aspartilasa, revelando una nueva actividad enzimática adicional distinta de la de glutamilación no descrita hasta la fecha para los miembros de esta subfamilia,.

Las modificaciones post-traduccionales (MPTs) actúan como señales químicas reguladoras que controlan la estabilidad, localización, actividad y funcionalidad de las proteínas. La cola C-t de la tubulina sufre múltiples MPTs, que incluyen la de glutamilación/poliglutamilación y de glicilación/poliglicilación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la

## Capítulo I

tubulina, la tirosinación y detirosinación de la  $\alpha$ -tubulina, y el procesamiento proteolítico de los Glu C-t de la  $\alpha$ -tubulina para la generación de  $\Delta 2$  y  $\Delta 3$ - tubulina. Estas MPTs están expuestas en la superficie externa de los microtúbulos (MTs) y permiten el reconocimiento e interacción de proteínas interactoras tipo MAPs, +TIPs y proteínas motoras que modulan la dinámica y funcionalidad de los MTs.

Los niveles de glutamilación en la tubulina de los MTs están estrictamente regulados a nivel celular y dependen de la actividad balanceada entre las enzimas que incorporan y eliminan (CCPs) Glu en las cadenas laterales de poli-E generadas en la región C-t terminal de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del heterodímero.

Las enzimas que catalizan la reacción inversa, la glutamilación de la tubulina y otros sustratos celulares, se engloban dentro de la extensa familia de proteínas similares a la tirosina ligasa de la tubulina (TTLLs) [219],[220],[221],[222]. Recientemente, la caracterización enzimática de la familia de las TTLL reveló un total de 7 glutamilasas activas, con distintas especificidades de sustrato frente a la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina y que difieren en sus preferencias por las reacciones de iniciación o elongación de la cadena lateral de Glu [221].

En este trabajo, presentamos la caracterización bioquímica y funcional de la CCP6 humana (hCCP6), que constituye la CCP modelo para el estudio de esta subfamilia de MCPs humanas gracias a su reducido tamaño y simplicidad estructural respecto a los otros miembros de la subfamilia M14D. Como punto de partida, estudiamos la producción recombinante de la hCCP6 en tres sistemas de expresión distintos para la obtención de cantidades suficientes de la proteína en su conformación soluble, estable y activa que nos permitiesen realizar estudios de caracterización estructural. En paralelo, llevamos a cabo estudios funcionales de la hCCP6 orientados a la caracterización de su actividad *in vitro*. Mediante distintas aproximaciones experimentales, analizamos la capacidad de la hCCP6 para generar MPTs en la región C-t de la tubulina, su especificidad enzimática respecto a las subunidades del heterodímero de tubulina y residuos ácidos C-t, y la capacidad inhibitoria de varias moléculas de la actividad proteolítica de la enzima. Los resultados obtenidos han confirmado la actividad de glutamilasa de la hCCP6, así como su capacidad de procesar cadenas largas de poliglutámicos (poli-E). Sorprendentemente, nuestros resultados han revelado una clara preferencia de la hCCP6 por la de glutamilación de una de las subunidades del heterodímero de tubulina ( $\alpha$ ), junto a una potencial actividad de aspartilasa. Además, mediante estudios de inhibición hemos podido identificar el ácido fólico como un nuevo inhibidor capaz de inhibir la hCCP6. Esto último nos hace pensar que este compuesto podría estar implicado en la inhibición de las CCPs eucariotas, en general. A pesar de estos resultados, futuros estudios serán necesarios para validar nuestros descubrimientos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Producción recombinante de la CCP6 humana en células HEK293 F

Los plásmidos recombinantes pTriEx-6 (Novagen) clonados con el cADN codificante para la hCCP6 (Uniprot: Q5VU57) y el mutante catalíticamente inactivo hCCP6 E401Q (equivalente al E270 en la bCPA activa [125],[170],[263]) fueron obtenidos según se describe en [264]. Ambas proteínas recombinantes contienen en su extremo N-t las etiquetas Strep-tag® II [265] y el epítipo de la hemaglutinina (HA), que permiten la purificación e inmunodetección de la proteína recombinante.

Para la producción transitoria de la hCCP6 y la hCCP6 E401Q, mezclamos los correspondientes vectores con polietilenimina lineal de 25 kDa (PEI, Polysciences) en una proporción ADN:PEI de 1:3 (p/p) en medio FreeStyle 293 (Life Technologies). A continuación, incubamos la mezcla durante 20 min a temperatura ambiente para favorecer la formación de los complejos de transfección ADN-PEI y añadimos la mezcla de transfección a razón de 1 µg de ADN por ml de cultivo. Inicialmente, realizamos transfecciones de 30 ml de cultivo de células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293 F, Life Technologies) crecidas en suspensión con una densidad celular de  $1 \cdot 10^6$  cels/ml en medio FreeStyle 293 (sin suero). Finalmente, incubamos los cultivos durante 60 h para la sobreexpresión intracelular de la proteína en un agitador rotatorio a 120 rpm, 37°C, 8% de CO<sub>2</sub> y 80% de humedad. De forma análoga, establecimos cultivos de células HEK293 F transfectados con el vector pTriEx-6 vacío, como control negativo de la síntesis de la proteína recombinante de interés.

Tras 60 h de expresión, centrifugamos los cultivos a 294 xg durante 10 min a temperatura ambiente y descartamos el medio sobrenadante. Las células recogidas en el pellet fueron lavadas dos veces con tampón fosfato salino, pH 7,4, (PBS, Life Technologies) y resuspendidas en el volumen correspondiente a la décima parte del volumen inicial del cultivo con tampón de lisis 100 mM (tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl, Sigma-Aldrich), pH 8, 150 mM cloruro de sodio (NaCl, Sigma-Aldrich) y 0,1% (p/v) Nonidet-P40 (NP-40, Sigma-Aldrich) y 1:000 (v/v) del cóctel de inhibidores de proteasas sin EDTA (EMD Millipore). Después, incubamos las células durante 30 min en hielo y las lisamos empleando 3 ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 37°C. Finalmente, los extractos celulares fueron centrifugados a 16,000 xg durante 15 min a 4°C para la clarificación de los extractos celulares y, finalmente, cuantificamos la concentración de proteína de las fracciones solubles por el método de Bradford [298], empleando la albúmina de suero bovina (BSA, Sigma) como proteína estándar.

## Capítulo I

Las fracciones solubles e insolubles se conservan para su posterior análisis mediante electroforesis SDS-PAGE y *western blot* (ver apartado 2.4).

### 2.2 Producción recombinante de la CCP6 humana en *E. coli*

Transformamos mediante choque térmico a 42°C el plásmido recombinante pTriEx-6 clonado con el cADN codificante para la hCCP6 en células competentes de *Escherichia coli* (*E. coli*) de dos cepas distintas: Rosetta (DE3) (Novagen) y BL21 (DE3) cc5 [266]. A partir de una colonia transformante seleccionada en placas de Luria-Bertani (LB) agar suplementado con 100 µg/ml de ampicilina (Roche), establecimos un pre-inóculo en medio líquido LB con antibiótico crecido a 37°C y en agitación a 250 rpm durante 16 h.

A continuación, inoculamos una décima parte del pre-inóculo en 30 ml de medio líquido LB suplementado con antibiótico, y crecimos el cultivo a 37°C y en agitación a 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica ( $\lambda=600$  nm) de 0,6 unidades de absorbancia (u.a). En ese momento indujimos la expresión de la proteína recombinante con 1 mM de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Sigma-Aldrich) e incubamos los cultivos a diferentes temperaturas (18°C y 37°C) post-inducción para la sobreexpresión intracelular de la proteína durante 2h y 30 min. En paralelo, para cada cepa, establecimos en las mismas condiciones cultivos líquidos no inducidos con IPTG de células transformadas con el vector recombinante, como control de la actividad basal transcripcional de la hCCP6, y cultivos de células transformadas con el vector vacío pTriEx-6, como control negativo de la síntesis de la proteína recombinante de interés.

Finalizado el tiempo expresión, centrifugamos los cultivos a 3500 xg durante 20 min a temperatura ambiente y descartamos el medio. Las células recogidas en el pelet fueron lavadas dos veces en PBS, pH 7,4, y resuspendidas en el volumen correspondiente a la quinta parte del volumen inicial del cultivo con el tampón de lisis comercial „BugBuster®“ (EMD Millipore) suplementado con lisozima (1mg/ml) y con 1:1000 (v/v) del cóctel de inhibidores de proteasas SetIII sin EDTA. Para la lisis, incubamos las células durante 30 min en hielo y las sonicamos con la ayuda del sonicador Branson S-450 (Biogen), empleando una amplitud del 40% y 3 ciclos de 30 s de duración con intervalos de ON/OFF de 5 s. Finalmente, los extractos celulares fueron centrifugados a 16,000 xg durante 15 min a 4°C, y la concentración de proteína total presente en las fracciones solubles fue cuantificada por el método de Bradford [267], empleando la albúmina de suero bovina (BSA, Sigma) como proteína estándar. Las fracciones solubles e insolubles obtenidas se conservaron para su posterior análisis mediante electroforesis SDS-PAGE y *western blot* (ver apartado 2.4).

### 2.3 Producción recombinante de la CCP6 humana en células Sf9

Para llevar a cabo la expresión recombinante de la hCCP6 en células de insecto Sf9 clonamos el gen de la enzima en un nuevo vector, el pFastBac1. En primer lugar, amplificamos por PCR la secuencia codificante para la hCCP6 con las etiquetas de fusión Strep-tag® II y HA en su extremo N-t, usando como molde el vector recombinante pTriEx-6 empleado anteriormente para la producción de la hCCP6 en células HEK293 F y *E. coli*, la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (New England Biolabs) y los oligonucleótidos cebadores sentido 5'-ATCGGAATTCATGGCAAGCTGGAGCCACC-3' y antisentido 5'-ATCGCTCGAGCTAAAAGGGGTTGAAGGGTCC-3, que contienen las dianas de restricción EcoRI y XhoI, respectivamente. El producto de PCR obtenido en este paso se clonó entre las dianas EcoRI y XhoI en el vector pFastBac1 (Life Technologies) y, finalmente, verificamos mediante análisis de restricción y secuenciación que el clonaje había funcionado correctamente.

La generación de baculovirus (BVS) recombinantes para la síntesis de hCCP6 en células derivadas de tejido ovárico pupal del insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf9, Life Technologies) se realizó empleando el sistema Bac-to-Bac® (Life Technologies), siguiendo las instrucciones proporcionados por el fabricante. Brevemente, transformamos mediante choque térmico a 42°C el vector pFastBac1 recombinante en células competentes de *E. coli* DH10Bac, para la transposición dirigida del *cassette* de expresión que contiene el cADN codificante para la hCCP6 desde el vector pFastBac1 al genoma modificado (bácmido) del BVS nucleopoliedrovirus multicápside de *Autographa californica* (AcMNPV).

Las células transformantes se seleccionaron en placas de LB agar suplementadas con 50 µg/ml de kanamicina, 7 µg/ml de gentamicina, 10 µg/ml tetraciclina, 100 µg/ml de X-Gal y 40 µg/ml de IPTG, tras 48 h. de incubación a 37°C. A continuación, inoculamos colonias blancas en cultivos líquidos de medio LB suplementado con 50 µg/ml de kanamicina, 7 µg/ml de gentamicina y 10 µg/ml tetraciclina, y los crecimos durante 16 h a 37°C y 250 rpm. Seguidamente, centrifugamos los cultivos a 3500 xg durante 15 min y aislamos el bácmido empleando el kit de midiprep „GenElute HP Plasmid DNA Midiprep’ (Sigma-Aldrich).

La verificación de la transposición del *cassette* de expresión en el bácmido purificado se realizó mediante PCR empleando los cebadores sentido y antisentido pUC/M13 proporcionados por el fabricante y la ADN polimerasa Phusion®. Confirmada la transposición, generamos los BVS recombinantes transfectando el bácmido recombinante en cultivos de 30 ml de células de insecto Sf9 crecidas en suspensión a una densidad celular de  $1 \cdot 10^6$  células/ml en medio Insect-XPRESS™ suplementado con L-glutamina (Lonza). Para la transfección, empleamos el agente de transfección FuGene HD (Roche) y seguimos las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

## Capítulo I

Finalmente, tras varias rondas de amplificación y titulación de los BVS recombinantes mediante ensayo en placa, se alcanzó un título vírico del orden de  $10^8$  pfu/ml, óptimo para realizar las primeras pruebas de expresión.

Para la producción recombinante de la hCCP6, infectamos a distintas (1, 2, 5 y 10 pfu/ml) multiplicidades de infección (MOI) cultivos de 30 ml de células de insecto Sf9 crecidas en suspensión a una densidad celular de  $1 \cdot 10^6$  cels/ml en medio Insect-XPRESS™ suplementado con L-glutamina, e incubamos los cultivos a 27°C y en agitación a 110 rpm durante 24, 48 y 72h post-infección. En paralelo, preparamos cultivos de células Sf9 infectados por BVS no recombinantes, como control negativo de la síntesis de la proteína recombinante de interés.

Transcurridos los tiempos de expresión establecidos, centrifugamos los cultivos a 294 xg durante 10 min a temperatura ambiente y conservamos el medio de expresión para su posterior análisis. Las células recogidas en el pelet fueron lavadas dos veces con PBS, pH 7,4, y resuspendidas en el volumen correspondiente a la décima parte del volumen inicial del cultivo con tampón de lisis (100 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0,1% (p/v) NP-40 y 1:1000 del cóctel de inhibidores de proteasas Set III sin EDTA. Seguidamente, incubamos las células durante 30 min en hielo y lisamos las células empleando 3 ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 37°C. Finalmente, los extractos celulares obtenidos fueron centrifugados a 16,000 xg durante 15 min a 4°C para la clarificación de los extractos celulares, y cuantificamos la concentración de proteína de las fracciones solubles por el método de Bradford [267], empleando la albúmina de suero bovina (BSA, Sigma) como proteína estándar. Las fracciones solubles, insolubles y los medios extracelulares obtenidos se conservaron para su posterior análisis mediante electroforesis SDS-PAGE y *western blot* (ver apartado 2.4).

### 2.4 Análisis de la expresión de la CCP6 humana

Para realizar el análisis de la expresión de la hCCP6 en las diferentes muestras, empleamos las técnicas de electroforesis SDS-PAGE y *western blot* con anticuerpos específicos. En un experimento típico, 30 µg de proteína total de las fracciones solubles y 15 µl de las fracciones insolubles fueron cargados en el gel. En el caso de la producción en células Sf9, analizamos también 15 µl de cada uno de los medios de expresión. Las muestras se prepararon en tampón de muestra (5X) (250 mM Tris-HCl, pH 8, 25% glicerol (Sigma-Aldrich), 7,5% (p/v) SDS (Sigma-Aldrich), 0,25 mg/ml azul de bromofenol (Sigma-Aldrich) y 12,5% (v/v) β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)) y hervidas a 95°C durante 5 minutos. Seguidamente, resolvimos las muestras por duplicado en un minigel de SDS-PAGE empleando un módulo de electroforesis vertical mini-Protean® (Bio-Rad) y un voltaje

## Capítulo I

continuo de 120 V durante 60 min. Los geles empleados contienen un gel separador al 10% de poliacrilamida en tampón 125 mM Tris-HCl, pH 8,8, y 0.1% (p/v) SDS, y un gel apilador al 4% de poliacrilamida en tampón 375 mM Tris-HCl, pH 6,8, y 0.1% (p/v) SDS. El tampón de migración en el que se realizó la electroforesis corresponde al tampón Tris-glicina (Tris-Gly) (25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM glicina (Sigma-Aldrich) y 0,1% (p/v) SDS) y el marcador de proteínas usado es el „EZ-Run™ Prestained Rec Protein Ladder’ (Fisher Scientific).

Finalizada la electroforesis, teñimos los geles con azul de Coomassie G-250 para la visualización de las bandas proteicas, y transferimos las proteínas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Immobilon-P, EMD Millipore) para la inmunodetección específica de la hCCP6 recombinante y de la tubulina poli-E. La transferencia se realizó a un voltaje constante de 100 V durante 90 min y a 4°C, en tampón Tris-Gly, pH 8,3, con un 10% (v/v) de metanol y con la ayuda de un módulo para la transferencia en húmedo Mini Trans-Blot® (Bio-Rad). A continuación, bloqueamos las membranas durante 1 h a temperatura ambiente con una solución de leche desnatada al 5% (p/v) en tampón PBS, pH 7,4, suplementado con un 0,05% (v/v) del detergente Tween-20 (Bio-Rad) (tampón PBS-T). Tras 4 lavados de 10 min a temperatura ambiente con PBS-T, incubamos las membranas durante 1 h a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos primarios preparados en leche 2% (p/v) PBS-T: anti-HA (1:5000, Bio-Rad) y anti-Strep-tag® II (1:1000, IBA Technologies), ambos producidos en ratón. Finalmente, lavamos las membranas con PBS-T y las incubamos con una solución de PBS-T que contiene el anticuerpo secundario producido en cabra anti-IgG de ratón conjugado a la peroxidasa de rábano (HRP) (1:5000, Bio-Rad). La inmunoreactividad de las bandas proteicas se visualizó por quimioluminiscencia empleando el sustrato „Luminata Forte Western HRP substrate” (EMD Millipore) con la ayuda del sistema de detección VersaDoc™ (Bio-Rad).

### 2.5 Purificación de la CCP6 humana

La hCCP6 recombinante soluble producida mediante los tres sistemas de expresión (células de mamífero HEK293 F, *E. coli* y células de insecto Sf9), fue semipurificada en condiciones nativas mediante un único paso de cromatografía de afinidad usando la resina anti-Strep-tag® II. Para ello, empleamos una columna (volumen de columna (CV) = 1 ml) empaquetada con resina „Strep-tactin® MacroPrep®” (IBA Technologies) y conectada al sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) ÄKTA™ Purifier 100 (GE Healthcare). Inicialmente, equilibramos la columna con 5 CV del tampón de unión W (100 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl) y, seguidamente, inyectamos las fracciones solubles obtenidas a partir de los extractos celulares en cada sistema de expresión, previamente filtradas a través de una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm (EMD Millipore).



## Capítulo I

A continuación, lavamos la columna con 5 CV del tampón W y eluimos las proteínas unidas a la resina en fracciones de 500 µl usando el tampón de elución (tampón W suplementado con 2,5 mM destiobiotina (IBA Technologies)). Para determinar el grado de pureza en las muestras resultantes, analizamos 15 µl de cada fracción eluida mediante electroforesis SDS-PAGE, siguiendo la metodología descrita en el punto 2.4. Finalizada la electroforesis, teñimos los geles con azul de Coomassie G-250 para la visualización de las bandas proteicas, agrupamos las fracciones más puras y cuantificamos por el método de Bradford la hCCP6 semipurificada, empleando la BSA como proteína estándar.

### 2.6 Ensayo de actividad *in vitro* de la CCP6 humana purificada

Para estudiar la actividad enzimática en la hCCP6 semipurificada mediante cromatografía de afinidad anti-Strep-tag® II, preparamos reacciones que contienen 0,625 µg de tubulina purificada de cerebro porcino (Cytoskeleton, Inc.) y 0,1 µg de la hCCP6 recombinante semipurificada producida en células de mamífero HEK293 F y células de insecto Sf9. En el caso de la hCCP6 producida en *E. coli*, decidimos incrementar la cantidad de proteína recombinante semipurificada ensayada a 2 µg, ya que en estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio no se detectó actividad enzimática empleando cantidades inferiores. Como control de la especificidad enzimática, establecimos reacciones de la hCCP6 con el sustrato en presencia de 10 mM del inhibidor de MCPs 1,10-fenantrolina y del mutante hCCP6 E401Q con el sustrato. Todas las reacciones fueron ensayadas mínimo en dos ensayos independientes, en un volumen final de 50 µl en tampón de actividad 80 mM ácido piperazina-N,N"-bis(2-etanosulfónico) (PIPES), pH 6,8, e incubadas a 37°C durante 5 h.

Finalizado el período de incubación, detuvimos las reacciones de digestión con 5 µl del tampón de muestra (5X), y hervimos las muestras a 95°C durante 5 min. A continuación, separamos las proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE, siguiendo las instrucciones del apartado 2.4. Tras la electroforesis SDS-PAGE, transferimos inmediatamente las proteínas resueltas a membranas de PVDF para la inmunodetección específica de la hCCP6 recombinante y de la tubulina poli-E. Para la transferencia, seguimos también el procedimiento descrito en el apartado 2.4. La hCCP6 y el correspondiente mutante catalíticamente inactivo hCCP6 E401Q recombinantes contienen en su extremo N-t las etiquetas Strep-tag® II y HA. En este caso, los anticuerpos primarios empleados corresponden al anti-poli-E ( $\geq 3$  Glu) producido en conejo (1:5000, cedido por el Dr. M.A. Gorovsky, Departamento de Biología, Universidad de Rochester) y el anti-HA (1:5000, Sigma-Aldrich) producido en ratón.

## Capítulo I

Los anticuerpos secundarios corresponden al anti-IgG de ratón producido en cabra conjugado a HRP (1:5000, Bio-Rad) y anti-IgG de conejo producido en asno conjugado a HRP (1:5000, GE Healthcare). La inmunoreactividad de las bandas proteicas se visualizó por quimioluminiscencia empleando el sustrato „*Luminata Forte Western HRP substrate*“ (EMD Millipore) con la ayuda del sistema de detección VersaDoc™ (Bio-Rad).

### 2.7 Modelo estructural de la CCP6 humana

Con el fin de obtener un modelo tridimensional de la estructura de la hCCP6, la secuencia primaria de la hCCP6 (Uniprot: Q5VU57) fue empleada como base para realizar un modelado automático con el servidor I-TASSER [268]. Para realizar el modelo, se usó como referencia las coordenadas de la estructura cristalina de la CCP de *Pseudomonas Aeruginosa* (PaCCP) (PDB: 4A38). La estructura 3D de la PaCCP fue obtenida del Banco de Datos de Proteínas (PDB) ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). La identidad secuencial entre ambas proteínas se verificó previamente empleando la herramienta BLAST [269]. Para la validación del modelo de la hCCP6 usamos el programa ProSA-web [270], y la calidad estereoquímica del mismo se determinó con el programa RAMPAGE. La representación del modelo molecular se realizó con el programa PyMOL [148]. Por otro lado, realizamos un alineamiento múltiple de las secuencias correspondientes a los dominios catalíticos de las 6 hCCPs humanas con el programa Clustal Omega [271]. Las secuencias aminoacídicas de las hCCPs se obtuvieron de la base de datos UniprotKB/SWISS-PROT ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Código Uniprot hCCP1: Q9UPW5; hCCP2: Q5U5Z8; hCCP3: Q8NEM8; hCCP4: Q96MI9; hCCP5: Q8NDL9 y hCCP6: Q5VU57.

### 2.8 Análisis de las modificaciones post-traduccionales de la tubulina

Para estudiar la actividad de la hCCP6 en los microtúbulos, los vectores recombinantes pTriex6 (Novagen) codificantes para la hCCP6 y la hCCP6 E401Q fusionadas a las etiquetas Strep-tag® II y HA fueron transfectados en cultivos de 2 ml de células HEK293 T (Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC)) crecidas en adherencia a una confluencia del 60% en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con 4500 mg/l de glucosa, 2 mM de GlutaMAX I, 1 mM de piruvato y un 10% (v/v) de suero fetal de ternera (medio DMEM, Life Technologies). Para realizar la transfección, mezclamos 1,4 µg de los vectores recombinantes con PEI en una proporción ADN:PEI de 1:3 (p/p) en medio DMEM (sin suero). A continuación, incubamos las mezclas durante 20 min a temperatura ambiente para favorecer la formación de los complejos de transfección ADN-PEI y añadimos la mezcla de transfección a los cultivos.

## Capítulo I

Finalmente, incubamos los cultivos durante 60 h en un incubador programado a 37°C y 10% de CO<sub>2</sub>, para permitir la sobreexpresión intracelular de las proteínas. Como control negativo, preparamos cultivos de células HEK293 T transfectados con el vector pTriEx-6 vacío.

Tras 60 h de expresión intracelular, resuspendimos las células en el medio pipeteando varias veces con suavidad, y procedimos según se describe en el apartado 2.1 para la lisis celular, clarificación de los extractos celulares y cuantificación de la proteína contenida en las fracciones solubles. A continuación, analizamos mediante electroforesis SDS-PAGE 30 µg de proteína total de las fracciones solubles proteicas. En este caso en particular, seguimos un protocolo ligeramente distinto con el objetivo de poder resolver eficientemente las subunidades α y β de la tubulina [272]. En concreto, las muestras fueron preparadas en tampón de muestra (5X) (250 mM Tris-HCl, pH 8, 25% glicerol, 7,5% (p/v) SDS, 0,25 mg/ml azul de bromofenol y 12,5% (v/v) β-mercaptoetanol) y se hirvieron a 95°C durante 5 minutos.

A continuación, cargamos las muestras proteicas por duplicado en minigeles de SDS-PAGE empleando un módulo de electroforesis vertical mini-Protean® (BioRad) y separamos las proteínas aplicando un voltaje continuo de 120 V durante 60 min. Los geles empleados constan de dos partes: un gel separador con un 10% de poliacrilamida en tampón 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, y 0.1% (p/v) SDS ultrapuro (>95%, Sigma-Aldrich), y un gel apilador preparado con un 4% de poliacrilamida en tampón 375 mM Tris-HCl, pH 9, y 0.1% (p/v) SDS ultrapuro [272]. El tampón de migración utilizado corresponde al tampón Tris-Gly, pH 8,3, (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina (Sigma-Aldrich) y 0,1% (p/v) SDS ultrapuro) y el marcador de proteínas empleado en este caso fue el „EZ-Run™ Prestained Rec Protein Ladder” (Fisher Scientific).

Finalizada la electroforesis SDS-PAGE, procedimos según se describe en el apartado 2.4 para la transferencia y la inmunodetección específica de las MPTs en la región C-t de la tubulina mediante anticuerpos específicos. Los anticuerpos primarios empleados son los siguientes: anti-HA (1:5000, Sigma-Aldrich), anti-α-tubulina (1:3000, Sigma-Aldrich), anti-β-tubulina (1:3000, Sigma-Aldrich) y GT335 (1:3000, Adipogen) producidos en ratón; anti-Tyr-tubulina (1:2000, Millipore EMD) producido en rata; y anti-deTyr-tubulina (1:1000, Millipore EMD), anti-poli-G (1:1000, obsequio del Dr. M.A. Gorovsky) anti-Δ2-tubulina (1:1000, Millipore EMD) y anti-poli-E (1:5000, cedido por el Dr. M.A. Gorovsky) producidos en conejo. Los correspondientes anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-IgG de ratón producido en cabra conjugado a la HRP (1:5000, Bio-Rad), anti-IgG de conejo producido en asno conjugado a HRP (1:5000, GE Healthcare) y anti-IgG de rata producido en cabra conjugado a HRP (1:5000, GE Healthcare).

## Capítulo I

La inmunoreactividad de las bandas proteicas se visualizó por quimioluminiscencia empleando el sustrato „*Luminata Forte Western HRP substrate*“ (EMD Millipore) con la ayuda del sistema de detección VersaDoc™ (Bio-Rad).

### 2.9 Inmunocitoquímica

Cultivos de células HEK293 T crecidas en medio DMEM sobre cubreobjetos de vidrio estériles hasta alcanzar un 50% de confluencia, fueron transfectados con los vectores recombinantes codificantes para la hCCP6 y hCCP6 E401Q fusionadas a las etiquetas Strep-tag® II y HA. Las transfecciones se realizaron mínimo por duplicado, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.8. A continuación, permitimos la sobreexpresión intracelular de las proteínas, incubando los cultivos durante 24 h a 37°C y un 10% de CO<sub>2</sub>.

A las 24 h de incubación, fijamos las células empleando un método específico para la preservación del entramado de MTs celulares [273]. En resumen, este método consiste en incubar las células durante 10 min con una solución salina tamponada de Hank (HBSS) suplementada con 1 mM de ditiobis(propionato de succinimidilo) (DSP, Sigma-Aldrich). A continuación, incubamos las células durante 10 min en una solución tampón estabilizadora de MTs (MTSB) suplementado con 1 mM de DSP. Lavamos las células durante 5 min con PBS suplementado con 0,5% Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) preparado en MTSB y fijamos las células con 4% (p/v) paraformaldehído en MTSB durante 15 min. Seguidamente, realizamos un lavado de 5 min en PBS, un lavado con una solución de PBS suplementada con 100 mM de Gly y, de nuevo, un último lavado con PBS. Todos estos pasos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente y con las soluciones empleadas atemperadas a 30-35°C para asegurar la integridad de los MTs.

Tras la fijación, permeabilizamos y bloqueamos las células incubándolas durante 30 min a temperatura ambiente con una solución de 5% (p/v) BSA en tampón PBS suplementado con 0,1% (v/v) Tritón X-100. A continuación, incubamos las células durante 1 h a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos primarios preparados en 2% (p/v) BSA en tampón PBS-0,1% Tritón X-100: anti-HA (1:500, Sigma-Aldrich) producido en ratón, anti-Tyr-tubulina (1:1000, Millipore EMD) producido en rata y anti- $\Delta 2$ -tubulina (1:1000, Millipore EMD) y anti-poli-E (1:500, cedido por el Dr. M.A. Gorovsky) producidos en conejo. Seguidamente, realizamos 4 lavados de 5 min con PBS-0,1% (v/v) Tritón-X100 e incubamos las células con los siguientes anticuerpos secundarios preparados también en PBS-0,1% (v/v) Tritón-X100: Alexa Fluor® 647 anti-IgG de conejo producido en cabra (1:1000, Life Technologies), Alexa Fluor 488® anti-IgG de conejo producido en cabra (1:1000, Life Technologies) y Alexa Fluor® 633 anti-IgG de rata producido en cabra (1:1000, Life Technologies).

## Capítulo I

Tras realizar 4 lavados adicionales de 5 min con PBS-0,1% (v/v) Tritón-X100 y un último lavado con PBS, procedimos al montaje de los cubreobjetos en portaobjetos con la ayuda del reactivo *ProLong® Gold* (Life Technologies). Finalmente, las imágenes de inmunofluorescencia fueron adquiridas en un microscopio confocal invertido (Leica TCS SP5) a temperatura ambiente y usando un objetivo X63, y analizadas con el programa LAF AS Lite 1.8.1 (Leica).

### 2.10 Análisis de la actividad glutamilasa de varias TTLLs

Cuatro constructos distintos con las secuencias codificantes para versiones truncadas de la TTLL4 (TTLL4\_C639), TTLL5, TTLL6 (TTLL6\_N705) y TTLL7 (TTLL7S) fueron transfectados en cultivos de 2 ml de células HEK293 T crecidas en adherencia a una confluencia del 60% en medio DMEM, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.8. Estos constructos fueron cedidos por el Dr. Carsten Janke (Institut Curie, Francia) y la construcción de los vectores, así como la secuencia codificante para las distintas formas recortadas de las TTLLs con actividad glutamilasa testadas, se detallan en la publicación [221]. Para la co-transfección de varias TTLL glutamilasas en un mismo cultivo celular, mantuvimos invariable la cantidad de 1,4 µg de ADN total a transfectar. De forma análoga, establecimos cultivos de células HEK293 T sin transfectar como control de los niveles de poliglutamilación presentes en las células sin modificar. Las transfecciones y co-transfecciones de los constructos se realizaron como mínimo por duplicado.

Tras 48 h. de expresión, los extractos celulares fueron analizados como se describe en el apartado 2.8. Así pues, realizamos la lisis, la clarificación de los extractos, la cuantificación de la fracción soluble proteica y análisis de 30 µg de proteína total mediante electroforesis SDS-PAGE seguido de *western blot*. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-poli-E (1:5000, cedido por el Dr. M.A. Gorovsky) producido en conejo y anti-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (1:5000, GAPDH, Ambion) producido en ratón. Los anticuerpos secundarios empleados fueron los siguientes: anti-IgG de ratón producido en cabra conjugado a la HRP (1:5000, Bio-Rad) y anti-IgG de conejo producido en asno conjugado a HRP (1:5000, GE Healthcare).

### 2.11 Poliglutamilación de la tubulina endógena de células HEK293 F

Para la modificación *in vitro* de los niveles de poliglutamilación presentes en la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina endógena de células HEK293 F, 1 l. de cultivo de células HEK293 F crecidas en suspensión a una densidad celular de  $1 \cdot 10^6$  cels/ml fue transfectado con el constructo que contiene el cADN codificante para la mTTLL6\_N705 fusionada en su extremo

## Capítulo I

N-t la proteína YFP. La transfección se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 2.8.

Tras 60 h de expresión, centrifugamos los cultivos a 294 xg durante 20 min a temperatura ambiente y descartamos el medio sobrenadante. Las células recogidas en el pelet fueron lavadas dos veces con PBS, pH 7,4, y resuspendidas en tampón de lisis (50 mM ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES, Sigma-Aldrich), pH 6,8, 200 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 2 mM de ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N'-tetraacético (EGTA, Sigma-Aldrich), 1 mM de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich), 1 mM ditiotreitól (DTT, Fluka), 0,1 mM de guanosín trifosfato (GTP, Sigma-Aldrich), 0,2% (v/v) NP-40 y el cóctel de inhibidores de proteasas Set III sin EDTA), a razón de 1 ml de tampón por cada gramo de pelet húmedo. A continuación, incubamos las células durante 15 min en hielo y las sonicamos con la ayuda del sonicador Branson S-450 (Biogen), empleando una amplitud del 40% y 2 ciclos de 60 s de duración con intervalos de ON/OFF de 5 s. Finalmente, los extractos celulares fueron ultracentrifugados a 120.000 xg durante 1 h. a 4°C para la clarificación de los extractos celulares. La fracción insoluble se descartó, y la fracción soluble se reservó para la posterior purificación de la tubulina (ver **apartado 2.12**).

### **2.12 Purificación de la tubulina poliglutamilada endógena de células HEK293 F**

La tubulina endógena de células HEK293 F altamente poliglutamilada en sus subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  por la acción de la mTTLL6\_N705, se semipurificó mediante cromatografía de afinidad de intercambio aniónico empleando una columna (volumen de columna (CV) = 15 ml) con la resina de dietilaminoetil-sefarosa (DEAE-*Sepharose Fast Flow*, GE Healthcare), conectada al sistema de FPLC ÄKTA™ Purifier 100 (GE Healthcare).

En primer lugar, equilibramos la columna con 3 CV del tampón 50 mM MES, pH 6,8, 200 mM NaCl, 2 mM EGTA y 1 mM MgCl<sub>2</sub>. A continuación, inyectamos la fracción soluble que contiene la tubulina modificada, previamente filtrada a través de una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m (EMD Millipore). Seguidamente, lavamos la columna con 2 CV del tampón de equilibrado y eluimos las proteínas unidas a la resina en fracciones de 3 ml estableciendo un gradiente lineal creciente (desde a 0 a 40%) de NaCl con el tampón 50 mM MES-NaOH, pH 6,8, 1 M NaCl, 2 mM EGTA y 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Para determinar el grado de pureza, analizamos 15  $\mu$ l de cada fracción eluida mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de alta resolución para los monómeros de la tubulina, siguiendo la metodología descrita en el punto 2.8. Tras la electroforesis SDS-PAGE, teñimos los geles con azul de Coomassie G-250 para la visualización de las bandas proteicas y agrupamos las fracciones más puras. A continuación, desalamos la muestra en una columna de gel filtración HiTrap (GE Healthcare) empleando el tampón Brinkley 1980 (BRB80) (80

## Capítulo I

mM PIPES, pH 6,8, 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 mM EGTA) y cuantificamos la concentración de proteína de la muestra desalada midiendo la absorbancia a 280 nm con la ayuda del espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

### 2.13 Ensayo de la cinética de deglutamilación de la tubulina poliglutamilada

Para estudiar la actividad de la hCCP6 sobre la tubulina altamente poliglutamilada en ambas subunidades del heterodímero purificada en el apartado anterior, preparamos reacciones que contienen 0,2 µg de tubulina purificada de cerebro porcino (Cytoskeleton, Inc.) y 0,1 µg de la hCCP6 recombinante. En paralelo, incubamos 0,2 µg del sustrato con 0,1 µg de hCCP1 recombinante, como control positivo de actividad deglutamilasa asociada a ambas subunidades del heterodímero de tubulina [134]. Además, como control de la especificidad enzimática, establecimos reacciones de incubación de ambas enzimas con el sustrato en presencia de 10 mM del inhibidor de MCPs 1,10-fenantrolina (OP) y del mutante hCCP6 E401Q con el sustrato. Todas las reacciones fueron ensayadas por duplicado en un volumen final de 50 µl en tampón 80 mM PIPES, pH 6,8, e incubadas a 37°C a distintos tiempos (15, 30, 45, 60 y 120 min). La hCCP6 y hCCP1 recombinantes empleadas en los ensayos contienen en su extremo N-t las etiquetas Strep-tag® II y HA. Ambas enzimas fueron producidas en células de mamífero HEK293 F y semipurificadas mediante cromatografía de afinidad anti-Strep-tag® II. La construcción del vector recombinante que codifica para la hCCP1 se detalla en la publicación [174].

Después de la incubación, detuvimos las reacciones de digestión con 10 µl del tampón de muestra (5X) y las hervimos a 95°C durante 5 min. A continuación, analizamos 20 µl de cada muestra mediante electroforesis SDS-PAGE siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.8, para la resolución eficiente de los monómeros de la tubulina. Tras la electroforesis SDS-PAGE, procedimos a la inmunodetección de las proteínas de interés mediante *western blot*, siguiendo también las instrucciones detalladas en apartado 2.8. En este caso, los anticuerpos primarios usados fueron: anti-poli-E (1:5000, obsequio del Dr. Gorovsky) producido en conejo, anti-Strep-tag® II (1:1000, IBA Technologies) producido en ratón y anti-Tyr-tubulina (1:2000, Millipore EMD) producido en rata. Los anticuerpos secundarios empleados fueron los siguientes: anti-IgG de ratón producido en cabra conjugado a la HRP (1:5000, Bio-Rad), anti-IgG de conejo producido en asno conjugado a HRP (1:5000, GE Healthcare) y anti-IgG de rata producido en cabra conjugado a HRP (1:5000, GE Healthcare).

### 2.14 Actividad de la CCP6 humana frente a teluquinas recombinantes con diferentes residuos C-terminales

Co-transfectamos individualmente los vectores recombinantes que codifican para 6 versiones artificiales de la proteína teluquina junto al vector recombinante pTriEx-6 codificante para la hCCP6, en cultivos de 2 ml de células HEK293 T crecidas en adherencia al 50% de confluencia en medio DMEM, según el protocolo descrito en el apartado 2.8. De forma análoga, co-expresamos individualmente las mismas teluquinas modificadas junto a las enzimas hCCP1 o mCCP3\_Z1670 (forma truncada de la mCCP3 enzimáticamente activa), como controles positivos de actividad deglutamilasa y deaspartilasa, respectivamente. Las proteínas recombinantes se sobreexpresaron intracelularmente durante 48 h. La hCCP6 y hCCP1 recombinantes contienen en su extremo N-t las etiquetas Strep-tag® II y HA, mientras que la mCCP3\_Z1670 presenta la proteína YFP. Las teluquinas modificadas contienen en su extremo N-t la proteína de fusión YFP y extensiones variables de residuos ácidos C-t (teluquina-GED y teluquina-GE[E]<sub>n</sub>, donde n=1-5). La construcción del vector recombinante que codifica para la hCCP1 se detalla en [27], y la generación de los vectores codificantes para la mCCP3\_Z1670 recombinante y las distintas versiones artificiales de las teluquinas se describe en [125].

Tras 48h de expresión, seguimos las instrucciones detalladas en el apartado 2.8 para la lisis celular, el fraccionamiento, cuantificación de la proteína soluble y análisis de 30 µg de proteína total mediante electroforesis SDS-PAGE de alta resolución para los monómeros de la tubulina, seguido de *western blot*.

En este caso, los anticuerpos primarios usados fueron: anti-poli-E (1:5000, obsequio del Dr. M.A. Gorovsky) producido en conejo, anti-HA (1:5000, Sigma-Aldrich) producido en ratón, anti-proteína fluorescente verde (GFP, 1:5000, Torrey Pines Biolabs) producido en conejo, anti-Δ2-tubulina (1:1000, Millipore EMD) producido en conejo y anti-poli-E (1:5000, cedido por el Dr. M.A. Gorovsky) producido en conejo. Los anticuerpos secundarios empleados fueron los siguientes: anti-IgG de ratón producido en cabra conjugado a la HRP (1:5000, Bio-Rad) y anti-IgG de conejo producido en asno conjugado a HRP (1:5000, GE Healthcare).

### 2.15 Ensayos de inhibición de la CCP6 humana

Para el estudio *in vitro* del efecto de diferentes compuestos químicos e inhibidores proteicos sobre la actividad de hCCP6, pre-incubamos durante 15 min y a 25°C, 0,1 µg de la hCCP6 activa producida en células de mamífero HEK293 F y semipurificada mediante cromatografía anti-Strep-tag® II, con cada uno de los siguientes inhibidores (a las



## Capítulo I

concentraciones indicadas): PCI (0,4 y 0,1 mM), NvCl (0,1 y 0,01 mM), N-(4-Aminobenzoil)-L-Glu (1 y 0,1 mM), ácido fólico (1 y 0,1 mM) o 10 mM EDTA. A continuación, añadimos a las reacciones 0,625 µg de tubulina purificada de cerebro porcino como sustrato, y las incubamos a 37°C durante 5 h. En paralelo, preparamos reacciones de la hCCP6 con el sustrato en ausencia de inhibidores para determinar los niveles iniciales de tubulina poli-E en éste. Todas las reacciones se prepararon mínimo por triplicado en un volumen final de 25 µl final en tampón de actividad 80 mM PIPES, pH 6,8, suplementado con 1/500 del cóctel de inhibidores de proteasas Set III sin EDTA (EMD Millipore).

Tras 5 h de incubación, detuvimos las reacciones de digestión con 5 µl de tampón de muestra (5X) y hervimos las muestras a 95°C durante 5 minutos. Seguidamente, analizamos 20 µl de cada muestra mediante electroforesis SDS-PAGE, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.8 para la resolución eficiente de los monómeros de la tubulina. Finalizada la electroforesis SDS-PAGE, procedimos a la inmunodetección de las proteínas de interés mediante *western blot*, siguiendo también las instrucciones detalladas en el apartado 2.8. En este caso, los anticuerpos primarios usados fueron: anti-poli-E (1:5000, cedido por el Dr. M.A. Gorovsky) producido en conejo y anti-β-tubulina (1:3000, Sigma-Aldrich) producido en ratón. Los anticuerpos secundarios usados fueron los siguientes: anti-IgG de ratón producido en cabra conjugado a la HRP (1:5000, Bio-Rad) y el anti-IgG de conejo producido en asno conjugado a HRP (1:5000, GE Healthcare).

La bandas se visualizaron mediante quimioluminiscencia usando el sustrato „*Luminata Forte Western HRP substrate*“ (EMD Millipore) con la ayuda del sistema de detección VersaDoc™ (Bio-Rad). Para calcular el porcentaje de inhibición de la actividad deglutamilasa de la hCCP6 para cada una de las moléculas testadas, cuantificamos las bandas proteicas de interés por densitometría con la ayuda del programa de análisis Quantity One® (Bio-Rad). A continuación, normalizamos los valores de poliglutamilación obtenidos para la subunidad α de la tubulina respecto al correspondiente valor de la β-tubulina. Finalmente, los valores normalizados de poliglutamilación para cada concentración de inhibidor fueron relativizados al valor normalizado de poliglutamilación calculado para el sustrato aislado, que representa el 100% de poliglutamilación.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1 Producción y purificación de la CCP6 humana**

La síntesis de proteínas recombinantes ha facilitado el estudio bioquímico, estructural y funcional de muchas proteínas poco abundantes en sus fuentes naturales. Sin embargo, no existe un único sistema de expresión idóneo para la producción de cualquier proteína recombinante, y la elección del sistema apropiado debe ser evaluado individualmente dependiendo de las propiedades bioquímicas y biológicas de la proteína de interés, de la naturaleza de los experimentos planificados y de la cantidad de proteína recombinante requerida. Los sistemas de expresión más empleados hoy en día están basados en células bacterianas y levaduras. No obstante, en los últimos años se ha extendido el uso de células de insecto infectadas por baculovirus (BVS) recombinantes y células de mamífero, como sistemas de producción para proteínas recombinantes estructuralmente complejas.

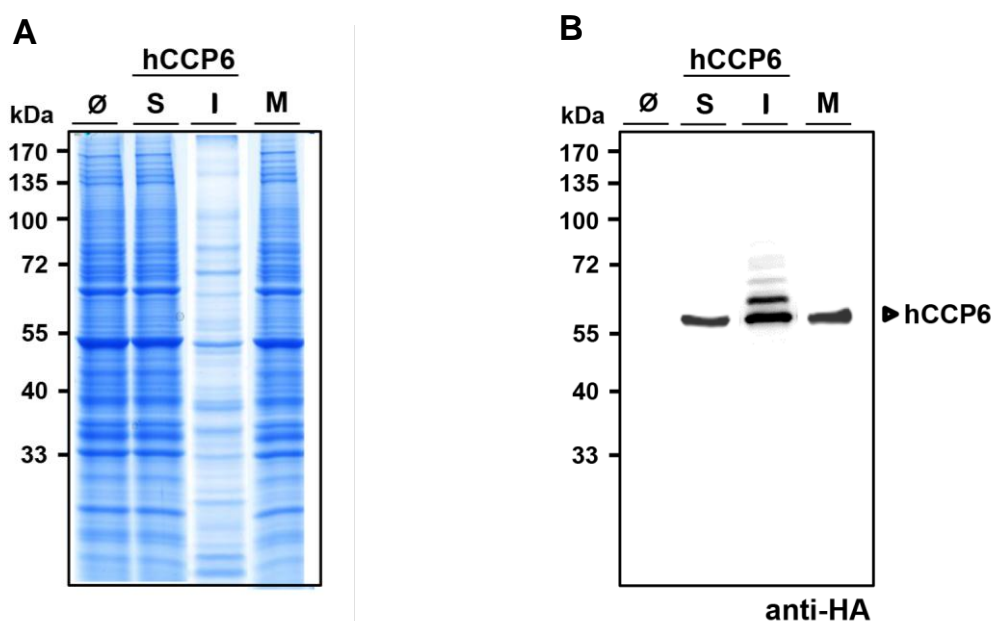
En la actualidad, no se ha conseguido determinar la estructura 3D para ninguna CCP de mamífero debido a la gran dificultad en producir estas enzimas. La obtención de grandes cantidades (>5 mg/ml) de la proteína de interés en su conformación soluble, estable, pura y homogénea son prerrequisitos imprescindibles para llevar a cabo ensayos de cristalización y resolución de la estructura 3D de la proteína mediante cristalografía de rayos X. Además, siempre que sea posible, es determinante verificar que la proteína se obtiene en su conformación nativa biológicamente activa, ya que un plegamiento proteico correcto se asocia a la presencia de actividad enzimática. A continuación, evaluamos 3 sistemas de expresión en términos de solubilidad, rendimiento y actividad enzimática con el objetivo de identificar el sistema más adecuado para la obtención de la hCCP6 recombinante, como punto de partida para llevar a cabo estudios de caracterización estructural y funcional de la proteína.

##### **3.1.1 Sistema de expresión basado en células de mamífero**

Los sistemas de expresión basados en células de mamífero han sido hasta hace unos años la opción menos popular para la producción de proteínas recombinantes debido a su baja productividad, especialmente de proteínas intracelulares. Sin embargo, las células de mamífero proporcionan el contexto de expresión adecuado para la obtención de proteínas recombinantes eucariotas que no pueden ser producidas de forma eficiente en ningún otro sistema de expresión, facilitando las chaperonas, cofactores, proteínas de unión y enzimas catalizadoras de MPTs, necesarias para el correcto plegamiento, estabilidad y funcionalidad de la proteína de interés [274].

En nuestro grupo de investigación obtenemos desde hace algunos años varias hCCPs biológicamente activas empleando células de mamífero HEK293, por lo que disponemos de protocolos optimizados para su producción. En nuestro caso, para la obtención de hCCP6, transfectamos un constructo con el cADN de la hCCP6 insertado en el vector de expresión pTriEx-6 en cultivos de células de mamífero HEK293 F crecidas en suspensión, y sobreexpresamos la proteína durante 60 h. Al mismo tiempo, transfectamos cultivos con un segundo constructo que codifica para la hCCP6 E401Q, y que es catalíticamente inactivo. En ambos casos (hCCP6 y hCCP6 E401Q), para facilitar la inmunodetección y purificación de la proteína recombinante, se incorporaron a la secuencia de las proteínas las etiquetas Strep-tag® II y el epítipo de la hemaglutinina del virus de la gripe (HA) en su extremo N-t. Además de estos constructos, como control negativo también transfectamos el vector pTriEx-6 vacío.

Para estudiar la expresión intracelular de la hCCP6, la fracción soluble proteica y la fracción insoluble de los extractos celulares fue analizada mediante 1) electroforesis SDS-PAGE seguido de la tinción de los gels con azul de Coomassie G-250 para la visualización del contenido proteico total en cada muestra analizada (**figura 24-A**), y 2) *western blot* para la inmunodetección específica de la proteína interés con el anticuerpo anti-HA (**figura 24-B**).



**Figura 24. Análisis de la expresión de la CCP6 humana en células de mamífero HEK293 F.** Electroforesis SDS-PAGE (A) y *western blot* (B) para la evaluación cualitativa del rendimiento y la calidad de la hCCP6 recombinante salvaje y el mutante catalíticamente inactivo hCCP6 E401Q producidas en células HEK293 F tras 60 h de expresión post-transfección. En cada carril cargamos 30  $\mu$ g de proteína total para las fracciones solubles de la hCCP6 salvaje (S) y del mutante hCCP6 E401Q (M) y volúmenes equivalentes de la fracción insoluble (I) de la hCCP6 salvaje. El gel de SDS-PAGE está teñido con azul de Coomassie G-250 y la inmunodetección de la hCCP6 recombinante se realizó con el anticuerpo anti-HA. El control negativo de la expresión proteica corresponde a células HEK293 F transformadas con el vector vacío pTriEx-6 ( $\emptyset$ ).

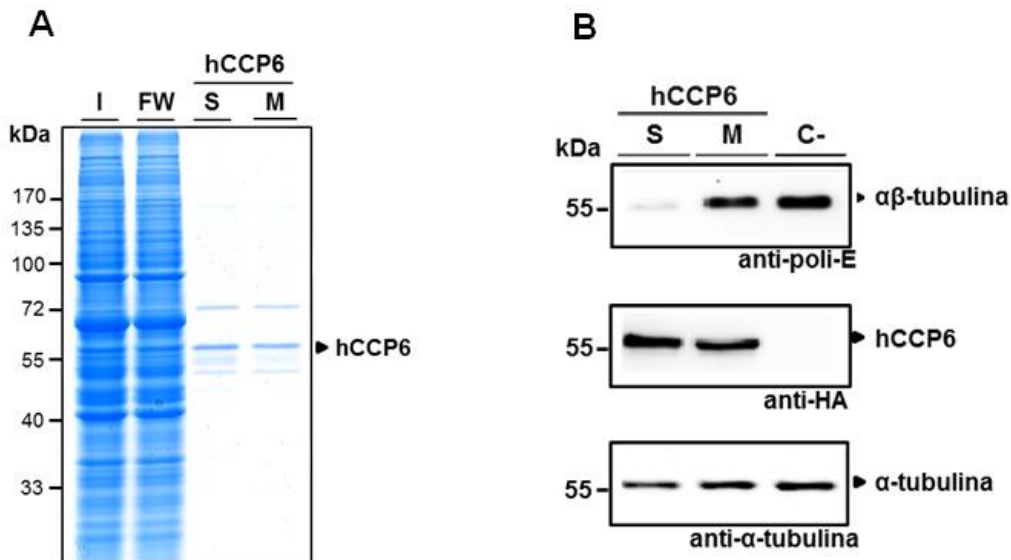
## Capítulo I

Los resultados obtenidos revelaron la presencia de una única banda proteica con el tamaño esperado (58 kDa) en la fracción soluble correspondiente a la hCCP6 (S) y hCCP6 E401Q (M) recombinantes, y la presencia de una parte de la proteína en la fracción insoluble (I) en el caso de los extractos transfectados con la hCCP6 salvaje (**figura 24-B**).

A continuación, realizamos una purificación de la hCCP6 presente en la fracción soluble mediante cromatografía de afinidad anti-Strep-tag® II. Como se muestra en el gel de la **figura 25-A**, la hCCP6 eluida se obtuvo parcialmente pura. Aunque probamos distintos pasos de purificación adicionales (cromatografía de exclusión molecular, intercambio iónico, etc.), no fuimos capaces de incrementar la pureza de la proteína debido a la baja cantidad obtenida y a la inestabilidad de ésta una vez enriquecida. Para confirmar que nuestra proteína es activa, una vez purificada, investigamos la actividad enzimática de la hCCP6 mediante ensayos *in vitro* de deglutamilación empleando tubulina purificada altamente poliglutamilada (poli-E) de cerebro porcino como sustrato. Como controles de este ensayo, preparamos dos reacciones adicionales: 1) el sustrato con la hCCP6 E401Q semipurificada para corroborar que la deglutamilación observada es específica de la hCCP6, y 2) el sustrato sin enzima para determinar los niveles iniciales de poli-E en el sustrato. A continuación, la deglutamilación de las cadenas laterales de poli-E en la tubulina catalizada por la hCCP6 fue evaluada mediante *western blot* empleando el anticuerpo anti-poli-E, que reconoce extensiones de  $\geq 3$  Glu codificados genéticamente en el extremo C-t de sus sustratos y las largas cadenas laterales de poli-E generadas post-traduccionalmente en la región C-terminal de la tubulina y otras proteínas [124].

Los resultados obtenidos muestran una clara disminución de la señal del anticuerpo anti-poli-E en las reacciones en presencia de la hCCP6 salvaje con el sustrato (hCCP6-S) respecto a los controles, lo que indica que la hCCP6 producida en células de mamífero HEK293F es activa. Debido a que esta disminución no se observó en el caso de la hCCP6 mutante (hCCP6-M) ni en el control negativo (C-) sin enzima, podemos asegurar que la hidrólisis de las cadenas de poli-E de la tubulina es debida específicamente a la actividad proteolítica de la hCCP6 (**figura 25-B**).

En conclusión, en el presente estudio hemos demostrado que el sistema de expresión basado en células de mamífero HEK293 F es apropiado para la producción de pequeñas cantidades de hCCP6 recombinante, útiles para realizar ensayos bioquímicos y funcionales. En este caso, la proteína recombinante pudo ser purificada de la fracción soluble mediante un único paso de purificación y la proteína semipurificada resultante fue útil para realizar ensayos de actividad enzimática. A pesar de que la proteína se produce en su forma soluble y es relativamente estable y activa, el bajo rendimiento del sistema es insuficiente para llevar a cabo estudios estructurales.



**Figura 25. Determinación de la actividad deglutamilasa de la CCP6 humana purificada producida en células de mamífero HEK293 F.** (A) Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie G-250 mostrando la pureza de la hCCP6 y hCCP6 E401Q solubles producidas en células HEK293 F y semipurificadas mediante cromatografía de afinidad anti-Strep-tag® II. Se muestran la fracción soluble inicial (I), la fracción proteica no-retenida en la columna (FW) y la fracción eluida con la hCCP6 salvaje (S) y el mutante hCCP6 E401Q catalíticamente inactivo (M) semipurificadas. (B) Análisis mediante *western blot* de volúmenes equivalentes de las reacciones de incubación de la hCCP6 y hCCP6 E401Q semipurificadas de HEK293 F con tubulina poli-E de cerebro porcino a 37°C durante 5 h. El control negativo (C-) corresponde a la tubulina poli-E sin enzima y permite determinar los niveles iniciales de poliglutamilación en el sustrato sin modificar. Todas las reacciones se prepararon por duplicado. El estado de glutamilación del sustrato se examinó con el anticuerpo anti-poli-E, que reconoce largas cadenas de poli-E ( $\geq 3$  Glu) en la región C-t del heterodímero de tubulina. La detección de la hCCP6 recombinante se realizó con el anticuerpo anti-HA. La  $\alpha$ -tubulina se ha empleado como control de carga del gel.

### 3.1.2 Sistema de expresión bacteriano

Los sistemas de expresión procariotas basados en la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) constituyen la estrategia más popular para la producción rápida y económica de proteínas recombinantes debido a su facilidad de manipulación y transformación, la disponibilidad de un gran número de vectores de expresión y cepas huésped mutantes, su crecimiento a alta densidad y el elevado rendimiento (~30% de la biomasa) en la síntesis intracelular de proteínas. Sin embargo, también presenta algunos inconvenientes importantes como, por ejemplo, es habitual la acumulación en cuerpos de inclusión de proteínas desplegadas o mal plegadas (especialmente de aquellas que requieren de tiempos más largos y/o chaperonas moleculares para plegarse correctamente) debido a la elevada tasa de síntesis proteica y a la incapacidad de *E. coli* para realizar la mayoría de las MPTs presentes en las proteínas eucariotas [275]. Además, la síntesis de proteínas heterólogas de membrana, de secreción o con un tamaño superior a 60 kDa son muy difíciles de expresar con éxito en *E. coli*.

## Capítulo I

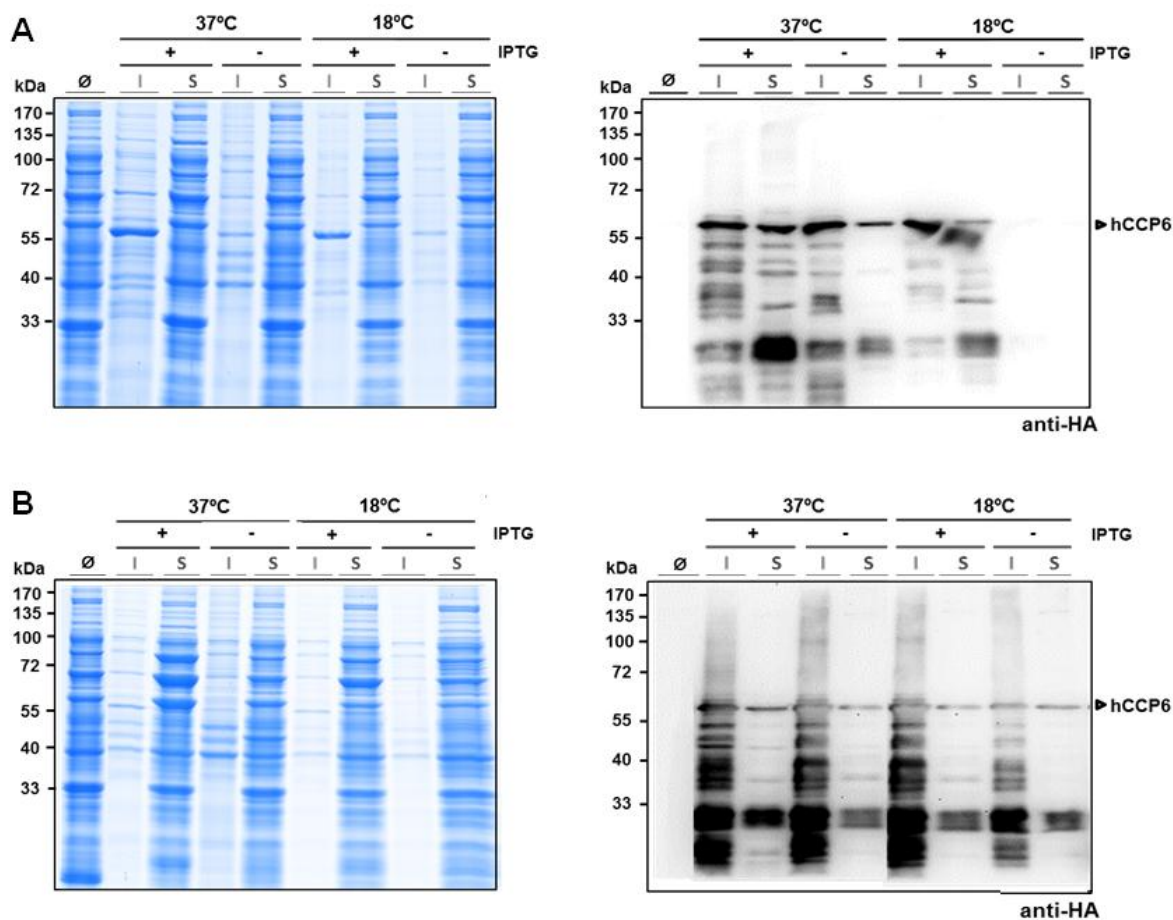
Ensayos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio sugirieron la dificultad en producir la hCCP6 en la bacteria *E. coli*. En concreto, se evaluaron distintas condiciones de expresión, como son la concentración de IPTG, la temperatura y los tiempos de expresión post-inducción en búsqueda de las condiciones óptimas de expresión para nuestra proteína de interés en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Sin embargo, en todas las condiciones ensayadas, el rendimiento obtenido en la producción de la proteína soluble fue bajo, debido a que gran parte de la proteína formaba agregados insolubles en cuerpos de inclusión y la proteína obtenida en su forma soluble estaba significativamente degradada y/o truncada (datos no mostrados).

Teniendo en cuenta esta experiencia previa, en el presente trabajo hemos intentado maximizar el rendimiento en la obtención soluble de la hCCP6 en su forma soluble mediante el uso de dos nuevas cepas de *E. coli* Rosetta (DE3) y BL21 (DE3) cc5. La síntesis de proteínas recombinantes en *E. coli* Rosetta (DE3) se recomienda para aquellas proteínas eucariotas que contienen codones infrecuentes o ausentes en *E. coli*, ya que reduce la formación de versiones truncadas de la proteína por la terminación prematura de la traducción gracias a la co-expresión de genes codificantes para varios ARNs de transferencia (tARNs) [276]. La cepa de *E. coli* BL21 (DE3) cc5 co-expresa las principales chaperonas citosólicas implicadas en la síntesis *de novo* de proteínas (ClpB y los complejos DnaK-DnaJ-GrpE y GroEL-GroES) en esta bacteria, contribuyendo así al correcto plegamiento de las proteínas heterólogas [277].

Para la expresión de la hCCP6, establecimos cultivos líquidos de *E. coli* Rosetta (DE3) y *E. coli* BL21 (DE3) cc5 que contienen el plásmido pTriEx-6 recombinante codificante para la proteína de interés fusionada a las etiquetas Strep-tag® II y HA en su extremo N-t. Los cultivos transformantes fueron incubados a 37°C y 250 rpm en medio LB suplementado con antibiótico, hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. En ese momento, indujimos la expresión intracelular de la hCCP6 recombinante con IPTG 1 mM y permitimos la sobreexpresión intracelular de la enzima durante 2,5 h a distintas temperaturas (18°C y 37°C) post-inducción. Paralelamente, preparamos para cada una de las cepas cultivos líquidos no inducidos de células transformadas con el vector recombinante para determinar la actividad basal transcripcional de la hCCP6 recombinante a ambas temperaturas post-inducción, y cultivos transformados con el vector vacío pTriEx-6, como control negativo de la síntesis de la proteína recombinante de interés.

Tras la expresión, la presencia de hCCP6 fue evaluada tanto en la fracción soluble como en la fracción insoluble de los extractos celulares mediante 1) electroforesis SDS-PAGE seguido de la tinción de los geles con azul de Coomassie G-250 para la visualización del contenido proteico total en cada muestra analizada, y 2) *western blot* para la

inmunodetección específica de la proteína interés con el anticuerpo anti-HA. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 26**.

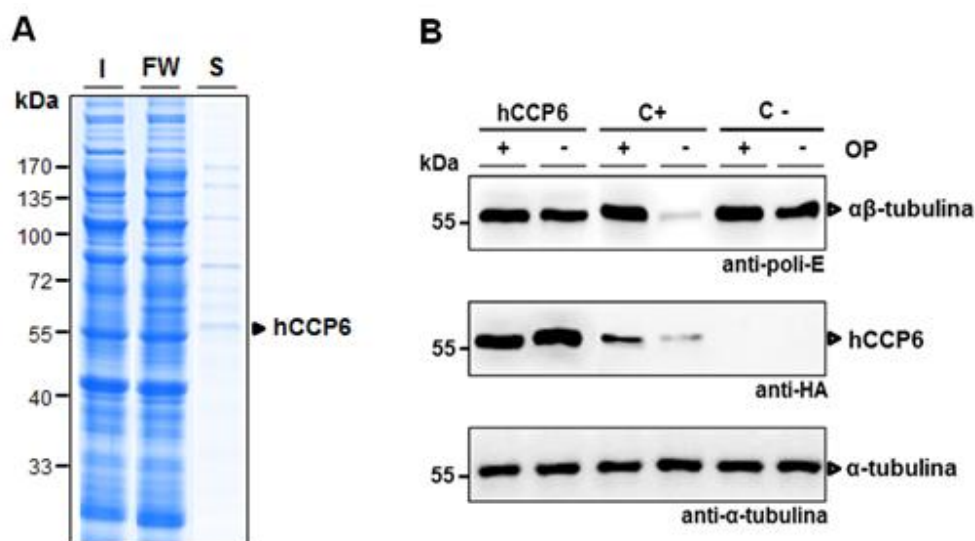


**Figura 26. Análisis de la expresión de la CCP6 humana producida en *E. coli*.** Electroforesis SDS-PAGE y *western blot* para la evaluación cualitativa del rendimiento y la calidad de la proteína recombinante obtenida en las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) cc5 (A) y *E. coli* (DE3) Rosetta (B), tras 2 h y 30 min de expresión post-inducción a 37°C y 18°C. Resolvimos 30 µg de proteína total de la fracción soluble (S) y volúmenes equivalentes de cada fracción insoluble (I), para cada una de las muestras analizadas. Los geles de SDS-PAGE están teñidos con azul de Coomassie G-250 y la inmunodetección de la hCCP6 se realizó con el anticuerpo anti-HA. Para ambas cepas, los controles de la expresión basal de hCCP6 a 37°C y 18°C corresponden a cultivos no inducidos transformados con el vector recombinante (IPTG -) y los controles negativos de la expresión proteica corresponden a cultivos transformados con el vector vacío pTriEx-6 (Ø).

La inmunodetección de la hCCP6 recombinante confirmó la presencia de la proteína en la fracción soluble (S) tras la inducción de la expresión con IPTG en ambas cepas y para las dos temperaturas de expresión ensayadas (18°C y 37°C). En todos los casos se observó una banda correspondiente con el tamaño esperado para la hCCP6 (~60 kDa), junto con un número variable de bandas de menor tamaño (**figura 26**). Además, el incremento en los niveles de la hCCP6 soluble en los cultivos inducidos (+) es prácticamente insignificante en comparación con los niveles observados en los cultivos sin inducir (-) en las condiciones testadas.

Esto sugiere un nivel elevado de expresión basal de la proteína en ausencia del agente inductor.

En general, el patrón de bandas proteicas visualizado en *E. coli* BL21 (DE3) cc5 (figura 26-A) es similar al de *E. coli* Rosetta (DE3) (figura 26-B), lo que indica que las múltiples bandas observadas son debidas, principalmente, a la degradación proteolítica de la proteína y no a la síntesis de versiones truncadas de la misma por la traducción ineficiente del mRNA. Por consiguiente, el bajo rendimiento obtenido en la síntesis de la hCCP6 soluble con el tamaño esperado es atribuible, básicamente, a la inestabilidad y susceptibilidad proteolítica de la proteína recombinante en el ambiente de expresión de *E. coli*. En la fracción insoluble (I) también observamos la presencia de la hCCP6 con un patrón de bandas que muestra una gran degradación y la presencia de una gran cantidad de proteína mal plegada y/o desplegada formando agregados insolubles. Este hecho también puede contribuir notablemente al bajo rendimiento obtenido en la producción de la proteína soluble de interés.



**Figura 27. Determinación de la actividad de glutamilasa de la CCP6 humana purificada producida en *E. coli*.** (A) Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie G-250 mostrando la pureza de la hCCP6 soluble producida en *E. coli* Rosetta (DE3) a 18°C tras 2,5 h de expresión post-inducción y semipurificada mediante cromatografía de afinidad anti-Strep-tag® II. Se muestran la fracción soluble inicial (I), la fracción proteica no-retendida en la columna (FW) y la fracción eluida con la hCCP6 semipurificada (S). (B) Análisis mediante *western blot* de volúmenes equivalentes de las reacciones de incubación de la hCCP6 semipurificada de *E. coli* con tubulina poli-E de cerebro porcino a 37°C durante 5 h. El control positivo (C+) corresponde a la incubación de la hCCP6 producida en células HEK293 F enzimáticamente activa con el sustrato. El control negativo (C-) corresponde a la tubulina poli-E y permite determinar los niveles iniciales de poliglutamilación en el sustrato sin modificar. Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en presencia y ausencia del inhibidor de MCPs 1,10-fenantrolina (OP). El estado de glutamilación del sustrato se examinó con el anticuerpo anti-poli-E, que reconoce largas cadenas de poli-E ( $\geq 3$  Glu) en la región C-t del heterodímero de tubulina. La detección de la hCCP6 recombinante se realizó con el anticuerpo anti-HA. La  $\alpha$ -tubulina se ha empleado como control de carga del gel.



## Capítulo I

Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos llevar a cabo una purificación de la hCCP6 mediante cromatografía de afinidad anti-Strep-tag® II, usando uno de los dos sistemas de expresión. Para ello, repetimos la expresión de hCCP6 en la cepa de Rosetta a 18°C, condiciones en las que obtuvimos una mayor cantidad de proteína soluble (ver **figura 26-A**). Una vez purificada la proteína (**figura 27-A**), determinamos la presencia de actividad enzimática en la hCCP6 semipurificada mediante ensayos *in vitro* de deglutamilación de la misma forma cómo se realizó en anteriormente (ver **apartado 3.1.1**). En este caso, todas las reacciones se ensayaron en presencia o ausencia del inhibidor de MCPs OP. Como control adicional se realizaron reacciones en las mismas condiciones, en presencia de hCCP6 purificada de células de mamífero (C+). Finalmente, el estado de glutamilación de la tubulina se examinó en todas las muestras mediante *western blot* analizando volúmenes equivalentes de cada reacción y empleando el anticuerpo anti-poli-E. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 27-B**.

Los resultados obtenidos muestran una clara disminución en la señal de las bandas obtenidas con el anticuerpo anti-poli-E en las reacciones con la hCCP6 producida en células de mamífero con el sustrato (C+) y en ausencia de inhibidor, en comparación con el control en presencia de OP y el control de la tubulina sin enzima (C-). Este resultado demuestra que las condiciones del ensayo son óptimas para la actividad enzimática de la hCCP6. Sin embargo, en el caso de la reacción en presencia de la hCCP6 producida en *E. coli* con el sustrato (hCCP6), no se observa una disminución en la intensidad de la banda correspondiente al anti-poli-E, en comparación con los diferentes controles. Este hecho indica que la enzima es catalíticamente inactiva en las concentraciones ensayadas. Además, la detección de la proteína recombinante con anti-HA demuestra que la hCCP6 producida en *E. coli* no es activa, incluso empleando cantidades de enzima muy superiores (>20 veces) a las usadas con la hCCP6 producida en células de mamífero (**figura 27-B**).

En conclusión, determinamos que la producción de hCCP6 en las cepas de *E. coli* Rosetta (DE3) y BL21 (DE3) cc5 es inviable en las condiciones ensayadas. El rendimiento en la obtención de hCCP6 soluble con el tamaño molecular esperado es muy bajo debido a que gran parte de la proteína se agrega formando cuerpos de inclusión y la proteína obtenida en su forma soluble es muy inestable, sufriendo una intensa degradación proteolítica. Además, la hCCP6 soluble semipurificada no presenta actividad enzimática, por lo que no es apta para llevar a cabo estudios de caracterización estructural ni funcional de la hCCP6.

## Capítulo I

La dificultad para producir proteínas recombinantes solubles, aún en presencia de chaperonas moleculares y de tARNs infrecuentes o ausentes en *E. coli*, está relacionada principalmente con la capacidad limitada de esta bacteria para catalizar la mayoría de MPTs presentes en las proteínas eucariotas.

Las MPTs tienen un papel crucial en el plegamiento proteico, la estabilidad, actividad biológica, localización e inmunogenicidad de las proteínas [278], de manera que la falta de éstas en la hCCP6 recombinante podría justificar la intensa degradación proteolítica, inestabilidad, insolubilidad y ausencia de actividad enzimática observada. Sin embargo, no podemos descartar la necesidad de algún cofactor, chaperonas específicas u otras proteínas de unión ausentes en *E. coli* imprescindibles para el correcto plegamiento, estabilidad y actividad biológica de la proteína. Hasta la fecha, no se ha conseguido obtener ninguna CCP de mamífero activa (algunas de hasta 120 kDa) empleando sistemas de expresión basados en bacterias [131], lo que corrobora la dificultad de obtener estas enzimas de forma soluble y activa en *E. coli*.

### 3.1.3 Sistema de expresión basado en células de insecto infectadas por baculovirus

Los sistemas de expresión basados en células de insecto infectadas por BVS recombinantes constituyen un método alternativo para la producción de proteínas heterólogas que no pueden ser sintetizadas de forma eficiente en los organismos procariontes, especialmente de proteínas intracelulares. Estos sistemas ofrecen niveles de producción relativamente altos y, además, son capaces de realizar MPTs de forma similar a las células eucariotas. Este sistema es compatible también con la expresión de proteínas de gran tamaño y permite la expresión simultánea de varias proteínas.

La producción de hCCP6 en células de insecto Sf9 se llevó a cabo empleando el sistema Bac-to-Bac® para la generación de BVS recombinantes. En primer lugar, realizamos la transposición dirigida del *cassette* de expresión que contiene la secuencia codificante para la hCCP6 fusionada a las etiquetas Strep-tag® II, desde el vector pFastBac1 al genoma modificado (bácmido) del AcMNPV. A continuación, transfectamos el bácmido recombinante en células Sf9 para el ensamblaje de los BVS recombinantes y, tras varias rondas de infección para la amplificación del virus, alcanzamos un título viral del orden de  $10^8$  pfu/ml adecuado para realizar las primeras pruebas de expresión. Para ello, infectamos cultivos de células Sf9 a distintas multiplicidades de infección (MOI) (1, 2, 5 y 10 pfu/ml) y permitimos la sobreexpresión intracelular de la proteína a varios tiempos de expresión post-infección (24, 48 y 72 h), con el objetivo de averiguar las condiciones óptimas para la producción de nuestra proteína de interés. Además, preparamos cultivos de células Sf9 infectados por BVS no recombinantes, como control negativo de expresión ( $\emptyset$ ).

## Capítulo I

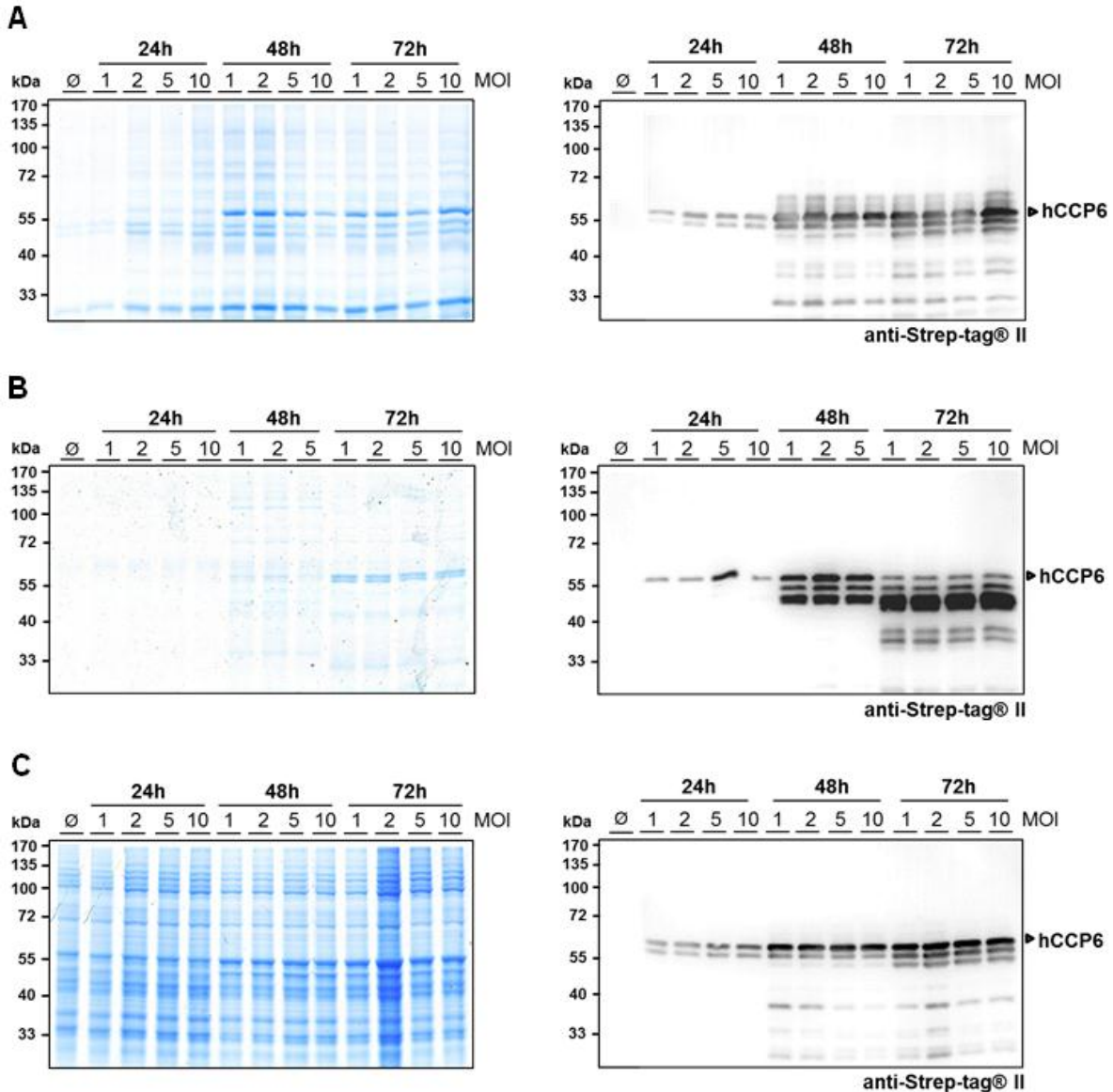
La expresión de hCCP6 se examinó en la fracción soluble e insoluble de los extractos celulares, y en el medio extracelular, empleando las técnicas de electroforesis SDS-PAGE y *western blot* usadas en los sistemas anteriores.

Como podemos observar en la **figura 28**, la hCCP6 recombinante se observa en todas las fracciones analizadas a las 24 h post-infección, como una banda mayoritaria detectada con el anticuerpo anti-poli-E con un tamaño alrededor de 60 kDa. Además, observamos una clara acumulación de esta proteína en la fracción soluble a lo largo de los diferentes tiempos analizados (24, 48 y 72 h). Sin embargo, a partir de las 48 h de expresión se aprecia una notable degradación proteolítica de la proteína en las fracciones solubles (**figura 28-A**). Por otro lado, la elevada tasa de síntesis proteica conduce también a la formación de agregados insolubles, y su consecuente degradación parcial (**figura 28-B**). Finalmente, observamos que una fracción de la hCCP6 recombinante se acumula en el medio extracelular a lo largo de los tiempos analizados, asociada a una intensa degradación proteolítica de la proteína extracelular a partir de las 48 h (**figura 28-C**). Ésto podría ser debido al ciclo lítico del AcMNPV, que promueve la lisis celular masiva entre las 48-72 h post-infección, y a la presencia de proteasas en el medio extracelular que conducen a una proteólisis parcial de nuestra proteína. Por último, los niveles de la hCCP6 recombinante obtenidos para cada tiempo de expresión post-infección en la fracción soluble son equivalentes independientemente del valor de la MOI usada. Por tanto, determinamos que las mejores condiciones testadas para la producción de hCCP6 empleando este sistema corresponden a tiempos de expresión post-infección de máximo 48 h y una MOI de 1 pfu/ml, ya que nos permitirá obtener niveles de expresión aceptables consumiendo una menor cantidad del stock viral para la infección de los cultivos.

Sin embargo, a partir de las 48 h de expresión observamos una apreciable degradación proteolítica de la proteína sintetizada intracelularmente, como consecuencia de la disrupción de los procesos celulares por la elevada carga vírica soportada por las células infectadas (**figura 28-A**). Por otro lado, la elevada tasa de síntesis proteica conduce también a la formación de agregados insolubles, y su consecuente degradación parcial (**figura 28-B**). Además, observamos la acumulación de la hCCP6 recombinante en el medio extracelular a lo largo de los tiempos analizados, y una intensa degradación proteolítica de la proteína extracelular a partir de las 48 h. Esto es debido a que el AcMNPV presenta un ciclo de replicación lítico que promueve la lisis celular masiva entre las 48-72 h post-infección. Por consiguiente, el contenido intracelular se va liberando progresivamente al medio de expresión, donde las proteasas extracelulares degradan la proteína recombinante liberada al medio (**figura 28-C**).

## Capítulo I

Finalmente, los niveles de la hCCP6 recombinante obtenidos para cada tiempo de expresión post-infección en la fracción soluble son equivalentes independientemente del valor de la MOI usada.



**Figura 28. Estudio de la expresión de la CCP6 humana en células de insecto Sf9 infectadas por AcMNPV recombinantes.** Electroforesis SDS-PAGE y *western blot* para la evaluación cualitativa del rendimiento y la calidad de la proteína de interés obtenida en células de insectos Sf9 infectadas por BVS recombinantes a distintas MOI y tiempos de expresión post-infección. En los geles cargamos 30  $\mu$ g. de proteína total en cada carril para las muestras de la fracción soluble (A), volúmenes equivalentes de la fracción insoluble (B) y el mismo volumen del medio extracelular (C), para cada una de las muestras analizadas. Los geles de SDS-PAGE están teñidos con azul de Coomassie G-250 y la inmunodetección de la proteína se realizó con el anticuerpo anti-Strep-tag® II. Los controles negativos de la expresión corresponden a cultivos de células de insecto transformados con el vector vacío pTriEx-6 (Ø).

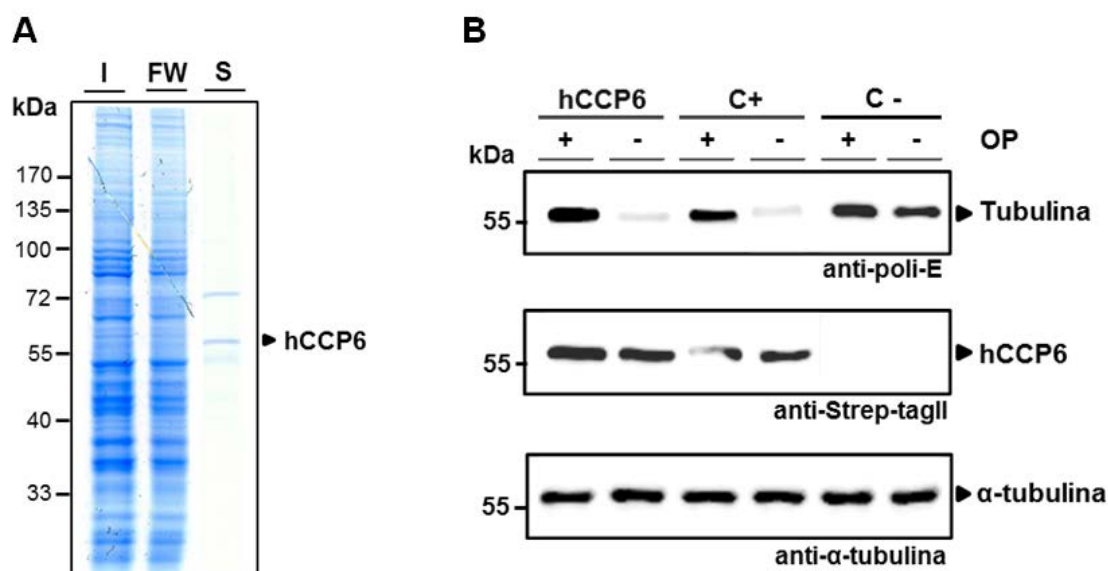
## Capítulo I

Por tanto, determinamos que las mejores condiciones testadas para la producción de hCCP6 empleando este sistema corresponden a tiempos de expresión post-infección de máximo 48 h y una MOI de 1 pfu/ml, ya que nos permitirá consumir un menor stock viral para la infección de los cultivos con idénticos niveles de expresión

En base a estos resultados, decidimos realizar una purificación mediante cromatografía de afinidad anti-Strep-tag® II de la hCCP6 soluble obtenida en células Sf9 infectadas a una MOI de 1 pfu/ml tras 48 h de expresión (**figura 29-A**). A continuación, determinamos la presencia de actividad enzimática en la hCCP6 semipurificada mediante ensayos *in vitro* de deglutamilación empleando tubulina purificada altamente poliglutamilada (poli-E) de cerebro porcino como sustrato. Además, preparamos reacciones de incubación del sustrato con la hCCP6 activa producida en células de mamífero como control positivo (C+) de actividad deglutamilasa, y del sustrato sin enzima (C-) para determinar los niveles iniciales de poli-E en el sustrato. Todas las reacciones se ensayaron en presencia y ausencia del inhibidor de MCPs OP. Finalmente, el estado de glutamilación de la tubulina se examinó mediante *western blot* analizando volúmenes equivalentes de cada reacción y empleando el anticuerpo anti-poli-E (**figura 29-B**).

Los resultados obtenidos muestran una clara disminución de la señal del anticuerpo en la banda correspondiente a la tubulina poli-E en las reacciones de incubación con la hCCP6 activa producida en células de mamífero (C+). De forma similar, la hCCP6 producida en células de insecto produjo también una disminución de la señal anti-poli-E. En ningún caso observamos esta disminución de la señal del anticuerpo en sus respectivos controles en presencia del inhibidor, ni en el control de la tubulina en ausencia de las enzimas (C-). Por tanto, este experimento demuestra que la hCCP6 producida en células Sf9 infectadas por AcMNPV recombinantes es activa, corroborando la capacidad demostrada previamente por este sistema de expresión para producir CCPs funcionales, en su conformación nativa enzimáticamente activa [122], [134],[137],[139] (**figura 29-B**).

En conclusión, determinamos que el sistema de expresión basado en células de insecto Sf9 infectadas por AcMNPV recombinantes es apropiado para la producción de pequeñas cantidades de hCCP6, útiles para realizar ensayos bioquímicos y funcionales. La proteína se produce en su forma soluble y activa, pero la acumulación de la proteína en su forma insoluble, la degradación parcial de la proteína soluble y la intensa degradación extracelular de la proteína liberada tras la lisis celular, determinan que el rendimiento en la producción de la hCCP6 soluble continúe siendo bajo e insuficiente para llevar a cabo estudios estructurales.



**Figura 29. Determinación de la actividad deglutamilasa de la CCP6 humana purificada producida en células de insecto Sf9 infectadas por AcMNPV recombinantes.** A) Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie G-250 mostrando la pureza de la hCCP6 soluble producida en células Sf9 infectadas a una MOI de 1 pfu/ml tras 48 h de expresión post-infección y semipurificada mediante cromatografía de afinidad anti-Strep-tag® II. Se muestran la fracción soluble inicial (I), la fracción proteica no-retenida en la columna (FW) y la fracción eluida con la hCCP6 semipurificada (S). (B) Análisis mediante *western blot* de volúmenes equivalentes de las reacciones de incubación de la hCCP6 semipurificada con tubulina poli-E de cerebro porcino a 37°C durante 5 h. El control positivo (C+) corresponde a la incubación de la hCCP6 producida en células HEK293 F enzimáticamente activa con el sustrato. El control negativo (C-) corresponde a la tubulina poli-E y permite determinar los niveles iniciales de poliglutamilación en el sustrato sin modificar. Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en presencia y ausencia del inhibidor de MCPs 1,10-fenantrolina (OP). El estado de glutamilación del sustrato se examinó con el anticuerpo anti-poli-E, que reconoce largas cadenas de poli-E ( $\geq 3$  Glu) en la región C-t del heterodímero de tubulina. La inmunodetección de la hCCP6 recombinante se realizó con el anticuerpo anti-HA. La  $\alpha$ -tubulina se ha empleado como control de carga del gel.

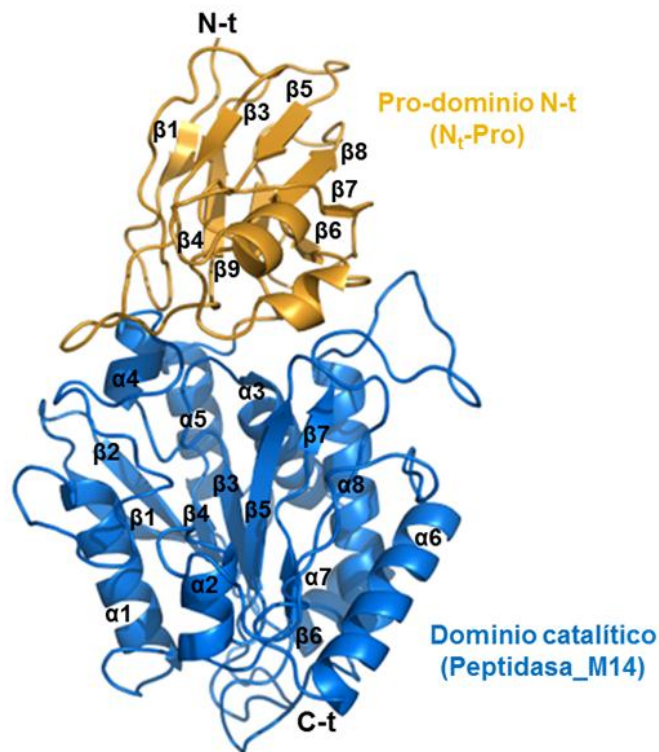
### 3.2 Modelo estructural de la CCP6 humana

Hasta la fecha, las únicas CCPs para las que se ha resuelto su estructura 3D son las CCPs bacterianas de los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* (PDB: 4A37; PaCCP), *Burkholderia cenocepacia* (PDB: 4B6Z; BcCCP), *Burkholderia mallei* (PDB: 3K2K; BmCCP) y *Shewanella denitrificans* (PDB: 3L2N; SdCCP). La PaCCP presenta una gran homología estructural con las CCPs de eucariotas para el pro-dominio N-t y el dominio catalítico CP, según los modelos obtenidos previamente para las 6 hCCPs [125],[151]. Debido a la dificultad de obtener grandes cantidades de la enzima soluble y activa para su cristalización, en este trabajo hemos realizado un modelado molecular por homología para obtener nuestro propio modelo estructural de la hCCP6 y poder analizar los elementos estructurales importantes para su función.

## Capítulo I

Para ello, modelamos la secuencia proteica de la hCCP6 con la ayuda del servidor I-TASSER [268], empleando como referencia las coordenadas de la estructura 3D de la PaCCP. El alineamiento secuencial de la hCCP6 y la PaCCP con la herramienta BLAST [269] demostró una identidad secuencial del 27% para un total de 264 residuos alineados.

La evaluación de la calidad del modelo con el programa ProSA-web [270] determinó un *z-score* de -5,78, dentro del rango de puntuaciones encontradas en estructuras proteicas nativas de una tamaño similar. Sin embargo, aunque en conjunto el modelo tiene una conformación 3D aceptable, el análisis de Ramachandran indica que la calidad estereoquímica del modelo es relativamente baja (84% de los residuos en posiciones favorables, un 8,8% en posiciones permitidas y un 7,2% en posiciones desfavorables). Por tanto, debemos tener ciertas precauciones al analizar el modelo, especialmente en regiones flexibles y no conservadas de la molécula, y por ello, nos vamos a centrar básicamente en el estudio de los rasgos generales de la estructura.



**Figura 30. Modelo estructural de la CCP6 humana.** Representación en cintas del modelo obtenido para la hCCP6 empleando el servidor *web* I-TASSER, en el que se muestra el pro-dominio N-t (N<sub>t</sub>-Pro, en naranja) y el dominio catalítico CP (Peptidasa\_M14, en azul). El pro-dominio N-t presenta el plegamiento β-sándwich característico en las CCPs y el dominio catalítico CP el plegamiento α/β hidrolasa típico de las peptidasas M14. Los elementos de estructura secundaria están numerados en ambos dominios. Los extremos N-t y C-t de la cadena polipeptídica son indicados. Imagen generada con PyMOL [148].

## Capítulo I

El modelo obtenido para la hCCP6 muestra el pro-dominio N-t con el plegamiento  $\beta$ -sándwich característico de las CCPs y el dominio catalítico CP con el plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa típico de los miembros de la familia M14, con la topología de los elementos de estructura secundaria esencialmente conservada y una morfología globular más compacta en comparación con el dominio catalítico de las MCPs clásicas (**figura 30**).

El alineamiento secuencial de los dominios catalíticos de las 6 hCCPs permitió identificar los residuos del centro activo claves para la coordinación al ion de zinc, la catálisis y la unión a sustrato. Estos residuos están altamente conservados en las MCPs de la familia M14, incluida la hCCP6. En la **tabla 9** se muestra un resumen de dichos residuos, incluyendo además los aminoácidos que integran el bolsillo de especificidad S1" en las CCPs. Los aminoácidos están coloreados acorde a las propiedades de los aminoácidos establecidas en el código RasMol [279], y en el caso de la bCPA y la hCCP6 se indica la numeración de los residuos según la posición que ocupan en la secuencia aminoacídica de la forma activa de ambas proteínas.

Curiosamente, las hCCPs contienen una Phe en la posición equivalente a la posición Tyr248 de la bCPA activa, que no está presente en otros miembros de la familia M14 [162],[280] (**tabla 9, figura 31-A**). La Tyr248 es un residuo estrictamente conservado en las peptidasas M14, aunque su función concreta durante la catálisis sigue siendo objeto de debate. Algunos estudios de mutagénesis dirigida de la Tyr248 por Phe o Ala en la bCPA muestran que estas sustituciones no afectan a la actividad catalítica [160],[161], mientras que en otros se sugiere que la Tyr es esencial para la catálisis [281] al proporcionar una activación adicional de la molécula de agua coordinada al ion de zinc responsable de la escisión del enlace peptídico C-t del sustrato, además de participar en el anclaje del residuo C-t en posición P1" en el centro activo de la enzima [280]. Las CCPs son catalíticamente activas, por lo que la relevancia de la sustitución Tyr248Phe se desconoce y será necesario la resolución de la estructura 3D de alguna de estas enzimas en complejo con un ligando para determinar las interacciones entre la Phe y el residuo C-t del ligando, así como su posible función durante la catálisis.

Por otro lado, las 6 hCCPs contienen en el bolsillo de especificidad S1" una Arg conservada en la posición equivalente a la Ile255 de la bCPA activa, que corresponde al residuo determinante de la especificidad de sustrato en las MCPs de la subfamilia M14A y M14D. El carácter básico de este residuo podría explicar la preferencia de sustrato acídica tipo-O para las CCPs. Además, la presencia de una Lys o Arg equivalente a la posición 250 en la bCPA activa también contribuiría a promover un entorno básico que facilite la preferencia por residuos acídicos (**tabla 9, figura 31-A**).



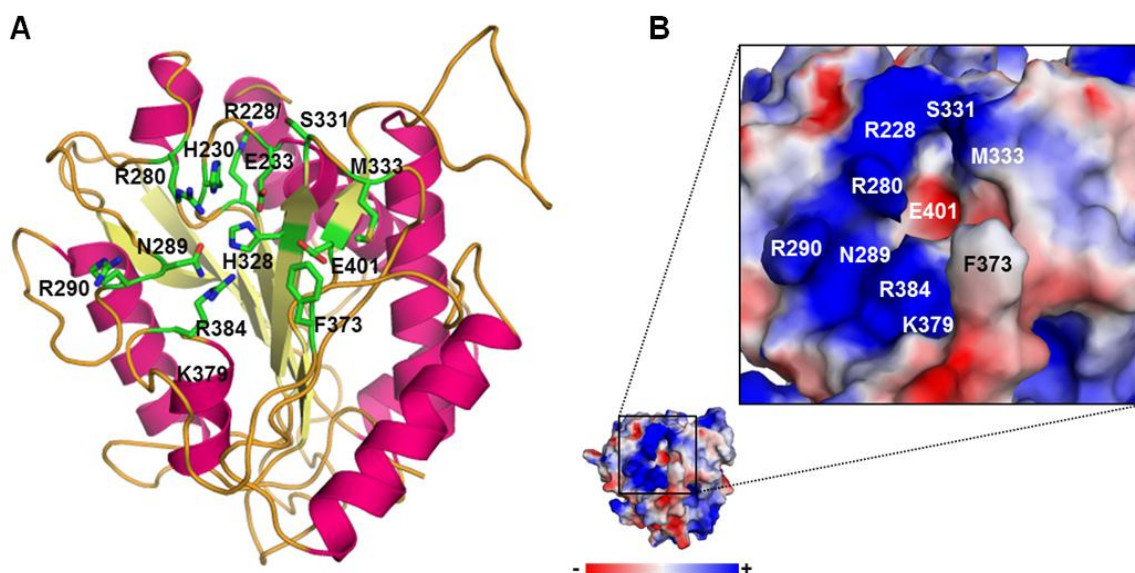
## Capítulo I

Finalmente, el resto de residuos que forman parte del bolsillo de especificidad S1" se encuentran generalmente muy conservados entre las distintas hCCPs, generando un contexto catalítico equivalente que justifica la capacidad de estas enzimas de compartir determinado sustratos (**tabla 9**).

**Tabla 9. Residuos conservados en las hCCPs importantes para la actividad enzimática.**

	bCPA	hCCP1	hCCP2	hCCP3	hCCP4	hCCP5	hCCP6
Coordinación a zinc	His69	His	His	His	His	His	His230
	Glu72	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu233
	His196	His	His	His	His	His	His328
Catálisis	Arg127	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg280
	Glu270	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu401
Unión a sustrato	Asn144	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn289
	Arg145	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg290
	Tyr248	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe373
Bolsillo de especificidad S1'	Ser194	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp326
	Leu203	Val	Ile	Ile	Val	Cys	Gly336
	Gly207	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly340
	Ile243	Met	Phe	Phe	Met	Phe	Tyr368
	Ile247	Ser	Asn	Lys	Ser	Asn	Ser372
	Ala250	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Lys379
	Gly253	Thr	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr382
	Ile255	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg384
	Thr268	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr399

La representación del potencial electrostático en superficie del dominio catalítico de la hCCP6 muestra una extensa área electropositiva rodeando la entrada al centro activo de la enzima, que está integrada por residuos conservados en las distintas hCCPs. Estos residuos que dan forma a la hendidura catalítica, conforman los subsitios de especificidad del centro activo de la enzima para la unión del sustrato. Así pues, la Arg384 y Lys379 forman parte del subsitio S1", la Asn289 y Arg 290 del subsitio S2, la Ser331 y Met333 del subsitio S1 y, finalmente, la Arg228 se encuentra orientada hacia la superficie de la molécula formando parte, posiblemente, del subsitio S3. La presencia de esta área de carácter básico explica la preferencia de la hCCP6, y de las CCPs de eucariotas en general, por sustratos con una gran carga negativa C-t, como por ejemplo la poliglutamilación lateral presente en el heterodímero de tubulina (**figura 31-B**).



**Figura 31. Análisis de los residuos importantes del centro activo de la CCP6 humana.** (A) Representación en cintas del dominio catalítico CP de la hCCP6, mostrando el conjunto de aminoácidos idénticos en las MCPs de la familia M14 (HXXE+R+NR+H+Y(F)+E), numerados acorde a su posición en la secuencia aminoacídica de la hCCP6. Se muestran los residuos R384 (I255 en la bCPA activa) y K379 (A250 en la bCPA activa) localizados en el bolsillo de especificidad S1<sup>o</sup>, que son los principales residuos determinantes de la especificidad de sustrato en las CCPs, y otros residuos que participan en la formación de los subsitios de unión al sustrato de la enzima (N289, R290, R228, S331, M333). Además, se representan la F373 (Y248 en la bCPA activa) y el residuo catalítico E401 (E270 en la bCPA activa) esencial para la catálisis. Las hélices- $\alpha$  y las cadenas- $\beta$  se muestran coloreadas en magenta y amarillo, respectivamente. Los aminoácidos se representan en barras y los átomos de carbono están coloreados en verde, el nitrógeno en azul, el oxígeno en rojo y el azufre en amarillo. (B) Representación del potencial electrostático en superficie del dominio catalítico de la hCCP6 mostrado como un gradiente de color, que incluye el color rojo (-60 Kbt/ec), el blanco (0 Kbt/ec) y el azul (+60 Kbt/ec). En la ampliación de la molécula se indican los residuos representados en la **figura 30-A** que contribuyen al potencial electrostático positivo en la superficie de la entrada al centro activo, además de la F373 en su posición “arriba” y el E401. Los residuos básicos se indican en color azul y los ácidos en rojo. Ambas figuras han sido generadas con PyMOL [148].

### 3.3 La CCP6 humana y modificaciones post-traduccionales de la tubulina

Las MPTs de la tubulina constituyen un poderoso mecanismo para la regulación rápida y generalmente reversible de la dinámica y funcionalidad de los MTs del citoesqueleto. La mayoría de MPTs conocidas tienen lugar en la cola C-t de la tubulina, que corresponde a los sitios de interacción de las proteínas MAPs, +TIPs y motores moleculares que intervienen en la estabilidad de los MTs, el tráfico intracelular y la división celular, entre otras funciones.

Las principales MPTs asociadas a la región C-t de la tubulina incluyen la deglutamilación/poliglutamilación, tirosinación/detirosinación, deglicilación/poliglicilación y la generación de  $\Delta 2$ -tubulina y  $\Delta 3$ -tubulina [208],[209].

## Capítulo I

Las enzimas que catalizan la poliglutamilación, poliglicilación y tirosinación de la tubulina pertenecen a la familia TTLL [220]-[223],[282],[283]. Las enzimas que catalizan la deglutamilación de las cadenas laterales de poli-E en la región C-t de la tubulina y la generación de  $\Delta 2$ -tubulina y  $\Delta 3$ -tubulina, forman parte de la familia M14 de las MCPs, mientras que las enzimas que catalizan la deglicilación y detirosinación aún no han sido identificadas. Hasta la fecha, solo se han descrito enzimas con actividad deglutamilasa en la familia de las CCPs, por lo que es tentador sugerir que estas enzimas pendientes de identificar pudieran pertenecer a la subfamilia M14D de las MCPs.

Para determinar las MPTs generadas en la región C-t de la tubulina por la acción de la hCCP6, transfectamos células HEK293 T crecidas en adherencia con el vector pTriEx-6, y sobreexpresamos la proteína recombinante durante 60 h. En paralelo, transfectamos cultivos con el vector pTriEx-6 recombinante codificante para la hCCP6 E401Q para corroborar que la deglutamilación observada es específica de la hCCP6, y con el vector pTriEx-6 vacío como control negativo.

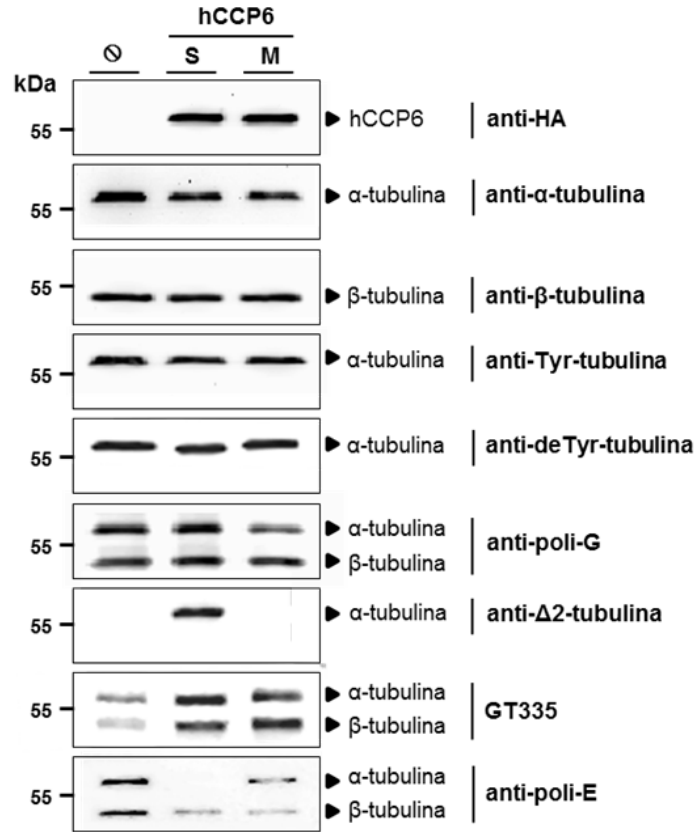
Tras 60 h de expresión, analizamos la fracción soluble proteica mediante *western blot*, para poder estudiar las diferentes MPTs presentes en la tubulina endógena de células de mamífero HEK293 T con anticuerpos específicos. Estos anticuerpos han sido ampliamente utilizados en numerosos estudiosos, y constituyen una de las herramientas principales para analizar este tipo de modificaciones [284].

Los resultados obtenidos demuestran que la hCCP6 (hCCP6-S) no altera los niveles de Tyr- y deTyr-tubulina en la  $\alpha$ -tubulina ni la poliglicilación de las cadenas laterales en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina endógena de células HEK293 T, ya que en todos los casos la señal de inmunodetección de estas MPTs se mantiene invariable respecto a los controles (hCCP6-M y  $\emptyset$ ). Sin embargo, sí observamos un incremento significativo en los niveles de  $\Delta 2$ - $\alpha$ -tubulina, demostrando la capacidad de la hCCP6 de hidrolizar el Glu C-t de la deTyr-tubulina. Este efecto es dependiente de la actividad enzimática de la hCCP6, ya que no se observa variación en los niveles de  $\Delta 2$ - $\alpha$ -tubulina en el mutante catalíticamente inactivo (hCCP6-M).

El estado de glutamilación en la región C-t de la  $\alpha$ - y la  $\beta$ -tubulina fue analizado empleando el anticuerpo GT335, que reconoce específicamente el primer Glu ramificado de la cadena, y el anticuerpo anti-poli-E, que detecta extensiones largas de poli-E que contengan  $\geq 3$  Glu. La inmunodetección con los 2 anticuerpos determina que la hCCP6 es capaz de hidrolizar cadenas largas de poli-E en la región C-t de la tubulina, pero incapaz de eliminar el primer Glu de la cadena en el punto de ramificación.

## Capítulo I

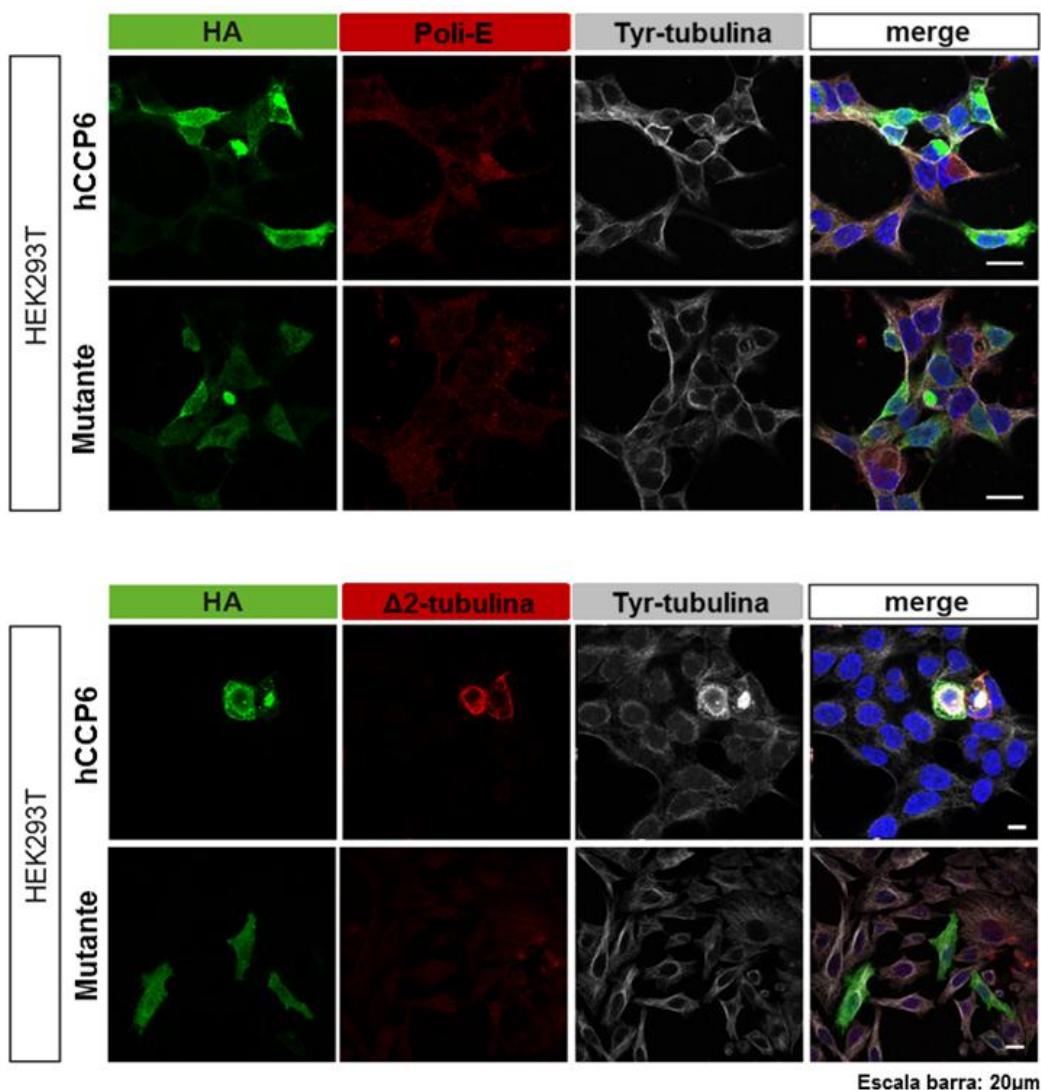
Estos resultados concuerdan con estudios previos en las que se demostró que la capacidad de eliminar el primer Glu ramificado de la cadena de poli-E generada post-traduccionamente en la región C-t de la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina es competencia exclusiva de la CCP5 [124],[139].



**Figura 32. Modificaciones post-traduccionales generadas por la CCP6 humana en la región C-terminal de la tubulina.** Análisis mediante *western blot* de 30  $\mu$ g de proteína total de extractos de células HEK293 T que sobreexpresaron durante 48 h la hCCP6 salvaje (S) o el mutante hCCP6 E401Q (M), para la inmunodetección específica de los niveles de Tyr-tubulina (anti-Tyr-tubulina), deTyr-tubulina (anti-deTyr-tubulina), poliglicilación (anti-poli-G),  $\Delta$ 2-tubulina (anti- $\Delta$ 2-tubulina), monoglutamilación (GT335) y poliglutamilación (anti-poli-E) en la región C-t de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina. El contenido total de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina en los extractos se determinó con los anticuerpos anti- $\alpha$ -tubulina y anti- $\beta$ -tubulina, respectivamente y la síntesis de la hCCP6 recombinante (S y M) se verificó con el anticuerpo anti-HA. El control negativo de la expresión proteica de la hCCP6 recombinante corresponde a cultivos de células HEK293 T transfectados con el vector pTriEx-6 vacío ( $\emptyset$ ). Los cultivos transfectados con el vector vacío nos permiten, a su vez, determinar los niveles iniciales de cada MPT en la tubulina endógena sin modificar de las células HEK293 T.

Sorprendentemente, observamos que la deglutamilación lateral de la cadena de poli-E catalizada por la hCCP6 parece afectar específicamente a la subunidad  $\alpha$  de la tubulina, ya que los niveles de poli-E en la subunidad  $\beta$  se mantienen invariables respecto a los controles (**figura 32**). Debido a que en la mayoría de tejidos ocurre una expresión solapante de varias CCPs, es posible que la preferencia de sustrato de la hCCP6 respecto a una de las

subunidades del heterodímero de tubulina constituya un mecanismo de especialización funcional respecto a otras CCPs con las que comparte sustratos proteicos en el mismo contexto celular. Aunque durante años se ha considerado que las distintas CCPs presentan funciones redundantes, estudios recientes apoyan la creciente evidencia de que no todas las CCPs presentan funciones equivalentes *in vivo* y que actúan de forma cooperativa o aditiva para activar señales en los MTs celulares [121]-[125],[139].



**Figura 33. Estudio de la actividad deglutamilasa de la CCP6 humana mediante inmunocitoquímica.** Tras la fijación de células de mamífero HEK293 T que sobreexpresaron la hCCP6 salvaje o el mutante hCCP6 E401Q durante 48 h, inmunodetectamos los niveles de  $\Delta 2$ -tubulina y poliglutamilación en la tubulina endógena con los anticuerpos anti- $\Delta 2$ -tubulina y anti-poli-E, respectivamente. La síntesis de la hCCP6 recombinante (salvaje y mutante) se verificó con el anticuerpo anti-HA, el entramado de MTs del citoesqueleto celular se visualizó gracias a la tinción de los MTs con el anticuerpo anti-Tyr-tubulina y los núcleos celulares están teñidos con DAPI (azul). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal invertido (Leica TCS SP5) a temperatura ambiente y usando un objetivo X63, y analizadas con el programa LAF AS Lite 1.8.1 (Leica). Escala de la barra = 20  $\mu$ m.

## Capítulo I

Finalmente, la actividad de glutamilasa demostrada anteriormente para la hCCP6 a partir de ensayos de inmunoblot de extractos proteicos de células HEK293 T que sobreexpresan la enzima recombinante, fue corroborada posteriormente mediante técnicas de inmunofluorescencia. Tal y como esperábamos, se observa un claro incremento en los niveles de  $\Delta 2$ -tubulina y una disminución de la señal del anticuerpo anti-poli-E en las células HEK293 T que sobreexpresan la hCCP6 salvaje (hCCP6) en comparación con las células que sobreexpresan la hCCP6 inactiva (mutante) (**figura 33**).

En resumen, concluimos que la hCCP6 no corresponde a la enzima responsable de la detirosinación ni deglicilación de la tubulina, como ya se había demostrado previamente para su ortólogo murino [124]. La capacidad de la hCCP6 de generar  $\Delta 2$ -tubulina y deglutamar las cadenas de poli-E en la región C-t del heterodímero de tubulina hasta el penúltimo Glu también había sido demostrada anteriormente para los ortólogos de la CCP6 de ratón [124] y de *C. elegans* [131]. Sin embargo, es la primera vez que se advierte de la preferencia de sustrato de una CCP respecto a una familia específica de tubulinas. Por último, la actividad de glutamilasa de la tubulina determinada para la hCCP6 concuerda con la especificidad de sustrato tipo-O y la capacidad para acomodar sustratos poli-E en el centro activo de la enzima, predicha en nuestro modelo estructural de la hCCP6.

### 3.4 Preferencia de sustrato de la CCP6 humana por las subunidades de la tubulina poliglutamiladas artificialmente con TTLLs

Las glutamilasas de la familia TTLL difieren en sus especificidades de sustrato respecto a las subunidades del heterodímero de tubulina y preferencias por la reacción de iniciación o elongación de la cadena de poli-E [221]. Aunque las CCPs catalizan esencialmente la misma reacción, se ha demostrado recientemente que presentan preferencias individuales por la longitud de la cadena de Glu y propiedades cinéticas distintas [122]. Sin embargo, hasta la fecha ningún estudio avala que las CCPs difieran en sus preferencias de sustrato por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina, de forma análoga a sus enzimas antagónicas TTLLs glutamilasas. En base a nuestras observaciones previas de la actividad preferente de la hCCP6 por la deglutamilación de las cadenas de poli-E en la  $\alpha$ -tubulina, hipotetizamos que muy probablemente estaríamos ante el descubrimiento de un nuevo mecanismo de control de los niveles de glutamilación en los MTs celulares, basado en las preferencias de sustrato individuales de las CCPs por una de las subunidades del heterodímero de tubulina. Este hecho, además implicaría un reconocimiento estructural específico por dicha subunidad no descrito hasta la fecha.

## Capítulo I

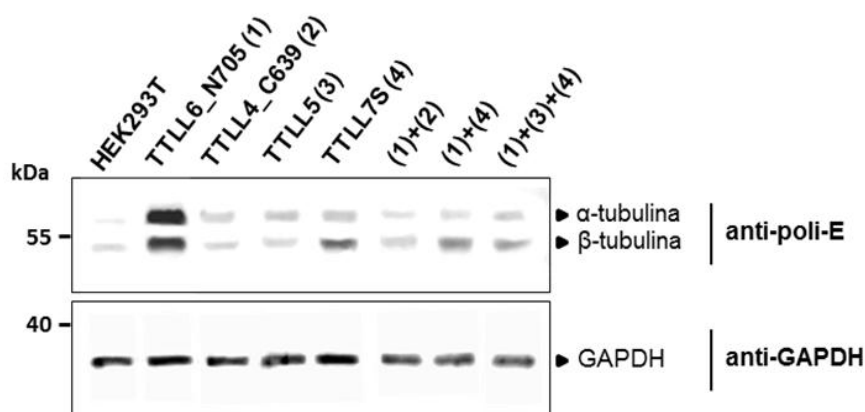
La tubulina endógena de las células interfásicas HEK293 T en cultivo presenta niveles muy bajos de poliglutamilación, confinados básicamente a los MTs de los centriolos y axonemas de los cilios [134]. Además, los niveles de poliglutamilación varían a lo largo del ciclo y la diferenciación celular [221], de manera que es difícil obtener patrones de poliglutamilación reproducibles y, en la mayoría de ocasiones, detectables. Por consiguiente, para corroborar la capacidad de la hCCP6 de catalizar preferentemente la deglutamilación de las cadenas laterales de poli-E en la región C-t de la  $\alpha$ -tubulina, necesitamos obtener tubulina altamente poli-E en ambas subunidades del heterodímero (ver **apartado 3.3.1**), como sustrato para llevar a cabo ensayos cinéticos *in vitro* de deglutamilación y examinar la variación en los niveles de glutamilación de la tubulina a lo largo del tiempo debido a la acción enzimática de la hCCP6 (ver **apartado 3.3.2**).

### 3.4.1 Modificación *in vitro* de los niveles de poliglutamilación de la tubulina

La existencia de TTLLs glutamilasas especializadas en la iniciación y elongación de la cadena lateral de Glu, sugieren que estas enzimas cooperan para la glutamilación de los heterodímeros de tubulina, como se ha demostrado que ocurre entre las distintas CCPs para acortar las cadenas de Glu [124],[221]. La modificación *in vitro* de los niveles de glutamilación empleando glutamilasas de la familia TTLL permite generar tubulinas con diferentes patrones de glutamilación, controlando específicamente la formación de cadenas cortas y largas de poli-E en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina en células en cultivo [285] .

Atendiendo a las propiedades enzimáticas de las diversas TTLLs con actividad glutamilasa [221], decidimos testar la eficiencia de la TTLL4, TTLL5, TTLL6 y TTLL7 de ratón, en su forma individual o combinada, en la generación de cadenas largas de poli-E en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina endógena de células HEK293 T. En realidad, empleamos versiones truncadas de estas TTLLs (excepto para TTLL5) recortadas en sus extremos N-t y C-t, que mantienen la misma preferencia de reacción que las correspondientes proteínas salvajes, pero que se sintetizan a niveles más elevados y, por consiguiente, la actividad glutamilasa detectada en los extractos celulares es mayor [221].

Los vectores recombinantes codificantes para la TTLL4\_C639, TTLL5, TTLL6\_N705 y TTLL7S fusionadas a la proteína YFP, fueron transfectados individualmente o co-transfectados en diferentes combinaciones, en células de mamífero HEK293 T. Cultivos de células HEK293 T sin transfectar fueron incluidos en el experimento como control de los niveles de poli-E en la tubulina endógena. Tras 48 h de expresión, analizamos la fracción soluble de todos los extractos celulares mediante *western blot*, y usamos el anticuerpo anti-poli-E para poder estudiar el nivel de poli-E presente en la región C-t de ambas subunidades del heterodímero de la tubulina.



**Figura 34. Estudio de la actividad glutamilasa de versiones truncadas de TTLLs y su efecto cooperador en la poliglutamilación simultánea de la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina.** Análisis mediante *western blot* de 30  $\mu$ g de proteína total de extractos de células de mamífero HEK293 T que sobreexpresaron durante 48 h la TTLL4 (TTLL4\_C639), TTLL5, TTLL6 (TTLL6\_N705) y TTLL7 (TTLL7S), así como diferentes combinaciones de éstas, para la determinación de los niveles de poliglutamilación en la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina empleando el anticuerpo anti-poli-E, que reconoce largas cadenas de poli-E ( $\geq 3$  Glu) en la región C-t del heterodímero de tubulina. Cultivos de células HEK293 T sin transfectar permitieron determinar los niveles iniciales de poliglutamilación en la tubulina endógena sin modificar de las células. La proteína GAPDH se ha empleado como control de carga del gel.

Los resultados obtenidos muestran que la sobreexpresión de la TTLL4\_C639 y TTLL5 no se traduce en un incremento en la señal del anticuerpo anti-poli-E en ninguna de las subunidades del heterodímero de tubulina en comparación con las células control HEK293 T sin transfectar. Este resultado es coherente con la habilidad de la TTLL4\_C639 y TTLL5 de catalizar la reacción de iniciación en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina, respectivamente, indetectable con el anticuerpo anti-poli-E [221]. La sobreexpresión de TTLL7S, en cambio, provoca un ligero incremento en la señal del anticuerpo en la subunidad  $\beta$  respecto a las células control, acorde a la capacidad de esta enzima de iniciar y elongar la cadena de poli-E en la subunidad  $\beta$  de la tubulina [223]. Finalmente, la sobreexpresión de la TTLL6\_N705 incrementó significativamente la señal de inmunodetección del anticuerpo anti-poli-E en ambas subunidades del heterodímero de tubulina respecto a las células HEK293 T control (**figura 34**). La TTLL6 cataliza *in vivo* la reacción de iniciación y elongación de la cadena de poli-E preferentemente en la subunidad  $\alpha$  de la tubulina, pero se ha demostrado que su correspondiente versión truncada TTLL6\_N705 es capaz de modificar *in vitro* ambas subunidades del heterodímero de tubulina [221]. Gracias a la actividad de esta enzima (TTLL6\_N705), fuimos capaces de incrementar simultáneamente los niveles de poliglutamilación presentes en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en estudios previos para la caracterización funcional de estas enzimas en células HeLa [221].



## Capítulo I

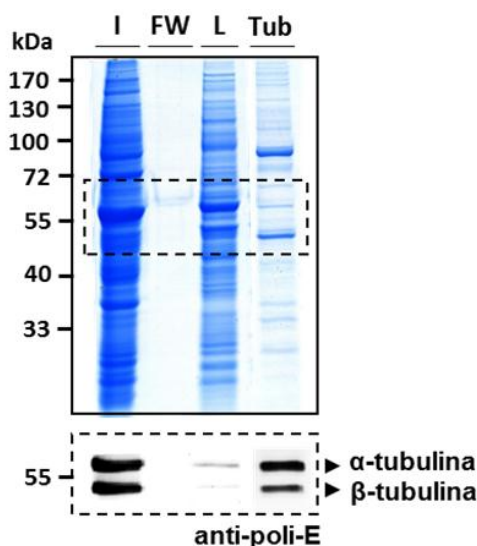
Curiosamente, la co-expresión de la TTLL6\_N705 con las otras glutamilasas examinadas no ofrece ninguna ventaja, ya que no observamos un efecto cooperativo para incrementar los niveles de poli-E en la región C-t de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina endógenas de células HEK293 T (**figura 34**). Además, la coexpresión de varias TTLLs al mismo tiempo parece tener algún tipo de efecto inhibitorio en la actividad glutamilasa de estas enzimas, ya que el claro incremento en la señal del anticuerpo anti-poli-E observado cuando se transfecta la TTLL6\_N705 sola, no se detecta cuando esta enzima es co-transfectada con otras TTLLs. Estos resultados sugieren que este efecto cooperador entre glutamilasas está estrictamente regulado a nivel celular y que no todas las combinaciones de TTLLs glutamilasas iniciadoras y elongadoras de la cadena lateral de Glu en la tubulina son productivas.

En resumen, la TTLL6\_N705 ha demostrado ser la única glutamilasa útil en incrementar significativamente los niveles de poliglutamilación en la región C-t de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina endógena de células HEK293 T. Además, los resultados de este ensayo sugieren que la cooperación entre TTLLs glutamilasas no depende únicamente de la simple complementación entre sus especificidades enzimáticas.

### 3.4.2 Ensayo cinético de deglutamilación de la tubulina modificada

Para investigar la actividad preferente de la hCCP6 por la subunidad  $\alpha$  de la tubulina, el siguiente paso fue realizar una sobreexpresión de TTLL6\_N705 en células de mamífero HEK293 F crecidas en suspensión durante 48h, con el objetivo de purificar la tubulina modificada. Finalizada la expresión, semipurificamos mediante cromatografía de intercambio aniónico DEAE-sefrosa (**figura 35**) esta tubulina, lo que nos permitió obtener un stock suficiente de tubulina endógena altamente poli-E en ambas subunidades del heterodímero de tubulina para ser usado como sustrato para la hCCP6.

A continuación, realizamos ensayos *in vitro* para determinar la cinética de deglutamilación de la tubulina modificada catalizada por la hCCP6. En paralelo, preparamos varias reacciones de incubación control, que incluyen 1) el sustrato con la hCCP6 E401Q, para corroborar que la deglutamilación observada es específica de la hCCP6; 2) el sustrato con la hCCP6 salvaje en presencia de OP como control negativo adicional de actividad enzimática; y 3) el sustrato sin enzima, para determinar los niveles iniciales de poli-E en el sustrato.



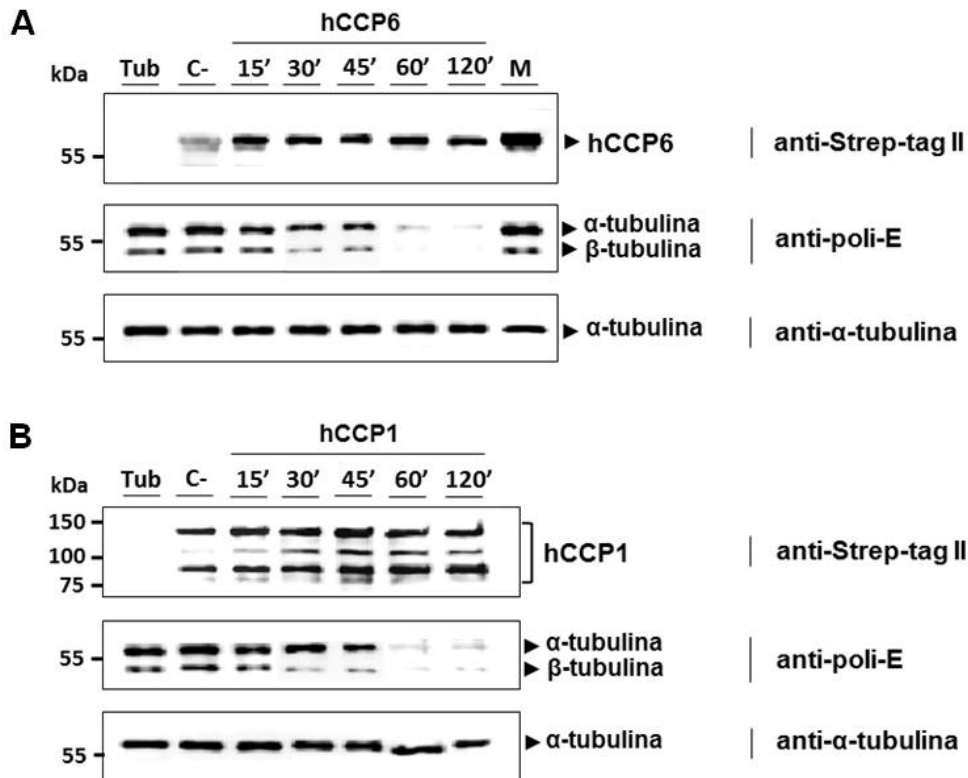
**Figura 35. Purificación de la tubulina poliglutamilada endógena de células HEK293 F.** (A) Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie G-250 mostrando la pureza de la tubulina soluble endógena de células HEK293 F modificada *in vitro* por la TTLL6\_N705 y semipurificada mediante cromatografía de intercambio aniónico DEAE-sefarosa. Se muestran la fracción soluble inicial (I), la fracción proteica no-retenida en la columna (FW), la fracción correspondiente al lavado (L) y la fracción eluida con la tubulina modificada semipurificada (Tub). (B) Inmunodetección de la tubulina altamente poli-E en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  en las diferentes fracciones recogidas durante el proceso de purificación empleando el anticuerpo anti-poli-E, que reconoce largas cadenas de poli-E ( $\geq 3$  Glu) en la región C-t del heterodímero de tubulina. Las fracciones analizadas son las mismas que se indican para el gel de SDS-PAGE. El recuadro de líneas discontinuas en el gel de SDS-PAGE delimita la región del gel que corresponde al *western blot* de la parte inferior.

En las mismas condiciones establecidas para la hCCP6, determinamos la cinética de deglutamilación de la tubulina modificada catalizada por la hCCP1. Todas las enzimas empleadas en este ensayo fueron producidas en células de mamífero HEK293 F y semipurificadas mediante cromatografía de afinidad anti-Strep-tag® II. Finalmente, el estado de glutamilación de la tubulina a los distintos tiempos de incubación se evaluó mediante *western blot* analizando volúmenes equivalentes de cada reacción y empleando el anticuerpo anti-poli-E.

Los resultados obtenidos muestran que la señal del anticuerpo anti-poli-E se reduce progresivamente de forma simultánea en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina a lo largo de los tiempos analizados debido a la actividad de la hCCP6, siendo prácticamente indetectable la señal en ambas subunidades a partir de los 60 min de incubación (**figura 36-A**). Como era de esperar, la señal del anticuerpo anti-poli-E en las reacciones del mutante catalíticamente inactivo (hCCP6-M) y de la hCCP6 tratada con OP (C-) no disminuye respecto al control del sustrato sin enzima (Tub), por lo que la deglutamilación observada en el sustrato es específica de la hCCP6.

## Capítulo I

La misma interpretación realizamos del patrón de deglutamilación observado en la tubulina poli-E por la actividad de la hCCP1, cuya actividad deglutamilasa se ha demostrado que afecta indistintamente a la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina [134] (**figura 36-B**). Por tanto, concluimos que la hCCP6 deglutamila *in vitro* ambas subunidades del heterodímero de tubulina por igual, sin mostrar una preferencia distinguible.



**Figura 36. Ensayo *in vitro* de la cinética de deglutamilación de la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina por la CCP6 y la CCP1 humanas.** Análisis mediante *western blot* de volúmenes equivalentes de las reacciones de incubación a distintos tiempos de la hCCP6 (A) y la hCCP1 (B) con la tubulina poli-E de células HEK293 T modificada *in vitro* por la TTLL6\_N705. El estado de glutamilación de la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina a lo largo de los tiempos analizados se determinó con el anticuerpo anti-poli-E, que reconoce largas cadenas de poli-E ( $\geq 3$  Glu) en la región C-t del heterodímero de tubulina. El control negativo (C-) de actividad MCP corresponde a la incubación de las hCCPs recombinantes con el sustrato en presencia de 1,10-fenantrolina (OP). En el caso de la hCCP6, se preparó un control adicional incubando el sustrato con la hCCP6 E401Q, para corroborar que la deglutamilación observada es específica de la hCCP6. Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado. La hCCP6 y hCCP1 recombinantes se inmunodetectaron con el anticuerpo anti-Strep-tag II. Cabe mencionar que para la hCCP1 sobreexpresada se detectan, además de la banda principal de ~150 kDa, fragmentos de ~120-130 kDa y ~80-90 kDa. Patrones similares se han determinado para la CCP1 nativa y recombinante, tanto para la hCCP1 como para la mCCP1 [27]. La  $\alpha$ -tubulina se ha empleado como control de carga del gel.

## Capítulo I

De forma sorprendente, los resultados de este experimento no concuerdan con los obtenidos en los ensayos de inmunoblot de extractos proteicos de células HEK293 T que sobreexpresan la hCCP6 recombinante. En estos últimos, observamos claramente una inequívoca preferencia de esta MCP por la deglutamilación de las cadenas largas de poli-E presentes en la subunidad  $\alpha$  de la tubulina. En nuestra opinión, seguimos creyendo firmemente en la posibilidad de que la hCCP6 y, probablemente otras CCPs, actúen preferentemente sobre una de las subunidades del heterodímero de la tubulina *in vivo*, como se ha demostrado recientemente por la longitud de las cadenas de poli-E [122]. Sin embargo, el diseño de experimentos irrefutables que nos permitan corroborar esta cuestión es sumamente complejo debido al desconocimiento existente en la comunidad científica acerca del código de la tubulina, como desarrollaremos a continuación.

La complejidad del código de la tubulina es infinita y, hasta la fecha, poco se conoce acerca de la interrelación entre las enzimas que actúan *in vivo* como glutamilasas y deglutamilasas en la tubulina, y de cómo estas enzimas son capaces de regular de forma fina y precisa las señales de glutamilación que modulan la dinámica y funcionalidad de los MTs. En este trabajo, sugerimos que la glutamilación de la tubulina debe estar estrictamente regulada a nivel celular y, aunque las glutamilasas con actividad iniciadora y elongadora de la cadena de poli-E cooperan para modular los niveles de glutamilación [221], no todas las combinaciones serían cooperativas en base a nuestras observaciones. Probablemente, debe existir cierta regulación a nivel celular, capaz de influenciar la preferencia de sustrato y la actividad de las CCPs. En esta línea, Rogowski y col. demostraron mediante ensayos *in vitro* de deglutamilación de la tubulina purificada de células HeLa modificada por la TTLL4 o la TTLL6, que la mCCP1 era capaz de eliminar el primer Glu ramificado de la cadena cuando la poliglutamilación había sido generada por la TTLL6 y no por la TTLL4 [124].

Por consiguiente, hipotetizamos que las CCPs podrían manifestar distintas preferencias de sustrato respecto a la subunidades de la tubulina dependiendo de conjunto de glutamilasas que actúen previamente en la generación de la cadena de poli-E. En el caso de la hCCP6, una posibilidad sería que la enzima no mostrara preferencia por las subunidades del heterodímero de tubulina cuando éstas han sido previamente modificadas por la TTLL6 (TTLL6\_N705), pero podría ser capaz de actuar preferentemente sobre una de las subunidades cuando colabora con otras TTLLs con capacidad elongadora de la cadena de poli-E. Por tanto, creemos que sería interesante seguir profundizando en esta cuestión, elucidando las pautas que gobiernan la cooperación entre las CCPs y la TTLLs *in vivo*, así como investigar otros posibles mecanismos celulares que pudieran afectar a la preferencia de sustrato de las CCPs.

## Capítulo I

Las CCPs son enzimas multidominio [32]. Estudios recientes han demostrado que la expresión de formas recombinantes recortadas de algunas CCPs incrementan tanto su estabilidad como su actividad enzimática, demostrando así la influencia de estos dominios adicionales sobre su actividad deglutamilasa [125]. La CCP6 es la CCP de menor tamaño, sin la presencia de dominios adicionales al pro-dominio N-t y el dominio catalítico CP característico de las MCPs M14. Los dominios adicionales presentes en el resto de CCPs podrían estar relacionados con mecanismos de autorregulación o en la interacción con otras proteínas reguladoras capaces de modificar su actividad y/o especificidad enzimática. Sin embargo, no podemos descartar que la hCCP6 forme parte de un macro-complejo o establezca interacciones transitorias con proteínas de su entorno que modulen su actividad enzimática e incluso su preferencia de sustrato ante determinadas circunstancias celulares. Esta suposición no ha sido confirmada experimentalmente hasta la fecha.

A pesar de ello, la obtención de CCPs en su conformación activa únicamente en sistemas de producción recombinantes basados en células de eucariotas superiores. Este hecho, sumado a la dificultad de purificarlas hasta la homogeneidad manteniendo su actividad enzimática [134],[137],[162], sugieren que la hCCP6 podría requerir de otras proteínas o cofactores para mantener su actividad. Al respecto, se ha demostrado que la mTLL1 es una enzima que cataliza la elongación de la subunidad  $\alpha$  formando un complejo con otras proteínas necesario para su actividad [219]. En cambio, las glutamilasas mTLL2 y mTLL9 se han demostrado como enzimas inactivas, cuya activación podría estar mediada por la formación de un complejo, de forma análoga a la mTLL1 [219]. Considerando estos antecedentes, sería posible que en el contexto celular ocurran asociaciones específicas que regulen la actividad preferencial de la hCCP6 frente a la subunidad  $\alpha$  de la tubulina, mientras que en el contexto aislado de los ensayos *in vitro* de deglutamilación de la tubulina modificada en presencia de la enzima semipurificada se pierda esta selectividad por la  $\alpha$  o la  $\beta$  tubulina.

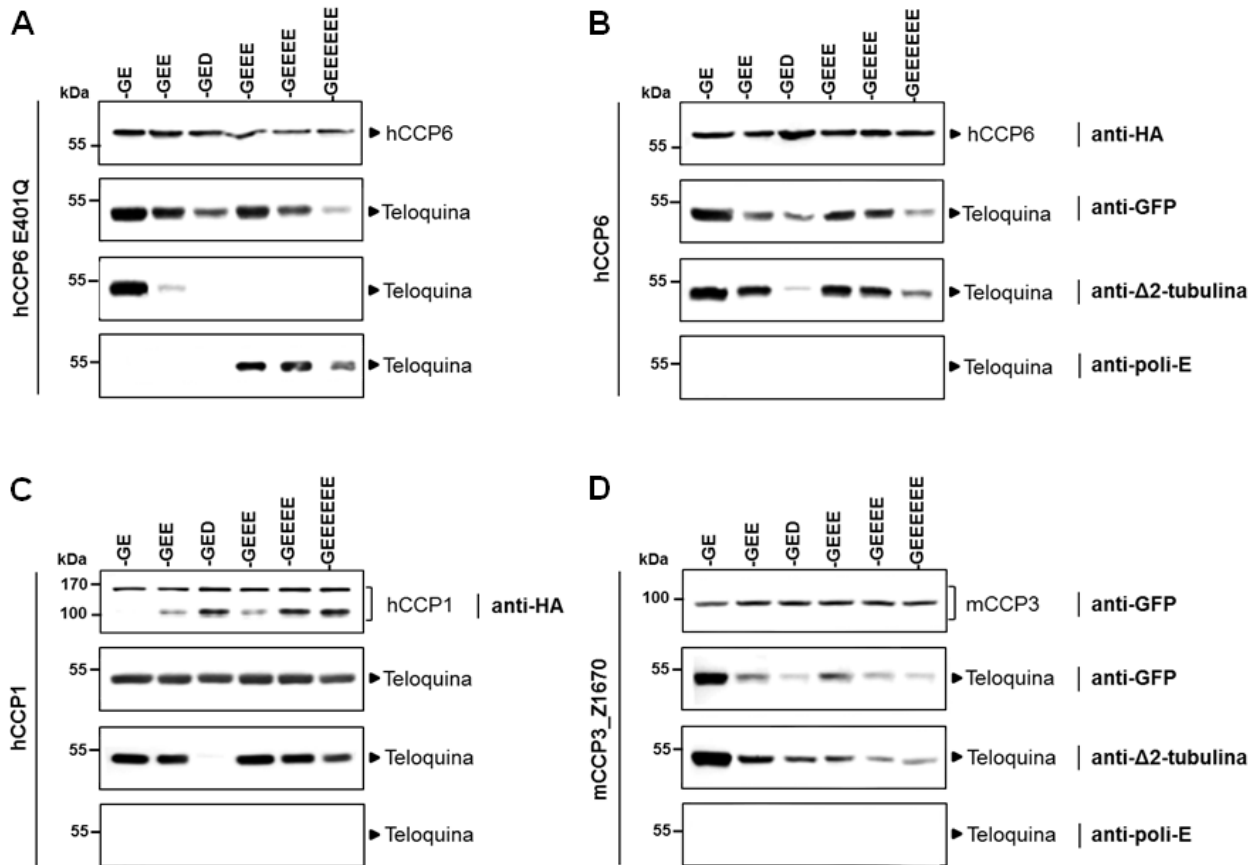
Por este motivo, será necesario llevar a cabo nuevos estudios para profundizar en el conocimiento acerca de la regulación de la actividad enzimática de las CCPs y determinar si existen mecanismos de control desconocidos hasta la fecha que regulen la preferencia de sustrato en la hCCP6. La confirmación de nuestras sospechas expandiría significativamente el rango de posibles señales generadas por la glutamilación en los MTs celulares y la complejidad biológica del código de la tubulina.

### 3.5 Especificidad de sustrato de la CCP6 humana por residuos acídicos

El análisis del centro activo en el modelo estructural de la hCCP6 predice una preferencia de sustrato acídica basándose en la existencia de una Arg conservada en el bolsillo de especificidad S1". Además, el entorno básico en los residuos que rodean la entrada el centro activo es compatible con el procesamiento de sustratos con extensiones variables de Glu C-t, como ya se ha demostrado para las proteínas tubulina, MLCK1, teloquina [124], cGAS [140] y DNAJC7 [286]. Sin embargo, aunque las CCPs son reconocidas como enzimas con actividad de glutamilasa, algunas CCPs han demostrado ser capaces de hidrolizar sustratos con Asp C-t [125],[27]. Esta actividad de aspartilasa nunca ha sido estudiada en la hCCP6.

Para evaluar la procesividad de la hCCP6 y la capacidad de escindir Asp C-t, diseñamos un experimento en el que co-expresamos individualmente distintas versiones artificiales de teloquinas junto a la hCCP6, en células HEK293 T durante 48 h. Las teloquinas recombinantes están fusionadas en su extremo N-t a la proteína YFP y modificadas en su extremo C-t con extensiones variables de Glu (teloquina-EGE[E]<sub>n</sub>, donde n=5) y Asp C-t (teloquina-GED). Además, realizamos el mismo ensayo co-expresando cada una de las teloquinas con la hCCP1 o la mCCP3\_Z1670 (forma trunca de la mCCP3 enzimáticamente activa [125]), como controles positivos de actividad de glutamilasa y de aspartilasa, respectivamente. Tras 48 h de expresión, las fracciones solubles de los extractos celulares fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE y *western blot*, usando los anticuerpos anti-poli-E y anti- $\Delta$ 2-tubulina. El anticuerpo anti-poli-E reconoce teloquinas con extensiones  $\geq 3$  Glu consecutivos, mientras que el anti- $\Delta$ 2-tubulina es capaz de detectar el producto final de la de glutamilación de las teloquinas con un único Glu C-t (-GE). Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 37**.

Cómo esperábamos, los resultados de este ensayo muestran que el mutante hCCP6 E401Q es catalíticamente inactivo, detectándose la señal del anticuerpo anti-poli-E en las teloquinas con  $\geq 3$  Glu y la del anticuerpo anti- $\Delta$ 2-tubulina en la teloquina-GE, que corresponde al epítipo de reconocimiento de este anticuerpo (**figura 37-A**). La disminución de la señal del anticuerpo anti-poli-E y el incremento de la señal del anticuerpo anti- $\Delta$ 2-tubulina respecto al control hCCP6 E401Q, indica que la hCCP6 es capaz de eliminar extensiones de hasta 6 Glu C-t consecutivos hasta el penúltimo Glu (-GE). Esto es posible gracias a la electropositividad existente en el centro activo de la enzima compatible con el reconocimiento de cadenas largas de poli-E C-t.



**Figura 37. Estudio de la procesividad de la CCP6 humana por glutámicos C-terminales, y de su capacidad de hidrolizar aspárticos en el extremo C-t.** Resultados representativos de *western blot* de extractos de células HEK293 T que co-expresaron durante 48 h distintas versiones de teloquinas modificadas en su extremo C-t (teloquina-GE[D,E]<sub>n</sub>) y las siguientes CCPs: (A) hCCP6 E401Q, (B) hCCP6 salvaje, (C) hCCP1 salvaje y (D) mCCP3\_Z1670. La actividad deglutamilasa y deaspartilasa de las distintas CCPs se examinó empleando los anticuerpos anti-poli-E y anti-Δ2-tubulina, que reconocen teloquinas con extensiones de ≥3 Glu C-t consecutivos y con la secuencia -GE C-t, respectivamente. La síntesis de las enzimas recombinantes hCCP6 salvaje, hCCP6 E401Q y hCCP1 se verificó con el anticuerpo anti-HA, mientras que la CCP3\_Z1670 se inmunodetectó con el anticuerpo anti-GFP. Para la CCP1 sobreexpresada, además de la banda principal de 150 kDa, se observan fragmentos de ~120-130 kDa. Las teloquinas están fusionadas a la proteína YFP, por lo su síntesis recombinante se corroboró empleando el anticuerpo anti-GFP.

Además, también observamos una leve actividad deaspartilasa, aunque la débil señal de Δ2-tubulina detectada en la teloquina-GED podría estar relacionada con la elevada sobreexpresión de la proteína recombinante o representar niveles endógenos de Δ2-tubulina en las células HEK293 T (**figura 37-B**). En el caso de la hCCP1, que hidroliza cadenas largas y cortas de poli-E [122],[124], la interpretación de los resultados obtenidos es idéntica a los obtenidos en el ensayo de la hCCP6 (**figura 37-C**). Por último, la mCCP3\_Z1670 cataliza con la misma preferencia la hidrólisis de Glu y Asp C-t hasta el penúltimo residuo C-t, acorde a la especificidad enzimática demostrada previamente en nuestro grupo para esta enzima [125].

## Capítulo I

En este ensayo, observamos la desaparición de la señal del anticuerpo anti-poli-E y un incremento de la señal del anticuerpo anti- $\Delta 2$ -tubulina en todas las versiones de teloquinas analizadas, corroborando la actividad deaspartilasa descrita para la CCP3 (**figura 37-D**).

La teloquina es una proteína con una secuencia aminoacídica idéntica a la región C-terminal de la MLCK1, que es uno de los pocos sustratos endógenos conocidos para la hCCP1 [29]. Ambas contienen 8 Glu C-t consecutivos que son directamente procesados hasta el penúltimo Glu por las CCP1, CCP4 y CCP6 de ratón [6]. En base a nuestros resultados, es tentador hipotetizar que la hCCP6 podría procesar extensiones de hasta 8 Glu C-t consecutivos en la teloquina salvaje como se ha descrito para su ortólogo murino [6]. La longitud de la cadena lateral de Glu en la región C-t de la tubulina puede variar entre 1 y 20 residuos, así que es probable que la hCCP6 y el resto de CCPs (excepto la CCP5) sean capaces de deglutamar extensiones de Glu superiores a las ensayadas en este estudio.

La capacidad de las CCPs de hidrolizar Asp C-t ha sido recientemente explorada, y varios estudios demuestran la presencia de actividad enzimática deaspartilasa para algunas de estas enzimas. En nuestro grupo de investigación, Tort y col. demostraron una cierta actividad deaspartilasa en la mCCP1 y mCCP2 mediante estudios de co-expresión de distintas versiones de teloquinas modificadas en su extremo C-t, en un experimento similar al realizado en nuestro trabajo [125]. Además, describieron por primera vez la habilidad de una CCP, la mCCP3, de catalizar la eliminación de Glu y Asp C-t con la misma eficiencia. Posteriormente, en nuestro grupo identificamos por Cromatografía Diagonal FRAccional Combinada (COFRADIC) cinco nuevos potenciales sustratos procesados directamente por la hCCP1 en células HEK293 T, que incluyen proteínas ribosomales, proteínas HMGB y factores de transcripción y de traducción, con extensiones de longitud variable de residuos acídicos consecutivos en su región C-terminal. Dos de estos sustratos, HMGB3 y la proteína 1 contenedora del dominio de dedo de zinc tipo TRAF (TRAD1), fueron validados, confirmando la capacidad de la CCP1 de hidrolizar Asp C-t, aunque de forma menos eficiente que Glu. Además, el procesamiento C-t de la proteína HMGB3 incluye la hidrólisis de una extensión de >10 Glu consecutivos en la región C-t de la proteína [27], lo que corrobora la elevada procesividad de la hCCP1.

En nuestro caso, el leve incremento de la señal del anticuerpo anti- $\Delta 2$ -tubulina en los extractos celulares de HEK293 T que sobreexpresan la teloquina-GED y hCCP6, podría corresponder al producto de la deaspartilación de la teloquina-GED por la actividad específica de la hCCP6 (**figura 37-B**). Sin embargo, futuros estudios serán necesarios para corroborar esta posible actividad deaspartilasa de la hCCP6.



## Capítulo I

En esta línea, en nuestro laboratorio estamos realizando actualmente estudios de interactómica empleando la técnica de identificación por biotina dependiente de proximidad (BioID) para descubrir nuevas proteínas interactoras de la hCCP6 en condiciones fisiológicas [287]. En cualquier caso, este experimento demuestra que la hCCP6 presenta una clara preferencia por la hidrólisis de Glu sobre Asp C-t, ya que la variación en la señal del anticuerpo anti- $\Delta$ 2-tubulina fue menor que el efecto sobre la señal de poli-E.

La posibilidad de eliminar extensiones de Glu y Asp C-t por diferentes CCPs expande significativamente el número de potenciales sustratos para estas enzimas, y tendría un gran impacto en la funcionalidad de muchas proteínas [125]. Por ejemplo, las proteínas HMGB son proteínas no histónicas pertenecientes a la superfamilia HMG que intervienen en múltiples procesos asociados a la remodelación de la cromatina como la transcripción, replicación, recombinación, reparación del ADN y la estabilidad genómica [288]. La MPT de la proteína HMGB3, así como de la HMGB1 y HMGB2, a través del acortamiento de su cola ácida C-t por la acción de la hCCP1, regula la interacción de estas proteínas con el ADN y, por tanto, su funcionalidad [27]. Del mismo modo, la deglutamilación de la proteína citosólica cGAS por la acción de la CCP5 y la CCP6, regula la actividad de esta proteína promoviendo su unión al ADN de doble cadena vírico (dsADN). La poliglutamilación de cGAS inhibe esta interacción, afectando a los mecanismos de la inmunidad innata frente a las infecciones víricas [140].

En resumen, en este trabajo hemos demostrado que la hCCP6 procesa extensiones de 2 a 6 Glu consecutivos, hasta el penúltimo Glu C-t de las teloloquinas. Además, hemos identificado por primera vez una probable actividad deaspartilasa para esta enzima, que deberá ser corroborada en un futuro mediante estudios de interactómica con el fin de identificar nuevos sustratos *in vivo* para la hCCP6.

### 3.6 Estudios de inhibición de la CCP6 humana

La actividad proteolítica de las MCPs es inhibida *in vitro* por agentes quelantes de cationes metálicos como el EDTA y la OP [19]. Además, una gran variedad de inhibidores sintéticos de bajo peso molecular, metabolitos secundarios producidos por microorganismos, algas y plantas, e inhibidores de naturaleza proteica están disponibles para la inhibición de las MCPs de la familia M14. Nuestro grupo de investigación se ha especializado durante años en la identificación, aislamiento y caracterización de estos inhibidores, con un especial interés en el estudio de nuevos inhibidores exógenos de naturaleza proteica [159]

En estudios previos se evaluó la capacidad inhibitoria de varios inhibidores exógenos proteicos de MCPs frente a la hCCP6 (resultados no publicados). Estos inhibidores fueron los siguientes: latexina [289], PCI [186], ACI [175], LCI [179], TCI [180] y NvCI [182].

## Capítulo I

Los resultados obtenidos sugirieron que el PCI y el NvCI ejercen una inhibición parcial de la actividad de la hCCP6, mientras que el resto de inhibidores no tenían ningún tipo de efecto inhibitor sobre la enzima [264]. Para corroborar estos resultados, repetimos los ensayos de inhibición en las mismas condiciones para el PCI y el NvCI, y, además, evaluamos la capacidad inhibitoria de dos nuevas moléculas químicas pequeñas: el N-(4-Aminobenzoil)-L-Glu (Bz-L-Glu) y el ácido fólico (AF).

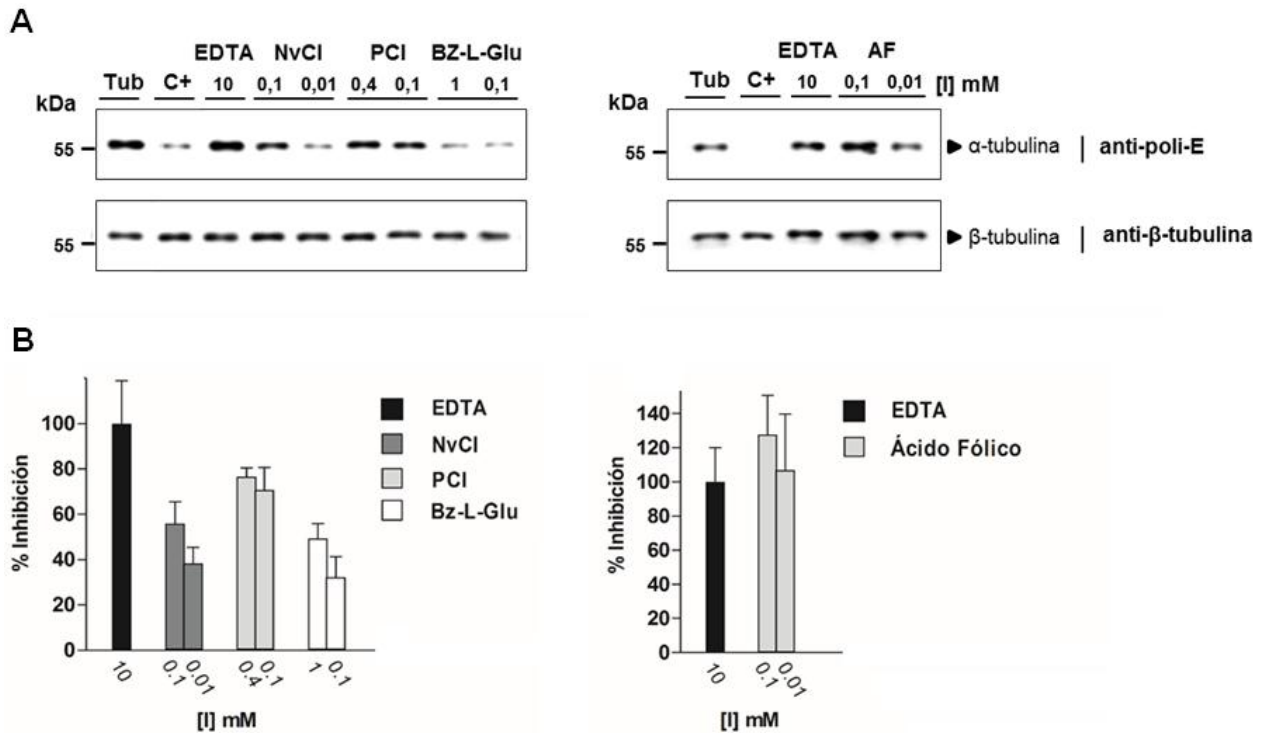
Para realizar los ensayos, preparamos reacciones de incubación con la hCCP6 activa producida en células de mamífero y tubulina purificada de cerebro porcino, en presencia de distintas concentraciones de PCI (0,4 y 0,1 mM), NvCI (0,1 y 0,01 mM), Bz-L-Glu (1 y 0,1 mM) y AF (1 y 0,1 mM). Además, preparamos otras reacciones idénticas a las anteriores pero sin inhibidor (C+) y con EDTA, como control positivo y negativo de actividad deglutamilasa, respectivamente. Después de la incubación, las diferentes muestras fueron analizadas mediante *western blot*, usando el anticuerpo anti-poli-E (**figura 38-A**). Para analizar los resultados de forma cuantitativa, densitometramos las bandas obtenidas en cada caso y calculamos el efecto de cada concentración de inhibidor en la actividad de la hCCP6 en comparación con la reacción control (**figura 38-B**).

Los resultados obtenidos muestran que la hCCP6 usada en los ensayos de inhibición es catalíticamente activa, ya que se observa una clara disminución de la señal del anticuerpo anti-poli-E en la reacción de incubación de la hCCP6 con la tubulina (C+), en comparación con el control de la tubulina sin enzima (Tub). Como era de esperar, la hCCP6 es totalmente inhibida por el EDTA, con niveles de detección de poli-E en la  $\alpha$ -tubulina equivalentes a los obtenidos en el control de la tubulina aislada (Tub) (**figura 38-A y 38-B**). Esta inhibición de MCPs por agentes quelantes como el EDTA ha sido demostrada extensamente en otros estudios [32],[124],[290].

Los inhibidores proteicos exógenos NvCI y PCI ejercieron un efecto inhibitorio parcial de la hCCP6, siendo el PCI más efectivo al eliminar el  $\geq 70\%$  de la actividad enzimática de la hCCP6 a las dos concentraciones ensayadas. (0,1 y 0,4 mM). Tanto el PCI como el NvCI son inhibidores competitivos muy potentes para un gran número de MCPs de la subfamilia M14A, con  $K_i$  del orden de nM o inferior [30],[182]. Por tanto, el NvCI y el PCI no son buenos inhibidores para las CCPs, ya que es necesario concentraciones elevadas (del orden de mM) para conseguir una elevada inhibición de la actividad enzimática de la hCCP6. Este hecho se podría explicar por la presencia del pro-dominio N-t en la CCPs cerca del centro activo, que posiblemente dificulte la unión de estos sustratos de naturaleza proteica.

Los resultados con los inhibidores químicos demostraron que el compuesto Bz-L-Glu es un inhibidor poco potente de la hCCP6, eliminando tan solo un  $\sim 50\%$  de la actividad enzimática de la hCCP6 a concentraciones relativamente elevadas (1 mM).

Sin embargo, el AF resultó ser el inhibidor más potente de todos los estudiados para la hCCP6, con un efecto similar o superior al EDTA a concentraciones hasta 1000 veces inferiores (10  $\mu$ M). Este resultado es especialmente relevante, ya que el folato es un compuesto esencial para las células y la síntesis de ADN. El mecanismo por el que el AF ejerce tal efecto inhibitorio es un misterio, ya que podría actuar como un verdadero inhibidor de la hCCP6 o como un sustrato para esta enzima, compitiendo con la tubulina poliglutamilada presente en la reacción.



**Figura 38. Estudio de la inhibición de la CCP6 humana.** (A) Resultados representativos de los *western blot* realizado para estudiar la inhibición de la hCCP6. En cada carril se analizaron volúmenes equivalentes de las reacciones de incubación a 37°C durante 5 h de la hCCP6 semipurificada con la tubulina poli-E de cerebro porcino, en presencia de distintas concentraciones de EDTA (10 mM), NvCl (0,1 y 0,01 mM), PCI (0,4 y 0,1 mM), Bz-L-Glu (1 y 0,1 mM) o AF (0,1 y 0,01 mM). El nivel de glutamilación del sustrato se examinó con el anticuerpo anti-poli-E, que reconoce largas cadenas de poli-E ( $\geq 3$  Glu) en la región C-t del heterodímero de tubulina. El control positivo (C+) y negativo de actividad deglutamilasa corresponden a las reacciones de incubación de la tubulina poli-E de cerebro porcino con la hCCP6 en ausencia de inhibidores o en presencia de EDTA, respectivamente. Reacciones del sustrato aislado determinan los niveles iniciales de poliglutamilación en la tubulina de cerebro porcino. Todas las reacciones se ensayaron por triplicado. La  $\beta$ -tubulina se ha empleado como control de carga del gel. (B) Inhibición relativa de los diferentes inhibidores testados frente a la hCCP6. Los niveles de poliglutamilación para cada una de las concentraciones de inhibidor ensayadas fueron cuantificados por densitometría, normalizados respecto a la  $\beta$ -tubulina y relativizados respecto al control del sustrato aislado (Tub). Las barras de error corresponden a la media de los valores obtenidos  $\pm$  desviación estándar (n=3).

## Capítulo I

Curiosamente, la forma mayoritaria del AF en las células corresponde a la forma poliglutamilada, es decir, con largas cadenas de Glu unidos mediante enlaces gamma [291]. Es evidente la homología entre estas moléculas y los sustratos descritos para la hCCP6, aunque será necesario realizar futuros estudios para revelar la capacidad de esta enzima para hidrolizar este tipo de moléculas.

La identificación del AF como un prometededor inhibidor potente de CCPs podría ser útil para llevar a cabo ensayos bioquímicos y funcionales de MCPs de la subfamilia M14D. Además, al ser un inhibidor químico relativamente pequeño podría emplearse como cofactor para la formación de complejos estables que faciliten la cristalización de la proteína y determinación de su estructura 3D, cuando seamos capaces de producir y purificar estas enzimas en cantidades suficientes para llevar a cabo estudios estructurales. Si esto ocurriera, la obtención de la estructura cristalina de la hCCP6 con una molécula unida de forma estable en el centro activo nos permitiría, a su vez, la caracterización de los determinantes estructurales de la unión del sustrato y evaluar, por ejemplo, el rol de la Phe equivalente a la Tyr248 en la bCPA en la fijación del sustrato.

En este apartado hemos testado la capacidad inhibitoria de la actividad deglutamilasa de la hCCP6 de inhibidores proteicos exógenos de las MCPs de la subfamilia M14A y de moléculas con ácidos carboxílicos en su estructura, y concluimos que únicamente el AF constituye un potencial inhibidor de la hCCP6 *in vitro*. El AF representa el primer inhibidor endógeno de MCPs de la subfamilia M14D identificado hasta la fecha. Sin embargo, futuros estudios serán necesarios para investigar la posible conexión de esta enzima con el metabolismo del AF, así como su rol como inhibidor de MCPs.



## ***CAPITULO II***

---

### ***Caracterización de la CPO humana***



### 1 INTRODUCCIÓN

Las MCPs son exopeptidasas de gran relevancia fisiológica que contienen un átomo de zinc esencial en el centro activo y catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos C-t de péptidos y proteínas [154]. Según la base de datos MEROPS, el grupo más estudiado de MCPs corresponde a las proteasas de la familia M14 [22], que se agrupan a su vez en las subfamilias M14A, M14B, M14C, M14D [295] en base a la conservación secuencial de los motivos que contienen los ligandos de unión a zinc y a su homología estructural. La bCPA fue la primera peptidasa M14 identificada y se aisló hace más de 80 años a partir de extractos de páncreas. Desde entonces, el número de MCPs pancreáticas y extra-pancreáticas pertenecientes a esta familia ha ido incrementándose considerablemente, en paralelo al número de estructuras 3D resueltas [30].

La subfamilia M14A de las MCPs es la más representada y mejor caracterizada de las peptidasas M14, e incluye las enzimas pancreáticas digestivas hCPA1, hCPA2 y hCPB. Estas 3 enzimas corresponden a proteínas no glicosiladas con un tamaño de ~35 kDa, que son sintetizadas con un péptido señal y secretadas como pro-carboxipeptidasas (PCPs) o zimógenos inactivos por el páncreas exocrino. La presencia de un pro-segmento o pro-dominio de ~100 residuos en el extremo N-t de las PCPs bloquea o reduce significativamente la actividad catalítica de estas enzimas, manteniéndolas en latencia hasta su activación en el lugar y momento adecuados [292],[293]. Tras la secreción en el duodeno intestinal, la proteólisis limitada del pro-segmento mediada por tripsina y otras serín-proteasas pancreáticas, genera enzimas activas de ~300 residuos [47],[294],[295], que participan activamente en la digestión luminal de las proteínas y péptidos procedentes de la dieta y otras fuentes endógenas, mediante la hidrólisis de los enlaces peptídicos C-t de los productos de hidrólisis de endopeptidasas digestivas presentes en el estómago y en el intestino delgado [241],[242] .

Las formas activas de las MCPs digestivas hCPA1, hCPA2 y hCPB presentan distintas especificidades de sustrato que se complementan funcionalmente durante el proceso digestivo. La hCPA1 y la hCPA2 hidrolizan preferentemente péptidos con residuos alifáticos y residuos aromáticos voluminosos en sus extremos C-t, respectivamente, mientras que la hCPB actúa específicamente sobre aminoácidos básicos [41],[59],[145]. Aunque su acción combinada permite obtener un amplio rango de aminoácidos libres, estas MCPs pancreáticas son incapaces de hidrolizar aminoácidos ácidos C-t [242],[243], como el Asp o Glu, aun siendo 2 de los aminoácidos más abundantes en las proteínas de los alimentos [296]. Recientemente, se ha caracterizado la hCPO como una nueva enzima digestiva de la subfamilia M14A de las MCPs.



## Capítulo II

A diferencia de las MCPs digestivas pancreáticas, la hCPO carece del pro-segmento N-t característico de las peptidasas M14A y se produce como una enzima constitutivamente activa. En su lugar, presenta una pequeña secuencia conservada N-t de 20-28 residuos que no es escindido de la proteína madura catalíticamente activa y cuya función se desconoce [83],[90]. La hCPO es una proteína altamente N-glicosilada sintetizada por los enterocitos del epitelio intestinal, que contiene un péptido señal para su secreción al espacio extracelular y su posterior anclaje a través de una molécula de GPI a la superficie externa de la membrana plasmática apical.

La hCPO se localiza en las microvellosidades o borde en cepillo (BC) de las células epiteliales del intestino delgado, donde participa a través de su especificidad de sustrato acídica en la última etapa de la digestión de los productos de degradación procedentes de la fase luminal de la digestión proteica en el intestino delgado, para la generación de aminoácidos acídicos libres, dipéptidos y tripéptidos fácilmente absorbibles por estas células especializadas del epitelio intestinal [90].

La acción biológica de las MCPs de la subfamilia M14A puede ser regulada específicamente mediante inhibidores exógenos de naturaleza proteica aislados y caracterizados a partir de diferentes organismos evolutivamente distantes como la patata (PCI [171],[186] e imaPCI [172]), el tomate (MCPI [173],[174]), los parásitos intestinales *Ascaris suum* y *Ascaris lumbricoides* (ACI [175],[176],[178]), las garrapatas *Rhipicephalus bursa* y *Haemaphysalis longicornis* (TCI [180] y HITCI [181]), la sanguijuela *Hirudo medicinalis* (LCI [179]) e invertebrados marinos (SmCI [183] y NvCI [182]). Todos ellos se tratan de proteínas globulares pequeñas (39-75 residuos) con una estructura terciaria muy estable mantenida por varios puentes disulfuro y un mecanismo de inhibición que mimetiza la unión del sustrato, basado en la interacción de los 2-4 residuos del extremo C-t con el centro activo de la enzima. Hasta la fecha, el NvCI constituye el inhibidor más potente descrito para los miembros de la subfamilia M14A, con una constante de equilibrio de disociación ( $K_i$ ) del orden de pM [182].

En este estudio, presentamos la estructura cristalina de una forma soluble de la hCPO (hCPO $\Delta$ C), en su forma aislada y en complejo con el inhibidor NvCI, obtenida mediante cristalografía de rayos X a una resolución de 1,85 Å. La caracterización estructural de la hCPO permitió estudiar los determinantes estructurales subyacentes en la preferencia de sustrato acídica C-t de la CPO, completando así el análisis del rango de especificidades de sustrato presentes en las MCPs digestivas. Además, investigamos los cambios estructurales inducidos en el centro activo de la enzima por la unión del NvCI y detallamos las interacciones establecidas entre la proteasa y el inhibidor.

## **Capítulo II**

Por último, mediante ensayos *in vitro* de cinética enzimática y análisis de los productos de digestión mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, demostramos la preferencia de la hCPO por la hidrólisis de Glu frente a Asp, así como la habilidad de la enzima de procesar el extremo C-t de proteínas endógenas bioactivas como el Factor de Crecimiento Epidérmico humano (hEGF).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Producción recombinante de la hCPOΔC humana

A partir de un clon codificante para la hCPO (clon ID 8327546; GenBank™ número de acceso BC112078) generamos mediante PCR un constructo que codifica para el mutante soluble de la hCPO, denominado hCPOΔC (Tyr21-Trp349), que carece del péptido señal de secreción endógeno de la proteína y de los 25 aminoácidos C-t correspondientes a la señal de reconocimiento para su modificación post-traducciona por una molécula de GPI. Para la PCR, empleamos la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (New England Biolabs) y los oligonucleótidos cebadores sentido 5'-CGGGATCCGAAGCTTTATGATAGATCCTTAGCC AACAC-3' y antisentido 5'-TTTAGCGGCCGCTTACCAGTGTTTCGCATACACATCATCC-3', que contienen las dianas de restricción BamHI y NotI, respectivamente. El producto de PCR obtenido se clonó en el vector de expresión pTriEx-7 (Novagen) entre las dianas de restricción BamHI y NotI, y verificamos mediante análisis de restricción y secuenciación que el clonaje había funcionado correctamente. El vector recombinante pTriEx-7 permite expresar la hCPOΔC fusionada en su extremo N-t a la secuencia señal de exportación IgM para la secreción extracelular de la proteína recombinante, y a la etiqueta Strep-tag® II para su inmunodetección y purificación.

Para la producción transitoria de la hCPOΔC recombinante, mezclamos el vector recombinante pTriex-7 codificante para la hCPOΔC con PEI (Polysciences) en una proporción ADN:PEI de 1:3 (p/p) en presencia de medio FreeStyle 293 (Life Technologies). A continuación, incubamos la mezcla durante 20 min a temperatura ambiente para favorecer la formación de los complejos de transfección ADN-PEI y añadimos la mezcla de transfección a razón de 1 µg de ADN por ml de cultivo, a 500 ml de cultivos de células de mamífero HEK293 F (Life Technologies) crecidas en suspensión a una densidad celular de  $1 \cdot 10^6$  células/ml en medio FreeStyle 293. Seguidamente, incubamos los cultivos durante 9 días para la sobreexpresión extracelular de la proteína recombinante en un agitador rotatorio a 120 rpm, 37°C, 8% de CO<sub>2</sub> y 80% de humedad. Tras 9 días de expresión extracelular, centrifugamos el cultivo a 294 xg durante 30 min a temperatura ambiente y recuperamos el medio de expresión. Finalmente, filtramos el medio a través de una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,8 µm (PALL Life Sciences) y lo reservamos a 4°C para la posterior purificación de la proteína recombinante.

### 2.2 Purificación de la CPOΔC humana

Purificamos la proteína recombinante hCPOΔC a partir del medio de expresión empleando una combinación de 3 métodos cromatográficos, que incluye un primer paso de semipurificación mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), seguido de un segundo paso de cromatografía de afinidad anti-Strep-tag® II (AC) y, finalmente, un tercer paso de cromatografía de exclusión molecular. Para ello, saturamos el medio de expresión con 30% de sulfato de amonio (Sigma-Aldrich) y lo inyectamos a una columna (CV = 15 ml) empaquetada con la resina hidrofóbica „TOYOPEARL Butyl-650 M” (Tosoh Bioscience) conectada al sistema de FPLC ÄKTA™ Purifier 100 (GE Healthcare), previamente equilibrada con 5 CV del tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 30% sulfato de amonio. Seguidamente, lavamos la columna con 2 CV del tampón de equilibrado y eluimos las proteínas unidas a la resina en fracciones de 10 ml con un gradiente lineal decreciente (desde 30 a 0%) de sulfato de amonio. Las fracciones eluidas de la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) que contienen la hCPOΔC semipurificada fueron agrupadas y aplicadas en una columna (CV = 5 ml) empaquetada con resina Strep-Tactin® MacroPrep® (IBA Technologies), previamente equilibrada con tampón 100 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich), pH 7,5, 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich) (tampón W). A continuación, lavamos la columna con 2 CV de tampón W y eluimos la proteína de la resina en fracciones de 2 ml con 6 CV del tampón W suplementado con 2,5 mM D-destibiotina (IBA Technologies). Por último, las fracciones eluidas de la cromatografía de afinidad anti-Strep-tag® II que contenían la proteína de interés fueron agrupadas y, seguidamente, purificamos hasta la homogeneidad la hCPOΔC recombinante mediante cromatografía de exclusión molecular, empleando una columna Superdex 75 HR 10/30 (GE Healthcare). La columna fue equilibrada con el tampón 25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl y, tras aplicar la muestra, eluimos la proteína con el tampón de equilibrado en fracciones de 5 ml.

Por último, aquellas fracciones que contenían la enzima pura fueron agrupadas y concentradas empleando un dispositivo de ultrafiltración por centrifugación Amicon Ultra-15 (10 kDa, EMD Millipore). Durante el proceso de concentración, aprovechamos para intercambiar el tampón en el que se había eluido la proteína en la gel filtración por el tampón de cristalización 5 mM Tris-HCl, pH 7,3, 100 mM NaCl y 1 mM β-mercaptoetanol. Finalmente, determinamos la concentración de proteína midiendo la absorbancia a 280 nm ( $Abs_{280}$ ), asumiendo una  $Abs_{280}$  (0,1%) (1 g/l) = 2,2, y congelamos a -80°C la hCPOΔC purificada a una concentración de 0,2 mg/ml.

### 2.3 Análisis del grado de pureza de la CPOΔC humana purificada

La pureza de la proteína y la homogeneidad alcanzada tras cada paso de purificación se verificó mediante electroforesis SDS-PAGE. Para ello, mezclamos 15 µl de cada fracción eluida con tampón de muestra 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8, 25% glicerol (Sigma-Aldrich), 7,5% (p/v) SDS (Sigma-Aldrich), 0,25 mg/ml azul de bromofenol (Sigma-Aldrich) y 12,5% (v/v) β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)) y hervimos las muestras a 95°C durante 5 minutos. Seguidamente, resolvimos las muestras en un minigel de SDS-PAGE empleando un módulo de electroforesis vertical mini-Protean® (Bio-Rad) y un voltaje continuo de 120 V durante 60 min. Los geles empleados contienen un gel separador al 12% de poliacrilamida en tampón 125 mM Tris-HCl, pH 8,8, y 0.1% (p/v) SDS, y un gel apilador al 4% de poliacrilamida en tampón 375 mM Tris-HCl, pH 6,8, y 0.1% (p/v) SDS. El tampón de migración en el que se realizó la electroforesis corresponde al tampón Tris-glicina (Tris-Gly) (25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM glicina (Sigma-Aldrich) y 0,1% (p/v) SDS) y el marcador de proteínas usado es el „EZ-Run™ Prestained Rec Protein Ladder“ (Fisher Scientific). Finalizada la electroforesis, teñimos los geles con BlueSafe (Nzytech) para la visualización de las bandas proteicas.

### 2.4 Producción y purificación del NvCI

El NvCI fue producido por el Dr. Covaleta en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, según se describe en [182]. Posteriormente, purificamos el inhibidor a partir del sobrenadante de la fermentación como se describe en esa misma publicación, pero con pequeñas modificaciones. Para ello, empleamos una combinación de dos métodos cromatográficos, que incluye un primer paso de semipurificación mediante cromatografía de intercambio catiónico seguido de un segundo paso de cromatografía de exclusión molecular.

Para la cromatografía de intercambio catiónico empleamos una columna (CV = 15 ml) Streamline Direct HST (GE Healthcare) conectada al sistema de FPLC ÄKTA™ Purifier 100 (GE Healthcare), previamente equilibrada con 2 CV del tampón 100 mM citrato, pH 3,2. A continuación, ajustamos el sobrenadante a una concentración de 100 mM de citrato, pH 3,2, centrifugamos el medio a 10.000 xg a 4°C durante 20 min y filtramos el sobrenadante a través de una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm (EMD Millipore). Seguidamente, inyectamos la muestra en la columna y lavamos con 5 CV del mismo tampón de equilibrado. Por último, eluimos las proteínas de la resina en fracciones de 5 ml estableciendo un gradiente lineal creciente (desde 0 a 100%) con tampón 100 mM fosfato, pH 8,0.

## Capítulo II

Tras la elución, las fracciones que contenían el NvCI semipurificado fueron agrupadas, tamponadas con 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, para incrementar la solubilidad de la proteína y concentradas empleando un dispositivo de ultrafiltración por centrifugación Amicon Ultra-15 (3 kDa, EMD Millipore). Finalmente, inyectamos la muestra concentrada en una columna de exclusión molecular HiLoad 16/60 empaquetada con resina Superdex 30 prep grade (GE Healthcare), previamente equilibrada con el tampón PBS, pH 7,4. Las proteínas fueron eluidas de la columna empleando el mismo tampón de equilibrado en fracciones de 5 ml y, aquellas fracciones que contenían la enzima pura, fueron agrupadas, tamponadas de nuevo con 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, y concentradas empleando un dispositivo de ultrafiltración por centrifugación Amicon Ultra-15 (3 kDa, EMD Millipore). La pureza del NvCI se determinó por espectrometría de masas MALDI-TOF MS, siguiendo las instrucciones detalladas en el apartado 2.5.

### 2.5 Determinación de los parámetros cinéticos de la CPOΔC humana

Analizamos la actividad carboxipeptidasa de la hCPOΔC purificada empleando el sustrato colorimétrico 3-(2-furil)acrilil-Glu-Glu-OH (FA-EE,  $\epsilon_{340} = 1671,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (Bachem), según se describe en [90]. La hidrólisis enzimática del sustrato se evaluó a 25°C, monitorizando de forma continua durante 10 min la disminución de la absorbancia a 340 nm, con la ayuda del espectrofotómetro Victor3 (Perkin Elmer). Para determinar los parámetros cinéticos  $K_M$  y  $V_{max}$  de la enzima frente al FA-EE, calculamos las velocidades iniciales de reacción ( $v_0$ ) para distintas concentraciones de sustrato (entre 0 y 1 M), empleando una concentración fija de enzima de 14 nM. Las reacciones se prepararon por triplicado en tampón de actividad 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, y en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  en placas de 96 pocillos de fondo plano. Finalmente, ajustamos los valores  $v_0$  vs [S] a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) y analizamos los datos mediante regresión no lineal con el programa GraphPad Prism 5.0. Los parámetros cinéticos  $K_{cat}$  ( $K_{cat} = V_{max}/[E]$ ) y  $K_{cat}/K_M$  se derivaron a partir de los valores obtenidos para  $K_M$  y  $V_{max}$ .

$$(Ec. 1) \quad v_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

Donde [S] corresponde a la concentración de sustrato,  $V_{max}$  a la velocidad enzimática máxima,  $K_M$  es la constante de Michaelis-Menten y [E] la concentración de enzima activa.

### 2.6 Determinación de la estructura cuaternaria de la CPOΔC humana en solución

El estado de oligomerización y el peso molecular aparente de la hCPOΔC purificada se determinó por cromatografía analítica de exclusión molecular. Para ello, inyectamos 50 µg de la enzima pura en una columna Superdex 75 HR 10/30 (GE Healthcare) conectada al sistema de FPLC ÄKTA Purifier 100 (GE Healthcare), previamente equilibrada con el tampón 25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl y calibrada con 50 µg de los siguientes marcadores de peso molecular: azul de dextrano, BSA, anhidrasa carbónica, citocromo C y aprotinina (Sigma-Aldrich). Las proteínas analizadas se eluyeron en fracciones de 5 ml con el mismo tampón de equilibrado. Preparamos una curva de calibración representando  $V_e/V_0$  ( $V_e$  = volumen de elución para cada proteína y  $V_0$  = volumen vacío, determinado por el azul de dextrano) respecto al logaritmo del  $M_w$  de los marcadores.

Posteriormente, confirmamos de una forma más precisa el  $M_w$  del mutante soluble de la hCPO mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Para la preparación de la muestra, aplicamos 2 µl de la enzima concentrada y purificada sobre una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,025 µm (Millipore EMD) para su diálisis frente a una solución de 50 mM de bicarbonato amónico (Sigma-Aldrich). A continuación, mezclamos volúmenes equivalentes de la proteína desalada y la matriz 2',6'-dihidroxiacetofenona (DHAP, Sigma-Aldrich), aplicamos 1 µl de la mezcla sobre la placa para MALDI '*MTP 384 polished steel*' (Bruker Daltonics) y dejamos evaporar el solvente a temperatura ambiente.

El espectro de masas fue adquirido con la ayuda de un espectrómetro de masas '*UltrafleXtreme MALDI-TOF*' (Bruker Daltonics), en modo lineal positivo y a un voltaje de aceleración de 25 kV. La calibración del aparato se realizó con el calibrante externo '*Protein calibration Standard I*' (Bruker Daltonics).

### 2.7 Cristalización y adquisición de datos

La exploración de las condiciones iniciales de cristalización se llevaron a cabo empleando una matriz comercial en formato de placa de 96 pocillos (PACT Premier HT-96, Molecular Dimensions), que permite explorar una gran diversidad de condiciones de cristalización (tampones, pH, concentración salina y precipitante). Para ello, empleamos el método de difusión de vapor por gota colgante, mezclando en las placas volúmenes equivalentes de la solución reservorio presente en cada condición con la solución de la proteína pura (~5 mg/ml hCPOΔC en 5 mM Tris-HCl, pH 7,3, 100 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoetanol), utilizando un robot dispensador Phoenix (Art Robbins Instruments).

## Capítulo II

A continuación, incubamos las placas a 18°C varios días para permitir la formación de los cristales e identificar las condiciones óptimas para su formación. Finalmente, identificamos los primeros cristales en la condición correspondiente a 100 mM HEPES, pH 7,0, 200 mM cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y 20% (p/v) polietilenglicol (PEG) 6000), de manera que replicamos esta condición en placas de 24 pocillos, mezclando manualmente volúmenes equivalentes de la solución de proteína y del reservorio, y adicionando a las gotas distintos ratios del inhibidor NvCl purificado y PNGasa F (Sigma-Aldrich). De nuevo, incubamos las placas a 18°C para permitir la formación de cristales con una morfología y tamaño adecuados para su difracción.

Tras varias semanas de incubación, aparecieron cristales individuales en la condición 100 mM HEPES, pH 7,0, 200 mM cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), 20% (p/v) polietilenglicol (PEG) 6000) y NvCl, a una a una relación molar de 1:0,5 de hCPOΔC:NvCl. Para su criopreservación, los cristales fueron pescados y congelados rápidamente en nitrógeno líquido antes del análisis de difracción, en una solución crioprotectora que contiene el tampón del reservorio con un 15% de glicerol (v/v). La difracción de los cristales congelados (100 K) se realizó en el sincrotrón ALBA en Barcelona (línea de luz BL13-XALOC [297]). Los datos fueron integrados usando el programa XDS [298], y para el escalado, reducción y posterior análisis de la información se utilizó el programa CCP4 [299].

### 2.8 Determinación de la estructura tridimensional y refinamiento

La estructura 3D de la hCPOΔC se obtuvo a partir de los datos del análisis de difracción por rayos X, empleando el método de reemplazo molecular y la estructura de la hCPA4 en complejo con un hexapéptido (PDB: 2PCU) como modelo de referencia. Los mapas de densidad electrónica obtenidos de forma automática con el programa CCP4, fueron corregidos manualmente con la ayuda del programa COOT [300] para construir el modelo completo de la hCPOΔC. El refinamiento del modelo se realizó con los programas Refmac [301] y Phenix [302]. Finalmente, todas las representaciones gráficas de la estructura 3D de la hCPOΔC se realizaron con el programa PyMOL [148].

### 2.9 Código de acceso

Las coordenadas atómicas para la estructura 3D de la carboxipeptidasa O humana (hCPO) en complejo con el inhibidor NvCl han sido depositadas en el Banco de Datos de Proteínas (RCSB PDB) ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)), con el código de acceso 5MRV.



## 2.10 Alineamiento de las metalo-carboxipeptidasas digestivas M14A

Realizamos un alineamiento secuencial basado en la estructura 3D de los dominios catalíticos de las MCPs digestivas de la subfamilia M14A: hCPA1 (código Uniprot: P15085; código PDB: 3FJU), hCPA2 (Uniprot: P48052; PDB: 1DTD), hCPB (Uniprot: P15086; PDB: 1ZLI) y hCPO (Uniprot: Q8IVL8; PDB: 5MRV), empleando el programa PROMALS3D [303]. Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos UniprotKB/SWISS-PROT ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) y las estructuras 3D del Banco de Datos de Proteínas ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)). La representación gráfica del alineamiento estructural de las 4 MCPs digestivas se realizó con el programa PyMOL [148].

## 2.11 Cálculo de la $K_i$ para inhibidores de unión fuerte

Empleamos el método de Morrison [304] para determinar las constantes de inhibición ( $K_i$ ) de la hCPOΔC de varios inhibidores proteicos reversibles de unión fuerte de MCPs de la subfamilia M14A: PCI, LCI, TCI y ACI. Estos inhibidores fueron producidos de forma recombinante y purificados en nuestro grupo, según se describe en [172],[175],[179],[193]. Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo en condiciones de equilibrio ( $[E_0]/K_i \leq 10$ ), pre-incubando a 25°C durante 15 min concentraciones crecientes de cada inhibidor (de 0 a 500 nM) con una concentración fija de enzima de 30 nM. Tras la pre-incubación, añadimos 500 μM del sustrato FA-EE a todas las reacciones y monitorizamos de forma continua durante 10 min la disminución de la absorbancia a 340 nm con la ayuda del espectrofotómetro Victor3. En paralelo, establecimos reacciones control de incubación del sustrato con la enzima, para determinar las velocidades iniciales de reacción ( $v_0$ ) en ausencia de inhibidor. Las reacciones se prepararon por triplicado en tampón de actividad 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, y en un volumen final de 200 μl en placas de 96 pocillos de fondo plano. Para cada concentración de inhibidor, calculamos la actividad enzimática residual ( $v_i/v_0$ ) y ajustamos los valores  $v_i/v_0$  vs  $[I]$  a la ecuación cuadrática de Morrison (Ec. 2) mediante regresión no-lineal, empleando una modalidad de inhibición competitiva. Finalmente, analizamos los datos cinéticos mediante regresión no-lineal con la ayuda del programa GraphPad Prism 5.0. para determinar la  $K_i$  aparente ( $K_i^{app}$ ), y calculamos las  $K_i$  reales para cada inhibidor aplicando la ecuación 3 (Ec. 3) para inhibidores competitivos, reemplazando los valores de  $K_i^{app}$  obtenidos anteriormente (Ec. 2) y la  $[S_0]$  empleada.

$$(Ec. 2) \quad \frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{([E]_T + [I]_T + K_i^{app}) - \sqrt{([E]_T + [I]_T + K_i^{app})^2 - 4[E]_T[I]_T}}{2[E]_T}$$

$$(Ec. 3) \quad K_i = \frac{K_i^{app}}{([S_0]/K_M) + 1}$$

Donde  $v_i/v_0$  corresponde a la actividad enzimática residual,  $[E]_T$  es la concentración total de enzima activa,  $[I]_T$  es la concentración total de inhibidor,  $[S_0]$  equivale a la concentración de sustrato ensayada y  $K_i^{app}$  y  $K_i$  son las constantes de inhibición aparente y real, respectivamente.

## 2.12 Cálculo de la $K_i$ para el NvCI

Para determinar la modalidad de inhibición del NvCI y calcular el valor de  $K_i$  para el complejo del inhibidor y la hCPOΔC, empleamos el método de Lineweaver-Burk [305]. Para ello, ensayamos diferentes concentraciones de sustrato (50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 μM) para cada concentración de NvCI (0,5, 1, 5 y 10 μM), empleando una concentración fija de 30 nM de enzima. La enzima fue pre-incubada con cada concentración de inhibidor durante 15 min a 25°C, previamente a la adición de 500 μM del sustrato FA-EE. A continuación, monitorizamos de forma continua durante 10 min la disminución de la absorbancia a 340 nm con la ayuda del espectrofotómetro Victor3. En paralelo, establecimos reacciones control de incubación del sustrato con la enzima, para determinar la actividad carboxipeptidasa inicial de la hCPOΔC en ausencia del inhibidor. Las reacciones se prepararon por triplicado en tampón de actividad 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, y en un volumen final de 200 μl en placas de 96 pocillos de fondo plano.

Para cada concentración de inhibidor, determinamos las velocidades iniciales de reacción ( $v_0$ ) a las distintas concentraciones de sustrato ensayadas. A continuación, calculamos los dobles recíprocos de  $v_0$  ( $1/v_0$ ) y  $[S]$  ( $1/[S]$ ) y representamos gráficamente  $1/v_0$  respecto a  $1/[S]$  para la interpretación visual del tipo de inhibición. Por último, estimamos el valor de  $K_i$  para el NvCI ajustando los valores  $v_0$  vs  $[S]$  a la ecuación 4 (Ec. 4) para inhibidores competitivos y analizamos los datos cinéticos obtenidos mediante regresión no lineal empleando el programa GraphPad Prism 5.0.

$$(Ec. 4) \quad v_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{\left( K_M \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S] \right)}$$

Donde  $v_0$  corresponde a la velocidad inicial de reacción,  $V_{max}$  es la velocidad enzimática máxima,  $[S]$  equivalente a la concentración de sustrato ensayada,  $K_M$  es la constante de Michaelis-Menten,  $[I]$  corresponde a la concentración total del inhibidor y  $K_i$  es la constante de inhibición.

### 2.13 Especificidad de sustrato de la CPOΔC humana

Preparamos reacciones que contienen 80 nM de la enzima y 1,6 μM de cada uno de los péptidos sintéticos ARLSQQKFPKAE y ARLSQQKFPKAD (GenScript), que difieren únicamente en su residuo C-t. Además, incluimos reacciones en las que incubamos la enzima simultáneamente con la misma concentración de ambos péptidos.

En paralelo, preparamos reacciones de la enzima con 1,6 μM de Met-encefalinas que contienen una Arg, Lys o Phe (Phoenix Pharmaceuticals, Inc) en su extremo C-t. Por último, como control de la especificidad enzimática, establecimos reacciones de incubación de la enzima desnaturalizada a 95°C durante 10 min con los distintos oligopéptidos. Todas las reacciones se ensayaron por duplicado en un volumen final de 20 μl en tampón de actividad 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, y fueron incubadas a 37°C durante 1, 5, 15 y 30 min. Tras la incubación, detuvimos las reacciones de digestión añadiendo 4 volúmenes de 0,1% ácido trifluoroacético (TFA).

Las reacciones de digestión fueron analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF, mezclando volúmenes equivalentes de las reacciones y la matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA, Sigma-Aldrich). Seguidamente, aplicamos 1 μl de la mezcla en la placa para MALDI 'MTP 384 polished steel' (Bruker Daltonics) y dejamos evaporar el solvente a temperatura ambiente. Los espectros de masas se adquirieron en un espectrómetro de masas „UltrafleXtreme MALDI-TOF' (Bruker Daltonics), en modo reflectrón positivo y a un voltaje de aceleración de 25 kV. La calibración del aparato se realizó con el calibrante externo 'Peptide Calibration Standard' (Bruker Daltonics).

### 2.14 Proteólisis C-terminal del EGF por la CPOΔC humana

Preparamos reacciones que contienen 1,5 μg de hEGF<sub>1-53</sub> recombinante (R&D Systems) y 30 nM de la enzima bCPA (Sigma-Aldrich), 50 nM de la CPB porcina (pCPB, Sigma-Aldrich) y 30 nM de la hCPOΔC. En paralelo, establecimos reacciones del sustrato aislado para determinar la masa monoisotópica del hEGF<sub>1-53</sub>, y reacciones de digestión del sustrato únicamente con la bCPA y la pCPB. Todas las reacciones se ensayaron por duplicado en un volumen final de 20 μl en tampón de actividad 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 250 mM NaCl, y fueron incubadas a 37°C durante 5, 15 y 30 min. Finalizamos los tiempos de incubación establecidos, detuvimos las reacciones de digestión añadiendo un volumen equivalente de 0,1% TFA. Por último, las reacciones de digestión fueron analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF, mezclando volúmenes equivalentes de las reacciones y la matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA, Sigma-Aldrich). Seguidamente, aplicamos 1 μl de la mezcla sobre la placa para MALDI 'MTP 384 polished steel' (Bruker Daltonics) y dejamos evaporar el solvente a temperatura ambiente.

## Capítulo II

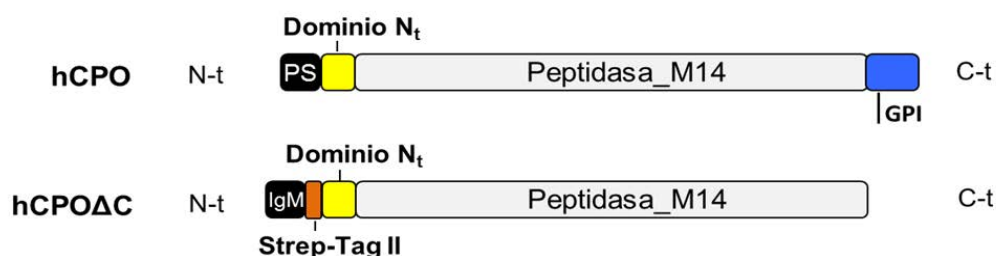
Los espectros de masas se adquirieron en un espectrómetro de masas „*UltrafleXtreme MALDI-TOF*’ (Bruker Daltonics), en modo lineal positivo y a un voltaje de aceleración de 25 kV. La calibración del aparato se realizó con el calibrante externo ‘*Protein calibration Standard I*’ (Bruker Daltonics).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Producción y purificación de la CPOΔC en células de mamífero

La hCPO es una proteína asociada a membrana a través de una molécula de GPI localizada en su extremo C-t, con puentes disulfuro y altamente N-glicosilada [90]. Tal complejidad estructural representa un gran desafío para la expresión y purificación de la enzima en gran cantidad y en su conformación nativa soluble enzimáticamente activa, que nos permita llevar a cabo estudios estructurales.

Para superar las dificultades asociadas a su producción, clonamos en el vector de expresión pTriEx-7 una forma truncada de la hCPO denominada hCPOΔC (residuos Tyr21-Trp329, acorde a la numeración en la hCPO activa), que carece de la secuencia señal de reconocimiento C-t para su escisión post-traducciona l y reemplazo por una molécula de GPI, y del PS endógeno. En su lugar, presenta una secuencia señal de exportación IgM N-t que permite la secreción eficiente de la proteína recombinante y, además, contiene una etiqueta Strep-tag® II N-t para la purificación e inmunodetección de la hCPOΔC. Así pues, la expresión recombinante de esta forma truncada de la hCPO permite la síntesis de la proteína en su forma soluble, maximizando el rendimiento en su producción y facilitando su purificación (figura 39).

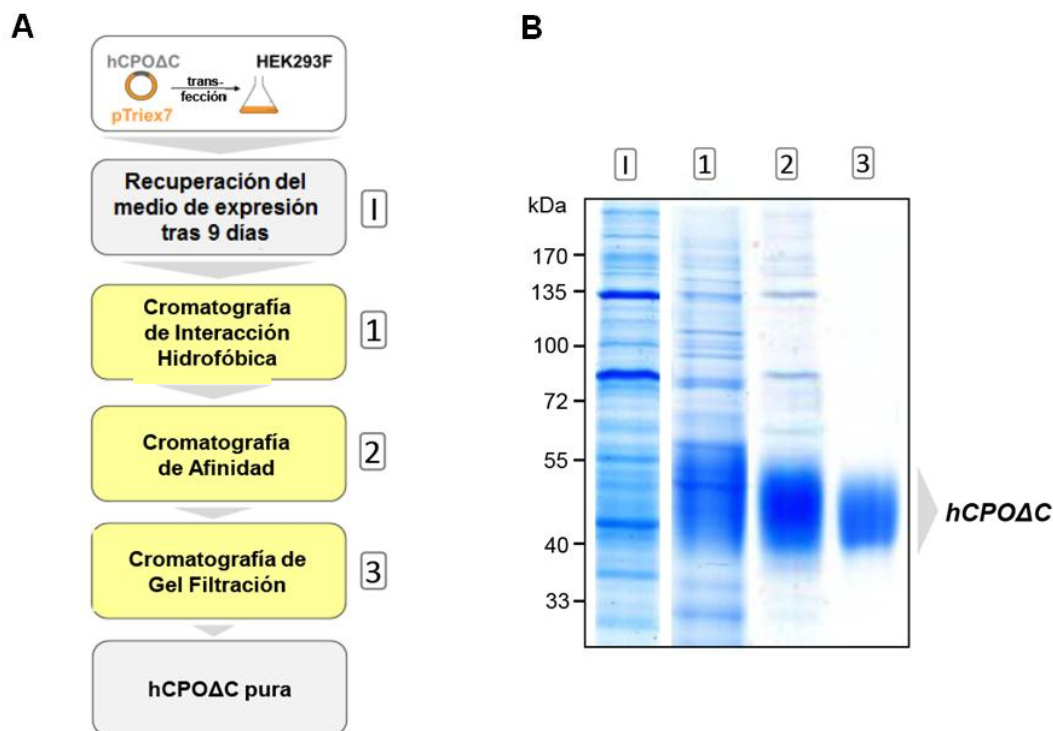


**Figura 39. Construcción del mutante soluble CPOΔC humana.** La hCPO salvaje contiene el PS de secreción (en negro), seguido del dominio N<sub>t</sub> (en amarillo), el dominio catalítico CP (Peptidasa\_M14, en gris) y la secuencia C-t (en azul), escindida post-traduccionalmente para la unión covalente de una molécula de GPI. El mutante de la hCPO, denominado hCPOΔC, carece de esta secuencia C-t para su expresión recombinante soluble, y contiene en su extremo N-t la secuencia de exportación IgM (en negro) en sustitución del PS endógeno de secreción, seguido de la etiqueta Strep-tag® II, para el reconocimiento y la purificación de la proteína recombinante. Los extremos N-t y C-t de la cadena polipeptídica son indicados.

Para la producción de la hCPOΔC, transfectamos el vector recombinante en cultivos células de mamífero HEK293 F crecidas en suspensión para la expresión transitoria de la proteína recombinante durante 9 días.

Los sistemas de expresión basados en células de mamífero proporcionan el contexto de expresión adecuado para la obtención de proteínas recombinantes humanas altamente glicosiladas y constituyen el sistema predilecto para la producción de proteínas de secreción y de membrana [311]. Por consiguiente, la expresión de la hCPOΔC en células de mamífero HEK293 F constituye el sistema óptimo para la secreción eficiente de la proteína recombinante y con un patrón de glicosilación que nos permita preservar la estabilidad y funcionalidad de la proteína.

Tras 9 días de expresión post-transfección, purificamos la hCPOΔC acumulada en el medio de cultivo siguiendo una estrategia de purificación basada en 3 pasos cromatográficos distintos. En primer lugar, realizamos un paso de captura mediante cromatografía de interacción hidrofóbica, seguido de un segundo paso de purificación intermedio mediante cromatografía de afinidad anti-Strep-tag® II y un último paso de pulido mediante cromatografía de exclusión molecular, para purificación hasta la homogeneidad de la hCPOΔC recombinante (**figura 40-A**).



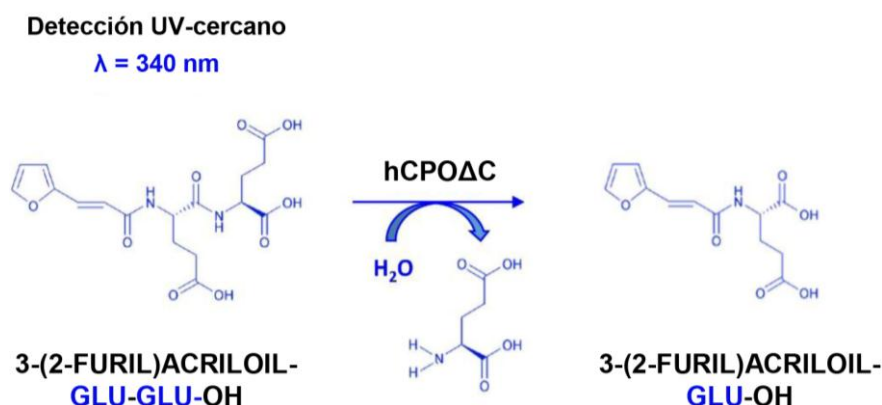
**Figura 40. Expresión y purificación de la CPOΔC humana.** (A) Esquema de la estrategia purificación seguida para la expresión y purificación de la hCPOΔC. La proteína recombinante se expresó extracelularmente durante 9 días en células de mamífero HEK293 F crecidas en suspensión. Seguidamente, recolectamos el medio de expresión y purificamos la hCPOΔC mediante 3 pasos cromatográficos: (1) cromatografía de interacción hidrofóbica, (2) cromatografía de afinidad anti-Strep-tag® II y (3) cromatografía de gel filtración. (B) Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie mostrando la pureza de la hCPOΔC eluida tras cada paso de purificación. Los números sobre los carriles del gel coinciden con el paso cromatográfico del que proceden. La fracción inicial correspondiente al medio de expresión con la hCPOΔC sin purificar se indica como I.

El análisis mediante electroforesis SDS-PAGE de las fracciones eluidas en cada paso cromatográfico, confirma la obtención de la hCPOΔC pura tras el último paso de purificación, observándose una única banda difusa de ~50 kDa ( $M_w$  teórico hCPOΔC = 40,8 kDa). Este patrón es típico en las proteínas glicosiladas y obedece, principalmente, a la heterogeneidad de esta MPT y a la migración anómala de las proteínas glicosiladas en los geles de SDS-PAGE debido a su carga negativa intrínseca (**figura 40-B**). Por último, la cuantificación de la proteína purificada y concentrada hasta el límite de su solubilidad determinó una concentración de hCPOΔC de ~5 mg/ml, suficiente para llevar a cabo los primeros ensayos de cristalización.

En resumen, aunque hemos sido capaces de producir y purificar la hCPOΔC en su forma soluble y cantidad suficiente, la elevada heterogeneidad estructural de la población proteica podría suponer una dificultad añadida para la formación de cristales regulares de la hCPOΔC que difracten a una elevada resolución.

### 3.2 Estudio de la actividad enzimática de la CPOΔC humana

Para averiguar si la hCPOΔC recombinante producida en células de mamífero es enzimáticamente activa, analizamos la actividad carboxipeptidasa de la hCPOΔC purificada empleando el sustrato cromogénico 3-(2-furil)acrilóil-Glu-Glu-OH (FA-EE). Los ensayos enzimáticos con el sustrato FA-EE se basan en la modificación de la absorción en el ultravioleta (UV) cercano del péptido cuando se hidroliza el enlace peptídico entre el primer y el segundo Glu. La disminución de absorbancia resultante se puede medir a longitudes de onda entre 322-345 nm y detectar fácilmente con la ayuda de un espectrofotómetro (**figura 41**).



**Figura 41. Reacción de hidrólisis del péptido FA-EE.** El sustrato cromogénico 3-(2-furil)acrilóil-Glu-Glu (FA-EE) absorbe la radiación electromagnética en el UV-cercano, a una longitud de onda entre 322-345 nm. La hidrólisis del enlace peptídico entre el primer y el segundo Glu C-t por la acción enzimática de la hCPOΔC, se detecta midiendo la disminución de la absorbancia a la longitud de onda indicada.

## Capítulo II

Determinamos los parámetros cinéticos  $K_M$  y  $V_{max}$  de la hCPOΔC frente al sustrato FA-EE, siguiendo las instrucciones del apartado 2.5. Los valores obtenidos para los distintos parámetros cinéticos se muestran en la **tabla 10**, y son comparables a los calculados en otro estudio para la hCPO salvaje producida en células de insecto y purificada en presencia de detergentes [90]. Estos resultados demuestran que la hCPOΔC es enzimáticamente activa, aunque presenta una eficiencia catalítica muy baja para el sustrato FA-EE. Sin embargo, este péptido es el sustrato de referencia para realizar ensayos cinéticos en presencia de la hCPO, ya que no hay disponible por el momento ningún otro sustrato sintético comercial para esta MCP.

**Tabla 10. Constantes cinéticas para la hidrólisis del FA-EE por la CPOΔC humana**

	$K_M$	$V_{max}$	$K_{cat}$	$K_{cat}/K_M$
	μM	μM/s	s <sup>-1</sup>	μM <sup>-1</sup> · s <sup>-1</sup>
<b>hCPO</b>	352 ± 49	-	8,6 ± 0.5	0,026
<b>hCPOΔC</b>	164,5 ± 18,7	0,099 ± 0,003	7,1 ± 0.2	0,043

Los datos se muestran como la media ± desviación estándar (SD) (n=3). Los parámetros cinéticos para la hCPO salvaje se extrajeron de la publicación [90]. La  $V_{max}$  para la hCPO no fue determinada en ese estudio.

### 3.3 Determinación de la estructura cuaternaria de la CPOΔC humana

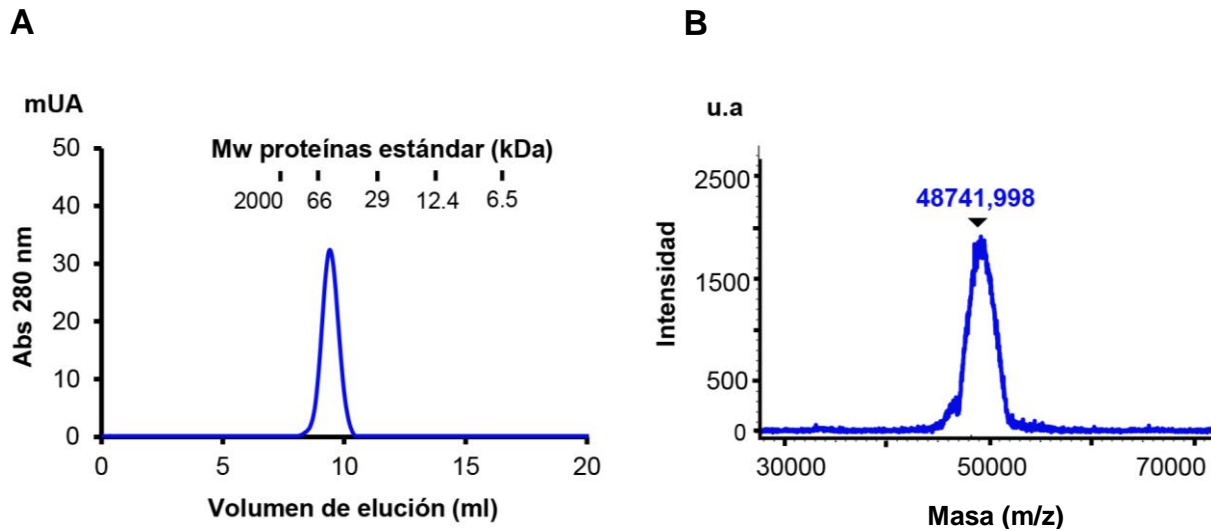
La posibilidad de que la hCPOΔC homodimerice en solución fue investigada mediante cromatografía de exclusión molecular, calibrando previamente la columna de gel filtración con varias moléculas patrones de tamaño conocido.

Los resultados obtenidos indican que la hCPOΔC presenta un  $M_w$  aparente de 56,2 kDa, lo que sugiere que la hCPOΔC ( $M_w$  teórico = 40,8 kDa) se comporta como un monómero en solución altamente N-glicosilado (**figura 42-A**) hasta una concentración de ~1 mg/ml.

Sin embargo, las proteínas glicosiladas pueden presentar un comportamiento anómalo durante la cromatografía de gel filtración [306], de manera que determinamos de una forma más precisa el  $M_w$  de la proteína mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. El espectro de masas reveló un  $M_w$  promedio para la hCPOΔC de 48,7 kDa, un ~20% superior al  $M_w$  teórico de la proteína recombinante (**figura 42-B**). Por consiguiente, corroboramos que la hCPOΔC se trata de una proteína monomérica en solución altamente N-glicosilada, con un 20% de su peso correspondiente a la unión de azúcares en su estructura.



Ambas técnicas confirmaron la elevada pureza de la proteína recombinante analizada, observándose un único pico de elución en el cromatograma obtenido de la cromatografía de gel filtración, y un único pico de intensidad en el espectro de masas MALDI-TOF, ambos correspondientes a la hCPOΔC.



**Figura 42. Determinación de la estructura cuaternaria de la CPOΔC humana.** (A) Cromatograma representativo de la cromatografía analítica de gel filtración llevada a cabo para la hCPOΔC purificada. La proteína eluida presenta un Mw aparente de 56,2 kDa, determinado a partir de una curva de calibración con patrones de Mw conocido. (B) Espectro de masas MALDI-TOF para la hCPOΔC purificada, mostrando un Mw promedio de 48,7 kDa.

La mayoría de enzimas proteolíticas del BC, incluida la CPO, corresponden a glicoproteínas. Se ha sugerido que la presencia de N-glicanos en su estructura podría desempeñar un rol protector frente a la proteólisis por proteasas intestinales. Por otro lado, la APA, APN y DPPIV son algunos ejemplos de enzimas proteolíticas del BC que se localizan en la membrana plasmática apical de los enterocitos formando homodímeros [307].

En general, las MCPs de la subfamilia M14A corresponden a proteínas monoméricas, aunque la CPA1, CPA2 y CPA3 se han identificado también formando parte de estructuras cuaternarias con otras enzimas. La CPO es una peptidasa M14A asociada a la membrana de los enterocitos a través de una molécula de GPI. Aunque el mutante soluble se comporta como un monómero a bajas concentraciones de la enzima, no podemos descartar que en su localización intestinal la concentración local de hCPO salvaje sea suficientemente elevada como para inducir la formación de homodímeros funcionales por concentración y/o por la interacción con la membrana celular.

### 3.4 Estructura tridimensional de la CPOΔC humana en complejo con el NvCI

Tras explorar una gran variedad de combinaciones proteicas y condiciones de cristalización, únicamente obtuvimos cristales de la hCPOΔC en presencia de NvCI, tras la incubación a 18°C durante varias semanas de las proteínas en la solución reservorio 100 mM HEPES, pH 7,0, 200 mM NH<sub>4</sub>Cl y 20% (p/v) PEG 6000. El complejo de la hCPOΔC con el inhibidor fue obtenido en la gota de cristalización, al mezclar la enzima con el NvCI en una relación 1:0.5 (hCPOΔC:NvCI).

**Tabla 11. Estadística de la adquisición de datos y del refinamiento**

Datos de difracción	
Longitud de onda	0,9792
Grupo espacial	C2 (C 1 2 1)
Dimensiones de la celda	
a, b, c (Å)	150,11 , 72,14 , 90,19
α, β, γ, ( ° )	90,00 , 94,66 , 90,00
Resolución (Å)	1,85
$R_{merge}^a$	0,069
$R_{sym}^b$	0,084
$I/\zeta(I)$	13,9
Totalidad (%)	98
Redundancia	3,5
Refinamiento	
Resolución (Å)	1,85
Nº reflexiones	79,833
$R_{work}^c/R_{free}^d$	18,6 / 20,8
Nº total de átomos	5995
Nº aminoácidos proteína	
hCPOΔC	307
NvCI	53
Moléculas de agua	518
rmsd <sup>e</sup>	
Longitudes de enlace (Å)	0,011
Ángulos de enlace (°)	0,96
Estadística Ramachandran (%)	
Favorables	97,6
Permitidos	2,4
Desfavorables	0

<sup>a</sup> $R_{merge} = \sum |I_i - \langle I \rangle| / \sum I_i$ , donde  $I_i$  es la  $i^{\text{a}}$  medida de la intensidad de una reflexión individual o sus reflexiones equivalentes generadas por simetría e  $\langle I \rangle$  es la intensidad promedia de esa reflexión y sus reflexiones equivalentes simétricas.

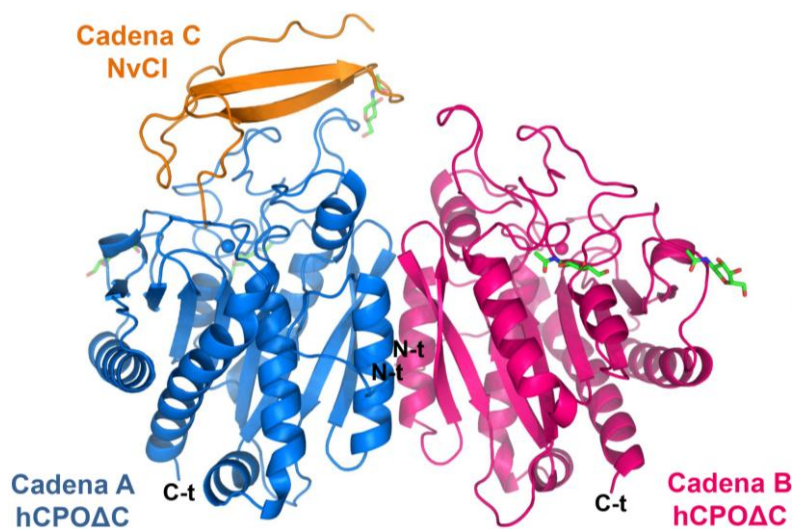
<sup>b</sup> $R_{sym} = \sum hkl \sum i |I_i - \langle I \rangle| / \sum hkl \sum i I_i$

<sup>c</sup> $R_{work} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$  para todas las reflexiones y <sup>d</sup> $R_{free} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$ , calculado en base a la exclusión del 5% de los datos del refinamiento.

<sup>e</sup>rmsd = raíz cuadrada de la varianza.

Los cristales correspondientes al complejo hCPOΔC-NvCl pertenecen al grupo espacial monoclinico C2 y difractaron a una resolución de 1,85 Å. La estructura 3D del complejo fue resuelta empleando el método de reemplazo molecular usando la hCPA4 (PDB: 2PCU) como modelo, y se refinó hasta alcanzar un *R-factor* y *R-free* de 18,6 y 20,8, respectivamente. El análisis de Ramachandran mostró un 97,6% de los residuos localizados en regiones favorables, un 2,4% en regiones permitidas y un 0% de los residuos en regiones desfavorables. En la **tabla 11** se muestran los parámetros determinados en el análisis de difracción de rayos X y el refinamiento del modelo.

La unidad asimétrica del cristal contiene 2 moléculas de hCPOΔC, aunque solo una de ellas está formando un complejo con el NvCl (**figura 43**). El análisis de la interficie entre las 2 moléculas de enzima utilizando el programa PDBePISA [308] y los resultados obtenidos anteriormente mediante cromatografía de gel filtración (ver **apartado 3.3**), indican que la unidad biológica real de la CPO corresponde a un monómero. Sin embargo, no podemos descartar que a concentraciones elevadas de la enzima como las que podrían estar presentes en el microvilli intestinal, la CPO homodimerice como ocurre en el cristal de la proteína obtenido en condiciones sobresaturantes. Otra posibilidad es que la homodimerización de la proteína observada en el cristal corresponda a un artefacto formado durante el proceso de cristalización, algo habitual en este tipo de ensayos [151],[182],[309].



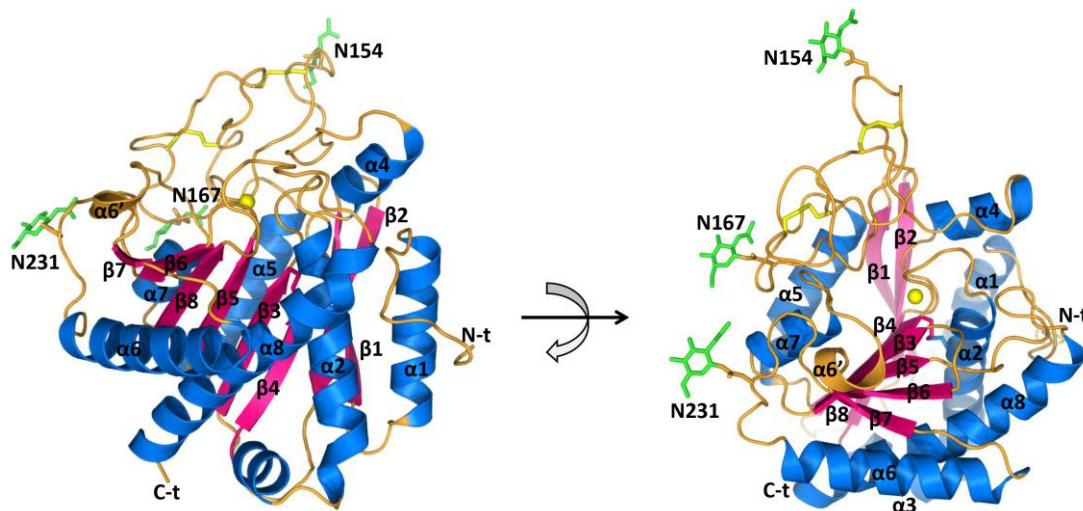
**Figura 43. Estructura tridimensional de la CPOΔC humana en complejo con el NvCl.** Los dos monómeros de hCPOΔC en la unidad asimétrica del cristal (cadenas A y B mostradas en azul y magenta, respectivamente) están apilados formando una estructura cristalina cuaternaria homodimérica. A diferencia de la cadena B, la cadena A presenta una molécula de NvCl (cadena C, en naranja) interaccionando en el centro activo de la enzima. En la cadena A, se muestran tres N-acetilglucosaminas (NAG) representadas en barras de color verde, con los átomos de nitrógeno en azul y los de oxígeno en rojo, y enlazadas a los sitios de N-glicosilación consenso Asn154, Asn167 y Asn231. No obstante, la densidad electrónica correspondiente a la NAG unida a la Asn154 en la cadena A, no se define nítidamente en esta misma posición en la cadena B, y se pierde. Los extremos N-t y C-t de la hCPOΔC son indicados. Figura preparada con PyMOL [148].

Las cadenas polipeptídicas de la hCPOΔC (cadena A unida a NvCl y cadena B no unida) pueden trazarse perfectamente en los mapas de densidad electrónica desde el Glu23 hasta el Trp329 (acorde a la numeración de la hCPO activa, sin el PS). Todos estos residuos forman parte del dominio catalítico CP de la proteína, que incluye los residuos Ser21-Trp349 (acorde a la numeración de la hCPO activa, sin el PS).

Aunque previamente a los ensayos de cristalización, corroboramos que la hCPOΔC contenía la secuencia N-t de 20 residuos de longitud (Tyr21-Trp40, en la hCPO activa), la cadena polipeptídica que incluye esta región no se puede trazar en los mapas la densidad electrónica, probablemente debido a que constituya una región flexible de la molécula o incluso a que se haya proteolizado durante el proceso de cristalización. Por último, la cadena polipeptídica del NvCl (cadena C) pudo trazarse inequívocamente desde la Phe1 a la Ala53.

### 3.5 Análisis de la estructura tridimensional de la CPOΔC humana

El dominio catalítico carboxipeptidasa CP de la hCPOΔC presenta una extensión de 307 residuos con el clásico plegamiento globular compacto α/β hidrolasa de la familia M14 de las MCPs.



**Figura 44. Estructura tridimensional de la CPOΔC humana.** Representación en cintas de la estructura 3D de la hCPOΔC recombinante, mostrada desde 2 ángulos de visión distintos. La hCPOΔC presenta el plegamiento globular típico α/β hidrolasa de las MCPs de la familia M14, compuesto una hoja-β central compuesta de 8 cadenas-β paralelas y antiparalelas, rodeada de 8 hélices-α. Las hélices-α (α1-α8) y las cadenas-β (β1-β8) se muestran en azul y magenta, respectivamente. La cadena-α6" característica de las MCPs de la subfamilia M14A también se muestra coloreada en naranja. Los tres residuos N-glicosilados (Asn154, Asn167 y Asn231) se representan como barras de color verde, y se numeran las Asn según la numeración que ocupan en la secuencia de la hCPO activa. El ion de zinc catalítico se muestra como una esfera amarilla. Los 3 puentes disulfuro entre las Cys65-Cys78, Cys137-159 y Cys151-Cys167 se representan en barras de color amarillo. Los extremos N-t y C-t de la hCPOΔC son indicados. Figura preparada con PyMOL [148].

## Capítulo II

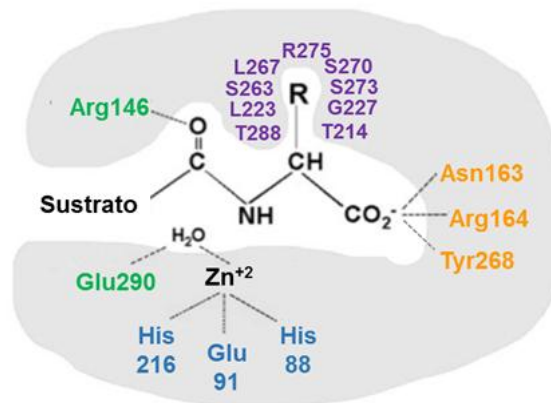
Concretamente, consiste en una hoja- $\beta$  central formada por un *mix* de 8 cadenas- $\beta$  ( $\beta$ 1- $\beta$ 8) paralelas y antiparalelas con una conectividad +1, +2, -1X, -2X, -2, +1X, -2, sobre las que se distribuyen 8 hélices- $\alpha$ . El núcleo de la hoja- $\beta$  está formado por 4 cadenas- $\beta$  coplanares paralelas ( $\beta$ 3- $\beta$ 5 y  $\beta$ 8), flanqueadas por 2 cadenas- $\beta$  paralelas por la parte superior ( $\beta$ 6- $\beta$ 7) y una horquilla- $\beta$  ( $\beta$ 1- $\beta$ 2) por la parte inferior, responsable del giro de 120° entre la primera y la última cadena- $\beta$ . Además, a continuación de la cadena- $\beta$ 7, contiene una hélice- $\alpha$  muy corta denominada hélice- $\alpha$ 6", característica en los miembros de la subfamilia M14A (**figura 44**).

Los mapas de densidad electrónica definen claramente 3 sitios de N-glicosilación distintos en la estructura 3D de hCPO $\Delta$ C, que corresponden a la Asn154 (N154), Asn167 (N167) y Asn231 (N231) en la cadena A, y Asn167 y Asn231 en la cadena B. En todos los casos, únicamente el primer monosacárido del N-glicano correspondiente a la N-acetilglucosamina (NAG), se resolvió claramente (**Figura 44**). Curiosamente, la NAG enlazada a la Asn154 solo se observa en la cadena A, probablemente debido a la flexibilidad interna del N-glicano o a su degradación en la cadena B, y presenta el menor B-factor en comparación con las otras NAGs resueltas en la estructura. Cabe destacar que el predictor bioinformático GlycoEP [310] identificó un total de 3 potenciales Asn N-glicosiladas en la secuencia de la CPO salvaje, que corresponden precisamente a las Asn que hemos confirmado experimentalmente en este trabajo. Por consiguiente, es probable que no existan otras Asn modificadas post-traduccionalmente mediante N-glicosilación en la estructura de la CPO. Finalmente, la hCPO $\Delta$ C contiene 3 puentes disulfuro en su estructura, formados entre las Cys65-Cys78, Cys137-159 y Cys151-Cys167 (**figura 44**).

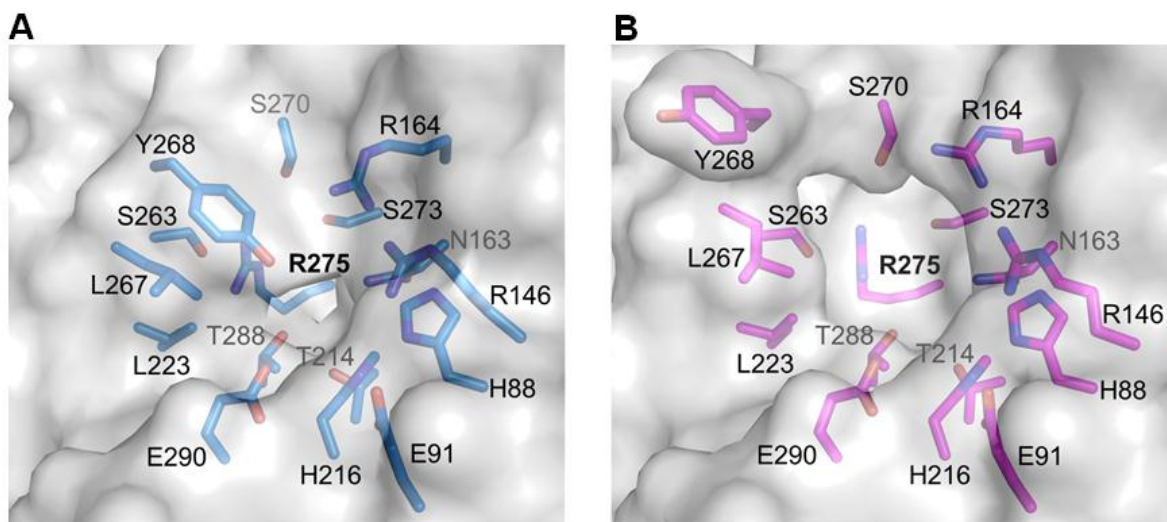
### 3.6 Análisis del centro activo de la CPO $\Delta$ C humana

El centro activo de la hCPO $\Delta$ C contiene todos los residuos necesarios para la actividad enzimática, localizados en los bucles L $\beta$ 8 $\alpha$ 8, L $\beta$ 5 $\beta$ 6, L $\beta$ 7 $\alpha$ 7, L $\beta$ 3 $\alpha$ 2 y L $\alpha$ 4 $\alpha$ 5 que conforman la entrada del centro activo. Evidentemente, encontramos aquellos residuos idénticos en las MCPs de la familia M14, que corresponden a la His88, Glu91 e His216 (His69, Glu72 e His196, respectivamente, según la nomenclatura "canónica" de la bCPA activa) responsables de la coordinación del ion de zinc esencial para la catálisis; los residuos catalíticos Glu290 (Glu270 en la bCPA activa) y Arg146 (Arg127 en la bCPA activa) que actúan como ácido/base general y en la estabilización del intermediario cargado negativamente durante la catálisis, respectivamente; y los residuos de unión a sustrato Asn163, Arg164 y Tyr268 (Asn144, Arg145 y Tyr248 en la bCPA activa), que neutralizan el grupo carboxilo C-t del residuo P1" del sustrato. Además, el bolsillo de especificidad S1" de la hCPO $\Delta$ C que acomoda la cadena lateral del residuo C-t a escindir, está formado por las

cadena lateral de los residuos Thr214, Leu223, Gly227, Ser263, Leu267, Ser270, Ser273, Arg275 y Thr 288 (figura 45 y 46).



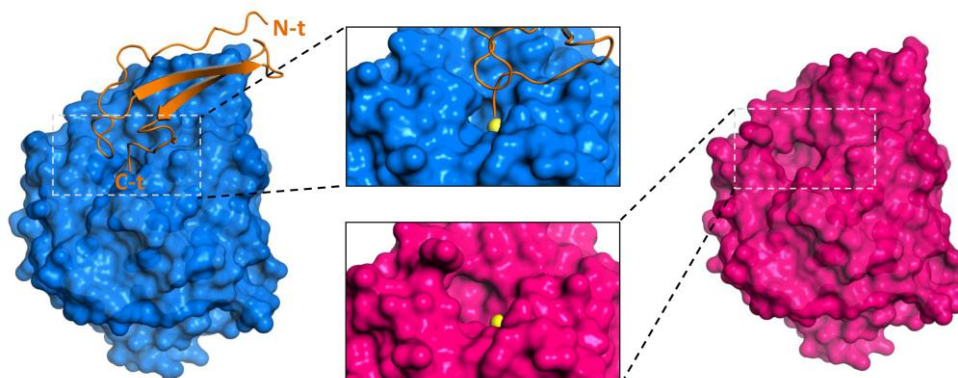
**Figura 45. Representación esquemática de los residuos del centro activo de la CPOΔC humana.** Se muestran los residuos importantes para la actividad enzimática conservados en las MCPs de la familia M14, que incluyen los residuos que coordinan el ion de zinc ( $Zn^{+2}$ ) (en azul), los residuos catalíticos que participan en la polarización del grupo carbonilo del enlace peptídico y en la activación de la molécula de agua coordinada al ion de zinc (en verde), los residuos que fijan el grupo carboxilo del aminoácido C-t (en naranja) y, por último, los residuos que acomodan la cadena lateral del aminoácido C-t a escindir, formando el bolsillo de especificidad S1" (en lila). Los residuos están numerados acorde a la posición que ocupan en la secuencia de la hCPO activa.



**Figura 46. Organización espacial de los residuos del centro activo en la CPOΔC humana.** Vista de la cavidad del centro activo de la hCPOΔC en su conformación "cerrada" con NvCl unido (A) y en la conformación "abierta" libre de ligando (B). Se muestra la organización espacial de las cadenas laterales de los residuos importantes para la coordinación del ion de zinc, la catálisis y la unión al sustrato descritos en la figura 45. La Arg275 determinante de la especificidad de sustrato tipo ácido en la hCPOΔC, se localiza en el fondo del bolsillo de especificidad S1". Los residuos se representan en barras coloreadas de color azul en la conformación "cerrada" y de color magenta en la conformación "abierta", sobre la superficie semitransparente de color gris de la cavidad del centro activo. En ambas figuras, los residuos se numeran acorde a la posición que ocupan en la secuencia de la hCPO activa. Figura preparada con PyMOL [148].

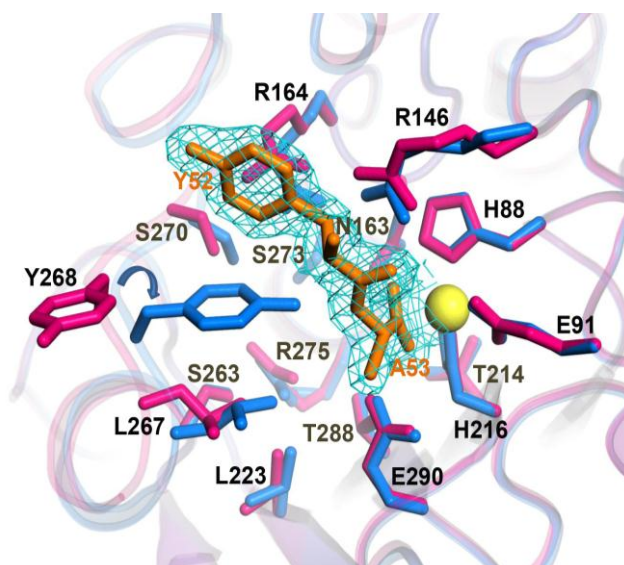
### 3.7 Comparación del centro activo de la CPOΔC humana con o sin NvCI unido

La obtención en una misma estructura cristalina de la hCPOΔC sola (conformación “abierta”) y formando un complejo con el NvCI (conformación “cerrada”) (**figura 47**), nos permitió investigar los cambios estructurales promovidos por la unión del ligando en los residuos que forman parte del centro activo de la enzima.



**Figura 47. Conformación “abierta” y “cerrada” de la CPOΔC humana.** Representación en superficie de la cadena A (en azul) unida al NvCI (representación en cintas, color naranja) y de la cadena B (en magenta) sin inhibidor unido. Para ambas estructuras se muestra una ampliación de la cavidad del centro activo, visiblemente más dilatada en la cadena B (conformación abierta) que en la cadena A. Tras la unión de la cola C-t del NvCI al centro activo de la cadena A (conformación cerrada), la cavidad se estrecha parcialmente gracias al movimiento de la Tyr268 para fijar el carboxilato C-t del inhibidor. El ion de zinc se muestra como una esfera amarilla, ubicado en el fondo de la cavidad. Los extremos N-t y C-t del NvCI son indicados. Figura preparada con PyMOL [148]

La desviación rmsd promedio para la cadena principal entre la conformación “abierta” (sin inhibidor unido, cadena B) y “cerrada” (con el inhibidor unido en el centro activo imitando la unión al sustrato, cadena A) es de tan solo 0,33 Å, aunque se incrementa hasta 1,85 Å en el bucle entre la cadena β7 y la hélice α7 que contiene el residuo Tyr268 (Tyr248 en la nomenclatura “canónica” de la bCPA). El movimiento de casi 180° (de la posición “arriba” a “abajo”) que tiene lugar en la Tyr268 tras la unión del ligando constituye el cambio estructural más importante en las cadenas laterales de los residuos del centro activo en la cadena A, y ha sido extensamente estudiado en las múltiples estructuras de MCPs en complejo con sustratos o inhibidores. No obstante, otros pequeños movimientos ocurren también en las cadenas laterales de residuos del centro activo importantes en la catálisis y la unión al sustrato, para acomodar la cola C-t del inhibidor y establecer interacciones inhibitorias, que incluyen la Arg146 (R146), Arg164, Leu223, Ser270, Arg275 y Thr288, acorde a la numeración en la hCPO activa (**figura 48**). Por último, mencionar que esta misma reorganización en los residuos del centro activo de la enzima también se describió previamente en la estructura cristalina del complejo de la hCPA4 activa con el NvCI [182].

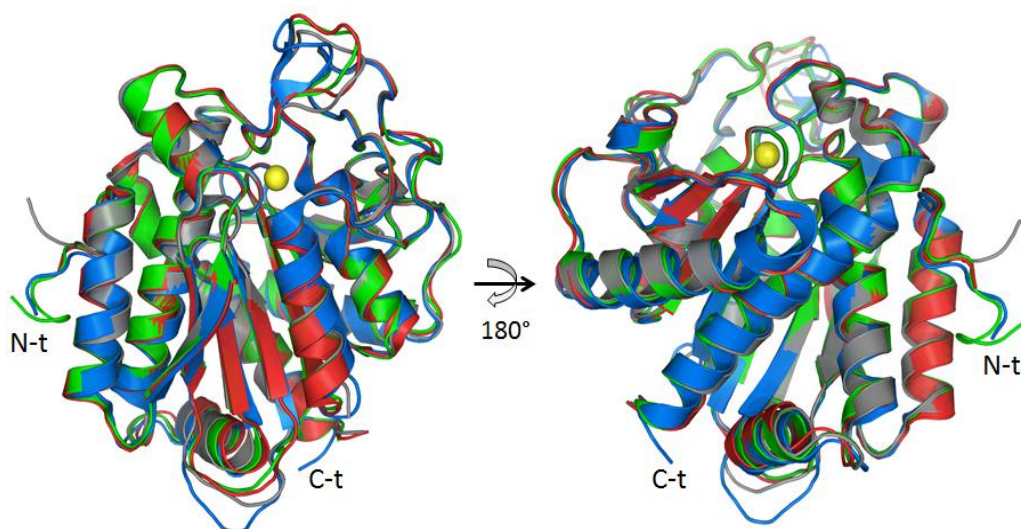


**Figura 48. Comparación de los residuos del centro activo en la conformación “abierta” y “cerrada” de la CPOΔC humana.** Representación de los residuos del centro activo importantes para la actividad enzimática en la hCPO, mostrados en barras de color magenta para la hCPOΔC sin inhibidor unido (magenta) o en azul para la hCPOΔC con la cola C-t del NvCI insertada en el centro activo. Para simplificar la imagen, sólo se muestran los dos últimos residuos C-t de NvCI (Y52 y A53) empleando el modelo en barras de color naranja, y con la densidad electrónica final superpuesta, correspondiente a un mapa de Fourier  $F_0-F_c$  de 1,85 Å de resolución contorneado a  $1\zeta$ . El cambio más evidente en la comparación entre ambas estructuras corresponde al movimiento de la cadena lateral de la Tyr268 promovido por la unión de la cola C-t del NvCI en el centro activo de la enzima, que rota alrededor de su ángulo X1 y desplaza el grupo hidroxilo 10,8 Å para ocluir parcialmente la cavidad del centro activo. También se observan reordenamientos más discretos en las cadenas laterales de otros residuos del centro activo, como son la R146, R164, L223, S270, R275 y T288, que interaccionan con residuos de la cola C-t del NvCI. Los residuos están numerados acorde a la posición que ocupan en la secuencia de la hCPO activa. El ion de zinc catalítico corresponde a la esfera amarilla. Imagen generada con PyMOL [148].

### 3.8 Especificidad de sustrato de las MCPs digestivas de la subfamilia M14A

El alineamiento estructural del dominio catalítico de la hCPO y de las MCPs pancreáticas hCPA1, hCPA2 y hCPB, corrobora la elevada homología existente entre las MCPs digestivas de la subfamilia M14A. La desviación rmsd entre sus cadenas principales corresponde a 0,85 Å para 299 residuos alineados en la hCPA1 (40% de identidad secuencial), de 0,83 Å para 297 residuos alineados en la hCPA2 (39% de identidad secuencial) y 0,83 Å para 300 residuos alineados en la hCPB (47% de identidad secuencial) (**Figura 49**).



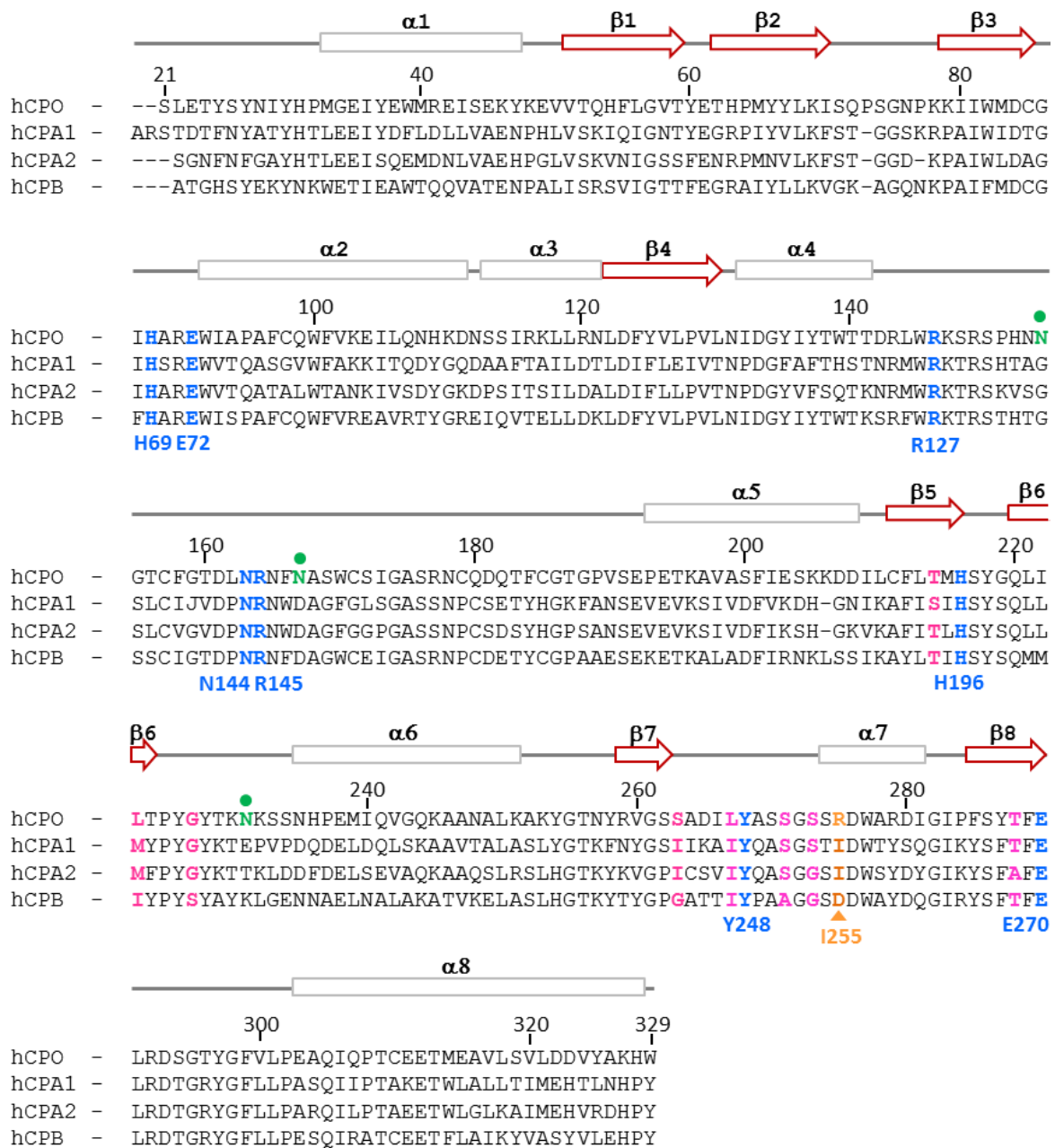


**Figura 49. Alineamiento estructural de las MCPs digestivas de la subfamilia M14A.** Superposición de las estructuras 3D de los dominios catalíticos de la hCPO (en azul) con las MCPs pancreáticas hCPA1 (en verde), hCPA2 (en rojo) y hCPB (en gris), representadas en cintas. Las coordenadas atómicas para la hCPA1 (PDB: 3FJU), hCPA2 (PDB: 1DTD) y hCPB (PDB: 1ZLI) se obtuvieron de la base de datos PDB ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). El ion de zinc catalítico se muestra como una esfera amarilla. Los extremos N-t y C-t de las MCPs son indicados. Figura preparada con PyMOL [148].

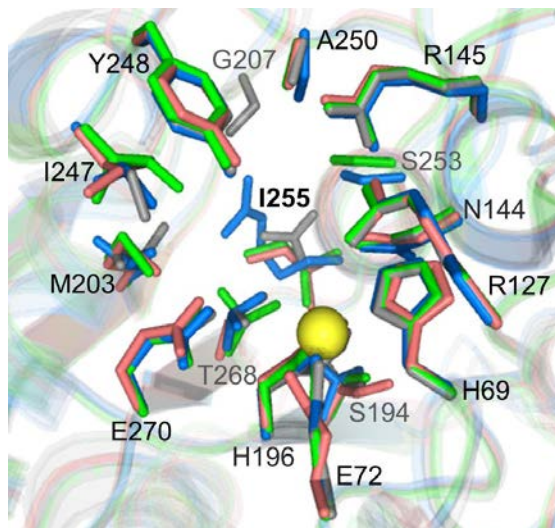
El alineamiento secuencial de los dominios catalíticos CP de las 4 MCPs digestivas permitió identificar los residuos del centro activo importantes para la actividad enzimática idénticos en todas las MCPs de la familia M14, además de los residuos que integran el bolsillo de especificidad S1<sup>''</sup> para cada una de las enzimas (**figura 50**). El dominio catalítico de la hCPO presenta un 40% de identidad secuencial con el de la hCPA1 para 299 residuos alineados, un 39% con el de la hCPA2 para 297 residuos alineados y un 47% con el de la hCPB para 300 residuos alineados, siendo necesario la introducción de 1 espacio, 3 espacios y 0 espacios, respectivamente, para su alineamiento con el dominio catalítico de la hCPO.

El bolsillo de especificidad S1<sup>''</sup> en las MCPs digestivas de la subfamilia M14A está formado por las cadenas laterales de los residuos equivalentes a las posiciones 194, 203, 207, 243, 247, 250, 253, 255 y 268 en la bCPA activa [153]. Estos residuos se encuentran generalmente conservados en la hCPA1, hCPA2, hCPB y hCPO, con pequeñas variaciones acorde a su especificidad de sustrato (**figura 50 y 51**), y corresponden generalmente a residuos con cadenas laterales cortas que permiten formar una cavidad con suficiente espacio para acomodar todo tipo de cadenas laterales de los residuos C-t de sus sustratos. Sin embargo, la diferencia más notable entre las 4 MCPs digestivas se observa en el residuo equivalente a la I255 en la bCPA activa localizado en el fondo del bolsillo de especificidad, que corresponde, precisamente, al principal residuo determinante de la especificidad de sustrato en las MCPs de la subfamilia M14A (**figura 50 y 51**).

## Capítulo II

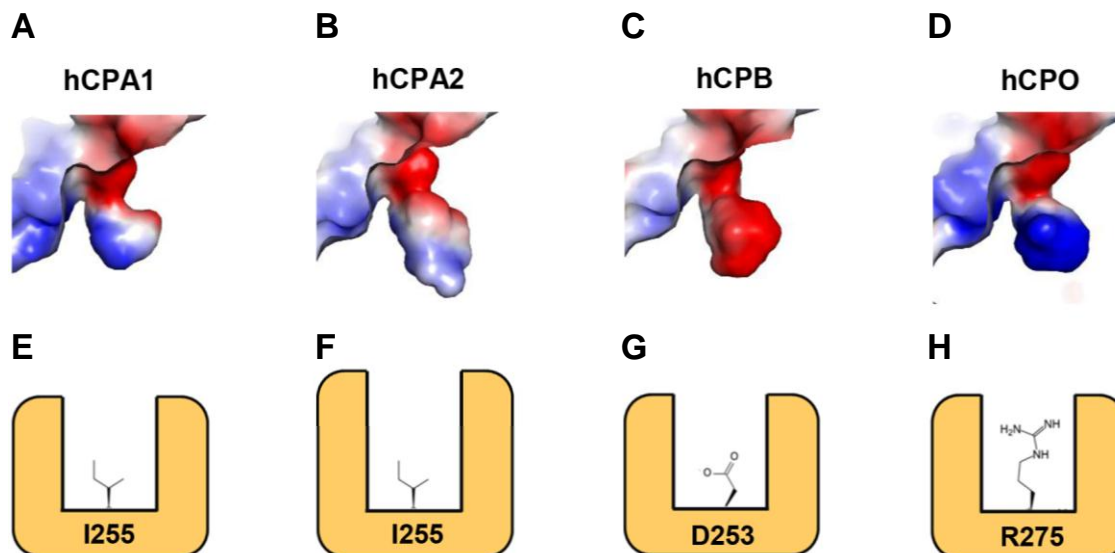


**Figura 50. Alineamiento secuencial de las MCPs digestivas de la subfamilia M14A.** Alineamiento secuencial basado en la estructura cristalina de los dominios catalíticos de la hCPO (Uniprot: Q8IVL8) y las MCPs pancreáticas hCPA1 (Uniprot: P15085), hCPA2 (Uniprot: P48052) y hCPB (Uniprot: P15086). Las secuencias primarias se obtuvieron de la base de datos UniprotKB/SWISS-PROT ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). La numeración mostrada encima de las secuencias corresponde a la posición que ocupa cada aminoácido en la hCPO activa, sin el PS. Los residuos indicados debajo de las secuencias y coloreados en azul, corresponden a los residuos de coordinación a zinc, catalíticos y de unión a sustrato idénticos en las MCPs de la familia M14. Estos residuos están numerados acorde a la posición que ocupan en la bCPA activa, que es el sistema de numeración estándar para las MCPs M14. Los residuos que integran el bolsillo de especificidad S1" en las diferentes MCPs digestivas están coloreados en magenta. El residuo equivalente a la I255 en la bCPA determinante de la preferencia del sustrato se destaca en naranja, con una flecha del mismo color debajo del alineamiento y numerado. Los residuos de Asn N-glicosilados (Asn154, Asn167 y Asn231) en la hCPO están coloreados en verde y marcados con un círculo verde encima de la secuencia de la hCPO. Los elementos de estructura secundaria se muestran etiquetados por encima del alineamiento, representándose las hélices- $\alpha$  con rectángulos vacíos de color gris y las cadenas- $\beta$  con flechas rojas vacías. Los espacios que no alinean en la secuencia se indican con guiones (-).



**Figura 51. Comparación de los residuos del centro activo en las MCPs digestivas de la subfamilia M14A.** Superposición de los residuos del centro activo importantes para la actividad enzimática en la hCPO, hCPA1, hCPA2 y hCPB, representados en barras de color azul, verde, rojo y gris, respectivamente. Los residuos concretos para cada posición en las distintas MCPs, se detallan en el alineamiento de la **figura 50**. La numeración indicada corresponde a posición que ocupa cada residuo en la secuencia de la bCPA activa. Para mostrar con mayor claridad la cadena lateral del residuo equivalente a la I255 en la hCPA1, obviamos la cadena lateral del residuo equivalente a la Ile243 en la bCPA. El ion de zinc catalítico se muestra como una esfera amarilla. Figura preparada con PyMOL [148].

La hCPA1 presenta un subsitio S1" de carácter hidrofóbico, que permite la unión de pequeños residuos alifáticos como la Leu, Val o Ala (**figura 52-A**). La hCPA2 presenta también un bolsillo de especificidad S1" de naturaleza hidrofóbica, pero de mayor tamaño, por lo que es capaz de acomodar la cadena lateral de residuos aromáticos voluminosos como la Phe, Tyr o Trp (**figura 52-B**). Sin embargo, en ambos casos, la especificidad de sustrato tipo-A con preferencia por la hidrólisis de residuos hidrofóbicos está determinada por la presencia de una Ile (I255 en la hCPA1 y hCPA2 activas) en la posición 255 en la bCPA activa (**figura 52-E, 52-F**). En cambio, la hCPB presenta un bolsillo de especificidad electronegativo, que permite la unión de las cadenas laterales con carga positiva de residuos como la Arg o la Lys (**figura 52-C**). Además, la sustitución de la Ile243 en la hCPA1 y la hCPA2 por una Gly en la hCPB contribuye a generar un ambiente más polar, que favorece la unión de residuos básicos. En este caso, la especificidad de sustrato tipo-B con preferencia por sustratos con residuos básicos C-t, está determinada por la presencia de un residuo Asp cargado negativamente (D253 en la hCPB activa) en la posición equivalente a la I255 en la bCPA activa (**Figura 52-G**). Por último, la hCPO contiene un bolsillo de especificidad S1" que muestra una clara electropositividad evidente en la base del mismo, óptima para la interacción con los grupos carboxilo de las cadenas laterales de aminoácidos cargados negativamente, como son el Glu o el Asp (**figura 52-D**).



**Figura 52. Características de los bolsillos de especificidad S1' en las MCPs digestivas de la subfamilia M14A.** (A-D) Representación en superficie de los bolsillos de especificidad S1' de (A) hCPA1, (B) hCPA2, (C) hCPB y (D) hCPO. El potencial electrostático en la superficie del bolsillo de unión al sustrato se representa con un gradiente de color, que incluye el color rojo (-60 KbT/ec), el blanco (0 KbT/ec) y el azul (+60 KbT/ec). Las coordenadas atómicas de la hCPA1 (PDB: 3FJU), hCPA2 (PDB: 1DTD) y hCPB (PDB: 1ZLI) se obtuvieron de la base de datos PDB ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). Figura preparada con PyMOL [148]. (E - H) Representación esquemática de los bolsillos de especificidad S1' mostrados en (A - D), indicando los residuos determinantes de la especificidad de sustrato en cada MCP. (E) En la hCPA1, la presencia del residuo hidrofóbico I255 permite la unión de las cadenas laterales de residuos alifáticos pequeños, como la Leu, Val o Ala. (F) En la hCPA2, la existencia de un bolsillo hidrofóbico de mayor tamaño que el de la hCPA1 y la presencia del residuo I255 en la base de la cavidad, determina su preferencia por aminoácidos hidrofóbicos más voluminosos, como la Phe, Tyr o Trp. (G) La preferencia de sustrato de la hCPB por residuos básicos se debe a la presencia de un Asp cargado negativamente (D253, acorde a la numeración en la hCPB activa) en el fondo del bolsillo S1'. (H) En la hCPO, la cadena lateral de una Arg cargada positivamente en la posición 275 (R275, acorde a la numeración de la hCPO activa) equivalente a la I255 encontrada en la hCPA1, hCPA2, y al D253 de la hCPB, determina su preferencia de sustrato por aminoácidos ácidos C-t, como el Glu o el Asp.

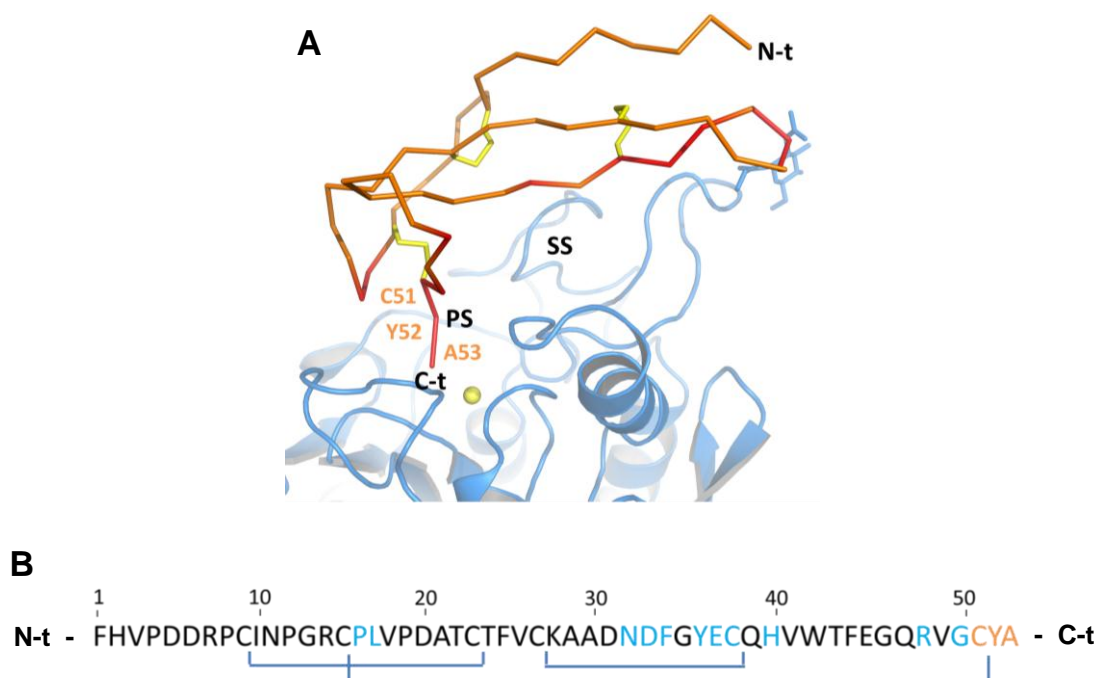
La especificidad de sustrato tipo-O, con una preferencia de sustrato ácida depende de la presencia de una Arg (R275 en la hCPO activa) en la posición equivalente a la Ile255 en la bCPA activa, localizada en la base del bolsillo S1' (**figura 52-H**). Además, del mismo modo que ocurre en la hCPB, la sustitución de la Ile243 en la hCPA1 y la hCPA2 por la Ser263 en la hCPO favorece un ambiente más polar.

La existencia de residuos con propiedades bioquímicas tan distintas en el fondo del bolsillo de especificidad S1' determina la preferencia de sustrato tipo-A, tipo-B y tipo-O de las hCPAs, hCPB y hCPO, respectivamente. La acción combinada de estas MCPs a través de sus respectivas especificidades de sustrato permiten hidrolizar el extremo C-t de la mayoría de péptidos y proteínas procedentes de la dieta, previamente degradados por endopeptidasas presentes en el estómago y en la luz intestinal.

Solo los residuos Pro C-t se resisten a la acción de estas proteasas (hCPA1, hCPA2, hCPB y hCPO), que son probablemente hidrolizados por otras CPs intestinales como la ACE y la CPP presentes en la membrana apical externa de los enterocitos [311], así como proteasas citosólicas de los enterocitos como la iminopeptidasa [253].

### 3.9 Determinantes estructurales de la inhibición de CPOΔC humana por el NvCI

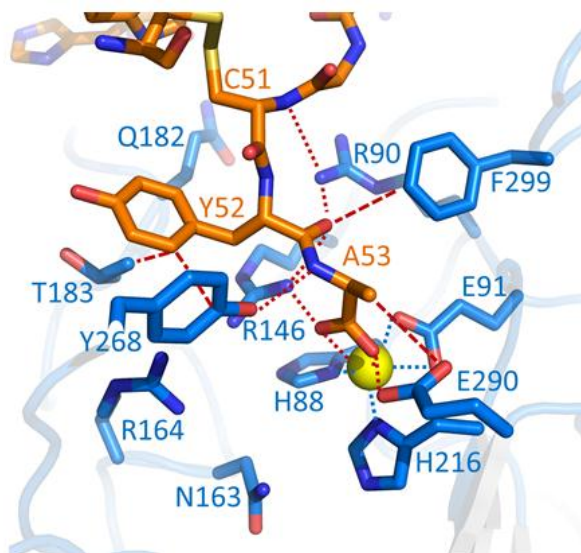
Como mencionamos anteriormente, solo 1 de las 2 moléculas de hCPOΔC presentes en la unidad asimétrica del cristal forma un complejo con el NvCI, estando la segunda molécula de hCPOΔC libre (ver **figura 43 y 47**). Este singular fenómeno podría ser debido a los contactos creados en el cristal en las condiciones de cristalización, y/o deberse a que el NvCI es un inhibidor proteico débil para la hCPO. En cualquier caso, el NvCI interacciona extensamente con la superficie de la hCPO, con una área de contacto total de 1734 Å<sup>2</sup> comparable a la calculada para la estructura del NvCI en complejo con la hCPA4 [182].



**Figura 53. Interacción del NvCI con la CPOΔC humana.** (A) Representación en cintas del complejo NvCI-hCPOΔC (en azul y naranja, respectivamente), mostrando la ubicación del sitio de interacción primario (PS) y secundario (SS) del inhibidor con la enzima. Los residuos de NvCI implicados en la unión con la hCPOΔC se señalan en rojo en la estructura en cintas del inhibidor. Los residuos de la cola C-t del NvCI (Cys51, Tyr52 y Ala53) que entran en el centro activo y contribuyen a la interacción primaria con la hCPOΔC, son etiquetados. El ion de zinc catalítico se muestra como una esfera amarilla. Los extremos N-t y C-t del inhibidor son indicados. Figura preparada con PyMOL [148]. (B) Secuencia primaria del NvCI en la que se destacan los residuos que forman parte del PS (en naranja) y del SS (en azul) del inhibidor.

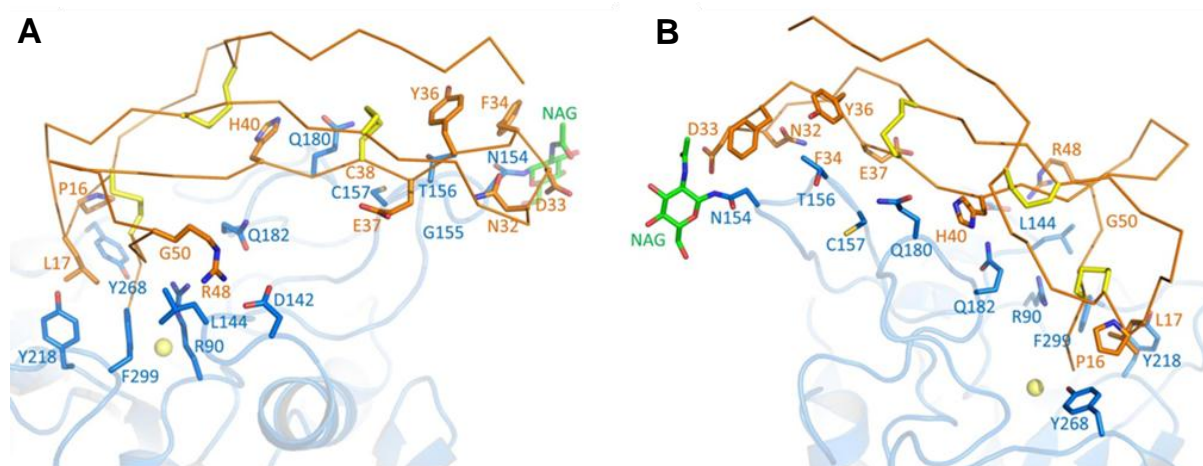
El NvCI está formado básicamente por 2 cadenas- $\beta$  antiparalelas centrales estabilizadas mediante 3 puentes disulfuro, y 2 colas cortas que se extienden hacia los extremos N-t y C-t de la molécula (ver **figura 43, figura 53-A**). El mecanismo de inhibición primario del NvCI se basa en la interacción competitiva de su cola C-t con los subsitios S1 y S2 del centro activo de la enzima, imitando la unión del sustrato. La oclusión de estos subsitios mediante interacciones específicas con residuos claves del centro activo es suficiente para inhibir la actividad enzimática de la hCPO $\Delta$ C. Además, otras interacciones entre el NvCI y regiones distantes del centro activo de la enzima ocurren en el complejo hCPO $\Delta$ C-NvCI, y constituyen el sitio de interacción secundario del inhibidor (**Figura 53-A y 53-B**).

La cola C-t del NvCI constituye el sitio de interacción primario del inhibidor con la enzima y está formada por los residuos Cys51, Tyr52 y Ala53 (posiciones P3, P2 y P1, respectivamente) (**figura 53-A y 53-B**). El NvCI no contiene ningún residuo en posición P1 $''$  que interactúe con el subsitio S1 $''$  de la enzima, de manera que el grupo carboxilo C-t de la Ala53 se coordina directamente con el ion de zinc de una forma bidentada. Además, la Ala53 establece puentes de hidrógeno con residuos localizados en el subsitio S1 y S1 $''$  importantes para catálisis y la unión al sustrato, como son los residuos Glu290, Arg146 y Tyr268, en su conformación “abajo” tras la unión del inhibidor en el centro activo (**figura 54**).



**Figura 54. Sitio de interacción primario del NvCI.** Detalle del centro activo de la hCPO $\Delta$ C, mostrando las interacciones formadas entre los residuos de la cola C-t del NvCI (Cys51, Tyr52 y Ala53), mostrados en barras de color naranja y etiquetados, y residuos claves para la unión del sustrato y la catálisis en la hCPO $\Delta$ C, mostrados en barras de color azul y numerados acorde a la posición que ocupan en la secuencia de la hCPO activa. Las líneas discontinuas de color rojo indican las interacciones, tanto electrostáticas como hidrofóbicas, entre los residuos del inhibidor y de la enzima. El ion de zinc catalítico se muestra como una esfera amarilla. Figura preparada con PyMOL [148].

Otras interacciones relevantes de esta región primaria consisten en los puentes de hidrógeno formados entre la Tyr52 y las cadenas laterales de la Arg90 y la Arg146 localizadas en el subsitio S2 de la hCPOΔC, y de la Cys51 con la Arg90 en posición S3 (figura 54). En la tabla 12 se detallan las interacciones moleculares que tienen lugar entre los residuos de la cola C-t del NvCI y residuos del centro activo de la enzima, los átomos que participan y sus correspondientes distancias de enlace.



**Figura 55. Sitio de interacción secundario del NvCI.** (A) Detalle del sitio de interacción secundario del NvCI con residuos de la superficie de la hCPOΔC, distantes del centro activo. La cadena lateral de los residuos implicados se muestra en barras de color naranja y azul para el NvCI y la hCPOΔC, respectivamente, y numerados acorde a la posición que ocupan en la secuencia del NvCI o de la hCPOΔC activa. (B) Igual que en A, pero con una rotación del complejo NvCI-hCPOΔC de 180°. En ambos paneles, los tres puentes disulfuro del NvCI y el átomo de zinc catalítico se muestran como barras amarillas o como una esfera amarilla, respectivamente. La molécula de NAG unida a la Asn154 se muestra en barras de color verde, con los átomos de nitrógeno en azul y los de oxígeno en rojo. Figura preparada con PyMOL [148].

El sitio de interacción secundario del NvCI se compone principalmente de contactos entre residuos de las 2 cadenas-β y regiones distantes de la cavidad del centro activo de la hCPOΔC (ver figura 55-A). Como se ha sugerido para otros inhibidores proteicos exógenos de MCPs de la familia M14, el sitio de interacción secundario contribuye sustancialmente a la estabilización del complejo y a la disminución de la  $K_i$  [179],[193].

El sitio de interacción secundario del NvCI con la hCPOΔC involucra a múltiples residuos, acorde a la gran superficie de contacto entre ambas moléculas en el complejo. De especial interés son las múltiples interacciones existentes entre la Asn154 y su respectiva NAG enlazada presentes en la hCPOΔC con los residuos Asn32, Asp33 y Phe34 del NvCI, así como los múltiples puentes de hidrógeno formados entre la His40 del NvCI y la Gln180 y Gln182 de la hCPOΔC, y el puente salino establecido entre la Arg48 del NvCI y el Asp142 de la hCPOΔC (figura 55-A y 55-B).

## Capítulo II

En la **tabla 12** se detallan también las interacciones moleculares que ocurren en el sitio de interacción secundario del NvCI con la enzima, los átomos involucrados y sus correspondientes distancias de enlace.

**Tabla 12. Interacciones entre los sitios de interacción primario y secundario en el NvCI y la CPOΔC humana.**

NvCI	hCPO	Distancia (Å)
<b>Sitio de interacción primario</b>		
Ala-53 O	Zn <sup>2+</sup>	2,28
Ala-53 Oη	Zn <sup>2+</sup>	2,55
Ala-53 O	Glu-290 Oε2	2,69
Ala-53 Oη	Arg-146 Nε2	2,81
Ala-53 Cβ	Glu-290 Oε1	3,57
Ala-53 N	Tyr-268 Oε	2,83
Tyr-52 O	Arg-90 Nε2	3,00
Tyr-52 O	Arg-146 Nε2	3,36
Tyr-52 O	Phe-299 Cδ	3,24
Tyr-52 Cδ1	Tyr-268 Cδ	3,53
Tyr-52 Cδ2	Thr-183 Cγ1	3,65
Cys-51 N	Arg-90Nε2	3,72
<b>Sitio de interacción secundario</b>		
Pro-16 Cβ	Tyr-268 Cδ2	3,58
Leu-17 Cδ1	Tyr-218 Cε1	3,85
Leu-17 Cδ1	Phe-299 Cδ	3,70
Asn-32 Nδ2	Gly-155 O	3,20
Asn-32 Cβ	Asn-154 O	3,74
Asp-33 Oδ1	Asn-154-NAG O7	3,69
Asp-33 Oδ2	Asn-154 Nδ2	3,00
Asp-33 Oδ2	Asn-154-NAG O7	3,13
Phe-34 Cε2	Asn-154 Oδ1	3,90
Phe-34 Cδ	Asn-154-NAG C8	3,62
Phe-34 Cε2	Asn-154 Cβ	3,62
Phe-34 Cδ2	Asn-154 Cβ	3,82
Phe-34 Cδ2	Thr-156 Cγ2	3,89
Tyr-36 O	Thr-156 Cγ2	3,61
Tyr-36 O	Thr-156 Cα	3,54
Glu-37 Cα	Thr-156 O	3,40
Glu-37 C	Thr-156 O	3,57
Cys-38 N	Thr-156 O	2,81
Cys-38 O	Thr-156 O	3,69
Cys-38 O	Cys-157 Cβ	3,80
His-40 N	Gln-180 O	3,52
His-40 O	Gln-182 Nε2	3,20
His-40 Nδ1	Gln-180 O	3,94
His-40 Nε2	Gln-180 Oε1	3,34
Arg-48 O	Leu-144 Cδ1	3,46
Arg-48 Nε2	Asp-142 Oδ1	2,56
Arg-48 Nε2	Asp-142 Oδ2	3,60
Gly-50 Cα	Arg-90 Nε1	3,51
Gly-50 Cα	Phe-299 Cε2	3,85



### 3.10 Cálculo de la $K_i$ para inhibidores de unión fuerte

La actividad proteolítica de las MCPs de la subfamilia M14A es totalmente bloqueada por varios inhibidores proteicos reversibles de unión fuerte ( $K_i \leq \text{nM}$ ) aislados de distintos organismos, como la patata (PCI e imaPCI) [214]-[216], el tomate (MCPI) [217],[218], gusanos intestinales (ACI) [219]-[222], sanguijuela (LCI) [223], garrapatas (TCI y HITCI) [224],[225] e invertebrados marinos (NvCI y SmCI) [226],[183]. A pesar de que estos inhibidores proceden de organismos evolutivamente distantes, todos ellos constituyen proteínas globulares pequeñas (39-75 residuos), que contienen varios puentes disulfuro en su estructura y con un mecanismo de inhibición competitivo basado en la unión de su cola C-t al centro activo de la enzima, de forma análoga al sustrato y afectando a residuos claves para la actividad enzimática [182].

La mayoría de estudios cinéticos con inhibidores clásicos reversibles se realizan en condiciones de estado estacionario, en las que la inhibición ocurre a concentraciones del inhibidor muy superiores a la concentración de enzima. En estas condiciones, la concentración de inhibidor unido a la enzima es constante y prácticamente despreciable, de manera que la concentración de inhibidor libre es equivalente a la concentración de inhibidor total usada en el ensayo [312]. Sin embargo, en los inhibidores reversibles de unión fuerte, existe una inhibición significativa de la enzima a concentraciones equivalentes en el rango nM, tanto de la enzima como del inhibidor.

En este caso, ocurre una depleción importante de la concentración del inhibidor libre para la formación del complejo enzima-inhibidor, de manera que la concentración de inhibidor libre ya no es equivalente a la concentración de inhibidor total usada en el ensayo. Por consiguiente, las ecuaciones empleadas en los estudios cinéticos de inhibidores reversibles para el modelo de estado estacionario, no pueden aplicarse para los inhibidores reversibles de unión fuerte, siendo necesario emplear la estrategia de Morrison para determinar de forma precisa las constantes de inhibición para este tipo de inhibidores [304].

Así pues, para complementar la caracterización enzimática de los inhibidores de unión fuerte disponibles en nuestro laboratorio frente a MCPs de la subfamilia M14A, calculamos la constante de disociación para los complejos de la hCPOΔC con los inhibidores competitivos PCI, LCI, TCI y ACI, siguiendo la estrategia descrita por Morrison descrita en el **apartado 2.11**. En la **tabla 13** se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 13. Constantes de inhibición para varios inhibidores proteicos frente a la CPOΔC humana.**

Inhibidor	$K_i$ (nM)
PCI	3,20 ± 0,58
LCI	12,79 ± 3,06
TCI	16,66 ± 3,10
ACI	43,57 ± 6,30

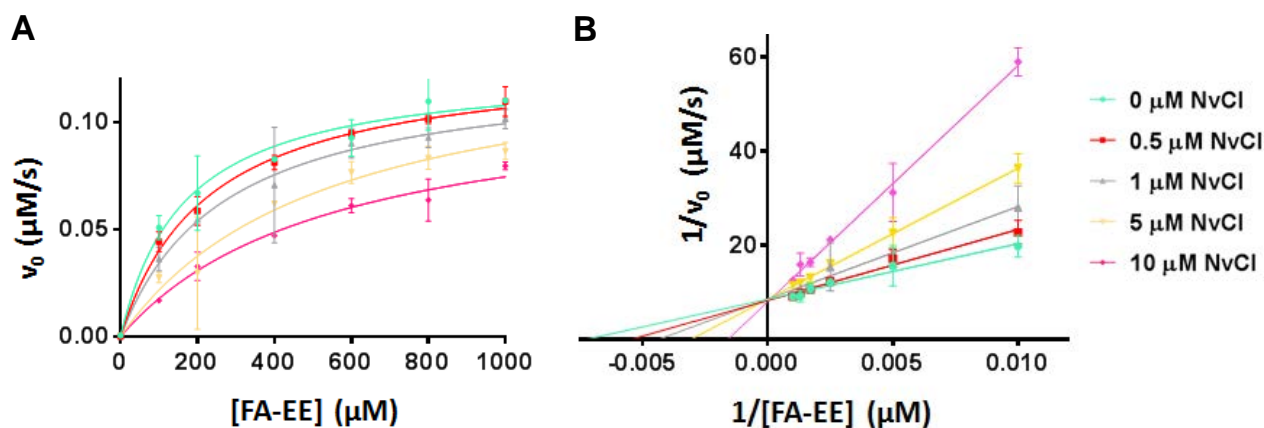
Los datos se muestran como la media ± (SD) (n=3).

El PCI constituye el inhibidor más potente de la hCPO con una  $K_i$  de  $3,2 \pm 0,58$  nM, seguido del LCI, el TCI y el ACI, con unas  $K_i$  de  $12,79 \pm 3,06$ ,  $16,66 \pm 3,10$  y  $43,57 \pm 6,30$  nM, respectivamente (**tabla 13**). En cualquier caso, todos ellos inhiben fuertemente la hCPO con unas constantes de inhibición del orden de nM, comparables a las determinadas para otros miembros de la subfamilia M14A como la CPA1, CPA2 y CPB [172],[175],[180],[313], Cuando la  $K_i$  de un inhibidor se encuentra en el mismo rango de concentración, o menor, que la concentración de enzima activa usada en el ensayo, corresponde a un inhibidor reversible de unión fuerte. Por tanto, corroboramos que el PCI, LCI, TCI y ACI se comportan como inhibidores de unión fuerte para la hCPO.

### 3.11 Cálculo $K_i$ para el NvCI

El NvCI corresponde a un inhibidor reversible de unión fuerte que presenta una  $K_i$  del orden de picomolar (pM) para las MCPs de la subfamilia M14A (excepto para la CPA2, nM), siendo el inhibidor más potente identificado hasta la fecha para estas enzimas [226].

Para corroborar la modalidad de inhibición competitiva del NvCI realizamos ensayos cinéticos de inhibición, en los que determinamos la velocidad inicial ( $v_0$ ) para cada concentración de sustrato ensayada (entre 0 y 1 M), en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor (entre 0 y 10  $\mu$ M) (**figura 56-A**). A continuación, obtuvimos el gráfico de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk representando el inverso de la concentración de sustrato ( $1/[FA-EE]$ ) respecto al inverso de la velocidad inicial de reacción ( $1/v_0$ ) obtenida para las distintas concentraciones de sustrato ensayadas, en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor [305]. Finalmente, el mecanismo de inhibición competitivo del NvCI se confirmó visualmente mediante la intersección convergente de todas las rectas en el eje vertical ( $1/V_{max}$ ) para todas las concentraciones de inhibidor ensayadas, característica de los inhibidores reversibles competitivos (**figura 56-B**).



**Figura 56. Tipo de inhibición de la actividad enzimática de la CPOΔC humana por el NvCI.** Cinética de Michaelis-Menten (A) y gráfico de Lineweaver-Burk (B) para la determinación de la modalidad de inhibición de la hCPOΔC por el NvCI. Concentraciones crecientes del sustrato FA-EE (de 0 a 1 M) fueron ensayadas en ausencia o en presencia del inhibidor, a las concentraciones indicadas. La transformación lineal de la ecuación de Michaelis-Menten corroboró que el NvCI es un inhibidor reversible competitivo, al observarse la  $V_{\max}$  (intersección de las rectas en eje vertical,  $1/V_{\max}$ ) de la enzima invariable para todas las concentraciones de inhibidor ensayadas. Las reacciones se llevaron a cabo en 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, empleando una concentración de hCPOΔC de 30 nM. Las barras de error representan la media  $\pm$  SD.

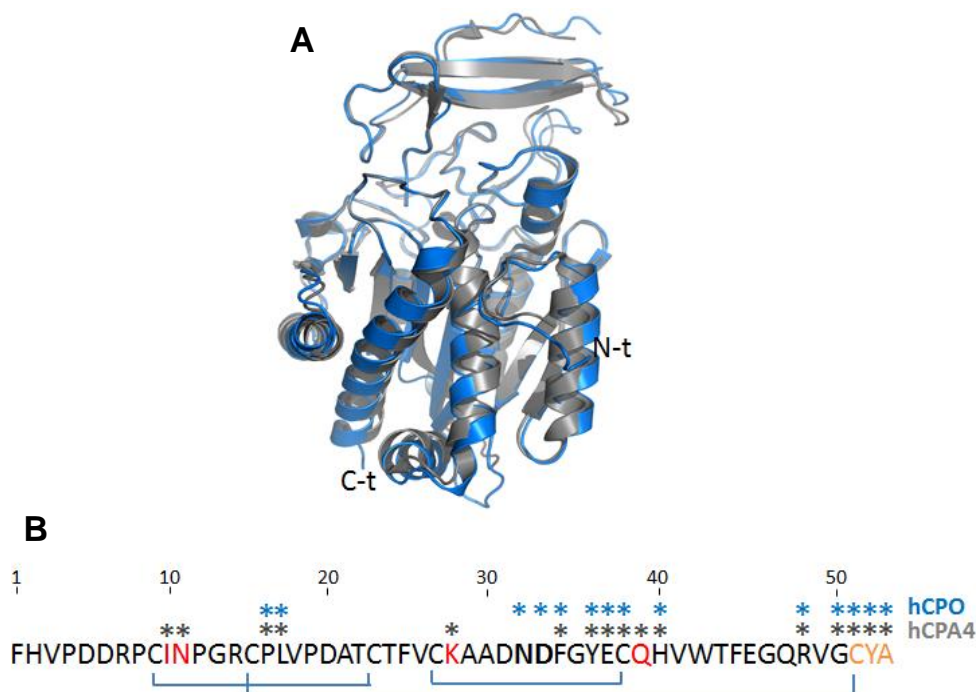
Curiosamente, ensayos previos de la cinética de inhibición del NvCI frente a la hCPOΔC siguiendo la estrategia de Morrison, demostraron que la actividad proteolítica de la enzima no era inhibida a concentraciones de inhibidor en el rango de nM (datos no mostrados). Por consiguiente, concluimos que el NvCI no se comporta como un inhibidor reversible de unión fuerte para la hCPO. En base a estos resultados, tuvimos que determinar la constante de disociación para el complejo NvCI-hCPOΔC realizando nuevos ensayos de inhibición a concentraciones de NvCI muy superiores a la concentración de enzima usada en el ensayo, siguiendo la estrategia descrita para inhibidores clásicos reversibles competitivos en el **apartado 2.12**.

El NvCI presenta una  $K_i$  de  $3,75 \pm 0,52 \mu\text{M}$  para el complejo de la hCPOΔC-NvCI, una constante de disociación 6 órdenes de magnitud superior a la calculada previamente para otros complejos del NvCI con la CPA1, CPA2, CPB, CPA4 y CPU [182]. Estos inesperados resultados nos condujeron a investigar las causas subyacentes en el espectacular incremento de la  $K_i$  del NvCI frente a la hCPOΔC, en comparación con otras MCPs de la subfamilia M14A.

### 3.12 Comparación de los determinantes estructurales de la inhibición del NvCI en la CPOΔC y CPA4 humanas

Para averiguar los motivos que influyen en la  $K_i$  sorprendentemente elevada obtenida para el NvCI frente a la hCPOΔC, alineamos las estructuras 3D resueltas para los complejos de la hCPA4 y de la hCPOΔC con el NvCI, y comparamos las interacciones moleculares existentes en los sitios de interacción primario y secundario del NvCI con la enzima, en ambas estructuras.

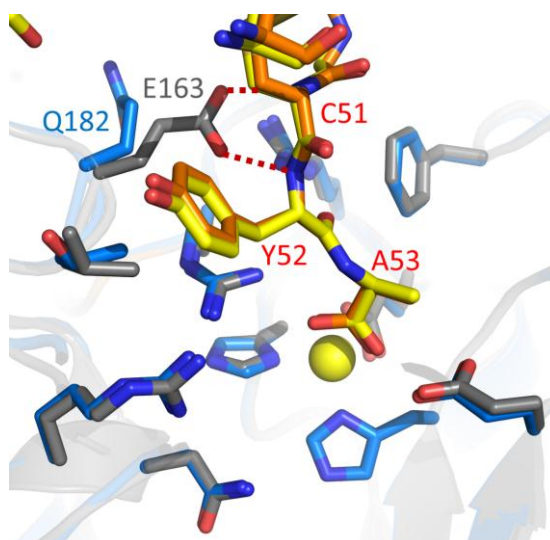
El alineamiento de las estructuras de la hCPA4 y la hCPOΔC en complejo con el NvCI muestra una superposición casi idéntica, con un rmsd de 0,72 Å (**figura 57-A**). Las interacciones existentes entre la cola C-t del NvCI y la hCPOΔC son muy similares a las observadas en el complejo de la hCPA4 con el NvCI [182], encontrándose las principales diferencias entre ambas estructuras en los contactos secundarios establecidos en la extensa superficie de interacción entre el inhibidor y las correspondientes enzimas (**figura 57-B**).



**Figura 57. Comparación de las interacciones del NvCI con la CPA4 y la CPOΔC humanas.** (A) Superposición estructural de los complejos de la hCPA4-NvCI (PDB: 4A94) y de la hCPOΔC-NvCI, representados en cintas de color gris y azul, respectivamente. Las coordenadas atómicas para la estructura de la hCPA4-NvCI se obtuvieron de la base de datos PDB ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). Figura preparada con PyMOL [148]. (B) Secuencia primaria del NvCI indicando los residuos del inhibidor implicados en la unión con la hCPA4 (asteriscos grises) o la hCPOΔC (asteriscos azules). Los residuos del NvCI de la cola C-t se muestran en naranja. Los residuos del NvCI que interactúan exclusivamente con la hCPA4 o la hCPOΔC se muestran en rojo o en negrita, respectivamente.

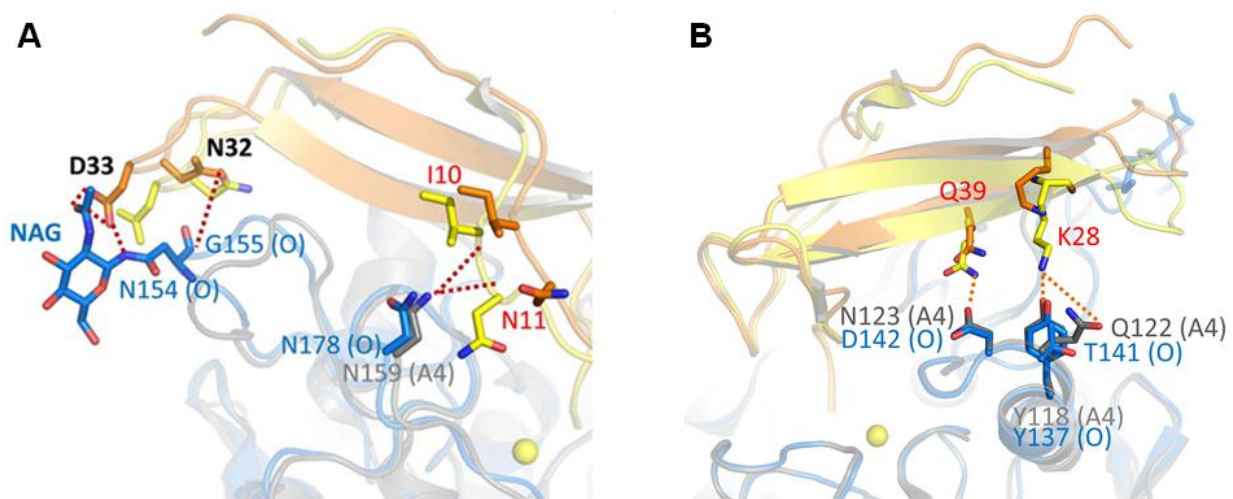
El análisis del sitio de interacción primario del NvCI con ambas enzimas reveló que la cadena lateral del Glu163 (E163) de la hCPA4 establece 2 puentes de hidrógeno adicionales con la Cys51 (C51) y de la Tyr52 (Y52) del inhibidor, que no están presentes en el complejo de la hCPOΔC-NvCI. Este hecho es debido a la presencia de una Gln (Q182 en la hCPO activa) en la posición equivalente al Glu163, que está orientada de tal manera que no se favorece la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos amino ( $N\epsilon 2$ ) y carbonilo ( $O\epsilon 1$ ) de la Gln y los grupos amino (N) de la Cys51 y la Tyr52 (**figura 58**). De hecho, la Gln182 ( $N\epsilon 2$ ) en la hCPOΔC se encuentra formando un puente de hidrógeno (3,20 Å) con la His40 (O) del NvCI (ver **tabla 12**).

Esta interacción podría tener un rol clave en la estabilización de los complejos NvCI-MCPs de la subfamilia M14A y en la pérdida de la afinidad de este inhibidor por la hCPO en comparación con otras MCPs (con  $K_i$  de 3 órdenes de magnitud inferiores, en el rango de pM). Muchas peptidasas de la familia M14A contienen un Glu en esta misma posición orientado a una distancia de enlace óptima para la formación de puentes de hidrógeno, lo que avala la importancia de la interacción entre la Cys51 y la Tyr52 del inhibidor con el Glu en posición S3 para la estabilización del complejo y la reducción del valor de la  $K_i$  del inhibidor para las MCPs de la subfamilia M14A [182].



**Figura 58. Comparación del sitio de interacción primario del NvCI entre la CPA4 y la CPOΔC humanas.** Detalle del centro activo de la hCPA4 y de la hCPOΔC en complejo con el NvCI, destacando los puentes de hidrógeno (líneas discontinuas rojas) formados entre la cadena lateral del E163 de la hCPA4 y los residuos Y52 y C51 de la cola C-t NvCI. Las cadenas laterales de los residuos mostrados se representan en barras coloreadas en gris y azul para la hCPA4 y la hCPOΔC, respectivamente, y en amarillo y naranja para los residuos del inhibidor en complejo con la hCPA4 y la hCPOΔC, respectivamente. El ion de zinc catalítico se muestra como una esfera amarilla. Figura preparada con PyMOL [148].

Por otro lado, en el análisis del sitio de interacción secundario del NvCI con ambas enzimas, identificamos la formación de varias interacciones, tanto electrostáticas como hidrofóbicas, entre la Asn154 y la NAG-154 de la hCPOΔC con la Asn32, Asp33 y la Phe34 del inhibidor (ver **tabla 12**), que no se observan en el complejo de la hCPA4-NvCI (**figura 59-A**). En cambio, en el complejo de la hCPA4-NvCI se observan varios puentes de hidrógeno que involucran a átomos de los residuos Ile10, Asn11, Lys28 y Gln39 del inhibidor, que no ocurren en el complejo de la hCPOΔC con el inhibidor (**figura 59-A y 59-B**). Nuestra hipótesis es que la presencia de la NAG-154 (y probablemente el resto del N-glicano) en la hCPOΔC actuaría como un impedimento estérico para el correcto posicionamiento del NvCI, que contribuiría significativamente a la desestabilización del complejo. Este hecho explicaría, a su vez, la pérdida de las interacciones estabilizadoras entre el sitio de interacción secundario del inhibidor y la hCPA4, en la superficie del complejo de la hCPOΔC-NvCI.



**Figura 59. Comparación del sitio de interacción secundario del NvCI entre la CPA4 y la CPOΔC humanas.** (A) Detalle del sitio de interacción secundario del NvCI con la hCPA4 y la hCPOΔC, mostrando únicamente aquellas interacciones exclusivas para cada uno de los complejos. Las líneas discontinuas rojas corresponden a las interacciones, tanto electrostáticas como hidrofóbicas, establecidas entre los residuos del inhibidor y de las enzimas. Las cadenas laterales de los residuos mostrados se representan en barras coloreadas en gris y azul para la hCPA4 y la hCPOΔC, respectivamente, y en amarillo y naranja para los residuos del inhibidor en complejo con la hCPA4 y la hCPOΔC, respectivamente. (B) Igual que en A, pero rotando los complejos para visualizar la cara opuesta de las moléculas. El ion de zinc catalítico se muestra como una esfera amarilla. Figura preparada con PyMOL [148].

En resumen, la pérdida de interacciones moleculares estabilizadoras en el complejo de la hCPOΔC-NvCI, como consecuencia de la presencia de una Gln en la posición equivalente al Glu163 en la hCPA4 (Gln182 en hCPOΔC) y del impedimento estérico ocasionado por la NAG-154 para el correcto posicionamiento del inhibidor, podrían ser las principales causas responsables del elevado valor de  $K_i$  observado en nuestro estudio para el NvCI frente a la hCPOΔC, en comparación con otras peptidasas de la subfamilia M14A para las que este mismo inhibidor demostró  $K_i$  mucho más bajas [182].

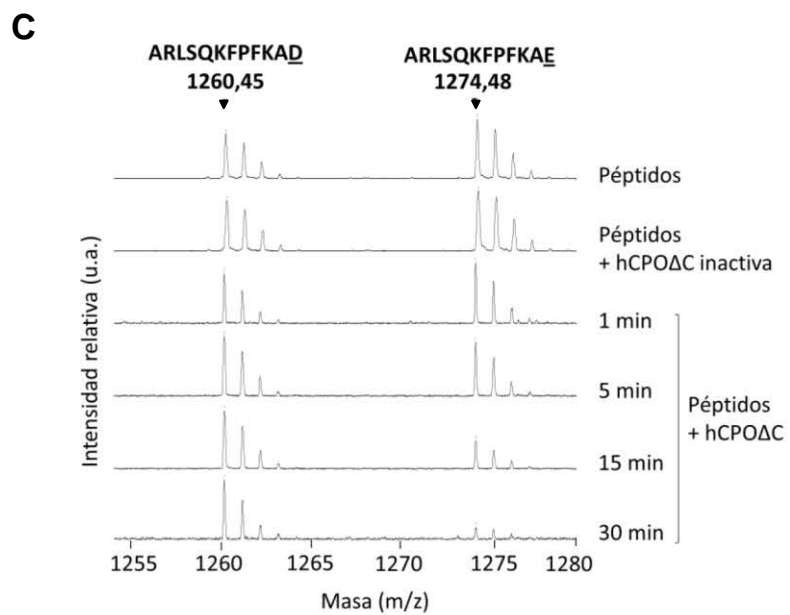
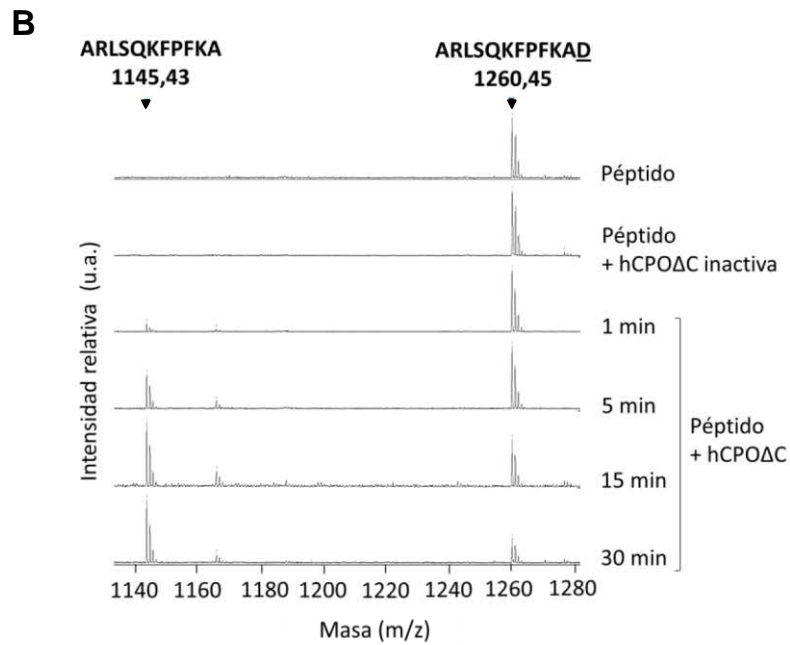
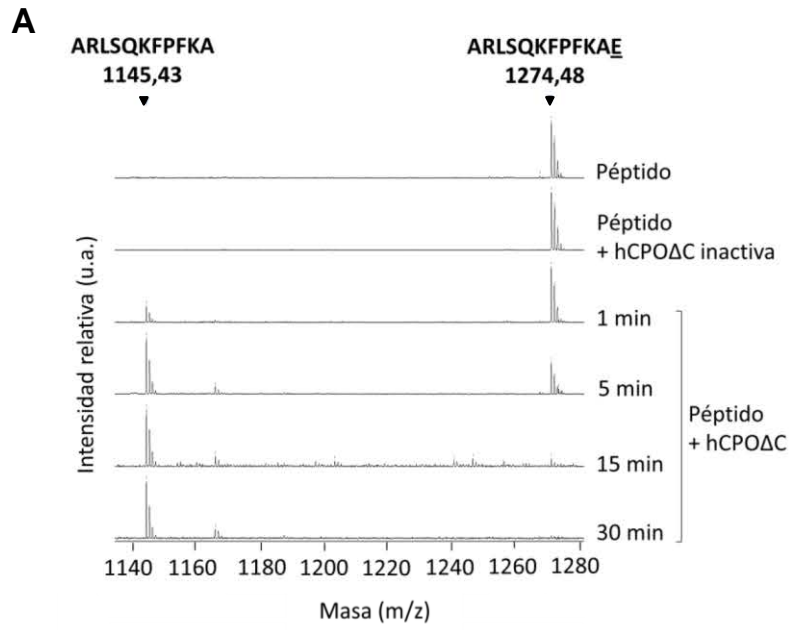
### 3.13 Estudio de la preferencia de sustrato acídica de la CPOΔC humana

Para investigar la preferencia de sustrato acídica de la hCPOΔC, examinamos la actividad de la enzima purificada frente a péptidos sintéticos con un Glu o Asp en su posición C-t (ARLSQKFPKAE o ARLSQKFPKAD, respectivamente).

Para ello, incubamos la hCPOΔC con concentraciones equimolares de cada uno de los péptidos, y con ambos péptidos simultáneamente. Como control de la especificidad enzimática, establecimos reacciones de incubación de los oligopéptidos con la hCPOΔC desnaturalizada a 95°C durante 10 min, y reacciones de la hCPOΔC con concentraciones equimolares de Met-enkefalinas con una Arg, Lys o Phe en su extremo C-t. Finalmente, analizamos diferentes tiempos de incubación de las reacciones de digestión mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, para obtener información semicuantitativa de la hidrólisis de los péptidos testados.

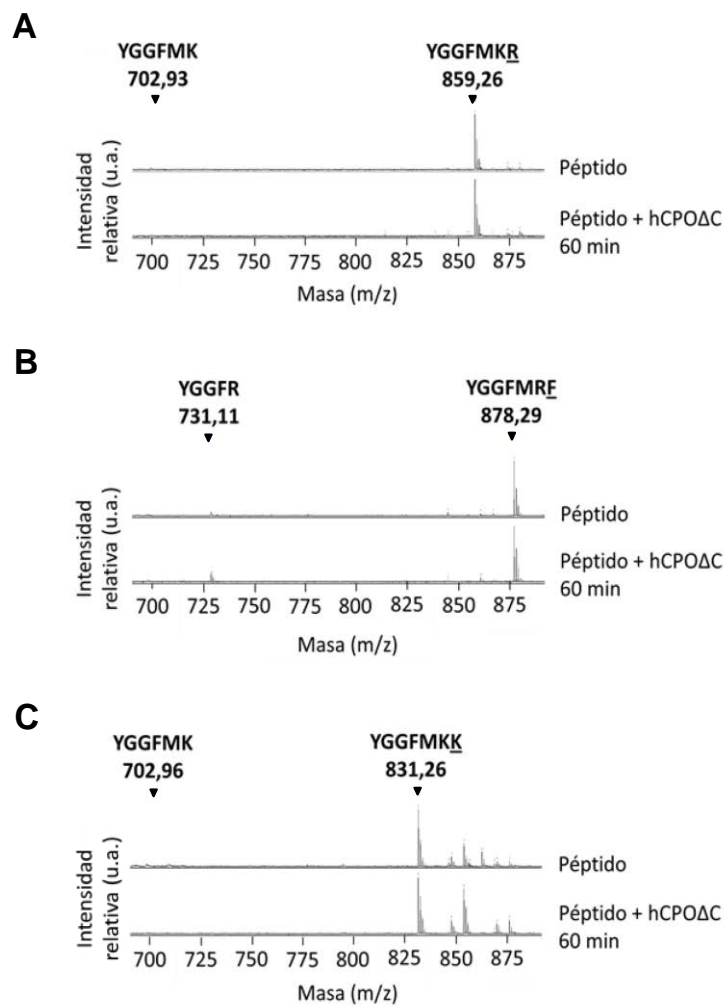
Los resultados obtenidos muestran que a los 15 min de incubación el péptido sintético con un Glu C-t había sido totalmente digerido por la hCPOΔC (**Figura 60-A**). Además, la enzima también fue capaz de digerir el péptido que contiene un Asp en su extremo C-t, aunque fueron necesarios tiempos de incubación superiores (>30 min) para observar la completa desaparición de la intensidad del pico correspondiente al sustrato peptídico intacto (**Figura 60-B**). El ensayo de competición correspondiente a la incubación simultánea de ambos péptidos con la hCPOΔC, corroboró que la enzima presenta una clara preferencia por la hidrólisis de Glu frente a Asp C-t, observándose a los 30 min de incubación la desaparición casi total del pico de intensidad correspondiente al péptido con un Glu C-t, mientras que el péptido análogo con un Asp C-t permanece prácticamente invariable a los distintos tiempos de incubación analizados (**Figura 60-C**). Por último, la hCPOΔC no fue capaz de procesar las Met-enkefalinas con un residuo hidrofóbico (Phe) o residuos básicos (Arg o Lys) C-t, incluso a tiempos de incubación largos (60 min) (**Figura 61-A, 61-B y 61-C**), acorde a su especificidad de sustrato acídica.

## Capítulo II





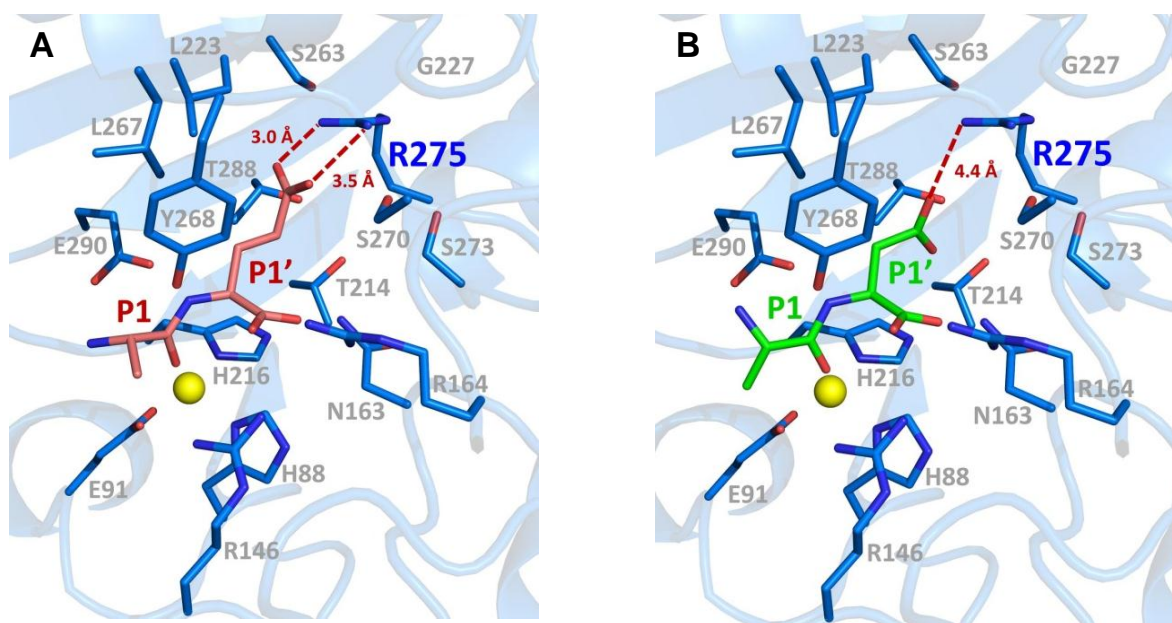
**Figura 60. Especificidad de sustrato tipo-O de la CPOΔC humana.** Espectro de masas MALDI-TOF de los péptidos sintéticos (A) ARLSQKFPKAE, (B) ARLSQKFPKAD y (C) ARLSQKFPKAE + ARLSQKFPKAD, tras la incubación de 1,6 μM de éstos con 80 nM de la hCPOΔC, a 37°C durante 1, 5, 15 y 30 min. Como control de la especificidad enzimática, obtuvimos los espectros de masas de las reacciones de los péptidos sin enzima y de los péptidos con la hCPOΔC inactiva, tras 30 min de incubación a 37°C. Todas las reacciones se ensayaron por duplicado. Los números mostrados encima de los picos principales indican la masa monoisotópica del ion MH<sup>+</sup> (m/z). Los picos con una masa de 1274,48 Da y 1260,45 Da corresponden a los péptidos ARLSQKFPKAE (masa teórica monoisotópica = 1273,48 Da) y ARLSQKFPKAD (masa teórica monoisotópica = 1259,45 Da), respectivamente. El pico de 1145,43 Da formado en presencia de la hCPOΔC, corresponde al péptido ARLSQKFPKA (masa teórica monoisotópica= 1144,43 Da) producido por la escisión de los residuos de Glu o Asp del extremo C-terminal de los péptidos ARLSQKFPKAE y ARLSQKFPKAD, respectivamente.



**Figura 61. Especificidad de sustrato tipo-A y tipo-B de la CPOΔC humana.** Espectro de masas MALDI-TOF de las Met-enkefalinas que contienen (A) Phe (IGGFMRF), (B) Arg (IGGFMKR) o (C) Lys (IGGFMKK) en su extremo C-t, tras la incubación de 1,6 μM de éstas con 80 nM de la hCPOΔC durante 60 min a 37°C. Como control, obtuvimos los espectros de masas de las reacciones de las Met-enkefalinas sin enzima, incubadas también durante 60 min a 37°C. Todas las reacciones se ensayaron por duplicado. Los números mostrados encima de los espectros corresponden a las masas monoisotópicas del ion MH<sup>+</sup> (m/z) de los diferentes péptidos Met-enkefalinas o de sus productos formados por la acción proteolítica de hCPOΔC. Las masas teóricas monoisotópicas para los sustratos y los sustratos sin el residuo C-t son las siguientes: IGGFMKR = 858,26 Da; IGGFMRF = 877,29 Da; IGGFMKK = 830,26 Da; IGGFMK = 701,93 Da; IGGFR = 730,11 Da; YGGFMK = 701,96.

En este experimento demostramos que la hCPO hidroliza residuos ácidos C-t, con una clara preferencia por la hidrólisis de Glu sobre Asp. Para esclarecer las posibles causas de esta preferencia de la hCPOΔC por sustratos con Glu C-t, se llevó a cabo un *docking* molecular de los péptidos ARLSQKFPKAE y ARLSQKFPKAD en el centro activo de la estructura 3D de la hCPOΔC, basado en el modelo estructural de la hCPA4 en complejo con un hexapéptido escindido en el centro activo [314].

Los resultados de esta simulación bioinformática sugieren que la preferencia de sustrato de la hCPO por Glu C-t es debida al posicionamiento favorable del Glu en posición P1' del péptido respecto a la Arg275 de la enzima. Mientras que los átomos Oε1 y Oε2 del Glu C-t del péptido se mantienen a una distancia de enlace aceptable para la formación de 2 puentes de hidrógeno con los átomos Nε1 y Nε2 de la Arg275. Por el contrario, los átomos Oδ1 y Oδ2 del Asp C-t se localizan a una distancia >4 Å de los átomos Nε1 y Nε2, lo que dificulta la interacción entre estos dos residuos, y podría explicar la menor afinidad de la enzima por este aminoácido (**figura 62**).



**Figura 62. Docking de los péptidos sintéticos con un glutámico o aspártico C-t en el centro activo de la CPOΔC humana.** (A) Péptidos PFKAE (en rojo) y PFKAD (en verde), posicionados en el bolsillo de especificidad S1' del centro activo de la hCPOΔC. Para simplificar la imagen, solo se muestran los últimos dos residuos de los péptidos (posiciones P1 y P1' C-t). La cadena lateral de los residuos claves para la coordinación del ion de zinc, la actividad catalítica y la unión al sustrato en la hCPO, se muestran en barras de color azul y numeradas acorde a la posición que ocupan en la secuencia de la hCPO activa. Se representan las interacciones (líneas rojas discontinuas) entre la cadena lateral del Glu y el Asp en posición P1' de los péptidos y la cadena lateral de la Arg275 en el bolsillo de especificidad S1' de la hCPOΔC. Los números próximos a las líneas discontinuas corresponden a la distancia expresada en Ångstroms (Å). El *docking* de ambos péptidos se realizó empleando el protocolo estándar de precisión para el *docking* de péptidos con el programa Glide [315]. Este trabajo se realizó con la ayuda del grupo de Dr. Juan Fernández-Recio (Barcelona Supercomputing Center (BSC), Barcelona). Figura preparada con PyMOL [148].

### 3.14 Proteólisis C-terminal del EGF por la CPOΔC humana

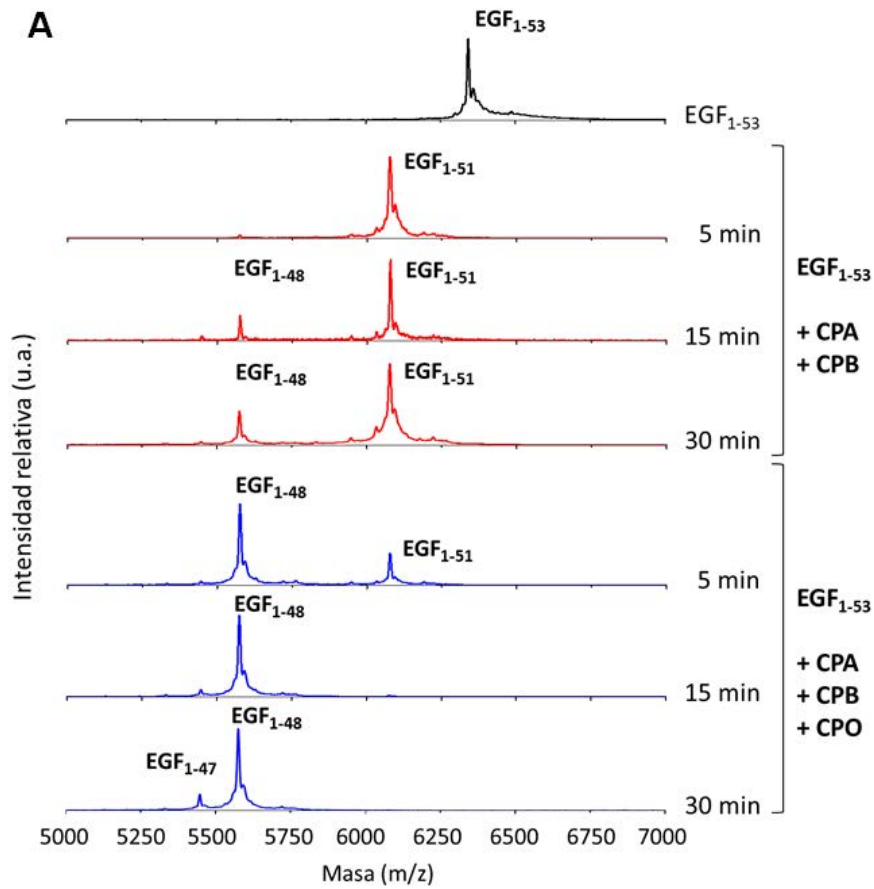
El EGF humano (hEGF) es un péptido de 53 aminoácidos (EGF<sub>1-53</sub>) que constituye un importante factor trófico para el desarrollo y la maduración del epitelio intestinal. En el tracto digestivo, el EGF es altamente resistente a la degradación proteolítica en el pH ácido del estómago y a las proteasas presentes en la luz intestinal. Sin embargo, aunque generalmente se considera que el hEGF<sub>1-53</sub> es la forma mayoritaria biológicamente activa en humanos, se han observado otras formas circulantes de hEGF truncadas en su extremo C-t (hEGF<sub>1-52</sub>, hEGF<sub>1-51</sub>, hEGF<sub>1-50</sub>, etc.) menos activas, como resultado de la proteólisis parcial por proteasas desconocidas presentes en la luz gastrointestinal [316],[317],[318],[319]. Estas modificaciones relativamente pequeñas en la región C-t de la molécula tienen un efecto marcado en la unión del EGF al EGFR [320],[321], afectando así su actividad biológica [322].

Para investigar si el hEGF podría constituir un potencial sustrato endógeno para la hCPO, incubamos el EGF (EGF<sub>1-53</sub>) con la bCPA y la pCPB, en ausencia o en presencia de la hCPOΔC purificado. Además, preparamos reacciones del EGF<sub>1-53</sub> en ausencia de enzimas, como control de la estabilidad de la molécula a lo largo de los tiempos de incubación ensayados. Tras la incubación, las reacciones de digestión fueron analizadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, y los espectros de masas obtenidos de la cinética de degradación proteolítica del hEGF por la acción enzimática de las distintas MCPs digestivas de la subfamilia M14A, se muestran en la **figura 63**.

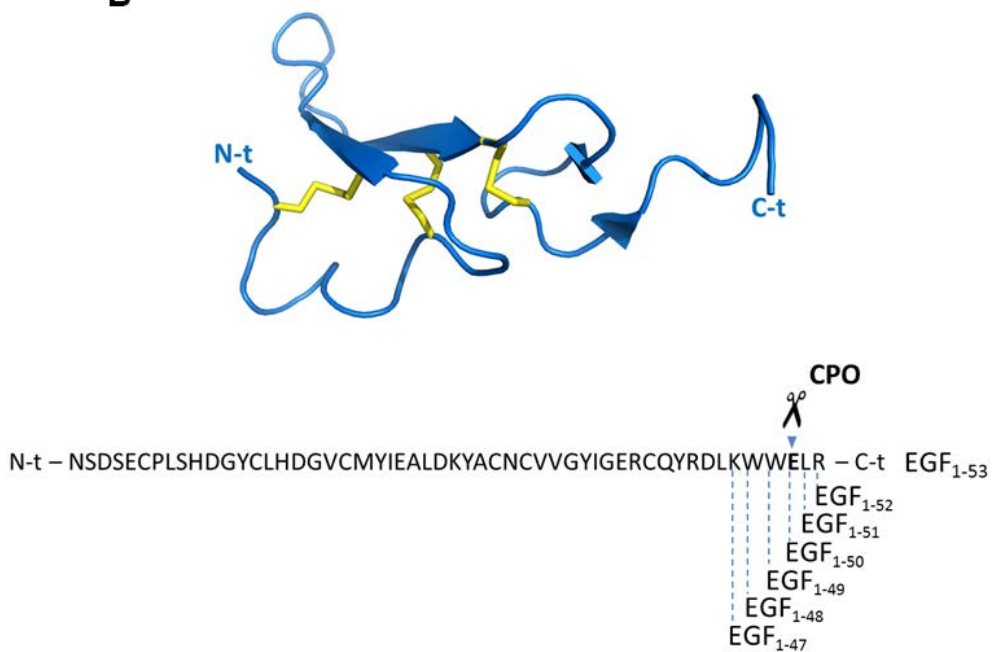
La combinación de la hCPA y la pCPB eliminó rápidamente la Arg53 y Leu52 C-t del EGF<sub>1-53</sub>, habiendo convertido a los 5 min de reacción la totalidad del sustrato inicial (espectro negro de la **figura 63-A** y **figura 63-B**) en la forma truncada EGF<sub>1-51</sub> (espectro rojo de la **figura 3-A** y **figura 63-B**). La presencia de un Glu en la posición 51 del hEGF, limitó la acción enzimática de la CPA y la CPB para generar formas truncadas de menor tamaño de esta molécula, debido a su especificidad enzimática tipo-A y tipo-B, respectivamente. No obstante, a los 15 y 30 min advertimos también una pequeña parte del EGF<sub>1-51</sub> hidrolizado al EGF<sub>1-48</sub>, aunque el producto de digestión mayoritario corresponde a la forma truncada EGF<sub>1-51</sub> con un Glu C-t (espectro rojo, **figura 63-A**). En cambio, la presencia de la hCPOΔC en las reacciones, favoreció la hidrólisis del Glu C-t del EGF<sub>1-51</sub> y permitió el avance de la reacción de proteólisis C-t de este factor de crecimiento para generar nuevas formas truncadas C-t del EGF. Tras 30 min de digestión, observamos un pico mayoritario correspondiente al pentapéptido C-t EGF<sub>1-48</sub>, que fue generado por la acción combinada de las 3 MCPs. Además, también se detecta un pico minoritario de menor intensidad correspondiente al EGF<sub>1-47</sub> (espectro azul de la **figura 63-A** y **figura 63-B**).

## Capítulo II

En este caso, la proteólisis del hEGF no progresó hacia la generación de nuevas formas truncadas en su extremo C-t, debido, probablemente, a la presencia de un puente disulfuro varios residuos antes y a su elevada resistencia proteolítica (**figura 63-B**).



**B**



**Figura 63. Proteólisis del extremo C-terminal del péptido EGF por la CPOΔC humana.** (A) Espectro de masas MALDI-TOF de la proteína EGF humana (EGF<sub>1-53</sub>), tras la incubación de 1,5 μg de hEGF con 30 nM de bCPA y 50 nM de pCPB, en presencia (espectro rojo) o ausencia (espectro azul) de 30 nM de hCPOΔC, durante 5, 15 y 30 min y a 37°C. Como control, obtuvimos el espectro de masas de reacciones de la proteína sin enzima, tras 30 min de incubación a 37°C. Todas las reacciones se prepararon por duplicado. (B) Representación en cintas de la estructura 3D del hEGF. Los enlaces peptídicos del extremo C-t escindidos mediante la acción proteolítica de la bCPA, pCPB y hCPOΔC se indican debajo de la secuencia aminoacídica del hEGF. El enlace peptídico escindido por la hCPOΔC se indica sobre la secuencia con unas tijeras. Cabe mencionar que el hEGF recombinante usado en este ensayo contiene la secuencia EGF<sub>1-53</sub> más una Met en su extremo N-t. En consecuencia, de manera que las masas isotópicas de los picos son: EGF<sub>1-53</sub> = 6348,77 Da; EGF<sub>1-51</sub> = 6078,85 Da; EGF<sub>1-48</sub> = 5577,32 Da; EGF<sub>1-47</sub> = 5449,15 Da. Las coordenadas atómicas del hEGF (PDB: 1IVO) se obtuvieron de la base de datos PDB ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)).

Los factores de crecimiento constituyen PBs que juegan un papel importante en el desarrollo del tracto gastrointestinal y en la regeneración del daño tisular, mediando la proliferación, la migración, la diferenciación y la supervivencia celular. Tanto en el ambiente fetal como post-natal, el intestino en desarrollo se expone a varios factores de crecimiento como el EGF, el factor de crecimiento similar al EGF de unión a heparina (HB-EGF), la hormona del crecimiento (GH), el factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1) o el péptido similar al glucagón-2 (GLP-2), entre muchos otros [323]. Los PBs tienen en común que son muy resistentes a la hidrólisis ácida en el ambiente gástrico y a la proteólisis mediada por proteasas intestinales, de manera que son biológicamente activos en el ambiente gastrointestinal y ejercen su función a nivel local o bien traspasan la mucosa intestinal para entrar en la circulación portal hepática y ser distribuidos a nivel sistémico [258].

En concreto, la señalización celular promovida por la unión del EGF al EGFR es crucial para la proliferación de las células epiteliales intestinales y su supervivencia. De hecho, la delección del gen codificante para el EGFR en ratones es letal durante el desarrollo embrionario y, los pocos que sobreviven, mueren en el período neonatal [323],[324],[325]. En etapas tempranas del desarrollo, el hEGF se encuentra habitualmente en líquidos que bañan el intestino, como por ejemplo el líquido amniótico, la leche materna o la saliva. A medida que éste avanza, la estimulación de mucosa gastrointestinal mediada por EGF endógeno depende principalmente de la secreción de este factor de crecimiento por las glándulas salivales y las glándulas de Brunner del duodeno intestinal [323].

Los enterocitos del intestino delgado son células columnares polarizadas que presentan una LBM y una membrana apical en BC, morfológica y funcionalmente distintas. La membrana LBM tiene acceso al hEGF circulante en sangre y la membrana apical en BC al hEGF secretado por las glándulas salivales y las glándulas de Brunner del duodeno. Ambas presentan numerosos EGFR, aunque son mucho más abundantes en la membrana LBM.

## Capítulo II

La hCPO es una glicoproteína que se localiza también en el BC de los enterocitos, hidrolizando oligopéptidos con residuos acídicos C-t procedentes de la dieta degradados parcialmente por proteasas presentes en el estómago y el duodeno intestinal. Sin embargo, Lyons y col. también observaron la presencia de la CPO en la LBM de células MDCK confluentes, por lo que no se descarta otras funciones en esta localización como podría ser el procesamiento del hEGF en la LBM.

Nuestros resultados confirman la habilidad de la hCPO para digerir no solo péptidos pequeños, sino también residuos C-t de sustratos de mayor tamaño presentes de forma habitual en el intestino. Este hecho sugiere un rol potencial para esta enzima en la modificación de factores de crecimiento y otras moléculas bioactivas que circulan por el tracto intestinal, como podría ser el EGF. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, hipotetizamos que la acción enzimática de la hCPO podría tener un papel clave en la inactivación/modulación de la señal celular mediada por EGF en los enterocitos y otras células del microvilli del intestino delgado, al cooperar con otras proteasas intestinales para generar formas truncadas C-t del EGF inactivas (EGF<sub>1-48</sub>). Se ha demostrado que las formas truncadas EGF<sub>1-52</sub> y EGF<sub>1-51</sub> son tan biológicamente activas como el EGF intacto, pero el pentapéptido EGF<sub>1-48</sub> C-t pierde una gran parte de su capacidad de activar el EGFR y, como consecuencia, de su actividad biológica [316],[317].

En esta línea, Lyons y colaboradores demostraron que la CPO es capaz de hidrolizar proteínas globulares más grandes que simples péptidos de pequeño tamaño, empleando la tubulina como modelo. Ensayos de actividad enzimática *in vitro* de la CPO humana purificada en presencia de tubulina purificada de cerebro porcino y la inmunodetección de las modificaciones C-terminales por *western blot* mostraron que la CPO era capaz de deglutamilar las cadenas de glutamatos generada post-traduccionalmente en la región C-terminal de la tubulina, así como los glutamatos codificados genéticamente en la secuencia primaria de la  $\alpha$ -tubulina detirosinada, generando  $\Delta 2$ - y  $\Delta 3$ -tubulina

Del mismo modo que el hEGF podría constituir un potencial sustrato para la hCPO *in vivo*, otros PBs, hormonas peptídicas y factores neuroendocrinos secretados por células presentes en el epitelio intestinal, como las células de Paneth, las células enterocromafines o las células calciformes, u hormonas secretadas por el páncreas endocrino, podrían corresponder a sustratos naturales para esta enzima, aunque será necesario realizar en un futuro nuevos estudios para averiguar el rol funcional de la hCPO en la regulación de procesos neuroendocrinos y/o en la respuesta inmunológica en el intestino delgado.



## ***DISCUSSION GENERAL***

---





## **DISCUSIÓN GENERAL**

Las MCPs son exopeptidasas dependientes de zinc que participan en la proteólisis C-t de péptidos y proteínas. La familia más numerosa y estudiada de MCPs es la M14, que contiene más de 25 miembros en humanos. Según el sistema de clasificación MEROPS, las peptidasas M14 se agrupan en las subfamilias M14A, M14B, M14C, M14D, en base a su homología estructural y de secuencia, así como a la presencia de motivos característicos esenciales para la unión del ion de zinc y la catálisis [262]. En general, las MCPs presentan una marcada preferencia por el residuo P1" del sustrato y son altamente selectivas para residuos hidrofóbicos, básicos o ácidos presentes en el extremo C-t. En mamíferos, estas enzimas están relacionadas con un amplio rango de procesos biológicos, como la digestión de proteínas, la regulación de la fibrinólisis en la sangre, la maduración de neuropéptidos, o el procesamiento específico de la tubulina, entre otras funciones [30],[124],[159],[163].

Durante años, nuestro grupo de investigación ha participado activamente en el descubrimiento y la caracterización de numerosas MCPs de la familia M14. Hasta la fecha, varias estructuras cristalinas de MCPs pancreáticas y extra-pancreáticas han sido obtenidas en complejo con inhibidores proteicos [60],[175],[179],[182],[193],[289],[326]. Estas estructuras han contribuido a elucidar los mecanismos funcionales de las MCPs, así como las bases estructurales para su inhibición. Sin embargo, a pesar de estos esfuerzos, la información disponible para algunos de sus miembros sigue siendo actualmente muy limitada. En particular, las MCPs con especificidad de sustrato tipo ácido han sido muy poco estudiadas debido a su descubrimiento reciente, y en parte, a la dificultad para su producción recombinante. Este hecho hace que exista un vacío de conocimiento acerca de los determinantes estructurales que definen la especificidad de sustrato por residuos ácidos C-t en las MCPs de la familia M14.

En esta tesis, presentamos la caracterización bioquímica, funcional y/o estructural de dos MCPs de la familia M14 con una especificidad de sustrato tipo ácido: la CCP6 y la CPO humanas. En concreto, nuestro trabajo se ha centrado en el estudio de las características estructurales que determinan la preferencia de sustrato tipo-O en la hCCP6 y la hCPO. Además, hemos estudiado otros aspectos relacionados con su función específica e inhibición.

En el capítulo I se muestra los resultados más relevantes del trabajo realizado para la caracterización bioquímica y funcional de la hCCP6. Esta MCP es la CCP de menor tamaño en eucariotas, ya que está formada básicamente por el pro-dominio N-t adyacente al dominio catalítico CP característico de las peptidasas M14.

## ***Discusión general***

La caracterización estructural de las CCPs eucariotas es una tarea compleja debido a la dificultad de obtener grandes cantidades de estas enzimas en su forma soluble y activa [125],[134],[137]. Por ello, hasta el momento, solo se ha logrado resolver la estructura 3D de cuatro CCPs, todas ellas bacterianas [151],[152]. Gracias a su simplicidad estructural respecto a otras hCCPs con una heterogeneidad de dominios y un tamaño mucho mayor, la hCCP6 se postuló como la candidata ideal para intentar obtener la primera estructura cristalina de una CCP eucariota.

El primer reto para alcanzar nuestro primer objetivo de este trabajo consistió en intentar obtener la hCCP6 recombinante en grandes cantidades y en su conformación soluble, estable, activa, pura y homogénea, como paso fundamental previo a los ensayos de cristalización y a la resolución de la estructura 3D mediante cristalografía de rayos X. Para ello, evaluamos sistemáticamente tres sistemas de expresión distintos basados en bacterias, células de insecto infectadas por BVS y células de mamífero, con el objetivo de identificar el sistema más adecuado para la producción de la hCCP6 recombinante con fines estructurales. Nuestros resultados evidenciaron la dificultad en la producción de esta proteína, y únicamente los sistemas de expresión basados en las células de mamífero HEK293 F y células de insecto Sf9 infectadas por AcMNPV recombinantes nos permitieron producir pequeñas cantidades de la hCCP6 en su forma soluble, estable y activa. En ambos casos, el rendimiento obtenido fue relativamente bajo, aunque la hCCP6 recombinante obtenida en células de mamífero HEK293 F era más estable. Dado que la expresión en células de insecto no ofrecía ninguna ventaja notable respecto a la expresión en células de mamífero, elegimos el sistema basado en células de mamífero como el mejor sistema para la producción recombinante de hCCP6.

A pesar de nuestros esfuerzos y de los múltiples intentos de expresión y purificación realizados, no fuimos capaces de obtener la hCCP6 en cantidades suficientes para llevar a cabo estudios de caracterización estructural. Para incrementar el rendimiento en la obtención soluble de la hCCP6 a escala laboratorio, será necesario seguir trabajando en la optimización de los sistemas testados, o bien explorar otros sistemas de expresión menos habituales para la producción de proteínas recombinantes. El diseño de una estrategia de optimización que garantice el éxito en la obtención de grandes cantidades de la hCCP6 soluble y activa, es una cuestión verdaderamente compleja. Existen múltiples variables que afectan a los procesos de producción de proteínas recombinantes, por lo que explorar las numerosas combinaciones posibles requerirá de bastante tiempo y esfuerzo. En esta línea, en un futuro se podría explorar la expresión de ortólogos de la hCCP6 de otras especies evolutivamente distantes de los seres humanos y que podrían presentar una mayor estabilidad.

## ***Discusión general***

Este es el caso, por ejemplo, de las proteínas Wnt, para las que después de varios años de intentos, únicamente la expresión de un ortólogo de rana resultó en la obtención de proteína suficiente para su cristalización [327]. Hasta la fecha, ningún grupo de investigación ha sido capaz de obtener CCPs de mamífero empleando otros sistemas de expresión distintos a las células de mamífero o células de insecto. Este hecho corrobora la dificultad en producir estas enzimas y sugiere que la síntesis recombinante de las hCCPs es totalmente dependiente de un contexto de expresión eucariota (chaperonas, cofactores, proteínas de unión y enzimas catalizadoras de MPTs) para su correcto plegamiento, estabilidad y funcionalidad, proporcionado únicamente por las células de eucariotas superiores. Por ello, otra opción que podría dar buenos resultados es la co-expresión de la hCCP6 en presencia de alguna otra proteína estabilizadora y/o ligando.

Debido a la imposibilidad de obtener proteína funcional en grandes cantidades, como alternativa a la estructura cristalina de la hCCP6, generamos un modelo estructural que nos permitiese estudiar la disposición de los residuos importantes para la actividad enzimática en el centro activo. El análisis del modelo confirmó que la hCCP6 contiene todos los residuos conservados en las MCPs de la familia M14 necesarios para la coordinación al ion de zinc, la unión al sustrato y la catálisis, en posiciones similares a otras CCPs. Como observaciones más relevantes, en este estudio hemos identificado la Arg384 de la hCCP6 ubicada en el bolsillo de especificidad S1<sup>o</sup>, en una posición equivalente a la I255 en la bCPA. El carácter básico de este residuo es compatible con la preferencia de sustrato acídica demostrada para los miembros de la subfamilia M14D, y podría ser el residuo determinante de la especificidad de sustrato tipo-O en las CCPs. Por otro lado, en el análisis del potencial electrostático en superficie del dominio catalítico CP de la hCCP6, identificamos un área cargada positivamente rodeando la entrada al centro activo de la enzima. En homología con otras CCPs, esta región permitiría la unión de extensiones de varios residuos C-t cargados negativamente, como es el caso de las cadenas laterales de poli-E presentes en la región C-t de la tubulina.

Por otro lado, la proteína que obtuvimos usando el sistema de células de mamífero nos sirvió para realizar un gran número de estudios funcionales. En primer lugar analizamos las MPTs en la región C-t de la tubulina de células de mamífero que sobreexpresan la hCCP6. Los resultados obtenidos en este experimento confirmaron que la hCCP6 es una enzima con actividad deglutamilasa, capaz de generar  $\Delta$ 2-tubulina en la subunidad  $\alpha$  de la tubulina detirosinada y de deglutamilar las cadenas laterales de poli-E generadas post-traduccionalmente en la región C-t de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina. Esta actividad enzimática de la hCCP6 es coherente con el bolsillo de especificidad observado en el modelo de la hCCP6.

## ***Discusión general***

A pesar de que las enzimas con actividad detirosinasa y deglicilasa de la tubulina aún no han sido identificadas, en este estudio también hemos demostrado experimentalmente que la hCCP6 no es la enzima responsable de llevar a cabo estas modificaciones en la tubulina, ya que no se observó modificación alguna en los niveles endógenos de deTyr-tubulina ni de poliglicilación presentes en la tubulina de células HEK293 T que sobreexpresan la hCCP6.

Curiosamente, en este mismo estudio observamos que la deglutamilación que lleva a cabo la hCCP6 en las células parece ser específica de la subunidad  $\alpha$  de la tubulina. Para intentar confirmar estos resultados, realizamos un ensayo *in vitro* de actividad enzimática en presencia de tubulina altamente poliglutamilada en ambas subunidades por la acción de la TTLL6\_N705. Sin embargo, los resultados del experimento no evidenciaron ningún tipo de preferencia de la hCCP6 respecto a la subunidad  $\alpha$  del heterodímero de la tubulina. Teniendo en cuenta que las TTLLs con actividad glutamilasa de la tubulina presentan una elevada especialización en términos de preferencia de sustrato ( $\alpha$  o  $\beta$  tubulina) y de reacción (iniciación o elongación de la cadena de Glu) [221], es altamente probable que las CCPs también se hayan diversificado funcionalmente durante la evolución para originar enzimas con distintas preferencias de sustrato y capaces de reconocer motivos estructurales más allá de los residuos C-t. Recientemente, se ha demostrado que las CCPs muestran preferencias por la longitud de la cadena lateral de Glu, o bien una especificidad particular por el Glu en el punto de ramificación [122]. En cambio, la preferencia de las CCPs por una de las dos subunidades del heterodímero de tubulina todavía no ha sido estudiada.

En el presente trabajo, por primera vez, hemos aportado evidencias experimentales que indican que la hCCP6 tiene actividad preferente por una subunidad concreta del heterodímero de tubulina. Este nuevo mecanismo de control permitiría regular de una forma muy precisa la longitud de las cadenas de poli-E de forma específica en cada una de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina. A pesar de estos interesantes resultados, los ensayos de deglutamilación *in vitro* empleando sustratos y enzimas purificadas para validar la actividad preferente de la hCCP6 respecto a la subunidad  $\alpha$  de la tubulina, no reprodujeron los resultados obtenidos en los experimentos a nivel celular. En esta ocasión, la hCCP6 no mostró especificidad por ninguna de las subunidades de la tubulina. Es muy posible que el contexto celular que acompaña a la hCCP6 en sus diferentes funciones celulares tenga un rol muy importante en la regulación de su especificidad enzimática. Por lo tanto, será necesario llevar a cabo nuevos estudios que nos permitan profundizar en el conocimiento acerca de los mecanismos de regulación *in vivo* de las CCPs, su rol biológico y la coordinación existente entre las CCPs y las glutamilasas para generar los distintos patrones de glutamilación en la tubulina.

## ***Discusión general***

Los resultados presentados en el presente capítulo establecen las bases para diseñar nuevos ensayos funcionales que nos permitan determinar en un futuro próximo de forma inequívoca la especificidad enzimática de la hCCP6, así como su función y relevancia a nivel biológico.

Por otro lado, mediante ensayos de actividad *in vitro* con la hCCP6 purificada y en presencia de telocinas modificadas con extensiones variables de residuos acídicos C-t, identificamos una potencial actividad deaspartilasa para la hCCP6. La deaspartilación de sustratos con residuos ácidos C-t ha sido recientemente demostrada para la hCCP1 y la mCCP3. No obstante, aunque todas las CCPs de mamífero son enzimas de glutamidasas, no es extrapolable que estas enzimas presenten también actividad deaspartilasa. Es probable que parte de la diversificación funcional de las CCPs implique capacidades distintas de estas enzimas para degradar Glu o Asp C-t. En el caso de la hCCP6, estamos pendientes de confirmar la actividad deaspartilasa detectada en este trabajo mediante estudios de interactómica que nos permitan identificar nuevos sustratos endógenos para la hCCP6. La posibilidad de eliminar extensiones de Glu y Asp C-t por la hCCP6 expandiría significativamente el número de potenciales sustratos para esta enzima y abriría nuevas líneas de investigación para el estudio de otras funciones de la hCCP6, distintas a la función que tiene esta proteasa sobre la tubulina.

Finalmente, realizamos experimentos de inhibición con la hCCP6 purificada. Los resultados demostraron que la enzima es inhibida por compuestos químicos como el clásico EDTA, o bien por inhibidores proteicos como el PCI y el NvCI. Además en este estudio hemos identificado el ácido fólico como un eficaz inhibidor de la actividad de la hCCP6 *in vitro*. Teniendo en cuenta la gran homología de este sustrato y sus compuestos derivados como los folatos poliglutamilados con la poliglutamilación que tiene lugar en la tubulina, se podría plantear un posible rol de la hCCP6 en el metabolismo y/o regulación de esta importante molécula. Hasta la fecha, no existe evidencia alguna de la vinculación funcional entre las CCPs y/o la hCCP6 y los folatos, ni de que la hCCP6 sea capaz de degradar Glu enlazados en gamma. De esta manera, este resultado abre las puertas a nuevos estudios que serán imprescindibles para desvelar estas cuestiones y el papel de estas enzimas en el metabolismo del ácido fólico.

En el capítulo II de esta tesis mostramos por primera vez la estructura cristalina de la hCPO, una nueva MCP digestiva de la familia M14 con una especificidad de sustrato acídica. Además, en este trabajo se realizó una completa caracterización bioquímica con el fin de estudiar la especificidad de sustrato de la enzima y analizar los determinantes estructurales esenciales para su inhibición.

## Discusión general

Con el objetivo de determinar la estructura 3D de la hCPO, en el presente trabajo expresamos una variante recombinante soluble de la enzima que carece de la secuencia de reconocimiento C-t modificada por GPI (denominada hCPO $\Delta$ C), perdiendo su punto de anclaje a la membrana. De esta manera, fuimos capaces de obtener grandes cantidades de la hCPO $\Delta$ C en su forma soluble y activa. Una vez optimizada su expresión en células de mamífero, conseguimos purificar totalmente la proteína recombinante desde el medio extracelular mediante un protocolo de purificación en tres pasos. Con la enzima purificada realizamos ensayos de cinética enzimática empleando el sustrato FA-EE, con lo que pudimos demostrar que la enzima purificada era catalíticamente activa.

Para estudiar la capacidad de diferentes inhibidores proteicos de inhibir la hCPO, realizamos ensayos de inhibición con cinco inhibidores exógenos conocidos de MCPs de la subfamilia M14A. Estos inhibidores fueron el PCI, LCI, TCI, ACI y el NvCI, y para todos ellos determinamos las constantes de inhibición ( $K_i$ ) frente a la hCPO $\Delta$ C. Excepto en el NvCI, en los demás casos obtuvimos constantes del orden de nM. Estos resultados confirman que estos inhibidores se comportan con la hCPO como típicos inhibidores de unión fuerte, en la línea de lo documentado para otras peptidasas digestivas de la subfamilia M14A. Sorprendentemente, la  $K_i$  obtenida para el NvCI fue excepcionalmente elevada ( $K_i$  de  $3,75 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ), en comparación con las constantes de inhibición calculadas en anteriores estudios para los complejos del NvCI con otras MCPs de la subfamilia M14A. Cabe destacar que en estos últimos casos, el NvCI se comportó como el inhibidor más potente conocido con constantes en el rango de pM para la mayoría de éstas [182].

A partir de nuestra hCPO $\Delta$ C purificada, exploramos una gran variedad de condiciones de cristalización. Aunque realizamos multitud de intentos en presencia de distintos ligandos y usando diferentes tampones de cristalización, los únicos cristales de esta proteína aparecieron en complejo con el NvCI. Estos cristales fueron analizados mediante difracción de rayos X, lo que permitió resolver la estructura tridimensional de la hCPO $\Delta$ C en complejo con el NvCI a una resolución de 1,85 Å.

El análisis de la estructura cristalina reveló la presencia inesperada de dos moléculas de hCPO $\Delta$ C en la unidad asimétrica del cristal, pero con solo una de las cadenas polipeptídicas unida al inhibidor NvCI. Al analizar en detalle la estructura de la enzima pudimos observar que la hCPO $\Delta$ C presenta el clásico plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa descrito para los miembros de la familia M14 de las MCPs, formado por una hoja- $\beta$  central de 8 cadenas- $\beta$  paralelas y antiparalelas, rodeada por 8 hélices- $\alpha$ . Gracias a la excepcional resolución del complejo, en el centro activo de la enzima pudimos identificar todos los residuos conservados en las peptidasas M14, importantes para la coordinación al ion de zinc, la catálisis y la unión al sustrato.

## ***Discusión general***

Además, observamos la presencia de la Arg275 en el fondo del bolsillo de especificidad S1", en una posición equivalente al residuo Ile255 en la bCPA que determina la especificidad de sustrato en las MCPs de la subfamilia M14A. Por tanto, podemos considerar esta Arg275 cómo el residuo responsable de la especificidad de sustrato tipo-O en esta enzima. La presencia de este aminoácido en el bolsillo catalítico genera un entorno básico que encaja bien con la capacidad de la hCPO de hidrolizar sustratos con residuos ácidos C-t. Además, en la estructura 3D de la hCPO pudimos observar varios residuos Asn modificados post-traduccionalmente mediante N-glicosilación, que corresponden a la Asn154, Asn167 y Asn231. En nuestro caso, solo pudimos asignar con certeza el primer residuo del N-glicano en el mapa de densidad (en los tres casos consiste en un residuo de NAG), ya que en general las N-glicosilaciones en las proteínas humanas suelen ser altamente flexibles y heterogéneas.

Por otro lado, la presencia de un complejo asimétrico con un monómero de hCPO no unido y otro unido al NvCI, nos permitió estudiar la reorganización que sufren los residuos del centro activo de la enzima tras la unión de la cola C-t del inhibidor. En general los inhibidores proteicos de MCPs se comportan como un sustrato, por lo que la comparación de la conformación "abierta" (-NvCI) y "cerrada" (+NvCI) de la hCPOΔC reveló que el principal movimiento promovido por la unión del NvCI en el centro activo de la enzima corresponde al movimiento de casi 180° de la cadena lateral de la Tyr268. Además de este desplazamiento, otros movimientos mucho más discretos en otros residuos del centro activo también se producen para acomodar la cola C-t del inhibidor.

Para determinar si nuestra hCPO recombinante se comporta como un dímero en solución, realizamos una cromatografía de exclusión molecular y analizamos la proteína por espectrometría de masas MALDI-TOF. Los resultados demostraron que la hCPOΔC se comporta como un monómero a pH fisiológico (pH ~7,4) y hasta concentraciones relativamente altas (~1 mg/ml). Sin embargo, estos estudios se llevaron a cabo con el mutante soluble de la proteína, y no con la proteína que contiene el punto de anclaje a la membrana. Por ello, es posible que la proteína salvaje unida a membrana en el entorno del microvilli del intestino sea capaz de formar complejos de mayor tamaño. Estudios recientes han demostrado que muchas de las proteínas que se encuentran en la membrana de los enterocitos y que participan en la digestión, están formando dímeros [243]. Este es el caso de la dipeptidasa I, que se encuentra anclada a la membrana mediante GPI en las células del intestino y otros tejidos como riñón, y donde participa activamente en la degradación terminal de dipéptidos y de algunos antibióticos [328].



## Discusión general

La obtención de la estructura 3D de la hCPO en complejo con el NvCI nos permitió estudiar también los determinantes estructurales de la inhibición de la hCPOΔC. Decidimos analizar las interacciones existentes entre los sitios de interacción primario y secundario del NvCI y la hCPOΔC, y comparar nuestros resultados con la única estructura publicada para este mismo inhibidor con la hCPA4 [226], con el objetivo de identificar los cambios estructurales que influyen en el incremento de la  $K_i$  del NvCI frente a la hCPOΔC. El análisis estructural de ambos complejos concluyó que las principales causas subyacentes en que el NvCI sea un inhibidor poco potente para la hCPO se corresponden con la pérdida de interacciones estabilizadoras en el sitio de interacción primario y al choque estérico que se da entre un residuo de NAG de la enzima y el inhibidor. De esta manera, el mecanismo de inhibición primario del NvCI se da, en gran parte, por la interacción de su cola C-t con residuos del centro activo localizados en los subsitios S1 y S2 de la enzima.

También se pudieron observar también otra serie de interacciones secundarias entre la hCPOΔC y el NvCI que tienen lugar en regiones alejadas del centro activo, pero que son igualmente importantes para la estabilidad del complejo. En general, la unión del inhibidor esta mediada por multitud de interacciones electroestáticas e hidrofóbicas. Algunas de ellas se dan entre la NAG enlazada a la Asn154 de la enzima y los residuos Asn32 y Asp33 del inhibidor. Este hecho es de especial importancia, ya que el resto de MCPs pancreáticas (hCPA1, hCPA2 y hCPAB) no están glicosiladas. Este contacto entre la NAG y el inhibidor, impide el acercamiento de este último al centro activo, lo que explicaría en parte las diferencias en las  $K_i$  observadas con la hCPO (en el rango de  $\mu\text{M}$ ) y otras MCPs digestivas (con constantes en el rango de pM-nM). Otra diferencia importante en el sitio de interacción primario del NvCI con la hCPOΔC corresponde a la Gln182 del subsitio S3 de la enzima, equivalente al Glu163 de la hCPA4, que se encuentra demasiado alejada de los residuos del inhibidor para establecer contacto. Esta interacción del Glu163 de la hCPA4 con el NvCI se ha demostrado que es fundamental para la reducción de la  $K_i$  en los distintos complejos del inhibidor con peptidasas M14A.

Además de estudiar los determinantes estructurales de la especificidad de sustrato de la hCPO y de la inhibición por el NvCI, quisimos estudiar en detalle la especificidad de sustrato de la hCPO y su posible rol en el procesamiento de moléculas bioactivas. En primer lugar, incubamos la hCPOΔC en presencia de péptidos sintéticos con un Glu o Asp C-t y analizamos los productos de digestión generados a distintos tiempos de incubación mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. El análisis de las muestras reveló que la hCPO es capaz de escindir ambos residuos, con una clara preferencia por Glu C-t. Aunque era de esperar debido a la naturaleza de su centro activo, hasta la fecha nunca se había podido demostrar la capacidad de esta enzima para escindir Asp C-t.

## ***Discusión general***

Experimentos de *docking* molecular con ambos péptidos (con Glu o Asp en el extremo C-t) en el centro activo de la hCPO demostraron que la cadena lateral del Glu se acomoda mucho mejor en el bolsillo de especificidad S1<sup>o</sup> de la hCPO que la cadena lateral del Asp, resultado que podría explicar la preferencia por Glu observada.

En segundo lugar, y cómo prueba de concepto, incubamos la hCPO con el EGF humano en presencia o ausencia de CPA y CPB, y analizamos las muestras a diferentes tiempos de incubación por espectrometría de masas MALDI-TOF. En este experimento observamos que la hCPO es capaz de cortar un residuo de Glu de la región C-t del EGF, acelerando así de forma considerable la proteólisis de la cola C-t de este factor de crecimiento. Aunque desconocemos la relevancia de este hecho, se ha visto que la eliminación de estos residuos podría tener un importante efecto sobre la actividad de esta molécula que se encuentra de forma natural en la luz intestinal. Por tanto, la combinación de la actividad de las MCPs digestivas (hCPA1, hCPA2, hCPB y hCPO) a través de la complementación de sus especificidades enzimáticas, podrían generar formas truncadas biológicamente inactivas del EGF. Si entrar a valorar su significancia biológica, con este sencillo experimento quisimos demostrar la importancia de la hCPO para una eficiente degradación C-t de péptidos y proteínas, y para la liberación específica de residuos de Glu.

La degradación específica de factores de crecimiento y neuropéptidos ha sido ampliamente documentada para otros miembros de la familia M14, cómo pueden ser la CPA4 [59], la CPM [107], la CPD [116] y la CPE [329]. Por su presencia en otros tejidos y su acceso a multitud de moléculas bioactivas como el EGF, se ha sugerido que la hCPO podría estar implicada en otras funciones reguladoras, más allá de su función principal relacionada con la degradación de péptidos procedentes de la dieta y otras fuentes endógenas en el borde en cepillo de los enterocitos. En el epitelio intestinal y el páncreas existen numerosas poblaciones de células enteroendocrinas diseminadas. Estas células secretan más de 30 pro-hormonas peptídicas que codifican para más de 100 péptidos bioactivos, entre las que se incluyen las pro-hormonas de la familia de la gastrina, de la secretina, de la somatostatina, de la colecistoquinina, de la graninas y de la familia del EGF, entre otras [330],[331],[332]. Muchos péptidos bioactivos son obtenidos también del procesamiento de los alimentos. Independientemente de su origen, los péptidos bioactivos actúan como moléculas de señalización que influyen en la fisiología gastrointestinal, regulando la secreción, la motilidad, la respuesta inmunitaria, inflamación, la regulación del apetito, el crecimiento y la diferenciación celular, la absorción, y otros muchos procesos. Algunas de estas pro-hormonas, como la pro-colecistoquinina y la cromogranina A, presentan secuencias ricas en residuos ácidos, de manera que su procesamiento proteolítico podría generar péptidos bioactivos con Glu o Asp C-t que actuarían cómo sustratos de la hCPO.

## *Discusión general*

A pesar de que las cuatro enzimas digestivas (hCPA1, hCPA2, hCPB y hCPO) presentan actividades complementarias en cuanto a especificidad de sustrato se refiere, existe una separación física en la localización de las MCPs pancreáticas (hCPA1, hCPA2 y hCPB) y de la hCPO, y por consiguiente, de la liberación de los aminoácidos libres que se generan tras su corte. Una posible explicación para esta segregación espacial es la necesidad de los enterocitos por consumir grandes cantidades de Glu, ya que estas células usan este aminoácido como fuente de energía principal para producir ATP [256]. El epitelio intestinal está en continua y rápida renovación y la absorción de nutrientes mediante transportadores específicos tiene un elevado coste energético, por lo que los enterocitos son un tipo de celular que presentan una gran demanda energética [256],[333]. Esta elevada dependencia de los enterocitos por el Glu para la producción de grandes cantidades de ATP podría ser la causa de que evolutivamente se haya optimizado la localización de la hCPO, como principal enzima productora de Glu y Asp libres utilizables por el enterocito en el tracto intestinal, de forma próxima a la principal demandante de esta fuente de combustible. De esta manera, los Glu (y en menor medida Asp) generados por la acción enzimática de la hCPO en la membrana del enterocito pueden ser rápida y eficientemente transportados mediante transportadores especializados presentes también en la membrana, evitándose la difusión por la luz intestinal de tan preciado aminoácido.

En esta tesis, hemos presentado un extenso trabajo con dos MCPs de la familia M14 con especificidad de sustrato tipo ácido. En particular, hemos investigado con especial interés los determinantes estructurales que subyacen en la preferencia de estas enzimas por la hidrólisis de enlaces peptídicos de residuos ácidos C-t. Aunque no conseguimos determinar la estructura tridimensional de la hCCP6, afortunadamente la estructura del dominio catalítico de la hCPO nos ha servido como modelo para el estudio de la especificidad enzimática ácida de este tipo de peptidasas M14. Nuestros estudios demuestran que la hCCP6 y la hCPO son capaces de degradar sustratos con Glu o Asp C-t gracias a la presencia de una Arg ubicada en el fondo del bolsillo de especificidad S1" del centro activo. Este residuo corresponde al residuo clave para determinar la especificidad de sustrato en las MCPs de la subfamilia M14A y M14D, y dependiendo de las propiedades bioquímicas de este aminoácido, las MCPs definen sus distintas especificidades de sustrato. Sorprendentemente, en ambas MCPs la preferencia por la hidrólisis de Glu C-t en sus sustratos es mucho mayor que por Asp. Este hecho podría explicarse por su especialización funcional en la degradación de sustratos poliglutamilados como la tubulina en el caso de la hCCP6, y a la dependencia de los enterocitos intestinales por el Glu hidrolizado por la CPO. A pesar de nuestros descubrimientos, estudios futuros serán necesarios para elucidar las implicaciones biológicas de estas dos enzimas.

## ***CONCLUSIONES***

---



## CONCLUSIONES

### Capítulo I

- De los tres sistemas evaluados, el mejor sistema de expresión para la obtención de hCCP6 recombinante corresponde a las células de mamífero HEK293 F. La utilización de este sistema nos ha permitido producir cantidades suficientes de hCCP6 activa para poder llevar a cabo estudios bioquímicos y de caracterización funcional.
- A pesar de los esfuerzos realizados, no ha sido posible llevar a cabo estudios de cristalización y difracción de rayos X para determinar la estructura 3D de la hCCP6, debido a la limitación en la producción de cantidad suficiente de la proteína en su forma soluble y activa, y en la dificultad de purificar la enzima hasta homogeneidad.
- El modelo de la estructura de la hCCP6 nos ha permitido estudiar la estructura general de la proteasa, así como los residuos del centro activo relacionados con la actividad proteolítica. Analizando el modelo, hemos podido observar que la mayor parte de estos residuos, como son los residuos de coordinación al ion de zinc, catalíticos y de unión al carboxilo del residuo C-t del sustrato, están conservados en la hCCP6 en posiciones equivalentes a otros miembros de la familia M14.
- El análisis del modelo de la hCCP6 también ha permitido identificar el residuo determinante de la especificidad de sustrato tipo ácido en la hCCP6. Este residuo en particular se corresponde con la Arg384, ubicada en el bolsillo de especificidad S1" de la enzima. El carácter básico de este residuo permite la interacción y correcto posicionamiento de residuos ácidos específicos C-t del sustrato.
- Por otro lado, la preferencia de la hCCP6 por sustratos poliglutamilados como la tubulina es consistente con la presencia en la enzima de un área con carga positiva rodeando la entrada al centro activo, que permite acomodar largas extensiones de residuos ácidos C-t con carga negativa.
- La hCCP6 es una MCP con actividad deglutamilasa que es capaz de modificar los MTs de las células generando  $\Delta 2$ -tubulina en su subunidad  $\alpha$  y eliminando las cadenas largas de poli-E presentes en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina.
- La hCCP6 no es capaz de eliminar la Tyr C-t de la  $\alpha$ -tubulina tirosinada presente en los MTs celulares, ni las cadenas largas de poli-G generadas post-traduccionamente en la región C-t de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina.

## Conclusiones

- La hCCP6 podría deglutamilar de forma específica las cadenas largas de poli-E generados post-traduccionalmente en la región C-t de la subunidad  $\alpha$  de la tubulina en células en cultivo. A pesar de la importancia de este descubrimiento, desconocemos el posible significado biológico de esta probable especialización y su impacto en la funcionalidad de los MTs.
- La obtención *in vitro* de tubulina altamente poliglutamilada en sus subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  como sustrato para la hCCP6 se llevó a cabo sobreexpresando una forma truncada de la enzima TTLL6 (TTLL6\_N705) en cultivos de células de mamífero HEK293 F. Esta tubulina modificada fue purificada para ser usada como sustrato.
- La hCCP6 deglutamila las cadenas largas laterales de poli-E presentes en la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina modificada por la TTLL6\_N705. Sin embargo, la enzima no mostró ninguna preferencia por una de las dos subunidades de la tubulina, como se había observado en los experimentos celulares de sobreexpresión de la hCCP6.
- Utilizando una batería de teluquinas con diferentes residuos C-t hemos podido demostrar que la hCCP6 presenta una clara preferencia por la hidrólisis de Glu C-t sobre Asp.

Mediante estudios de inhibición hemos visto que el ácido fólico se comporta como un inhibidor de la hCCP6. Además de este compuesto, hemos visto que otros inhibidores clásicos como el PCI, el NvCl o el EDTA son capaces de inhibir a la enzima.

## Capítulo II

- La producción recombinante de grandes cantidades de la hCPO, y en su forma soluble y activa, ha sido posible expresando en células de mamífero HEK293 F una variante de la hCPO (hCPO $\Delta$ C) sin su región C-t y, por tanto, sin el anclaje GPI que media la unión con la membrana,
- La hCPO $\Delta$ C fue purificada mediante un protocolo de tres pasos de purificación. Experimentos de gel filtración y MALDI-TOF demostraron que nuestra proteína recombinante altamente glicosilada se comporta como un monómero en solución, hasta concentraciones de hasta ~1 mg/ml.

## Conclusiones

- La actividad proteolítica de la hCPOΔC es inhibida por varios inhibidores exógenos proteicos de MCPs de la subfamilia M14A, que corresponden a: PCI, LCI, TCI, ACI y NvCI. Los cuatro primeros se comportan como inhibidores de unión fuerte para la hCPOΔC, con  $K_i$  del orden de nM. Sorprendentemente, el NvCI mostró una inhibición mucho peor, con una  $K_i$  en el rango de  $\mu$ M.
- La estructura 3D de la hCPOΔC en complejo con el inhibidor NvCI fue resuelta mediante cristalografía de rayos X con una resolución de 1,85 Å.
- El dominio catalítico carboxipeptidasa de la hCPOΔC presenta el plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa clásico de las MCPs de la familia M14, y el centro activo contiene todos los residuos importantes para la actividad enzimática conservados en las peptidasas de la familia M14.
- La Arg275 de la hCPOΔC que determina la preferencia de sustrato tipo ácido de esta enzima fue localizada en el fondo del bolsillo de especificidad S1".
- El estudio del complejo hCPO-NvCI permitió estudiar el mecanismo de inhibición a nivel molecular. En el complejo se pudo observar una interacción primaria entre la cola C-t del NvCI con residuos claves para la actividad enzimática presentes en el centro activo de la hCPOΔC. Esta interacción mimetiza la unión de un sustrato. Además, se observaron otra serie de contactos secundarios entre la enzima y el inhibidor que tienen lugar en la interficie entre ambas moléculas y que contribuyen a estabilización del complejo.
- La hCPOΔC hidroliza oligopéptidos con residuos Glu o Asp C-t, pero tiene una mayor preferencia por la hidrólisis de Glu C-t.
- La hCPOΔC es capaz de degradar el extremo C-t péptidos bioactivos como el EGF, en combinación con las proteasas digestivas CPA1 y CPB. Este hecho sugiere un potencial rol de la hCPO en la regulación de otras moléculas de señalización presentes en la luz intestinal *in vivo*, y demuestra la importancia de esta enzima para una eficiente proteólisis de sustratos peptídicos.



## **Conclusiones**

## ***BIBLIOGRAFÍA***

---



### BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, D. P. Mehta, and H. H. Freeze, "Handbook of Proteolytic Enzymes," *Handb. Proteolytic Enzym.*, vol. 1, pp. 1938–1941, 1998.
- [2] N. D. Rawlings, M. Waller, A. J. Barrett, and A. Bateman, "MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. Database issue, pp. D503-9, 2014.
- [3] J. G. Pérez-Silva, Y. Español, G. Velasco, and V. Quesada, "The Degradome database: Expanding roles of mammalian proteases in life and disease," *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. D1, pp. D351–D355, 2016.
- [4] X. S. Puente, L. M. Sánchez, A. Gutiérrez-Fernández, G. Velasco, and C. López-Otín, "A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems.," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 33, no. November 2004, pp. 331–334, 2005.
- [5] C. López-Otín and C. M. Overall, "Protease degradomics: a new challenge for proteomics.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 7, pp. 509–519, 2002.
- [6] E. W. Davie and H. Neurath, "Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen.," *J. Biol. Chem.*, vol. 212, no. 2, pp. 515–29, 1955.
- [7] E. W. Davie and O. D. Ratnoff, "Waterfall sequence for intrinsic blood clotting.," *Science*, vol. 145, no. 3638, pp. 1310–2, 1964.
- [8] R. G. MacFarlane, "An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier," *Nature*, vol. 202, pp. 498–9, 1964.
- [9] G. R. Ordóñez, X. S. Puente, V. Quesada, and C. López-Otín, "Proteolytic Systems: Constructing Degradomes," in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 539, pp. 33–47, 2009.
- [10] X. S. Puente, L. M. Sanchez, C. M. Overall, and C. López-Otín, "Human and mouse proteases: a comparative genomic approach," *Nat Rev Genet*, vol. 4, no. 7, pp. 544–558, 2003.
- [11] D. Whitford, *Proteins: structure and function*. J. Wiley & Sons, 2005.
- [12] C. López-Otín and J. S. Bond, "Proteases: multifunctional enzymes in life and disease," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 45, pp. 30433–30437, 2008.
- [13] N. M. Hooper, *Proteases in biology and medicine*. Portland Press, 2002.
- [14] V. Quesada, G. R. Ordóñez, L. M. Sánchez, X. S. Puente, and C. López-Otín, "The degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. database issue, pp. D239-43, 2009.
- [15] J. A. Mótyán, F. Tóth, and J. Tózsér, "Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology.," *Biomolecules*, vol. 3, no. 4, pp. 923–42, 2013.

## Bibliografía

- [16] "Enzyme nomenclature. Report on the recommendations (1964) of the International Union of Biochemistry on Nomenclature and Classification of Enzymes.," *Science*, vol. 150, no. 3697, pp. 719–21, 1965.
- [17] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer "*Biochemistry*, 5<sup>th</sup> edition", W. H. Freeman, New York. 2002.
- [18] B. Turk, "Targeting proteases: successes, failures and future prospects.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 5, no. 9, pp. 785–799, 2006.
- [19] N. D. Rawlings, "Protease families, evolution and mechanism of action," in *Proteases: Structure and Function*, Vienna: Springer Vienna, pp. 1–36, 2013.
- [20] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, and A. Bateman, "Asparagine peptide lyases: A seventh catalytic type of proteolytic enzymes," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 44, pp. 38321–38328, 2011.
- [21] N. Tajima, F. Kawai, S.-Y. Park, and J. R. H. Tame, "A novel intein-like autoproteolytic mechanism in autotransporter proteins," *J. Mol. Biol.*, vol. 402, no. 4, pp. 645–656, 2010.
- [22] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, and R. Finn, "Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors," *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. D1, pp. D343–D350, 2016.
- [23] I. Schechter and A. Berger, "On the size of the active site in proteases. I. Papain.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 27, no. 2, pp. 157–62, 1967.
- [24] O. Schilling, P. F. Huesgen, O. Barré, U. auf dem Keller, and C. M. Overall, "Characterization of the prime and non-prime active site specificities of proteases by proteome-derived peptide libraries and tandem mass spectrometry," *Nat. Protoc.*, vol. 6, no. 1, pp. 111–120, 2011.
- [25] L. M. Smith, N. L. Kelleher, and T. C. for T. D. Consortium for Top Down Proteomics, "Proteiform: a single term describing protein complexity.," *Nat. Methods*, vol. 10, no. 3, pp. 186–7, 2013.
- [26] S. Tanco, K. Gevaert, and P. Van Damme, "C-terminomics: Targeted analysis of natural and posttranslationally modified protein and peptide C-termini," *Proteomics*, vol. 15, no. 5–6, pp. 903–914, 2015.
- [27] S. Tanco, O. tort, H. Demol, F.X. Avilés, K. Gevaert, P. Van damme and J. Lorenzo, "C-terminomics Screen for Natural Substrates of Cytosolic Carboxypeptidase 1 Reveals Processing of Acidic Protein C termini.," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 14, no. 1, pp. 177–90, 2015.
- [28] N. D. Rawlings, D. P. Tolle, and A. J. Barrett, "Evolutionary families of peptidase inhibitors.," *Biochem. J.*, vol. 378, no. Pt 3, pp. 705–16, 2004.
- [29] A. Petrera, Z. W. Lai, and O. Schilling, "Carboxyterminal protein processing in health and disease: key actors and emerging technologies," *J. Proteome Res.*, vol. 13, no. 11, pp. 4497–4504, 2014.

## Bibliografía

- [30] J. L. Arolas, J. Vendrell, F. X. Aviles, and L. D. Fricker, "Metallocoarboxypeptidases: emerging drug targets in biomedicine.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 13, no. 4, pp. 349–366, 2007.
- [31] J. Vendrell and F. X. Avilés, "Carboxypeptidases," in *Proteases New Perspectives*, Basel: Birkhäuser Basel, pp. 13–34, 1999.
- [32] M. Rodríguez de la Vega, R.G. Sevilla, A. Hermoso, J. Lorenzo, S. Tanco, A. Diez, L.D. Fricker, J.M. Bautista, F.X. Avilés "Nna1-like proteins are active metallocoarboxypeptidases of a new and diverse M14 subfamily.," *FASEB J.*, vol. 21, no. 3, pp. 851–65, 2007.
- [33] M. Alonso-del-Rivero, S.A. Trejo, M. Rodríguez de la Vega, Y. González, S. Bronsoms, F. Canals, J. Delfín, J. Diaz, F.X. Avilés and M.A. Chávez, "A novel metallocoarboxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*-a step into the invertebrate world of proteases.," *FEBS J.*, vol. 276, no. 17, pp. 4875–90, 2009.
- [34] V. K. Akparov, V. I. Timofeev, I. G. Khaliullin, V. Švedas, G. G. Chestukhina, and I. P. Kuranova, "Structural insights into the broad substrate specificity of carboxypeptidase T from *Thermoactinomyces vulgaris*," *FEBS J.*, vol. 282, no. 7, pp. 1214–24, 2015.
- [35] D. P. Bown, H. S. Wilkinson, and J. A. Gatehouse, "Midgut carboxypeptidase from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: enzyme characterisation, cDNA cloning and expression.," *Insect Biochem. Mol. Biol.*, vol. 28, no. 10, pp. 739–49, 1998.
- [36] E. Estébanez-Perpiñá, J. Vendrell, M.A. Jongsma, D. P. Bown, J.A. Gatehouse, R. Huber, W. Bode, F.X. Avilés and D. Reverter, "Crystal structure of a novel mid-gut procarboxypeptidase from the cotton pest *Helicoverpa armigera*," *J. Mol. Biol.*, vol. 313, no. 3, pp. 629–38, 2001.
- [37] A. Bayés, A. Sonnenschein, X. Daura, J. Vendrell, and F. X. Aviles, "Procarboxypeptidase A from the insect pest *Helicoverpa armigera* and its derived enzyme," *Eur. J. Biochem.*, vol. 270, no. 14, pp. 3026–3035, 2003.
- [38] D. P. Bown and J.A. Gatehouse, "Characterization of a digestive carboxypeptidase from the insect pest corn earworm (*Helicoverpa armigera*) with novel specificity towards C-terminal glutamate residues.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 271, no. 10, pp. 2000–11, 2004.
- [39] A. Bayés *et al.*, "Structural basis of the resistance of an insect carboxypeptidase to plant protease inhibitors.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 46, pp. 16602–7, 2005.
- [40] H. Neurath, "Evolution of proteolytic enzymes.," *Science*, vol. 224, no. 4647, pp. 350–7, 1984.
- [41] I. García-Sáez, D. Reverter, J. Vendrell, F. X. Avilés, and M. Coll, "The three-dimensional structure of human procarboxypeptidase A2. Deciphering the basis of the inhibition, activation and intrinsic activity of the zymogen," *EMBO J.*, vol. 16, no. 23, pp. 6906–6913, 1997.
- [42] J. G. Pardo, "Structural and functional characterization of regulatory metallocoarboxypeptidases: Studies on human carboxypeptidases D and Z, and the transthyretin-like domain," 2015.
- [43] S. Ventura, F. X. Gomis-Rüth, A. Puigserver, F. X. Avilés, and J. Vendrell, "Pancreatic procarboxypeptidases: oligomeric structures and activation processes revisited.," *Biol. Chem.*, vol. 378, no. 3–4, pp. 161–5, 1997.

## Bibliografía

- [44] G. A. Scheele, "Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins.," *J. Biol. Chem.*, vol. 250, no. 14, pp. 5375–85, 1975.
- [45] F. X. Aviles, J. Vendrell, A. Guasch, M. Coll, and R. Huber, "Advances in metallo-procarboxypeptidases," vol. 389, pp. 381–389, 1993.
- [46] W. Kemmler, J. D. Peterson, and D. F. Steiner, "Studies on the conversion of proinsulin to insulin. I. Conversion *in vitro* with trypsin and carboxypeptidase B.," *J. Biol. Chem.*, vol. 246, no. 22, pp. 6786–91, 1971.
- [47] V. Villegas, J. Vendrell, and X. Avilés, "The activation pathway of procarboxypeptidase B from porcine pancreas: participation of the active enzyme in the proteolytic processing.," *Protein Sci.*, vol. 4, no. 9, pp. 1792–800, 1995.
- [48] F.X. Gomis-Rüth, M. Gómez-Ortiz, J. Vendrell, S. Ventura, W. Bode, R. Huber and F.X. Avilés, "Crystal structure of an oligomer of proteolytic zymogens: detailed conformational analysis of the bovine ternary complex and implications for their activation," *J. Mol. Biol.*, vol. 269, no. 5, pp. 861–880, 1997.
- [49] R. Pezzilli, A. M. Morselli-Labate, A. R. Barbieri, and L. Platè, "Clinical usefulness of the serum carboxypeptidase B activation peptide in acute pancreatitis.," *Journal of the Pancreas*, vol. 1, no. 3, pp. 58–68, 2000.
- [50] S. Matsugi, T. Hamada, N. Shioi, T. Tanaka, T. Kumada, and S. Satomura, "Serum carboxypeptidase A activity as a biomarker for early-stage pancreatic carcinoma," *Clin. Chim. Acta*, vol. 378, no. 1–2, pp. 147–153, 2007.
- [51] P. Shamamian, J. D. Goldberg, X. Y. Ye, J. D. Stewart, P. J. White, and C. Gilvarg, "Evaluation of pro-carboxypeptidase A and carboxypeptidase A as serologic markers for adenocarcinoma of the pancreas.," *HPB (Oxford)*, vol. 8, no. 6, pp. 451–7, 2006.
- [52] M. T. Everitt and H. Neurath, "Rat peritoneal mast cell carboxypeptidase: localization, purification, and enzymatic properties.," *FEBS Lett.*, vol. 110, no. 2, pp. 292–6, 1980.
- [53] S. M. Goldstein, C. E. Kaempfer, D. Proud, L. B. Schwartz, A. M. Irani, and B. U. Wintroub, "Detection and partial characterization of a human mast cell carboxypeptidase.," *J. Immunol.*, vol. 139, no. 8, pp. 2724–9, 1987.
- [54] W. E. Serafin, E. T. Dayton, P. M. Gravalles, K. F. Austen, and R. L. Stevens, "Carboxypeptidase A in mouse mast cells. Identification, characterization, and use as a differentiation marker.," *J. Immunol.*, vol. 139, no. 11, 1987.
- [55] F. Henningsson, K. Yamamoto, P. Saftig, T. Reinheckel, C. Peters, S. D. Knight and G. Pejler, "A role for cathepsin E in the processing of mast-cell carboxypeptidase A.," *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. Pt 9, pp. 2035–42, 2005.
- [56] E. B. Springman, M. M. Dikov, and W. E. Serafin, "Mast cell procarboxypeptidase A. Molecular modeling and biochemical characterization of its processing within secretory granules.," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 3, pp. 1300–7, 1995.

## Bibliografía

- [57] G. Pejler, M. Abrink, M. Ringvall, and S. Wernersson, "Mast cell proteases.," *Adv. Immunol.*, vol. 95, no. 7, pp. 167–255, 2007.
- [58] T. B. Feyerabend, H. Hausser, A. Tietz, C. Blum, L. Hellman, A.H. Straus, H.K. Takahashi, E.S. Morgan, A.M. Dvorak, H.J. Fehling and H.R. Rodewald, "Loss of histochemical identity in mast cells lacking carboxypeptidase A.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 14, pp. 6199–210, 2005.
- [59] S. Tanco, X. Zhang , C. Morano , F.X. Avilés, J. Lorenzo and L.D. Fricker, "Characterization of the substrate specificity of human carboxypeptidase A4 and implications for a role in extracellular peptide processing," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 24, pp. 18385–18396, 2010.
- [60] R. García-Castellanos, R. Bonet-Figueroa, I. Pallarés, S. Ventura, F. X. Avilés, J. Vendrell and F. X. Gomis-Rüth, "Detailed molecular comparison between the inhibition mode of A/B-type carboxypeptidases in the zymogen state and by the endogenous inhibitor latexin," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 62, no. 17, pp. 1996–2014, 2005.
- [61] T. Kayashima, K. Yamasaki, T. Yamada, H. Sakai, N. Miwa, T. Ohta, K. Yoshiura, N. Matsumoto, Y. Nakane, H. Kanetake, F. Ishino, N. Niikawa and T. Kishino, "The novel imprinted carboxypeptidase A4 gene ( CPA4) in the 7q32 imprinting domain.," *Hum. Genet.*, vol. 112, no. 3, pp. 220–6, 2003.
- [62] P. L. Ross, I. Cheng, X. Liu, M. S. Cicek, P. R. Carroll, G. Casey and J. S. Witte "Carboxypeptidase 4 gene variants and early-onset intermediate-to-high risk prostate cancer.," *BMC Cancer*, vol. 9, no. 1, p. 69, 2009.
- [63] L. Sun, C. Guo, J. Burnett, J. Pan, Z. Yang, Y. Ran and D. Sun, "Association between expression of Carboxypeptidase 4 and stem cell markers and their clinical significance in liver cancer development.," *J. Cancer*, vol. 8, no. 1, pp. 111–116, 2017.
- [64] L. Sun, J. Burnett, C. Guo, Y. Xie, J. Pan, Z. Yang, Y. Ran and D. Sun, "CPA4 is a promising diagnostic serum biomarker for pancreatic cancer.," *Am. J. Cancer Res.*, vol. 6, no. 1, pp. 91–6, 2016.
- [65] L. O. Mosnier, P. Buijtenhuijs, P. F. Marx, J. C. M. Meijers, and B. N. Bouma, "Identification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in human platelets.," *Blood*, vol. 101, no. 12, pp. 4844–4846, 2003.
- [66] B. N. Bouma and L. O. Mosnier, "Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)-how does thrombin regulate fibrinolysis?," *Ann Med*, vol. 38, no. 6, pp. 378–388, 2006.
- [67] Z. Valnickova *et al.*, "Biochemical characterization of bovine plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI).," *BMC Biochem.*, vol. 10, p. 13, 2009.
- [68] M. R. De La Vega Otazo *et al.*, "Functional segregation and emerging role of cilia-related cytosolic carboxypeptidases (CCPs).," *FASEB J.*, vol. 27, no. 2, pp. 424–31, 2013.
- [69] M. B. Boffa, R. Bell, W. K. Stevens, and M. E. Nesheim, "Roles of thermal instability and proteolytic cleavage in regulation of activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor.," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 17, pp. 12868–78, 2000.



## Bibliografia

- [70] P. F. Marx *et al.*, "Crystal structures of TAFI elucidate the inactivation mechanism of activated TAFI: a novel mechanism for enzyme autoregulation," *Blood*, vol. 112, no. 7, pp. 2803–2809, 2008.
- [71] B. N. Bouma and L. O. Mosnier, "Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) at the interface between coagulation and fibrinolysis," in *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, vol. 33, no. 5–6, pp. 375–381, 2003.
- [72] J. Stasko, J. Hudecek, and P. Kubisz, "Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and its importance in the regulation of fibrinolysis.," *Vnitr. Lek.*, vol. 50, no. 1, pp. 36–44, 2004.
- [73] P. J. Declerck, A. Gils, and B. De Taeye, "Use of Mouse Models to Study Plasminogen Activator Inhibitor-1," in *Methods in enzymology*, vol. 499, pp. 77–104, 2011.
- [74] M. S. Fawzy and E. A. Toraih, "Data supporting the structural and functional characterization of Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor in breast cancer.," *Data Br.*, vol. 5, pp. 981–9, 2015.
- [75] K. Kolev and C. Longstaff, "Bleeding related to disturbed fibrinolysis.," *Br. J. Haematol.*, vol. 175, no. 1, pp. 12–23, 2016.
- [76] E. Fidan *et al.*, "Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and thrombin-antithrombin-III-complex levels in patients with gastric cancer," *Tumor Biol.*, vol. 33, no. 5, pp. 1519–1525, 2012.
- [77] M. S. Fawzy, E. A. Mohammed, A. S. Ahmed, and A. Fakhr-Eldeen, "Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor Thr325Ile polymorphism and plasma level in breast cancer: a pilot study.," *Meta gene*, vol. 4, pp. 73–84, 2015.
- [78] O. Kaftan, B. Kasapoglu, M. Koroglu, A. Kosar, and S. K. Yalcin, "Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor in Breast Cancer Patients," *Med. Princ. Pract.*, vol. 20, no. 4, pp. 332–335, 2011.
- [79] O. Hataji, O. Taguchi, E. C. Gabazza, H. Yuda, C.N. d'Alessandro-Gabazza, H. Fujimoto, Y. Nishii, T. Hayashi, K. Suzuki and Y. Adachi, "Increased circulating levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in lung cancer patients," *Am. J. Hematol.*, vol. 76, no. 3, pp. 214–219, 2004.
- [80] O. S. Balcik, M. Albayrak, M.E. Uyar, S. Dagdas, O. Yokus, F. Ceran, H. Cipil, A. Kosar, G. Ozet, "Serum thrombin activatable fibrinolysis inhibitor levels in patients with newly diagnosed multiple myeloma.," *Blood Coagul. Fibrinolysis*, vol. 22, no. 4, pp. 260–3, 2011.
- [81] Z. A. Bazzi, D. L. Mouhanned El-Youssef, R. Romagnuolo, J. Tubman, D. Cavallo-Medved, L. A. Porter and M. B. Boffa, "Activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFIa) attenuates breast cancer cell metastatic behaviors through inhibition of plasminogen activation and extracellular proteolysis," *BMC Cancer*, vol. 16, no. 1, p. 328, 2016.
- [82] C. M. Lopus, J. J. Song, Q. Wang, C. A. Wagner, T. M. Lindstrom, C.R. Chu, J. Sokolove, L.L. Leung and W. H. Robinson, "Brief report: carboxypeptidase B serves as a protective mediator in osteoarthritis.," *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*, vol. 66, no. 1, pp. 101–6, 2014.

## Bibliografia

- [83] S. Wei, S. Segura, J. Vendrell, F. X. Avilés, E. Lanoue, R. Day, Y. Feng and L. D. Fricker, "Identification and characterization of three members of the human metallocarboxypeptidase gene family," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 17, pp. 14954–14964, 2002.
- [84] P. J. Lyons and L. D. Fricker, "Substrate specificity of human carboxypeptidase A6," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 49, pp. 38234–38242, 2010.
- [85] P. J. Lyons, M. B. Callaway, and L. D. Fricker, "Characterization of carboxypeptidase A6, an extracellular matrix peptidase.," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 11, pp. 7054–63, 2008.
- [86] A. Pizzuti, G. Calabrese G, M. Bozzali, L. Telvei, E. Morizio, V. Guida, V. Gatta, L. Stuppia, A. Ion, G. Palka and B. Dallapiccola, "A peptidase gene in chromosome 8q is disrupted by a balanced translocation in a duane syndrome patient.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 43, no. 12, pp. 3609–12, 2002.
- [87] A. Salzmänn, M. Guipponi, P.J. Lyons, L.D. Fricker, M. Sapio, C. Lambercy, C. Buresi, O. Amar, B. Bencheikh, F. Lahjouji, R. Ouazzani, A. Crespel, D. Chaigne and A. Malafosse, "Carboxypeptidase A6 gene (CPA6) mutations in a recessive familial form of febrile seizures and temporal lobe epilepsy and in sporadic temporal lobe epilepsy," *Hum. Mutat.*, vol. 33, no. 1, pp. 124–135, 2012.
- [88] N. Belhedi, N. Perroud, F. Karege, M. Vessaz, a. Malafosse, and a. Salzmänn, "Increased CPA6 promoter methylation in focal epilepsy and in febrile seizures," *Epilepsy Res.*, vol. 108, no. 1, pp. 144–148, 2014.
- [89] F. Fialka, R. M. Gruber, R. Hitt, L. Opitz, E. Brunner, H. Schliephake and F-J. Kramer, "CPA6, FMO2, LGI1, SIAT1 and TNC are differentially expressed in early- and late-stage oral squamous cell carcinoma - a pilot study," *Oral Oncol.*, vol. 44, no. 10, pp. 941–948, 2008.
- [90] P. J. Lyons and L. D. Fricker, "Carboxypeptidase O is a glycosylphosphatidylinositol-anchored intestinal peptidase with acidic amino acid specificity," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 45, pp. 39023–39032, 2011.
- [91] E. Sezgin, I. Levental, S. Mayor, and C. Eggeling, "The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2017.
- [92] O. Hazel, L. C. Burke, G. B. Barfi, and P. J. Lyons, "Decreased Aggregation of Carboxypeptidase O upon Incorporation into Lipid Rafts", vol. 30, no. 1 Supplement. Federation of American Societies for Experimental Biology, 2016.
- [93] M. Uhlen *et al.*, "Tissue-based map of the human proteome," *Science*, vol. 347, no. 6220, pp. 1260419–1260419, 2015.
- [94] S. Cermelli, Y. Guo, S. P. Gross, and M. A. Welte, "The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot," *Curr. Biol.*, vol. 16, no. 18, pp. 1783–1795, 2006.
- [95] R. A. Skidgel, "Basic carboxypeptidases: regulators of peptide hormone activity," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 9, no. 8, pp. 299–304, 1988.

## Bibliografía

- [96] J. Garcia-Pardo, R. Graña-Montes, M. Fernandez-Mendez, A. Ruyra, N. Roher, F. X. Avilés, J. Lorenzo and S. Ventura, "Amyloid formation by human carboxypeptidase D transthyretin-like domain under physiological conditions," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 49, pp. 33783–33796, 2014.
- [97] M. K. Schäfer, R. Day, W. E. Cullinan, M. Chrétien, N. G. Seidah, and S. J. Watson, "Gene expression of prohormone and proprotein convertases in the rat CNS: a comparative in situ hybridization analysis.," *J. Neurosci.*, vol. 13, no. 3, pp. 1258–79, 1993.
- [98] M. Zheng, R. D. Streck, R. E. Scott, N. G. Seidah, and J. E. Pintar, "The developmental expression in rat of proteases furin, PC1, PC2, and carboxypeptidase E: implications for early maturation of proteolytic processing capacity.," *J. Neurosci.*, vol. 14, no. 8, pp. 4656–73, 1994.
- [99] A. Zhou, G. Webb, X. Zhu, and D. F. Steiner, "Proteolytic processing in the secretory pathway.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 30, pp. 20745–8, 1999.
- [100] S. E. Reznik and L. D. Fricker, "Carboxypeptidases from A to Z: implications in embryonic development and Wnt binding.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 58, no. 12–13, pp. 1790–1804, 2001.
- [101] L. D. Fricker, B. Das, and R. H. Angeletti, "Identification of the pH-dependent membrane anchor of carboxypeptidase E (EC 3.4.17.10).," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 5, pp. 2476–82, 1990.
- [102] Y. Levin, R. A. Skidgel, and E. G. Erdős, "Isolation and characterization of the subunits of human plasma carboxypeptidase N (kininase I).," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 79, no. 15, pp. 4618–22, 1982.
- [103] R. A. Skidgel, "Human carboxypeptidase N: lysine carboxypeptidase.," *Methods Enzymol.*, vol. 248, pp. 653–63, 1995.
- [104] M. O. Quagraine, F. Tan, H. Tamei, E. G. Erdős, and R. A. Skidgel, "Plasmin alters the activity and quaternary structure of human plasma carboxypeptidase N.," *Biochem. J.*, vol. 388, no. pt 1, pp. 81–91, 2005.
- [105] R. A. Skidgel and E. G. Erdős, "Structure and function of human plasma carboxypeptidase N, the anaphylatoxin inactivator.," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 7, no. 14, pp. 1888–99, 2007.
- [106] V. A. Bokisch and H. J. Müller-Eberhard, "Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation and characterization as a carboxypeptidase," *J. Clin. Invest.*, vol. 49, no. 12, pp. 2427–2436, 1970.
- [107] R. A. Skidgel, R. M. Davis, and F. Tan, "Human carboxypeptidase M. Purification and characterization of a membrane-bound carboxypeptidase that cleaves peptide hormones.," *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 4, pp. 2236–41, 1989.
- [108] D. Reverter, K. Maskos, F. Tan, R. A. Skidgel, and W. Bode, "Crystal structure of human carboxypeptidase M, a membrane-bound enzyme that regulates peptide hormone activity," *J. Mol. Biol.*, vol. 338, no. 2, pp. 257–269, 2004.
- [109] R. A. Skidgel and E. G. Erdős, "Cellular carboxypeptidases.," *Immunol. Rev.*, vol. 161, pp. 129–41, 1998.

## Bibliografía

- [110] K. Deiteren, D. Hendriks, S. Scharpé, and A. M. Lambeir, "Carboxypeptidase M: multiple alliances and unknown partners.," *Clin. Chim. Acta.*, vol. 399, no. 1–2, pp. 24–39, 2009.
- [111] L. Song and L. D. Fricker, "Cloning and expression of human carboxypeptidase Z, a novel metalloproteinase.," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 16, pp. 10543–50, 1997.
- [112] X. Xin, R. Day, W. Dong, Y. Lei, and L. D. Fricker, "Cloning, sequence analysis, and distribution of rat metalloproteinase Z.," *DNA Cell Biol.*, vol. 17, no. 4, pp. 311–9, 1998.
- [113] L. Song and L. D. Fricker, "Cloning and expression of human carboxypeptidase Z, a novel metalloproteinase.," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 16, pp. 10543–50, 1997.
- [114] C. Moeller, E. C. Swindell, A. Kispert, and G. Eichele, "Carboxypeptidase Z (CPZ) modulates Wnt signaling and regulates the development of skeletal elements in the chicken.," *Development*, vol. 130, no. 21, pp. 5103–11, 2003.
- [115] E. Kalinina, O. Varlamov, and L. D. Fricker, "Analysis of the carboxypeptidase D cytoplasmic domain: Implications in intracellular trafficking," *J. Cell. Biochem.*, vol. 85, no. 1, pp. 101–111, 2002.
- [116] L. Song and L. D. Fricker, "Tissue distribution and characterization of soluble and membrane-bound forms of metalloproteinase D.," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 46, pp. 28884–9, 1996.
- [117] O. Varlamov, F. Wu, D. Shields, and L. D. Fricker, "Biosynthesis and packaging of carboxypeptidase D into nascent secretory vesicles in pituitary cell lines.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 20, pp. 14040–5, 1999.
- [118] Y. H. Kim, H. M. O'Neill, and J. P. Whitehead, "Carboxypeptidase X-1 (CPX-1) is a secreted collagen-binding glycoprotein," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 468, no. 4, pp. 894–899, 2015.
- [119] Y. Lei, X. Xin, D. Morgan, J. E. Pintar, and L. D. Fricker, "Identification of mouse CPX-1, a novel member of the metalloproteinase gene family with highest similarity to CPX-2.," *DNA Cell Biol.*, vol. 18, no. 2, pp. 175–85, 1999.
- [120] M. Guinand, M. J. Vacheron, G. Michel, and D. J. Tipper, "Location of Peptidoglycan Lytic Enzymes in *Bacillus sphaericus*," *J. Bacteriol.*, vol. 138, no. 1, pp. 126–132, 1979.
- [121] E. Kalinina, R. Biswas, I. Bereznik, A. Hermoso, F. X. Aviles, and L. D. Fricker, "A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases.," *FASEB J.*, vol. 21, no. 3, pp. 836–50, 2007.
- [122] H.Y. Wu, Y. Rong, K. Correia, J. Min, and J. I. Morgan, "Comparison of the Enzymatic and Functional Properties of Three Cytosolic Carboxypeptidase Family Members," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 2, pp. 1222–1232, 2015.
- [123] C. Janke, "The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, functions," *J. Cell Biol.*, vol. 206, no. 4, pp. 461–472, 2014.

## Bibliografía

- [124] K. Rogowski, J. van Dijk, M.M. Magiera, C. Bosc, J.C. Deloulme, A. Bosson, L. Peris, N.D. Gold, B. Lacroix, M. Bosch Grau, N. Bec, C. Larroque, S. Desagher, M. Holzer, A. Andrieux, M. J. Moutin and C. Janke, "A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration," *Cell*, vol. 143, no. 4, pp. 564–578, 2010.
- [125] O. Tort, S. Tanco, C. Rocha, I. Bièche, C. Seixas, C. Bosc, A. Andrieux, M. Moutin, F. X. Avilés, J. Lorenzo and C. Janke, "The cytosolic carboxypeptidases CCP2 and CCP3 catalyze posttranslational removal of acidic amino acids," *Mol. Biol. Cell*, vol. 25, no. 19, pp. 3017–3027, 2014.
- [126] S. A. Riazuddin, S. Vasanth, N. Katsanis, and J. D. Gottsch, "Mutations in AGBL1 cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy and alter protein-protein Interaction with TCF4," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 93, pp. 758–764, 2013.
- [127] F. J. Baird and C. L. Bennett, "Microtubule defects & Neurodegeneration.," *J. Genet. Syndr. Gene Ther.*, vol. 4, no. Figure 1, p. 203, 2013.
- [128] R. J. Mullen, E. M. Eicher, and R. L. Sidman, "Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 73, no. 1, pp. 208–12, 1976.
- [129] A. Harris, J. I. Morgan, M. Pecot, A. Soumare, A. Osborne, and H. D. Soares, "Regenerating motor neurons express *Nna1*, a novel ATP/GTP-binding protein related to zinc carboxypeptidases.," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 16, no. 5, pp. 578–96, 2000.
- [130] K. Thakar, S. Karaca, S. A. Port, H. Urlaub, and R. H. Kehlenbach, "Identification of CRM1-dependent nuclear export cargos using quantitative mass spectrometry.," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 12, no. 3, pp. 664–78, 2013.
- [131] Y. Kimura, N. Kurabe, K. Ikegami, K. Tsutsumi, Y. Konishi, O. I. Kaplan, H. Kunitomo, Y. Iino, O. E. Blacque and M. Setou, "Identification of tubulin deglutamylase among *Caenorhabditis elegans* and mammalian cytosolic carboxypeptidases (CCPs)," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 30, pp. 22936–22941, 2010.
- [132] J. Kim, J. E. Lee, S. Heynen-Genel, E. Suyama, O. Keiichiro, L. KiYoung, I. Trey, P. Aza-Blanc and J. G. Gleeson, "Functional genomic screen for modulators of ciliogenesis and cilium length," *Nature*, vol. 464, no. 7291, pp. 1048–1051, 2010.
- [133] R. O'Hagan, B. P. Piasecki, M. Silva, P. Phirke, K.C. Nguyen, D. H. Hall, P. Swoboda and M. M. Barr, "The tubulin deglutamylase CCP-1 regulates the function and stability of sensory cilia in *C. elegans*," *Curr. Biol.*, vol. 21, no. 20, pp. 1685–94, 2011.
- [134] I. Berezniuk, H. T. Vu, P. J. Lyons, J. J. Sironi, H. Xiao, B. Burd, M. Setou, R. H. Angeletti, K. Ikegami and L. D. Fricker, "Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 9, pp. 6503–6517, 2012.
- [135] X. Zhao, S. K. Onteru, K. E. Dittmer, K. Parton, H. T. Blair, M. F. Rothschild and D. J. Garrick, "A missense mutation in AGTPBP1 was identified in sheep with a lower motor neuron disease," *Heredity (Edinb.)*, vol. 109, no. 3, pp. 156–162, 2012.

## Bibliografía

- [136] N. Pathak, C. A. Austin-Tse, Y. Liu, A. Vasilyev, and I. A. Drummond, "Cytoplasmic carboxypeptidase 5 regulates tubulin glutamylation and zebrafish cilia formation and function.," *Mol. Biol. Cell*, pp. 1–22, 2014.
- [137] I. Berezniuk, P. J. Lyons, J. J. Sironi, H. Xiao, M. Setou, R. H. Angeletti, K. Ikegami and L. D. Fricker, "Cytosolic carboxypeptidase 5 removes  $\alpha$ - and  $\gamma$ -linked glutamates from tubulin," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 42, pp. 30445–30453, 2013.
- [138] P. J. Lyons, M. R. Sapio, and L. D. Fricker, "Zebrafish cytosolic carboxypeptidases 1 and 5 are essential for embryonic development," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 42, pp. 30454–30462, 2013.
- [139] H. Y. Wu, P. Wei, and J. I. Morgan, "Role of Cytosolic Carboxypeptidase 5 in Neuronal Survival and Spermatogenesis.," *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 41428, 2017.
- [140] P. Xia, B. Ye, S. Wang, X. Zhu, Y. Du, Z. Xiong, Y. Tian and Z. Fan, "Glutamylation of the DNA sensor cGAS regulates its binding and synthase activity in antiviral immunity.," *Nat. Immunol.*, vol. 17, no. 4, pp. 369–378, 2016.
- [141] A. Ghosh-Roy, A. Goncharov, Y. Jin, and A. D. Chisholm, "Kinesin-13 and tubulin posttranslational modifications regulate microtubule growth in axon regeneration.," *Dev. Cell*, vol. 23, no. 4, pp. 716–28, 2012.
- [142] B. Ye, C. Li, Z. Yang, Y. Wang, J. Hao, L. Wang, Y. Li, Y. Du, L. Hao, B. Liu, S. Wang, P. Xia, G. Huang, L. Sun, Y. Tian and Z. Fan, "Cytosolic carboxypeptidase CCP6 is required for megakaryopoiesis by modulating Mad2 polyglutamylation," *J. Exp. Med.*, vol. 211, no. 12, pp. 2439–2454, 2014.
- [143] C. Li, J. Wang, J. Hao, B. Dong, Y. Li, X. Zhu, J. Ding, S. Ren, H. Zhao, S. Wu, Y. Tian and G.Q., "Reduced cytosolic carboxypeptidase 6 (CCP6) level leads to accumulation of serum polyglutamylated DNAJC7 protein: a potential biomarker for renal cell carcinoma early detection," *Oncotarget*, vol. 7, no. 16, pp. 22385–22396, 2016.
- [144] A. Guasch, M. Coll, F. X. Avilés, and R. Huber, "Three-dimensional structure of porcine pancreatic procarboxypeptidase A," *J. Mol. Biol.*, vol. 224, no. 1, pp. 141–157, 1992.
- [145] M. Coll, A. Guasch, F. X. Avilés, and R. Huber, "Three-dimensional structure of porcine procarboxypeptidase B: a structural basis of its inactivity," *EMBO J.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, 1991.
- [146] J. Vendrell, E. Querol, and F. X. Avilés, "Metalloproteases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1477, no. 1–2, pp. 284–98, 2000.
- [147] F. X. Avilés, B. San Segundo, M. Vilanova, C. M. Cuchillo, and C. Turner, "The activation segment of procarboxypeptidase A from porcine pancreas constitutes a folded structural domain," *FEBS Lett.*, vol. 149, no. 2, pp. 257–260, 1982.
- [148] W. L. DeLano, "The PyMOL Molecular Graphics System." DeLano Scientific, San Carlos, CA, 2002.

## Bibliografía

- [149] P. F. Marx, T. H. Brondijk, T. Plug, R. A. Romijn, W. Hemrika, J. C. Meijers and E. G. Huizinga, "Crystal structures of TAFI elucidate the inactivation mechanism of activated TAFI: a novel mechanism for enzyme autoregulation.," *Blood*, vol. 112, no. 7, pp. 2803–9, 2008.
- [150] K. Anand, I. Pallarés, Z. Valnickova, T. Christensen, J. Vendrell, K. U. Wendt, H. A. Schreuder, J. Enghild and F. X. Avilés, "The crystal structure of thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) provides the structural basis for its intrinsic activity and the short half-life of TAFIa.," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 43, pp. 29416–23, 2008.
- [151] A. Otero, M. Rodríguez de la Vega, S. Tanco, J. Lorenzo, F. X. Avilés, and D. Reverter, "The novel structure of a cytosolic M14 metalloprotease (CCP) from *Pseudomonas aeruginosa*: a model for mammalian CCPs," *FASEB J.*, vol. 26, no. 9, pp. 3754–3764, 2012.
- [152] V. Rimsa, T. C. Eadsforth, R. P. Joosten, and W. N. Hunter, "High-resolution structure of the M14-type cytosolic carboxypeptidase from *Burkholderia cenocepacia* refined exploiting PDB-REDO strategies," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 70, no. 2, pp. 279–289, 2014.
- [153] F. X. Gomis-Rüth, "Structure and mechanism of metalloproteases.," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 43, no. 5, pp. 319–345, 2008.
- [154] J. L. Arolas and F. X. Gomis-Ruth, "Zinc Metalloproteases," no. Table 1, pp. 2473–2479, 2010.
- [155] F. X. Avilés, J. Vendrell, A. Guasch, M. Coll, and R. Huber, "Advances in metalloproteases. Emerging details on the inhibition mechanism and on the activation process," *Eur. J. Biochem.*, vol. 211, no. 3, pp. 381–389, 1993.
- [156] W. N. Lipscomb, J. A. Hartsuck, F. A. Quioco, G. N. Reeke Jr., "The structure of carboxypeptidase A. IX. The x-ray diffraction results in the light of the chemical sequence.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 64, no. 1, pp. 28–35, 1969.
- [157] S. Wu, C. Zhang, D. Xu, and H. Guo, "Catalysis of carboxypeptidase A: promoted-water versus nucleophilic pathways," *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, no. 28, pp. 9259–9267, 2010.
- [158] D. Xu and H. Guo, "Quantum mechanical/molecular mechanical and density functional theory studies of a prototypical zinc protease (carboxypeptidase A) suggest a general acid-general base mechanism," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 28, pp. 9780–9788, 2009.
- [159] D. Fernández, I. Pallarès, J. Vendrell, and F. X. Avilés, "Progress in metalloproteases and their small molecular weight inhibitors.," *Biochimie*, vol. 92, no. 11, pp. 1484–500, 2010.
- [160] S. J. Gardell, C. S. Craik, D. Hilvert, M. S. Urdea, and W. J. Rutter, "Site-directed mutagenesis shows that Tyrosine 248 of carboxypeptidase A does not play a crucial role in catalysis.," *Nature*, vol. 317, no. 6037, pp. 551–5, 1985.
- [161] D. Hilvert, S. J. Gardell, W. J. Rutter, and E. T. Kaiser, "Evidence against a crucial role for the phenolic hydroxyl of Tyr-248 in peptide and ester hydrolyses catalyzed by carboxypeptidase A: comparative studies of the pH dependencies of the native and Phe-248-mutant forms," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 108, no. 17, pp. 5298–5304, 1986.

## Bibliografía

- [162] H.Y. Wu, T. Wang, L. Li, K. Correia, and J. I. Morgan, "A structural and functional analysis of *Nna1* in Purkinje cell degeneration (*pcd*) mice," *FASEB J.*, vol. 26, no. 11, pp. 4468–4480, 2012.
- [163] D. Fernández, I. Pallarès, G. Covalada, F. X. Avilés, and J. Vendrell, "Metalloproteinases and their inhibitors: recent developments in biomedically relevant protein and organic ligands," *Curr. Med. Chem.*, vol. 20, no. 12, pp. 1595–608, 2013.
- [164] J. Arolas, J. Vendrell, F.X. Avilés, and L.D. Fricker, "Metalloproteinases: emerging drug targets in biomedicine," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 13, no. 4, pp. 349–366, 2007.
- [165] M. Jin, M. Ishida M, Y. Katoh-Fukui, R. Tsuchiya, T. Higashinakagawa, S. Ikegami and Y. Arimatsu, "Reduced pain sensitivity in mice lacking latexin, an inhibitor of metalloproteinases," *Brain Res.*, vol. 1075, no. 1, pp. 117–121, 2006.
- [166] Z. Xue *et al.*, "Latexin exhibits tumor-suppressor potential in pancreatic ductal adenocarcinoma," *Oncol. Rep.*, vol. 35, no. 1, pp. 50–8, 2016.
- [167] Z. J. Sahab *et al.*, "Tumor suppressor RARRES1 interacts with cytoplasmic carboxypeptidase AGL2 to regulate the  $\alpha$ -tubulin tyrosination cycle," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 4, pp. 1219–1228, 2011.
- [168] E. E. Oldridge, H. F. Walker, M. J. Stower, M. S. Simms, V. M. Mann, A. T. Collins, D. Pellacani, N. J. Maitland, "Retinoic acid represses invasion and stem cell phenotype by induction of the metastasis suppressors RARRES1 and LXN," *Oncogenesis*, vol. 2, no. 4, p. e45, 2013.
- [169] C.C. Wu, R. Y. Shyu, J. M. Chou, S. W. Jao, P. C. Chao, J. C. Kang, S. T. Wu, S. L. Huang, and S. Y. Jiang, "RARRES1 expression is significantly related to tumour differentiation and staging in colorectal adenocarcinoma," *Eur. J. Cancer*, vol. 42, no. 4, pp. 557–565, 2006.
- [170] D. C. Rees and W. N. Lipscomb, "Refined crystal structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5 Å resolution," *J. Mol. Biol.*, vol. 160, no. 3, pp. 475–498, 1982.
- [171] G. M. Hass, H. Nau, K. Biemann, D. T. Grahn, L. H. Ericsson, and H. Neurath, "The amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes," *Biochemistry*, vol. 14, no. 6, pp. 1334–42, 1975.
- [172] D. Lufrano, J. Cotabarren, J. Garcia-Pardo, R. Fernandez-Alvarez, O. Tort, S. Tanco, F. X. Avilés, J. Lorenzo, and W. D. Obregón, "Biochemical characterization of a novel carboxypeptidase inhibitor from a variety of Andean potatoes," *Phytochemistry*, vol. 120, pp. 36–45, 2015.
- [173] B. Martineau, K. E. McBride, and C. M. Houck, "Regulation of metalloproteinase inhibitor gene expression in tomato," *Mol. Gen. Genet.*, vol. 228, no. 1–2, pp. 281–6, 1991.
- [174] G. M. Hass and M. A. Hermodson, "Amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from tomato fruit," *Biochemistry*, vol. 20, no. 8, pp. 2256–2260, 1981.



## Bibliografía

- [175] L. Sanglas, F. X. Aviles, R. Huber, F. X. Gomis-Rüth, and J. L. Arolas, "Mammalian metallopeptidase inhibition at the defense barrier of *Ascaris* parasite.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 6, pp. 1743–1747, 2009.
- [176] G. A. Homandberg, R. D. Litwiller, and R. J. Peanasky, "Carboxypeptidase inhibitors from *Ascaris suum*: the primary structure.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 270, no. 1, pp. 153–61, 1989.
- [177] G. A. Homandberg and R. J. Peanasky, "Characterization of proteins from *Ascaris lumbricoides* which bind specifically to carboxypeptidase," *J. Biol. Chem.*, vol. 251, no. 8, pp. 2226–2233, 1976.
- [178] G. A. Homandberg and R. J. Peanasky, "Characterization of proteins from *Ascaris lumbricoides* which bind specifically to carboxypeptidase," *J. Biol. Chem.*, vol. 251, no. 8, pp. 2226–2233, 1976.
- [179] D. Reverter, C. Fernández-Catalán, R. Baumgartner, R. Pfänder, R. Huber, W. Bode, J. Vendrell, T. A. Holak, and F. X. Avilés, "Structure of a novel leech carboxypeptidase inhibitor determined free in solution and in complex with human carboxypeptidase A2.," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 7, no. 4, pp. 322–328, 2000.
- [180] J. L. Arolas *et al.*, "A carboxypeptidase inhibitor from the tick *Rhipicephalus bursa*: Isolation, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 5, pp. 3441–3448, 2005.
- [181] H. Gong *et al.*, "Characterization of a carboxypeptidase inhibitor from the tick *Haemaphysalis longicornis*," *J. Insect Physiol.*, vol. 53, no. 10, pp. 1079–1087, 2007.
- [182] G. Covalada, M. Alonso-del-Rivero, M. A. Chávez, F. X. Avilés, and D. Reverter, "Crystal structure of novel metallocarboxypeptidase inhibitor from marine mollusk *Nerita versicolor* in complex with human carboxypeptidase A4," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 12, pp. 9250–9258, 2012.
- [183] M. Alonso-del-Rivero, S. A. Trejo, M. L. Reytor, M. Rodríguez-de-la-Vega, J. Delfin, J. Diaz, Y. González-González, F. Canals, M. A. Chavez and F. X Avilés, "Tri-domain bifunctional inhibitor of metallocarboxypeptidases A and serine proteases isolated from marine annelid *Sabellastarte magnifica*," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 19, pp. 15427–15438, 2012.
- [184] J. L. Arolas, J. Lorenzo, A. Rovira, J. Vendrell, F. X. Aviles, and S. Ventura, "Secondary binding site of the potato carboxypeptidase inhibitor. Contribution to its structure, folding, and biological properties," *Biochemistry*, vol. 43, no. 24, pp. 7973–7982, 2004.
- [185] M. Alonso-del-Rivero, M. L. Reytor, S. A. Trejo, M. A. Chávez, F. X. Avilés, and D. Reverter, "A noncanonical mechanism of carboxypeptidase inhibition revealed by the crystal structure of the tri-Kunitz SmCI in complex with human CPA4," *Structure*, vol. 21, no. 7, pp. 1118–1126, 2013.
- [186] J. Villanueva, F. Canals, S. Prat, D. Ludevid, E. Querol, and F. X. Avilés, "Characterization of the wound-induced metallocarboxypeptidase inhibitor from potato: cDNA sequence, induction of gene expression, subcellular immunolocalization and potential roles of the C-terminal

## Bibliografía

- propeptide," *FEBS Lett.*, vol. 440, no. 1, pp. 175–182, 1998.
- [187] C. Blanco-Aparicio *et al.*, "Potato carboxypeptidase inhibitor, a T-knot protein, is an epidermal growth factor antagonist that inhibits tumor cell growth.," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 20, pp. 12370–7, 1998.
- [188] C. Marino-Buslje *et al.*, "Contribution of C-tail residues of potato carboxypeptidase inhibitor to the binding to carboxypeptidase A," *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 5, pp. 1502–1509, 2000.
- [189] J. L. Arolas, J. Lorenzo, A. Rovira, J. Vendrell, F. X. Aviles, and S. Ventura, "Secondary Binding Site of the Potato Carboxypeptidase Inhibitor. Contribution to Its Structure, Folding, and Biological Properties <sup>†</sup>," *Biochemistry*, vol. 43, no. 24, pp. 7973–7982, 2004.
- [190] D. Lufrano, J. Cotabarren, J. Garcia-Pardo, R. Fernandez-Alvarez, O. Tort, S. Tanco, F. X. Avilés, J. Lorenzo, and W. D. Obregón, "Biochemical characterization of a novel carboxypeptidase inhibitor from a variety of Andean potatoes," *Phytochemistry*, vol. 120, pp. 36–45, 2015.
- [191] B. Martineau, K. McBride, and C. Houck, "Regulation of metallocarboxypeptidase inhibitor gene expression in tomato," *MGG Mol. Gen. Genet.*, vol. 228, no. 1–2, 1991.
- [192] J. L. Arolas, S. Bronsoms, S. Ventura, F. X. Aviles, and J. J. Calvete, "Characterizing the tick carboxypeptidase inhibitor: Molecular basis for its two-domain nature," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 32, pp. 22906–22916, 2006.
- [193] J. L. Arolas *et al.*, "The three-dimensional structures of tick carboxypeptidase inhibitor in complex with A/B carboxypeptidases reveal a novel double-headed binding mode.," *J. Mol. Biol.*, vol. 350, no. 3, pp. 489–98, 2005.
- [194] C. Janke, J. C. Bulinski, and J. Chloě Bulinski, "Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 12, no. 12, pp. 773–786, 2011.
- [195] S. Chakraborti, K. Natarajan, J. Curiel, C. Janke, and J. Liu, "The emerging role of the tubulin code: From the tubulin molecule to neuronal function and disease," *Cytoskeleton*, vol. 73, no. 10, pp. 521–550, 2016.
- [196] H. Mohri, "Amino-acid composition of &quot;Tubulin&quot; constituting microtubules of sperm flagella.," *Nature*, vol. 217, no. 5133, pp. 1053–4, 1968.
- [197] F. Breu, S. Guggenbichler, and J. Wollmann, "Microtubule Dynamics," *Vasa*, vol. 777, pp. 57–69, 2008.
- [198] M. Pilhofer, M. S. Ladinsky, A. W. McDowall, G. Petroni, and G. J. Jensen, "Microtubules in Bacteria: Ancient Tubulins Build a Five-Protofilament Homolog of the Eukaryotic Cytoskeleton," *PLoS Biol.*, vol. 9, no. 12, p. e1001213, 2011.
- [199] X. Zhu and I. Kaverina, "Golgi as an MTOC: Making microtubules for its own good," *Histochem. Cell Biol.*, vol. 140, no. 3, pp. 361–367, 2013.
- [200] G. M. Cooper, "Microtubules," 2000.

## Bibliografía

- [201] K. J. Verhey and J. Gaertig, "The Tubulin Code," *Cell Cycle*, vol. 6, no. 17, pp. 2152–2160, 2007.
- [202] A. Wehenkel and C. Janke, "Towards elucidating the tubulin code.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 16, no. 4, pp. 303–5, 2014.
- [203] C. Fulton and P. Simpson, "Selective synthesis and utilisation of flagellar tubulin. The multi-tubulin hypothesis." *Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation, Book C (R. Golden, T. Pollard and J. Rosenbaum, eds.)*, pp. 987-1005, 1976.
- [204] R. F. Ludueña and A. Banerjee, "The Isoforms of Tubulin," in *The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology*, Totowa, NJ: Humana Press, pp. 123–175, 2008.
- [205] M. Sirajuddin, L. M. Rice, and R. D. Vale, "Regulation of microtubule motors by tubulin isoforms and post-translational modifications.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 16, no. 4, pp. 335–44, 2014.
- [206] E. Nogales, S. G. Wolf, and K. H. Downing, "Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography.," *Nature*, vol. 391, no. 6663, pp. 199–203, 1998.
- [207] M. M. Magiera and C. Janke, "Post-translational modifications of tubulin," *Curr. Biol.*, vol. 24, no. 9, pp. R351–R354, 2014.
- [208] P. G. McKean, S. Vaughan, and K. Gull, "The extended tubulin superfamily.," *J. Cell Sci.*, vol. 114, no. Pt 15, pp. 2723–33, 2001.
- [209] C. P. Garnham and A. Roll-Mecak, "The chemical complexity of cellular microtubules: Tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions," *Cytoskeleton*, vol. 69, no. 7, pp. 442–463, 2012.
- [210] Y. Song and S. T. Brady, "Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules," *Trends Cell Biol.*, vol. 25, no. 3, pp. 125–136, 2015.
- [211] J. Wehland and K. Weber, "Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of alpha-tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells.," *J. Cell Sci.*, vol. 88 ( Pt 2), pp. 185–203, 1987.
- [212] H. S. Barra, C. A. Arce, and C. E. Argaraña, "Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin," *Mol. Neurobiol.*, vol. 2, no. 2, pp. 133–153, 1988.
- [213] C. Janke and M. Kneussel, "Tubulin post-translational modifications: Encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton," *Trends Neurosci.*, vol. 33, no. 8, pp. 362–72, 2010.
- [214] C. W. Chu *et al.*, "A novel acetylation of  $\beta$ -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 22, no. 4, pp. 448–56, 2011.
- [215] L. Li and X. J. Yang, "Tubulin acetylation: responsible enzymes, biological functions and human diseases," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 72, no. 22, pp. 4237–4255, 2015.
- [216] S. De, A. Tsimounis, X. Chen, and S. A. Rotenberg, "Phosphorylation of  $\alpha$ -tubulin by protein kinase C stimulates microtubule dynamics in human breast cells," *Cytoskeleton*, vol. 71, no. 4, pp. 257–272, 2014.

## Bibliografia

- [217] A. Fourest-Lieuvain *et al.*, "Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 17, no. 3, pp. 1041–50, 2006.
- [218] Y. Song *et al.*, "Transglutaminase and Polyamination of Tubulin: Posttranslational Modification for Stabilizing Axonal Microtubules," *Neuron*, vol. 78, no. 1, pp. 109–123, 2013.
- [219] C. Janke *et al.*, "Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family.," *Science*, vol. 308, no. 5729, pp. 1758–1762, 2005.
- [220] K. Rogowski *et al.*, "Evolutionary Divergence of Enzymatic Mechanisms for Posttranslational Polyglycylation," *Cell*, vol. 137, no. 6, pp. 1076–1087, 2009.
- [221] J. van Dijk, K. Rogowski, J. Miro, B. Lacroix, B. Eddé, and C. Janke, "A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylation.," *Mol. Cell*, vol. 26, no. 3, pp. 437–48, 2007.
- [222] D. Wloga *et al.*, "Glutamylation on  $\alpha$ -tubulin is not essential but affects the assembly and functions of a subset of microtubules in *Tetrahymena thermophila*," *Eukaryot. Cell*, vol. 7, no. 8, pp. 1362–1372, 2008.
- [223] M. Mukai, K. Ikegami, Y. Sugiura, K. Takeshita, A. Nakagawa, and M. Setou, "Recombinant mammalian tubulin polyglutamylase TTLL7 performs both initiation and elongation of polyglutamylation on  $\beta$ -tubulin through a random sequential pathway," *Biochemistry*, vol. 48, no. 5, pp. 1084–1093, 2009.
- [224] C. Janke, K. Rogowski, and J. van Dijk, "Polyglutamylation: a fine-regulator of protein function? „Protein modifications: beyond the usual suspects“ review series.," *EMBO Rep.*, vol. 9, no. 7, pp. 636–41, 2008.
- [225] C. Regnard, E. Desbruyères, J. C. Huet, C. Beauvallet, J. C. Pernollet, and B. Eddé, "Polyglutamylation of nucleosome assembly proteins," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 21, pp. 15969–15976, 2000.
- [226] J. Van Dijk *et al.*, "Polyglutamylation is a post-translational modification with a broad range of substrates," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 7, pp. 3915–3922, 2008.
- [227] V. Das, A. Kanakkanthara, A. Chan, and J. H. Miller, "Potential role of tubulin tyrosine ligase-like enzymes in tumorigenesis and cancer cell resistance.," *Cancer Lett.*, vol. 350, no. 1–2, pp. 1–4, 2014.
- [228] J. Galivan, A. Pupons, and M. S. Rhee, "Hepatic parenchymal cell glutamylation of methotrexate studied in monolayer culture.," *Cancer Res.*, vol. 46, no. 2, pp. 670–5, 1986.
- [229] K. Million, J. Larcher, J. Laoukili, D. Bourguignon, F. Marano, and F. Tournier, "Polyglutamylation and polyglycylation of alpha- and beta-tubulins during in vitro ciliated cell differentiation of human respiratory epithelial cells.," *J. Cell Sci.*, vol. 112 (Pt 2), pp. 4357–4366, 1999.
- [230] M. Lalle, S. Camerini, S. Cecchetti, C. Blasetti Fantauzzi, M. Crescenzi, and E. Pozio, "*Giardia duodenalis* 14-3-3 protein is polyglycylationed by a tubulin tyrosine ligase-like member and deglycylationed by two metallopeptidases.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 6, pp. 4471–84, 2011.

## Bibliografia

- [231] T. Sjöblom *et al.*, “The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers,” *Science*, vol. 314, no. 5797, pp. 268–274, 2006.
- [232] A. Roll-Mecak, “Intrinsically disordered tubulin tails: complex tuners of microtubule functions?,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 37, pp. 11–19, 2015.
- [233] C. Bonnet *et al.*, “Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 16, pp. 12839–12848, 2001.
- [234] M. L. Valenstein and A. Roll-Mecak, “Graded control of microtubule severing by tubulin glutamylation,” *Cell*, vol. 164, no. 5, pp. 911–921, 2016.
- [235] M. E. Bailey, D. L. Sackett, and J. L. Ross, “Katanin severing and binding microtubules are inhibited by tubulin carboxy tails,” *Biophys. J.*, vol. 109, no. 12, pp. 2546–61, 2015.
- [236] B. Lacroix *et al.*, “Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing,” *J. Cell Biol.*, vol. 189, no. 6, pp. 945–954, 2010.
- [237] B. E. Kremer, T. Haystead, and I. G. Macara, “Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. 10, pp. 4648–59, 2005.
- [238] N. Galjart, “Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends,” *Curr. Biol.*, vol. 20, no. 12, pp. R528–37, 2010.
- [239] A. Akhmanova and M. O. Steinmetz, “Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 4, pp. 309–22, 2008.
- [240] X. Wu, X. Xiang, and J. a Hammer, “Motor proteins at the microtubule plus-end,” *Trends Cell Biol.*, vol. 16, no. 3, pp. 135–43, 2006.
- [241] B. I. Hirschowitz, “Pepsinogen: Its Origins, Secretion and Excretion,” *Physiol. Rev.*, vol. 37, no. 4, 1957.
- [242] I. T. Beck, “The role of pancreatic enzymes in digestion,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 26, no. 3, pp. 311–25, 1973.
- [243] D. Hooton, R. Lentle, J. Monro, M. Wickham, and R. Simpson, “The secretion and action of brush border enzymes in the mammalian small intestine,” in *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, vol. 168, pp. 59–118, 2015.
- [244] R. Chandra and R. A. Liddle, “Neural and hormonal regulation of pancreatic secretion,” *Curr. Opin. Gastroenterol.*, vol. 25, no. 5, pp. 441–6, 2009.
- [245] R. A. Liddle, “Cholecystokinin cells,” *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 59, no. 1, pp. 221–242, 1997.
- [246] J. H. Grendell, “Structure and function of the exocrine pancreas,” pp. 78–91, 2014.
- [247] S. W. Crawley, M. S. Mooseker, and M. J. Tyska, “Shaping the intestinal brush border,” *J. Cell Biol.*, vol. 207, no. 4, 2014.

## Bibliografía

- [248] G. Picariello and F. Addeo, "Use of brush border membrane vesicles to simulate the human intestinal digestion," *Food Res. Int.*, vol. 88, pp. 327–335, 2016.
- [249] E. M. Danielsen and G. H. Hansen, "Lipid rafts in epithelial brush borders: atypical membrane microdomains with specialized functions," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1617, no. 1, pp. 1–9, 2003.
- [250] C. Itami, R. Taguchi, H. Ikezawa, and T. Nakabayashi, "Release of ectoenzymes from small intestine brush border membranes of mice by phospholipases," *Biosci. Biotech. Biochem.*, vol. 61, no. 2, pp. 336–340, 1997.
- [251] R. E. McConnell, A. E. Benesh, S. Mao, D. L. Tabb, and M. J. Tyska, "Proteomic analysis of the enterocyte brush border.," *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 300, no. 5, pp. G914-26, 2011.
- [252] G. Wu *et al.*, "Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition.," *Amino Acids*, vol. 40, no. 4, pp. 1053–63, 2011.
- [253] G. Liu *et al.*, "Prolidase isoenzymes in the rat: their organ distribution, developmental change and specific inhibitors," *Pediatr Res*, vol. 62, pp. 54–59, 2007.
- [254] H. Sjöström, O. Norén, and L. Josefsson, "Purification and specificity of pig intestinal prolidase.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 327, no. 2, pp. 457–70, 1973.
- [255] Y. S. Kim, J. A. Nicholson, and K. J. Curtis, "Intestinal peptide hydrolases: peptide and amino acid absorption.," *Med. Clin. North Am.*, vol. 58, no. 6, pp. 1397–412, 1974.
- [256] F. Blachier, C. Boutry, C. Bos, and D. Tome, "Metabolism and functions of L-glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 90, no. 3, p. 814S–821S, 2009.
- [257] G. Wu, "Intestinal mucosal amino acid catabolism.," *J. Nutr.*, vol. 128, no. 8, pp. 1249–52, 1998.
- [258] W. M. Miner-Williams, B. R. Stevens, and P. J. Moughan, "Are intact peptides absorbed from the healthy gut in the adult human?," *Nutr. Res. Rev.*, vol. 27, no. 2, pp. 308–329, 2014.
- [259] V. Raikos and T. Dassios, "Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review.," *Dairy Sci. Technol.*, vol. 94, no. 2, pp. 91–101, 2014.
- [260] F. Shahidi and Y. Zhong, "Bioactive peptides.," *J. AOAC Int.*, vol. 91, no. 4, pp. 914–31.
- [261] L. A. Scheving, R. A. ShiurbaS, T. D. NguyenQ, and G. M. G. Toan D. NguyenQ, "Epidermal Growth Factor Receptor of the Intestinal Enterocyte: localization to laterobasal but not brush border membrane," *J Biol Chem*, vol. 264, no. 3, pp. 1735–1741, 1989.
- [262] A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and E. a O'Brien, "The MEROPS database as a protease information system.," *J. Struct. Biol.*, vol. 134, no. 2–3, pp. 95–102, 2001.
- [263] Y. Qian, O. Varlamov, and L. D. Fricker, "Glu300 of rat carboxypeptidase E is essential for enzymatic activity but not substrate binding or routing to the regulated secretory pathway," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 17, pp. 11582–11586, 1999.

## Bibliografía

- [264] A. Otero Bilbao, "Characterization of two metallo-carboxypeptidases of M14D subfamily from bacterial and human origin," Universitat Autònoma de Barcelona, 2014.
- [265] T. G. Schmidt and A. Skerra, "The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins," *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 6, pp. 1528–1535, 2007.
- [266] A. de Marco, E. Deuerling, A. Mogk, T. Tomoyasu, and B. Bukau, "Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*," *BMC Biotechnol.*, vol. 7, p. 32, 2007.
- [267] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.," *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–54, 1976.
- [268] Y. Zhang, "I-TASSER server for protein 3D structure prediction.," *BMC Bioinformatics*, vol. 9, p. 40, 2008.
- [269] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, "Basic local alignment search tool," *J. Mol. Biol.*, vol. 215, no. 3, pp. 403–410, 1990.
- [270] M. Wiederstein and M. J. Sippl, "ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. Web Server, pp. W407–W410, 2007.
- [271] F. Sievers *et al.*, "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega.," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 7, p. 539, 2011.
- [272] A. Banerjee, F. A. Bovenzi, and S. L. Bane, "High-resolution separation of tubulin monomers on polyacrylamide minigels," *Anal. Biochem.*, vol. 402, no. 2, pp. 194–196, 2010.
- [273] P. B. Bell and B. Safiejko-Mrocicka, "Improved methods for preserving macromolecular structures and visualizing them by fluorescence and scanning electron microscopy.," *Scanning Microsc.*, vol. 9, no. 3, pp. 843-57-60, 1995.
- [274] M. R. Dyson, "Fundamentals of Expression in Mammalian Cells," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 896, 2016.
- [275] D. M. Francis, R. Page, D. M. Francis, and R. Page, "Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*," in *Current Protocols in Protein Science*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. 5.24.1-5.24.29, 2010.
- [276] H. Tegel, J. Ottosson, and S. Hober, "Enhancing the protein production levels in *Escherichia coli* with a strong promoter," *FEBS J.*, vol. 278, no. 5, pp. 729–739, 2011.
- [277] M. Martínez-Alonso, E. García-Fruitós, N. Ferrer-Miralles, U. Rinas, and A. Villaverde, "Side effects of chaperone gene co-expression in recombinant protein production.," *Microb. Cell Fact.*, vol. 9, p. 64, 2010.
- [278] N. Ferrer-Miralles, J. Domingo-Espín, J. L. Corchero, E. Vázquez, and A. Villaverde, "Microbial factories for recombinant pharmaceuticals.," *Microb. Cell Fact.*, vol. 8, p. 17, 2009.

## Bibliografía

- [279] R. A. Sayle and E. J. Milner-White, "RASMOL: biomolecular graphics for all.," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 20, no. 9, p. 374, 1995.
- [280] D. Fernández, E. Boix, I. Pallarès, F. X. Avilés, and J. Vendrell, "Analysis of a new crystal form of procarboxypeptidase B: further insights into the catalytic mechanism," *Biopolymers*, vol. 93, no. 2, pp. 178–185, 2010.
- [281] C. Jae Hyun, D. H. Kim, D. H. Kim, K. J. Lee, and K. Y. Choi, "The Role of Tyr248 Probed by Mutant Bovine Carboxypeptidase A: Insight into the Catalytic Mechanism of Carboxypeptidase A," 2001.
- [282] K. Ikegami, M. Mukai, J. I. Tsuchida, R. L. Heier, G. R. MacGregor, and M. Setou, "TTLL7 is a mammalian  $\beta$ -tubulin polyglutamylase required for growth of MAP2-positive neurites," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 41, pp. 30707–30716, 2006.
- [283] K. Ikegami and M. Setou, "TTLL10 can perform tubulin glycylation when co-expressed with TTLL8," *FEBS Lett.*, vol. 583, no. 12, pp. 1957–1963, 2009.
- [284] M. M. Magiera and C. Janke, "Investigating tubulin posttranslational modifications with specific antibodies", 2nd ed., vol. 115. Elsevier, Inc., 2013.
- [285] B. Lacroix and C. Janke, "Generation of Differentially Polyglutamylated Microtubules," in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 777, pp. 57–69, 2011.
- [286] C. Li *et al.*, "Reduced cytosolic carboxypeptidase 6 (CCP6) level leads to accumulation of serum polyglutamylated DNAJC7 protein: A potential biomarker for renal cell carcinoma early detection.," *Oncotarget*, vol. 7, no. 16, pp. 22385–96, 2016.
- [287] K. J. Roux, D. I. Kim, and B. Burke, "BioID: A screen for protein-protein interactions," *Curr. Protoc. Protein Sci.*, no. SUPPL.74, pp. 1–14, 2013.
- [288] M. Štros, "HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin," *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, vol. 1799, no. 1–2, pp. 101–113, 2010.
- [289] I. Pallarès *et al.*, "Structure of human carboxypeptidase A4 with its endogenous protein inhibitor, latexin.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 11, pp. 3978–83, 2005.
- [290] I. Berezniuk *et al.*, "Cytosolic Carboxypeptidase 1 Is Involved in Processing  $\alpha$ - and  $\beta$ -Tubulin," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 9, pp. 6503–6517, 2012.
- [291] A. V Hoffbrand, E. Tripp, and A. Lavoie, "Synthesis of folate polyglutamates in human cells.," *Clin. Sci. Mol. Med.*, vol. 50, no. 1, pp. 61–8, 1976.
- [292] E. Waldschmidt-Leitz and A. Purr, "Über Proteinase und Carboxy-Polypeptidase aus Pankreas (XVII. Mitteilung zur Spezifität tierischer Proteasen)," *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser.)*, vol. 62, no. 8, pp. 2217–2226, 1929.
- [293] S. J. Gardell *et al.*, "A novel rat carboxypeptidase, CPA2: characterization, molecular cloning, and evolutionary implications on substrate specificity in the carboxypeptidase gene family.," *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no. 33, pp. 17828–36, 1988.



## Bibliografía

- [294] J. Vendrell, C. M. Cuchillo, and F. X. Avilés, "The tryptic activation pathway of monomeric procarboxypeptidase A\*," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 12, pp. 6949–6953, 1990.
- [295] J. Vendrell *et al.*, "Pancreatic procarboxypeptidases: their activation processes related to the structural features of the zymogens and activation segments," *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.*, vol. 373, no. 2, pp. 387–392, 1992.
- [296] S. A. Adibi and D. W. Mercer, "Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals.," *J. Clin. Invest.*, vol. 52, no. 7, pp. 1586–94, 1973.
- [297] J. Juanhuix *et al.*, "Developments in optics and performance at BL13-XALOC, the macromolecular crystallography beamline at the Alba Synchrotron," *J. Synchrotron Radiat.*, vol. 21, no. 4, pp. 679–689, 2014.
- [298] W. Kabsch, "XDS.," *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, vol. 66, no. Pt 2, pp. 125–32, 2010.
- [299] M. D. Winn *et al.*, "Overview of the CCP4 suite and current developments.," *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, vol. 67, no. Pt 4, pp. 235–42, 2011.
- [300] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, and K. Cowtan, "Features and development of *Coot.*," *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, vol. 66, no. Pt 4, pp. 486–501, 2010.
- [301] G. N. Murshudov *et al.*, "REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures.," *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, vol. 67, no. Pt 4, pp. 355–67, 2011.
- [302] P. D. Adams *et al.*, "PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 66, no. 2, pp. 213–221, 2010.
- [303] J. Pei, B.-H. Kim, and N. V. Grishin, "PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. 7, pp. 2295–300, 2008.
- [304] J. F. Morrison, "The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 7, no. 3, pp. 102–105, 1982.
- [305] H. Lineweaver and D. Burk, "The determination of enzyme dissociation constants," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 56, no. 3, pp. 658–666, 1934.
- [306] E. Folta-Stogniew, "Oligomeric states of proteins determined by size-exclusion chromatography coupled with light scattering, absorbance, and refractive index detectors," in *New and Emerging Proteomic Techniques*, vol. 328, New Jersey: Humana Press, pp. 97–112, 2006.
- [307] E. M. Danielsen, "Dimeric assembly of enterocyte brush border enzymes.," *Biochemistry*, vol. 33, no. 6, pp. 1599–605, 1994.
- [308] E. Krissinel and K. Henrick, "Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State," *J. Mol. Biol.*, vol. 372, no. 3, pp. 774–797, 2007.
- [309] S. Tanco, J. L. Arolas, T. Guevara, J. Lorenzo, F. X. Avilés, and F. X. Gomis-Rüth, "Structure-function analysis of the short splicing variant carboxypeptidase encoded by *Drosophila melanogaster* silver," *J. Mol. Biol.*, vol. 401, no. 3, pp. 465–477, 2010.

## Bibliografía

- [310] J. S. Chauhan, A. Rao, and G. P. S. Raghava, "In silico Platform for Prediction of N-, O- and C-Glycosites in Eukaryotic Protein Sequences," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, p. e67008, 2013.
- [311] M. Yoshioka, R. H. Erickson, and Y. S. Kim, "Digestion and assimilation of proline-containing peptides by rat intestinal brush border membrane carboxypeptidases role of the combined action of angiotensin-converting enzyme and carboxypeptidase P", *J. Clin. Invest*, 1988."
- [312] J. Strelow *et al.*, "Mechanism of Action assays for Enzymes," *Assay Guid. Man.*, pp. 1–24, 2012.
- [313] D. Reverter *et al.*, "A Carboxypeptidase Inhibitor from the Medical Leech *Hirudo medicinalis*," vol. 273, no. 49, pp. 32927–32933, 1998.
- [314] À. Bayés *et al.*, "Caught after the act: A human A-type metallo-carboxypeptidase in a product complex with a cleaved hexapeptide," *Biochemistry*, vol. 46, no. 23, pp. 6921–6930, 2007.
- [315] M. P. Repasky, M. Shelley, and R. A. Friesner, "Flexible ligand docking with Glide," in *Current Protocols in Bioinformatics*, vol. Chapter 8, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. Unit 8.12., 2007
- [316] R. J. Playford *et al.*, "Epidermal growth factor is digested to smaller, less active forms in acidic gastric juice.," *Gastroenterology*, vol. 108, no. 1, pp. 92–101, 1995.
- [317] D. P. Calnan *et al.*, "Potency and stability of C terminal truncated human epidermal growth factor.," *Gut*, vol. 47, no. 5, pp. 622–7, 2000.
- [318] R. K. Rao, O. Koldovský, M. Korc, P. F. Pollack, S. Wright, and T. P. Davis, "Processing and transfer of epidermal growth factor in developing rat jejunum and ileum.," *Peptides*, vol. 11, no. 6, pp. 1093–102.
- [319] K. Tsukumo, H. Nakamura, and S. Sakamoto, "Purification and characterization of high molecular weight human epidermal growth factor from human urine.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 145, no. 1, pp. 126–33, 1987.
- [320] H. Gregory, C. E. Thomas, J. A. Young, I. R. Willshire, and A. Garner, "The contribution of the C-terminal undecapeptide sequence of urogastrone-epidermal growth factor to its biological action.," *Regul. Pept.*, vol. 22, no. 3, pp. 217–26, 1988.
- [321] C. Panosa *et al.*, "A comparison of non-biologically active truncated EGF (EGFt) and full-length hEGF for delivery of Auger electron-emitting <sup>111</sup>In to EGFR-positive breast cancer cells and tumor xenografts in athymic mice," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 42, no. 12, pp. 931–938, 2015.
- [322] R. A. Goodlad, R. Boulton, and R. J. Playford, "Comparison of the mitogenic activity of human epidermal growth factor I-53 and epidermal growth factor I-48 in vitro and in vivo.," *Clin. Sci. (Lond)*, vol. 91, no. 4, pp. 503–7, 1996.
- [323] K. J. Rowland, P. M. Choi, and B. W. Warner, "The role of growth factors in intestinal regeneration and repair in necrotizing enterocolitis.," *Semin. Pediatr. Surg.*, vol. 22, no. 2, pp. 101–11, 2013.

## Bibliografía

- [324] D. S. Salomon, R. Brandt, F. Ciardiello, and N. Normanno, "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies.," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 19, no. 3, pp. 183–232, 1995.
- [325] R. J. Playford and N. A. Wright, "Why is epidermal growth factor present in the gut lumen?," *Gut*, vol. 38, no. 3, pp. 303–5, 1996.
- [326] P. Aloy *et al.*, "The Crystal structure of the inhibitor-complexed carboxypeptidase d domain ii and the modeling of regulatory carboxypeptidases," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 19, pp. 16177–16184, 2001.
- [327] C. Y. Janda, D. Waghray, A. M. Levin, C. Thomas, and K. C. Garcia, "Structural Basis of Wnt Recognition by Frizzled," *Science.*, vol. 337, no. 6090, pp. 59–64, 2012.
- [328] Y. Nitanaï, Y. Satow, H. Adachi, and M. Tsujimoto, "Crystal structure of human renal dipeptidase involved in beta-lactam hydrolysis.," *J. Mol. Biol.*, vol. 321, no. 2, pp. 177–84, 2002.
- [329] X. Zhang, F.-Y. Che, I. Berezniuk, K. Sonmez, L. Toll, and L. D. Fricker, "Peptidomics of *Cpe<sup>fat/fat</sup>* mouse brain regions: implications for neuropeptide processing," *J. Neurochem.*, vol. 107, no. 6, pp. 1596–1613, 2008.
- [330] J. F. Rehfeld, "The new biology of gastrointestinal hormones.," *Physiol. Rev.*, vol. 78, no. 4, pp. 1087–108, 1998.
- [331] W. I. Khan and J. E. Ghia, "Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation.," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 161, no. 1, pp. 19–27, 2010.
- [332] A. R. Gunawardene, B. M. Corfe, and C. A. Staton, "Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract.," *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 92, no. 4, pp. 219–31, 2011.
- [333] J. T. Brosnan and M. E. Brosnan, "Glutamate: a truly functional amino acid," *Amino Acids*, vol. 45, no. 3, pp. 413–418, 2013.