

# UNA NUEVA METALO CARBOXIPEPTIDASA Y UN NUEVO INHIBIDOR BIFUNCIONAL DE SERINO/METALO PROTEASAS AISLADOS DEL ANÉLIDO MARINO *SABELLASTERTE MAGNIFICA*: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

**Autoría principal:** Maday Alonso-del-Rivero Antigua

**Otros autores:** María de los Ángeles Chávez Planes, Mey Ling Reytor González, Gilberto Valdés, Julieta Delfín García, Joaquín Díaz Brito, Rossana García Fernández, Dagmara Díaz Díaz y Yamile González González

**Colaboradores:** Mónica Rodríguez de la Vega Otazo, Sebastián Alejandro Trejo, Francesc Xavier Avilés Puigvert y David Reverter

Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de la Habana (UH)

**Dra. Maday Alonso-del-Rivero Antigua (35%).** Participó en todas las etapas del diseño y del trabajo experimental que se presenta. La mayoría de los resultados asociados al inhibidor SmCI forman parte de su tesis de doctorado. Fue tutora de las dos tesis de maestría y los diplomas que avalan este premio. Participó en el diseño de los experimentos, discusión de los resultados, la escritura de la patente, y los artículos que avalan el premio.

**MSc Mey Ling Reytor Gonzalez. (20%).** Participó en la obtención por vía recombinante así como purificación del mutante no glicosilado SmCI N23A, su caracterización cinética (resultados que formaron parte de su tesis de maestría), la purificación y caracterización cinética de los bidominios, la obtención y purificación de los complejos SmCI/CPs para la obtención de la estructura cristalográfica. Escritura de artículos, y discusión de resultados.

**Dra. María de los Ángeles Chávez Planes (15%).** Asesoró el trabajo, participó en el diseño de algunos experimentos, tutoría de la tesis de doctorado que avala este premio la discusión de resultados y escritura y revisión de los artículos.

**Dra Julieta Delfín García (5%).** Participó en la purificación de la enzima SmCP, tutoría de la tesis de doctorado que avala este premio, discusión de los resultados y revisión de los artículos.

**Dr. Joaquin Diaz Brito (5%)** Participó en el diseño de algunos experimentos del trabajo, discusión de resultados y revisión de los artículos.

**Dra. Rossana García Fernández (5%).** Participó en la purificación y caracterización cinética del tercer dominio recombinante y los estudios de relación

estructura función de este dominio del inhibidor frente a serino proteasas. Estos resultados formaron parte de su tesis de maestría.

**Lic. Gilberto Valdés** (5%). Participó en la purificación y caracterización cinética del inhibidor tridominio recombinante. Resultados que formaron parte de su tesis de diploma.

**Dra. Yamile González González** (5%). Participó en la discusión de los resultados y en el diseño de algunos experimentos.

**Téc. Dagmara Díaz Díaz** (5%). Participó en la purificación de las proteínas naturales a partir de los extractos del cuerpo y la corona de tentáculos de *S. magnifica*.

## RESUMEN

Las metalocarboxipeptidasas (CPs) son enzimas que desempeñan importantes funciones en los seres vivos lo que ha motivado el estudio de estas enzimas y sus inhibidores. En el presente trabajo se detectan, purifican y caracterizan estructural y funcionalmente dos nuevas moléculas presentes en el anélido *Sabellastarte magnifica*, una metalo carboxipeptidasa (SmCP) presente en el cuerpo y un inhibidor bifuncional de serino/metalo carboxipeptidasa (SmCI) presente en la corona de tentáculos. La identificación de estas proteínas se realizó mediante la combinación de métodos cinéticos convencionales con métodos proteómicos como el *Intensity Fading* MALDI-TOF MS. Ambas moléculas presentan características funcionales novedosas que las destacan dentro de las familias de proteasas e inhibidores a las que pertenecen. **La enzima SmCP es una metalo CP de la familia M14A con masa molecular de 33.7 kDa, inhibida fuertemente por inhibidores típicos de CPs y representa la primera enzima descrita capaz de hidrolizar sustratos con aminoácidos hidrofóbicos y ácidos en el C terminal.** Por su parte, **SmCI es el primer inhibidor descrito en invertebrados marinos y el primer inhibidor bifuncional capaz de inhibir fuertemente a metalo CPs y proteasas serino como la tripsina y la elastasa pancreática.** La combinación de la degradación de Edman y la obtención de su cDNA (número de acceso GenBank: AM283480) permitió la obtención de su secuencia de aminoácidos (número de acceso UNIPROT: P84875). SmCI es una glicoproteína de 165 aminoácidos, con una masa molecular de 19.7 kDa y 9 puentes disulfuro, formada por tres dominios BPTI/Kunitz. **SmCI constituye la primera proteína BPTI/Kunitz capaz de inhibir CPs.** Se obtuvo el inhibidor recombinante y su forma no glicosilada (SmCI N23A) sobre expresados en *P. pastoris*, lo que permitió confirmar las características bifuncionales del inhibidor natural. Se obtuvieron además variantes recombinantes del inhibidor: los bidominios D1D2 y D2D3, así como el tercer dominio (SmCI D3) para abordar estudios de relación estructura-función. La caracterización cinética de estas moléculas indicó que la inhibición de carboxipeptidasas, no involucra el extremo carboxilo de la molécula y que el D1 juega un papel esencial en esta inhibición. **La estructura 3D del complejo SmCI N23A/hCPA4, demostró que SmCI presenta un mecanismo**

**novedoso no canónico de interacción con estas enzimas y que** inserta su extremo amino en el centro activo de la enzima a diferencia a lo descrito para los inhibidores clásicos de CPs. **En este trabajo se describe por primera vez la estructura 3D de una proteína tridominio de la familia BPTI/Kunitz.** Además, **se demuestra que se requiere la proteína tridominio para alcanzar la completa inhibición de CPA.** Los estudios cinéticos frente a proteasas serino revelaron que solo rSmCI-D3 y el bidominio D2D3 son capaces de inhibir a tripsina, sugiriendo el papel fundamental del D3 en esta inhibición y que la inhibición de elastasa pancreática está determinada solo por el primer dominio.

## COMUNICACIÓN CORTA

En los últimos años, se ha renovado e incrementado el interés en el estudio de las metalocarboxipeptidasas, fomentado fundamentalmente por la participación de estas enzimas no solo en procesos vitales de los organismos vivos como la digestión de los alimentos, sino también por su papel en otros procesos fisiológicos normales y patológicos, tales como el procesamiento de hormonas, los mecanismos de defensa, la fertilización, la carcinogénesis, la inflamación, la coagulación/fibrinólisis, entre otras [1]. Dentro de las enzimas con funciones no digestivas, se destacan por ejemplo, la CPB plasmática (TAFI, *Thrombin-activatable- fibrinolysis inhibitor*), la que participa en la regulación de la fibrinólisis, protegiendo al coágulo de la lisis por acción de la plasmina, por lo que sus inhibidores tienen potencialidades como agentes fibrinolíticos [1]. Otro ejemplo es la CPA4 humana que se sobre expresa en cáncer de próstata, por lo que representa un marcador importante de esta enfermedad [3]. El interés en la búsqueda de inhibidores naturales y sintéticos de las CPs se ha incrementado por la identificación de las nuevas carboxipeptidasas no digestivas de la subfamilia A/B. A diferencia de las endoproteinasas, sólo seis inhibidores naturales de CPs han sido informados [2]. Estos inhibidores son capaces de inhibir no solo las CPs digestivas, sino que inhiben las enzimas reguladoras miembros de esta subfamilia.

Los invertebrados marinos constituyen una fuente natural muy valiosa de compuestos bioactivos con actividades funcionales diversas, generalmente relacionadas con los mecanismos de defensa de estos organismos. Dentro de estas biomoléculas, los inhibidores de proteasas (IP) se han estudiado ampliamente, fundamentalmente, los inhibidores de serino proteasas. Muy pocas carboxipeptidasas se han purificado y caracterizado a partir de estos organismos y su función se ha relacionado con los procesos digestivos y el procesamiento de hormonas. Por otra parte, el incremento de las aplicaciones genómicas y los métodos proteómicos ha facilitado una visión mayor de las familias de enzimas y de inhibidores. Sin embargo, tales avances han sido limitados en los invertebrados. Nuestro país tiene una extraordinaria riqueza de la fauna marina, en particular de invertebrados, los que han sido utilizados por nuestro Grupo para la identificación de moléculas novedosas con características estructurales y funcionales excepcionales y múltiples aplicaciones. Teniendo en cuenta la importancia de las metalo CPs y sus inhibidores, se realizó un tamizaje amplio de

estas actividades en el que se seleccionó el anélido marino *Sabellastarte magnifica* como fuente de estos compuestos. El objetivo fundamental de este trabajo consistió en la **purificación y caracterización estructural y funcional de un inhibidor de unión fuerte de metalocarboxipeptidasa A, y una metalo CP a partir del anélido *S. magnifica*.**

A partir del extracto del cuerpo de este organismo se aisló una metalo CP denominada SmCP y en el extracto de la corona de tentáculos se identificó un nuevo inhibidor bifuncional de serino/metalos CPs. **Estas proteínas representan las dos primeras moléculas descritas para este organismo y constituyen proteínas modelos para los estudios de la relación estructura-función de este grupo de enzimas y sus inhibidores.** Sobre la base de la importancia de estas enzimas, el estudio de la relación de estructura función de este grupo de moléculas ha contribuido al conocimiento de esta familia de proteínas y ha proporcionado información importante para sus futuras aplicaciones biomédicas y biotecnológicas.

**La estrategia de identificación de ambas moléculas combinó la evaluación cinética con los métodos proteómicos como el *Intensity Fading* MALDI-TOF MS y la electroforesis bidimensional.** Esta estrategia novedosa permitió identificar en los extractos del cuerpo del anélido *S. magnifica* una enzima tipo CPA y un nuevo inhibidor de CPs en el extracto de la corona de tentáculos de este organismo. **En este trabajo y con el empleo de geles bidimensionales y técnicas de DIGE se pudo describir por primera vez, el proteoma de los extractos del cuerpo y de la corona de tentáculos de *S. magnifica*, lo que contribuyó al conocimiento de esta especie** (artículo: Alonso del Rivero *et al*, 2003; 2009; García Fernández *et al.*, 2009).

A partir del extracto de la corona de tentáculos de *S. magnifica* se obtuvo un inhibidor bifuncional de metalos CPs y serino proteasas denominado SmCI. La purificación de esta proteína se realizó mediante la combinación de la cromatografía de afinidad (matriz de CPA inmovilizada) y cromatografía en fase reversa (columnas C8). **La obtención de un soporte con CPA inmovilizada en Glioxil-agarosa por primera vez para metalo CP y el establecimiento de las condiciones de la cromatografía de afinidad permitieron diseñar un procedimiento sencillo, reproducible y eficiente con la optimización de tiempo y recursos para la purificación de SmCI a partir de su fuente natural, lo que ha constituido un aporte importante para otros grupos internacionales que trabajan con CPs y sus inhibidores** (tesis de doctorado Alonso del Rivero 2007).

SmCI es una glicoproteína de 19.69 kDa (determinado por espectrometría de masas) con 18 cisteínas formando 9 puentes disulfuro. La estructura primaria del inhibidor se obtuvo mediante la combinación de técnicas de química de proteínas (degradación automática de Edman, degradación proteolítica) y técnicas de biología molecular como la obtención de su cDNA (PCR y Nested-PCR con el

empleo de oligonucleótidos degenerados) (**número de acceso UNIPROT: P84875 y número de acceso del GenBank: AM283480**). Estas dos secuencias **constituyen las dos primeras descritas y anotadas para esta especie**. El análisis de la secuencia de aminoácidos mostró que SmCI está formado por tres dominios que pertenecen a la familia BPTI Kunitz del inhibidor de tripsina de páncreas bovino (BPTI) y una elevada homología con proteínas e inhibidores de proteasas que pertenecen a esta familia. Los resultados cinéticos y estructurales mostraron **que SmCI es un inhibidor bifuncional y de unión fuerte de metalo CPs A y de serino proteasas** como la tripsina de páncreas porcino y la elastasa pancreática porcina. **Representa, por tanto, la primera molécula BPTI/Kunitz y la primera proteína en general descrita, capaz de inhibir estos dos tipos de proteasas y por tanto, el primer inhibidor de este tipo identificado en la naturaleza**. En este trabajo se obtuvo este inhibidor y su forma no glicosilada (SmCI N23A) sobre expresadas en *Pichia pastoris*. Las características bifuncionales encontradas durante la caracterización cinética de las proteínas tridominio recombinantes confirman las propiedades encontradas para el inhibidor natural. De manera similar, se obtuvieron en *Pichia pastoris*, los dos bidominios recombinantes rSmCI D1-D2 y SmCI D2-D3, así como el tercer dominio de SmCI (SmCI-D3). De todas las formas recombinantes, solamente el bidominio D1-D2 retiene la actividad inhibidora de metalo CPA pero con menor fortaleza de inhibición, indicando que se necesita la proteína tridominio para lograr la completa inhibición de CP. Este resultado indicaba que **el mecanismo por el cual SmCI inhibe a CPA no involucra el extremo carboxilo de la molécula, lo que no coincide con los mecanismos descritos para los inhibidores clásicos de CPs y sugiere la contribución de los dominios Kunitz en el mecanismo de inhibición, no informado previamente para esta familia** (Alonso del Rivero *et al* 2012, tesis de doctorado Alonso del Rivero 2007, tesis de maestría García Fernández 2007, y Reytor 2010).

En este trabajo se aisló y purificó el complejo SmCI N23A/CPA4 humana en una relación 1:1, el que se utilizó para su cristalización y determinación de la estructura cristalográfica. Esta estructura reveló que SmCI presenta las características típicas de proteínas de la familia BPTI/Kunitz: una horquilla  $\beta$  central, una hélice  $\alpha$  hacia el extremo carboxilo, un porcentaje elevado de estructura al azar y un lazo expuesto hacia el extremo amino, donde se localiza el sitio reactivo (P1). Por tanto, en este trabajo **se describe por primera vez la estructura tridimensional de una proteína tridominio de la familia BPTI/Kunitz (PDB 4BD9)**. Este resultado constituye un importante aporte al conocimiento de esta familia, la que desempeña importantes funciones en todos los organismos vivos. La estructura del complejo SmCI N23A/hCPA4 confirmó la presencia de un **mecanismo novedoso no-canónico de interacción de este inhibidor con la metalo CPA4 humana, no descrito anteriormente para estas enzimas**. SmCI inserta su extremo amino en el centro activo de la CP y mantiene los mismos contactos observados para los inhibidores de CPs que realizan su inhibición mediante el extremo carboxilo. Estos resultados evidencian adaptaciones evolutivas de las especies para lograr una economía celular. La presencia de un

sitio secundario de interacción situado en el lazo de unión del D2-D3 de SmCI contribuye a la inhibición de las metalo CPs, lo que demuestra que los tres dominios son necesarios para la inhibición fuerte de estas enzimas. Estos resultados validan los resultados cinéticos obtenidos que explican la menor inhibición de CPs determinada para el bidominio D1-D2 y la necesidad de la contribución de la proteína tridominio para lograr la máxima inhibición de CPs (artículo: Alonso del Rivero *et al*, 2012, 2013).

Con relación a la inhibición de serino proteasas, los resultados cinéticos demuestran que **el tercer dominio recombinante es el principal responsable de la inhibición de tripsina**, lo que coincide con la presencia de Lys-Gly en el sitio reactivo. Sin embargo, el bidominio D1-D2 contribuye a la inhibición de tripsina, aunque con menor fortaleza, lo que se explica por la presencia de treonina con una cadena lateral ramificada en el sitio P1 del primer dominio, que determina una unión muy débil con el bolsillo de tripsina [4]. A ello se suma que el sitio P1' del dominio 2 contiene una valina que es un residuo voluminoso con una cadena lateral ramificada que ocasiona una cascada de alteraciones pequeñas en la interfaz tripsina/inhibidor [5]. Con relación a la inhibición de EPP, solamente el bidominio D1-D2 es capaz de inhibir esta enzima, demostrando el papel fundamental del residuo de treonina del primer dominio en la inhibición de esta enzima (Alonso del Rivero *et al*, 2012). **En la estructura del complejo SmCI N23A/CPA4 humana los lazos canónicos de inhibición para las serino proteasas quedan expuestos y ubicados en el lado opuesto de interacción con la CPA, lo que sugiere un posible escenario para la inhibición simultánea de estos dos tipos de enzimas** (Alonso del Rivero *et al* 2013).

Por otra parte y a partir del extracto del cuerpo del anélido *S. magnifica* se realizó la purificación hasta homogeneidad de una nueva metalocarboxipeptidasa, denominada SmCP, mediante la combinación de cromatografía de afinidad (con PCI inmovilizado) y cromatografía de Intercambio iónico. **SmCP es una proteasa de 33792 Da con un extremo amino y secuencias internas homólogas a metalo carboxipeptidasas que pertenece a la familia M14 y constituye la primera proteasa descrita para esta especie.** La enzima contiene un átomo de Zn por molécula de proteína, es activada por  $\text{Ca}^{2+}$  y drásticamente inhibida por agentes quelantes como la 1.10 ortofenantrolina, así como por exceso de  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  y moderadamente por el EDTA. SmCP es fuertemente inhibida por inhibidores específicos de CP como el ácido benzyl succínico y por inhibidores proteicos como el PCI (inhibidor de CP aislado de papa) y el LCI (inhibidor de CP aislado de sanguijuela), ambos con valores de  $K_i$  en el orden nanomolar. La enzima muestra una elevada eficiencia catalítica frente a sustratos sintéticos clásicos de metalo CP tipo A, principalmente aquellos con residuos hidrofóbicos en el C terminal, sin embargo es capaz de hidrolizar sustratos con residuos ácidos en el C terminal, no antes descrito para enzimas tipo CPA. Esta propiedad anteriormente descrita para CP tipo CPO, fue demostrada con el empleo de sustratos peptídicos y espectrometría de masa MALDI TOF. **En este trabajo se describe por primera vez una metalocarboxipeptidasa de la familia M14A con**

**amplia especificidad de sustrato, tanto de carboxipeptidasas tipo A, como de carboxipeptidasas tipo O (artículo: Alonso del Rivero *et al.*, 2009).**

**Referencias bibliográficas**

- (1) Vendrell J, Aviles FX and Fricker LD. (2004) Messerschmidt A, Bode W, Cygler M. Wiley and Sons, Ltd, Chichester; pp. 176-189
- (2) Arolas JL, Vendrell J, Aviles FX, Fricker LD. (2007) *Curr Pharm Des.* 13 (3):347-64.
- (3) Huang H.; Reed CP.; Zhang JS.; Shridhar V.; Wang L. and Smith DI. (1999) *Cancer research* 59: 2981-2988.
- (4) Krowarsch, D., Dadlez, M., Buczek, O., Krokoszynska, I., Smalas, A.O., and Otlewski, J. (1999) *J. Mol. Biol.*, 289, 175-186
- (5) Krowarsch, D., Zakrzewska, M., Smalas, A.O., Otlewski, J (2005) *Protein Peptide Letters* 12, 00-00.