

Proteólisis limitada

MODIFICACIONES PROTEICAS POSTRADUCCIONALES

1

Proteólisis Limitada

- Probablemente todas las proteínas maduras deben ser modificadas de esta manera, a todas debe removerse su metionina líder (o fMet), después de que emergen del ribosoma
- Muchas proteínas involucradas en una gama de procesos biológicos son sintetizadas como precursores inactivos, que son activados por proteólisis limitada

2

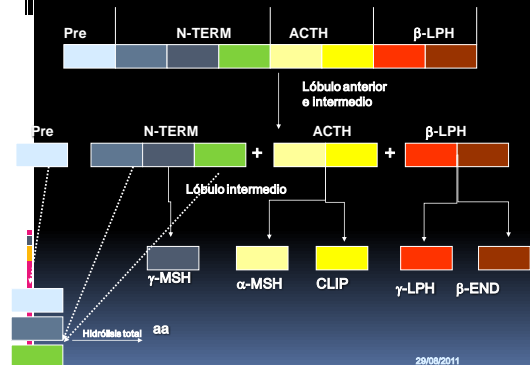
Proteólisis limitada

- **Precusores inactivos** → **Proteína funcional**
 - Por ejemplo:
 - **Tripsinógeno** → **Tripsina**
 - **Quimotripsinógeno** → **quimotripsina**
 - **Proinsulina(84 residuos)** → **Insulina (51 aa) + PepC**
- **POMC** → **ACTH + β-LPH**



3

Procesamiento de POMC



28/08/2011

4

Destino y recambio de proteínas

ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

5

Recambio proteico

- Recambio proteico supone la síntesis y degradación continuas de las proteínas, que llevan a que la concentración proteica total se mantenga estacionaria
- La degradación proteica lleva a la generación de péptidos funcionalmente inactivos en primera instancia, y a aminoácidos libres (500 g/día).
- Los aminoácidos se emplean en su mayoría para la síntesis de nuevas proteínas (4,00 g/día endógenos vs. 100 g/día ingeridos)

6

El recambio proteico es una forma de gastar energía sin sentido?

- Las proteínas sufren alteraciones que las convierten en **funcionalmente inactivas** y las "marcan" para la degradación
 - Oxidación
 - Proteólisis limitada
 - Desnaturalización

7

Degradación y recambio proteicos

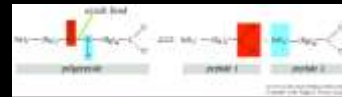
- Las proteínas tienen **vidas medias** muy variables
- La **vida media** ($t_{1/2}$) varía de **minutos a meses** dependiendo del tipo de proteína
 - $t_{1/2}$ promedio de las proteínas de la rata 1-2 días (variando entre 0.2 y 150 horas)
 - Hemoglobina humana ($t_{1/2}$ = 120 días)
 - Factores de la coagulación y hormonas polipeptídicas ($t_{1/2}$ = minutos a horas)
 - $t_{1/2}$ de muchas enzimas varía con las condiciones metabólicas de la células

8

Factores en la estructura proteica que afectan la vida media de las proteínas

- La **regla N-terminal**: En promedio, la **vida media** de una proteína se relaciona con el **residuo N-terminal**.
 - Proteínas con Met, Ser, Ala, Thr, Val, o Gly en la posición N-terminal tienen $t_{1/2}$ **mayores a 20 hrs.**
 - Proteínas con Phe, Leu, Asp, Lys, o Arg en N-terminal tienen $t_{1/2}$ **de 3 min. o menos.**
- Secuencias PEST**
 - presentes en proteínas con $t_{1/2}$ **menores de 2 hrs.**
 - formadas por secuencias de 12-60 residuos de largo
 - ricas en Pro, Glu, Ser y Thr

9



Nombre recomendado en 1984 por la *Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB)*

PEPTIDASAS

10

Peptidasas

- Son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de los péptidos y proteínas
- Son hidrolasas dado que usan una molécula de agua
- Pueden romper enlaces peptídicos específicos = Proteólisis limitada (ej.)
- En el caso de la digestión y la degradación proteica esto es inespecífico y el resultado final buscado es la degradación total

11

Funciones de la peptidasas

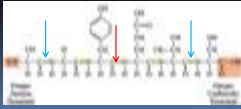
- Recambio proteico
- Digestión
- Coagulación sanguínea y fibrinólisis
- Apoptosis
- Procesamiento de hormonas peptídicas
- Procesamiento de antígenos

12

Clasificación de peptidasas

Según el sitio de corte

- Endopeptidasas
- Exopeptidasas



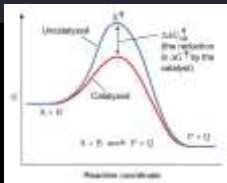
Según el mecanismo catalítico

- Catálisis ácido-base
 - Peptidasas de Asp
 - Metalopeptidasas
- Catálisis covalente
 - Peptidasas de Ser
 - Peptidasas de Cys
 - Peptidasas de Thr

13

MECANISMO CATALÍTICO

14

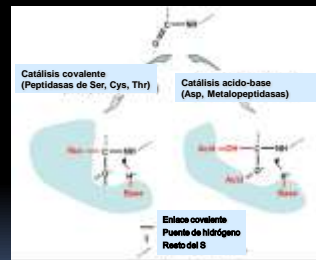


- Aumentan la velocidad de hidrólisis porque **aceleran la formación del estado de transición**

- Actúan mediante la formación de un **intermediario tetraédrico** entre la enzima y el sustrato.
- Convierten el carbono trigonal muy estable y difícil de atacar en uno **tetraédrico** mucho más inestable.

15

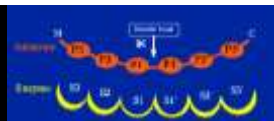
Mecanismo catalítico general



- Catálisis ácido-base
 - Peptidasas de Asp
 - Metalopeptidasas
- Catálisis covalente
 - Peptidasas de Serina
 - Peptidasas de Cys
 - Peptidasas de Thr

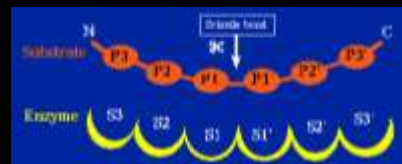
16

Los subsitios en las peptidasas



- La nomenclatura para describir los subsitios en las peptidasas se introdujo en 1967 por Schechter y Berger.
- En este sistema, se considera que los residuos aminoácidos del sustrato se unen a la enzima en subsitios del sitio activo
- Los subsitios en la peptidasas se denominan S (por subsitios) y los residuos aminoácidos en el sustrato P (por péptido).

17



- Por convención el enlace a ser cortado se encuentra entre P₁ y P₁'.
- Los residuos hacia el extremo N-terminal del sustrato se numeran P₁, P₂, P₃, ..., P_n, y hacia el extremo C-terminal P₁', P₂', P₃', ..., P_n'.

18

Enzimas digestivas como ej.

- Quimotripsina corta enlaces peptídicos donde el carbonilo del enlace peptídico (P₁) pertenece a grupos aromáticos grandes (Phe, Trp y Tyr), a los que acomoda en un bolsillo hidrofóbico.
- Tripsina es específica para aminoácidos cargado positivamente (Arg y Lys), los cuales se acomodan en un bolsillo que contiene un Asp, cargado negativamente.
- Esto le confiere **ESPECIFICIDAD** a la unión

19

Regulación de la actividad



- Estas enzimas se sintetizan como **zimógenos** inactivos y se activan por proteólisis limitada
- Son inactivadas por inhibidores
 - Serpinas (Ser-pep.)
 - IAPs (caspasas)
 - TIMPs (Metalopep.)
 - Cistatinas (catepsinas)

20

CATÁLISIS ÁCIDO-BASE

PEPTIDASAS DE ASPARTATO

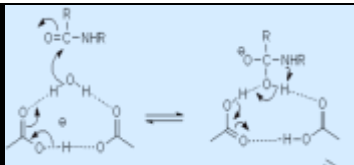
21

Peptidasas de Aspartato

- Se incluyen en este grupo
 - La enzima gástrica **pepsina**
 - algunas peptidasas encontradas en los **lisosomas**
 - La enzima renal **renina**
 - La proteasa de **HIV**
- **Dos residuos de Asp** del sitio catalítico participan en la catálisis **ácido/base**.

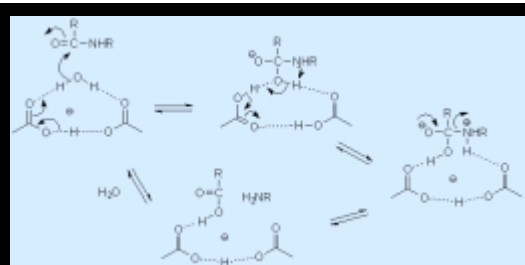
22

Mecanismo catalítico



- En la reacción inicial, uno de los Asp acepta un protón de una molécula de agua presente en el sitio activo.
- El oxígeno del hidroxilo generado ataca al carbono del carbonilo del enlace peptídico de la proteína sustrato, formándose el **intermediario tetraédrico**.
- **No se forma enlace covalente E-S.**

23

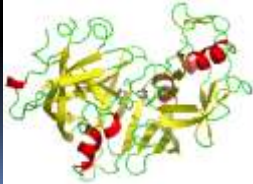


- El grupo amino recibe el protón del hidroxilo atacante (que se encontraba unido al otro Asp) y el enlace peptídico se rompe.
- Finalmente se liberan ambos productos, y reingresa una molécula de agua al sitio activo reconstituyéndose el estado inicial de la enzima.

24

Renina es una peptidasa de Asp

- Renina se produce en el riñón en respuesta a una disminución de la PA
- Transforma Angiotensinógeno en Angiotensina I



25

CATÁLISIS ÁCIDO-BASE

METALO PEPTIDASAS

26

Metalo peptidasas

- Representan uno de los tipos más antiguos de peptidasas
 - Se encuentran en procariotas y eucariotas
- Difieren entre sí en la secuencia y en la estructura, pero la mayoría contienen un átomo de **Zn** catalíticamente activo
 - En algunos casos, en lugar de Zn presentan Co o Ni.
- Varias enzimas contienen la secuencia HEXXH,
 - 2 residuos de His se asocian con el Zn
 - El tercer ligando del Zn es Glu (termolisina, neprilisina, alanil aminopeptidasa) o His (astacina).

27

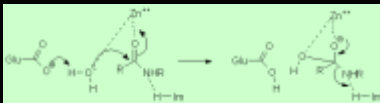
Peptidasas de zinc

- Las peptidasas de Zn, como las otras peptidasas que examinamos, se sintetizan como **zimógenos**, estas presentan un gran segmento peptídico bloqueando el sitio catalítico.
- En las carboxipeptidasas, el segmento de activación está formado por 95-99 residuos; en la termolisina, está formado por varios cientos de residuos.
- En el caso de las carboxipeptidasas, el segmento de activación tiene actividad tipo chaperonina, facilitando el plegamiento de la proteína y confiriéndole estabilidad ante cambios de temperatura.

28

Mecanismo catalítico de peptidasas de Zn

- Durante la catálisis el Zn^{2+} promueve el ataque nucleofílico por parte del oxígeno del agua sobre el carbono carbonílico del sustrato.

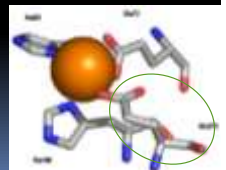
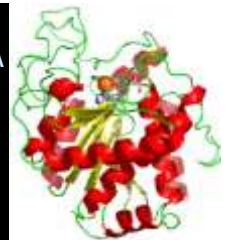


- Una base en el sitio activo (un Glu en la Carboxipeptidasa) facilita esta reacción al extraer un protón de la molécula de agua atacante.
- La proteína a ser cortada nunca se une a la enzima, es decir que no se forma ningún intermediario acil-enzima

29

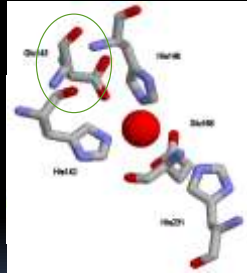
Carboxi Peptidasa A

- El zinc se ubica en el fondo de un bolsillo abierto hacia la superficie de la enzima.
 - Coordina con Glu72, His69, y His196
 - El cuarto ligando probablemente sea una molécula de agua.
- El residuo catalítico clave es el Glu270
- Es una **exopeptidasa**, hidroliza aminoácidos C-terminales
- Es específica para aminoácidos aromáticos



Termolisina

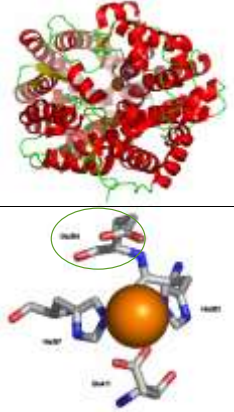
- Es un endopeptidasa
- No es homóloga a la carboxipeptidasa A, y tiene un sitio catalítico mucho más expuesto
- EL Zn²⁺ está unido a His142, His146, y Glu166
- El residuo catalítico crítico es el Glu143



31

Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

- Glu384 es el residuo catalítico
- Remueve dos residuos aminoacídicos de la angiotensina I, convirtiéndola en angiotensina II
- La ECA es el blanco principal de los fármacos antihipertensivos.
- En la corteza adrenal la angiotensina II estimula la producción de la hormona esteroidea aldosterona



CATALISIS COVALENTE

PEPTIDASAS DE SERINA

33

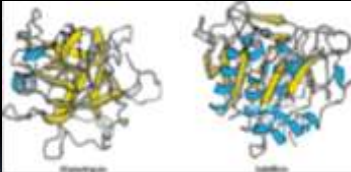
Peptidasas de Serina

- Se caracterizan por presentar un residuo de serina en el sitio activo, que forma parte de la **tríada catalítica** constituida por la Ser, más una His y un Asp
- Se agrupan en:
 - similares a quimotripsina
 - similares a subtilisina
- Las serpinas son inhibidores de las peptidasas de Ser.
 - inhibidor del activador de plasminógeno
 - Alfa 1-antitripsina
 - antitrombina
 - alfa 1-antiquimotripsina

35

Evolución convergente ha generado dos tipos de peptidasas de serina

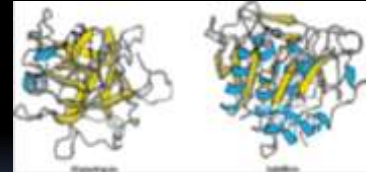
- La superfamilia de la quimotripsina (eucariotas)
 - Tripsina
 - quimotripsina
 - Elastasa
 - Trombina
- La superfamilia de subtilisina (procariontas)



36

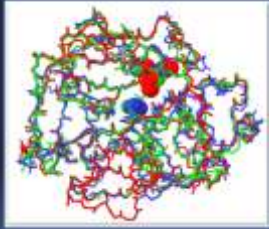
Evolucion convergente ha generado dos tipos de peptidasas de serina

- A pesar de que la secuencia aminoacídica y la estructura es muy diferente ambas familias presentan el mismo mecanismo catalítico con la misma tríada



37

Evolución divergente generó las 3 peptidasas de Ser digestivas



Superposición de **Quimotripsina** (rojo), **Tripsina** (verde) y **Elastasa** (azul). Los residuos catalíticos (Asp102, His57, y Ser195) son prácticamente indistinguibles entre sí, debido a la casi idéntica superposición de los sitios catalíticos. La homología en la estructura primaria es del 40%.

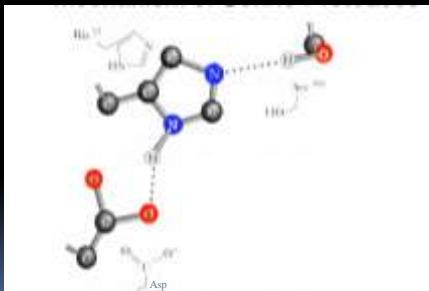
38

MECANISMO CATALÍTICO DE LAS PEPTIDASAS DE SERINA

- El sitio activo está constituido por:
 - serina (Ser195),
 - aspartato (Asp102)
 - una histidina (His57)
- Estos aminoácidos constituyen la tríada catalítica

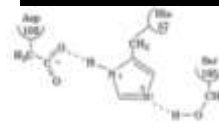
39

La tríada catalítica



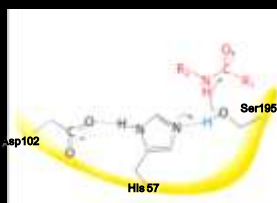
40

La tríada catalítica



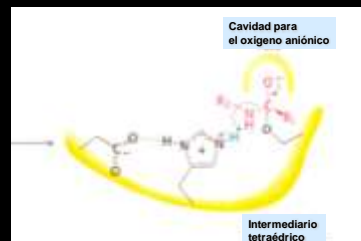
- El par de electrones sobre el nitrógeno del imidazol de la **histidina 57** tiene la habilidad de aceptar el H del grupo -OH de la Ser, coordinando el ataque al enlace peptídico.
- Este par de electrones es mucho más electronegativo por el tironeamiento del H unido al N1 del anillo imidazólico por el grupo carboxilo del **Asp 102**.
- El grupo OH de la Serina 195** actúa como nucleófilo, atacando el carbono carbonilo del enlace peptídico del sustrato.

41



- En el primer paso de la catálisis la His57 remueve un protón del -OH de la Ser195
- El oxígeno de la Ser realiza un **ataque nucleofílico** sobre el carbonilo del enlace peptídico a ser hidrolizado

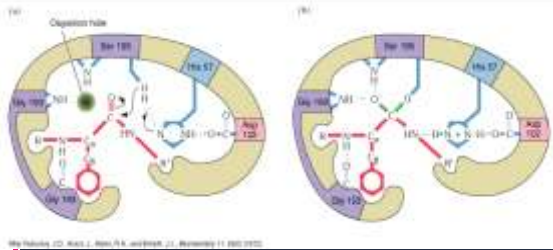
42



El doble enlace del carbonilo del sustrato se pierde, formándose un **intermediario tetraédrico**, unido covalentemente a la enzima.

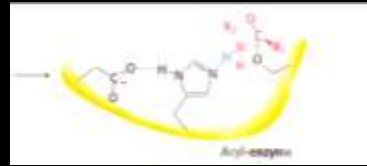
43

La catálisis en las peptidasas de Ser es COVALENTE



El corrimiento de la carga negativa sobre el oxígeno del carbonilo del sustrato es favorecido por su interacción con los grupos imino de la Gly 193 y la Ser 195 de la cadena principal de la enzima que forman una cavidad, el "oxyanion hole".

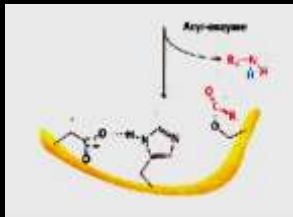
44



La formación del intermediario tetraédrico debilita el enlace C-N del péptido, produciéndose:

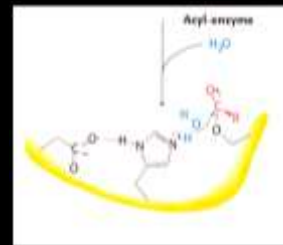
- La ruptura del enlace peptídico
- La reconstrucción del doble enlace del carbonilo
- Formación de los dos productos finales que permanecen unidos a la enzima.

45



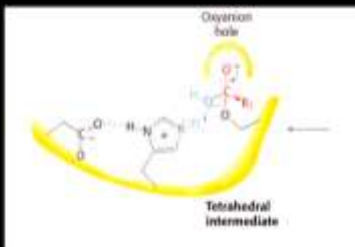
- El siguiente paso consiste en la expulsión del grupo saliente (proteína con un extremo N-terminal nuevo).
- El otro péptido permanece unido a la E formando la "acil-enzima", que ahora se encuentra unido mediante enlace éster a la Ser195.

46



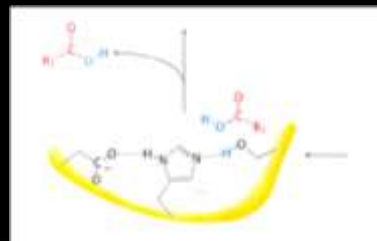
Para hidrolizar el enlace éster se introduce una molécula de agua que actúa como **nucleófilo**, atacando el carbonilo

47



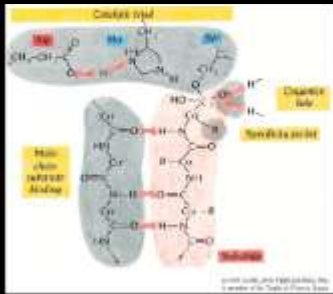
Generando un nuevo intermediario tetraédrico que debilita la unión ES

48



Lo que lleva a la liberación del segundo producto, el péptido portador del extremo C-terminal nuevo y a la regeneración de la enzima nativa

49



No sólo la presencia de la triada catalítica y la formación del "oxyanion hole" son necesarios para la catálisis, la enzima debe ser capaz de acomodar este gran sustrato

60

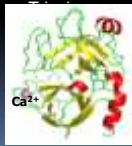
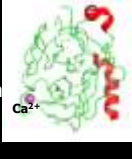
LAS SER-PEPTIDASAS INTESTINALES

61

Activación de Tripsinógeno

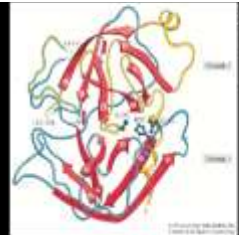
- Catalizada por enteropeptidasa (producida por las células del epitelio intestinal) y tripsina
- Las diferencias en la estructura primaria de tripsinógeno y tripsina son menores
 - Sólo pierde 6 aminoácidos del extremo N-terminal
- La estructura tridimensional se ve drásticamente afectada, la enzima activa es rica en hojas plegadas β , pero no el tripsinógeno.

Tripsinógeno



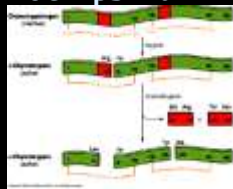
Quimotripsina

- Formada por 241 aa en 3 subunidades unidas por puentes disulfuro
 - A 13 aa
 - B 131 aa
 - C 97aa
- Con dos dominios formados por barriles β antiparalelos
 - En el dominio 1 se encuentran la H57 y D102
 - S195 se encuentra en el dominio 2



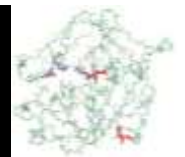
Activación de Quimotripsina

- Catalizada por tripsina
- La cadena es cortada
 - entre los residuos 13 y 14
 - entre los residuos 15 y 16
 - entre los residuos 146 y 147
 - entre los residuos 148 y 149.
- Esto resulta en la liberación de dos dipéptidos, generándose dos cortes en la cadena principal.
- El segmento 1-13 se retiene como parte de la enzima activa, unido por un puente disulfuro.



Activación de Quimotripsinógeno

- En la activación Ile116 se aproxima a Asp194, provocando su desplazamiento y la apertura del sitio catalítico



Quimotripsinógeno



Quimotripsina

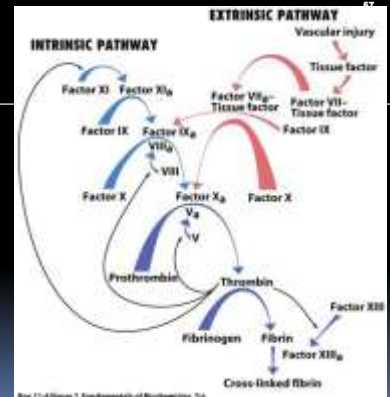
Elastasa

Proelastasa contiene un segmento de 12 residuos en el extremo N-terminal que es cortado durante la activación pero retenido por un puente disulfuro entre la Cys N-terminal y la Cys125

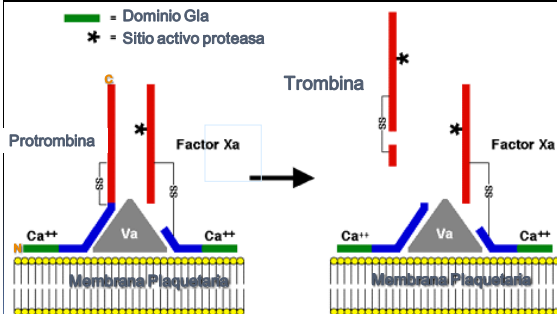
El nuevo residuo N-terminal, Val16, forma un puente salino con el Asp194, como la Ile N-terminal en quimotripsina.



Coagulación



Complejo de activación de Protrombina (Protrombinasa)



Complejo trombina-fibrinógeno



CATALISIS COVALENTE

PEPTIDASAS DE CISTEÍNA

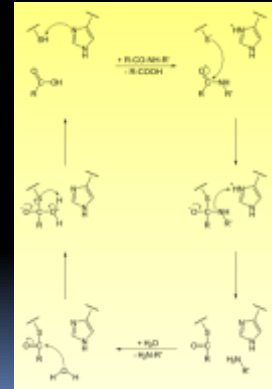
- Presentan una Cys esencial para la actividad
- Pertenecen a esta familia
 - Las proteasas de vegetales:
 - Papaina (papaya)
 - Actinidina (kiwi)
 - Bromelaina (anana)
 - Ficina (higos)
 - De mamíferos:
 - las catepsinas lisosomales
 - caspasas (apoptosis)
 - las calpains
 - Parasitarias
 - cruzipaina de *Trypanosoma cruzi*

Mecanismo catalítico

- La catálisis procede mediante la formación de un intermediario **covalente** e involucra a un residuo de **Cys** y a uno de **His**, que junto con una **Asn** forman la **tríada catalítica**.
- El tiolato actúa como nucleófilo, siendo estabilizado por la formación de un par iónico con el grupo imidazol de la His.
- El nucleófilo atacante es el par iónico tiolato-imidazol en los dos pasos de la catálisis, no requiriéndose una molécula de agua.

62

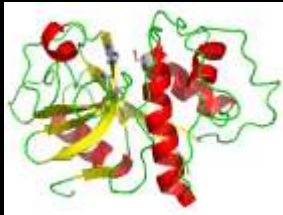
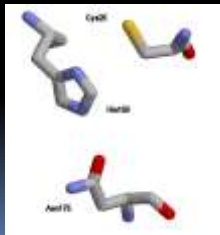
- La molécula de agua entra más tarde para formar el intermediario tetraédrico con el péptido que saldrá como segundo producto.



63

Papaína

- Cys 25, His 159 y Asn 175** forman la tríada catalítica



64

Calpains

- También son una gran familia de peptidasas.
- Función incierta, se considera que contribuyen a:
 - Transducción de señales
 - Apoptosis
 - Regulación de la señalización celular
 - Reorganización del citoesqueleto
 - Algunas formas de distrofia muscular
- Presentan los mismos residuos catalíticos que las otras proteasas de cisteína (Cys, His, Asn)
- A diferencia del resto, las calpains **se activan por unión a Ca²⁺**, seguida por el auto-clivaje de un fragmento N-terminal.
- Las dos enzimas más estudiadas son μ - y m -calpains.
 - Su nombre deriva de las concentraciones de Ca²⁺ requerida para activarlas: μ M en un caso y mM en el otro
 - Bajo condiciones normales ambas son inactivas dado que la concentración de Ca²⁺ se encuentra por debajo de esos niveles.



65

Catepsinas

- Son enzimas lisosomales
- El sitio catalítico se localiza en una grieta profunda, y los residuos catalíticos son **Cys, His, y Asn**, como en papaína
- Concentración anormalmente alta en tumores
 - catepsina B se usa como **marcador para cáncer de mama**
- Función no del todo conocida
 - Procesamiento de proenzimas y prohormonas
 - Reconstrucción del Cartilago
 - Reconstrucción ósea
 - Catepsina K
 - (carencia = picnidosostosis o enfermedad de Toulouse Lautrec)

Catepsina B de rata



66



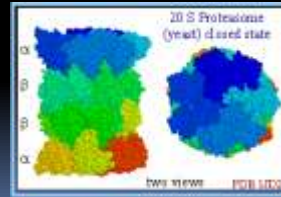
CATÁLISIS COVALENTE

PEPTIDASAS DE TREONINA

68

Peptidasas de Treonina

- A esta clase pertenecen las hidrolasas del proteasoma y las veremos en detalle con las peptidasas intracelulares



69



70