

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

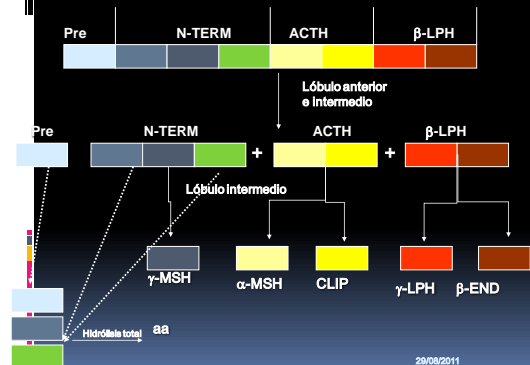
## Proteólisis limitada

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



3

## Procesamiento de POMC



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

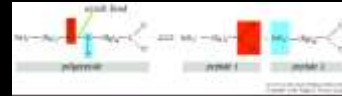
- Las proteínas tienen **vidas medias** muy variables
- La **vida media** ( $t_{1/2}$ ) varía de **minutos a meses** dependiendo del tipo de proteína
  - $t_{1/2}$  promedio de las proteínas de la rata 1-2 días (variando entre 0.2 y 150 horas)
  - Hemoglobina humana ( $t_{1/2}$  = 120 días)
  - Factores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

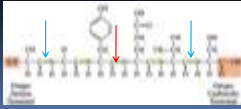
- Recambio proteico
- Digestión
- Coagulación sanguínea y fibrinólisis
- Apoptosis
- Procesamiento de hormonas peptídicas
- Procesamiento de antígenos

12

## Clasificación de peptidasas

### Según el sitio de corte

- Endopeptidasas
- Exopeptidasas



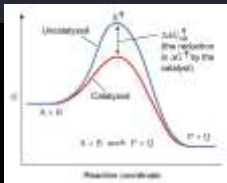
### Según el mecanismo catalítico

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

13

## MECANISMO CATALÍTICO

14

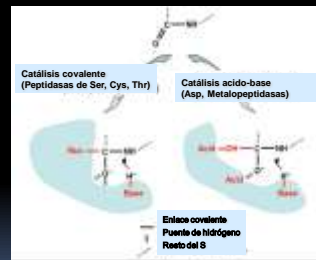


- Actúan mediante la formación de un **intermediario tetraédrico** entre la enzima y el sustrato.
- Convierten el carbono trigonal muy estable y difícil de atacar en uno **tetraédrico** mucho más inestable.

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

15

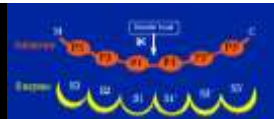
## Mecanismo catalítico general



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

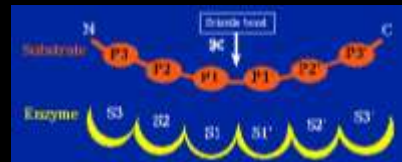
16

## 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 P<sub>1</sub> y P<sub>1</sub>'.
- Los residuos hacia el extremo N-terminal del sustrato se numeran P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, .....P<sub>n</sub>, y hacia el extremo C-terminal P<sub>1</sub>', P<sub>2</sub>', P<sub>3</sub>', .....P<sub>n</sub>'.

18

## Enzimas digestivas como ej.

- Quimotripsina corta enlaces peptídicos donde el carbonilo del enlace peptídico (P<sub>1</sub>) 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

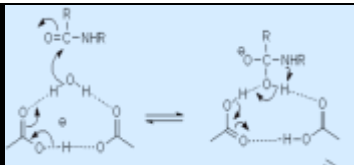
21

## 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**.

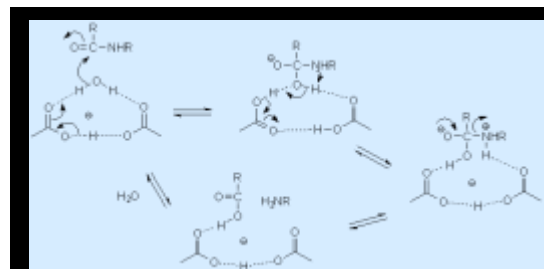
22

## 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

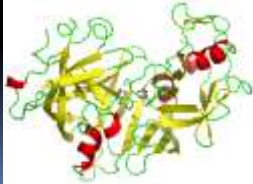


- El grupo amino recibe el protón del hidroxilo atacante (que se encontraba unido al otro Asp) y el enlace peptídico se rompe.
- Finalmente se liberan ambos productos, y reingresa una molécula de agua al sitio activo reconstituyéndose el estado inicial de la enzima.

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

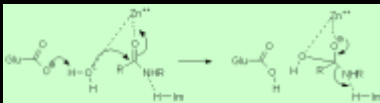
## Peptidasas de zinc

- 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.

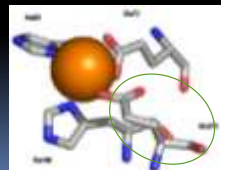
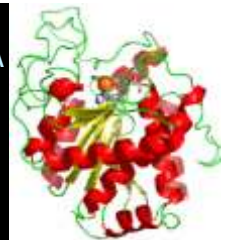


- Una base en el sitio activo (un Glu en la Carboxipeptidasa) facilita esta reacción al extraer un protón de la molécula de agua atacante.
- La proteína a ser cortada nunca se une a la enzima, es decir que no se forma ningún intermediario acil-enzima

29

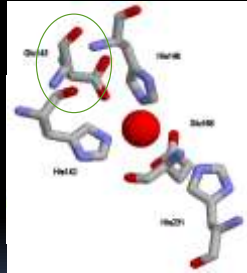
## Carboxi Peptidasa A

- 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

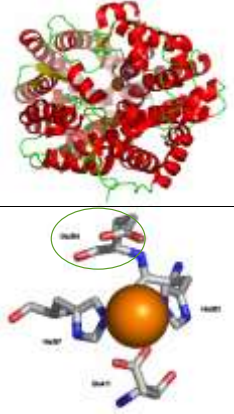
- Es un endopeptidasa
- No es homóloga a la carboxipeptidasa A, y tiene un sitio catalítico mucho más expuesto
- EL Zn<sup>2+</sup> está unido a His142, His146, y Glu166
- El residuo catalítico crítico es el Glu143



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

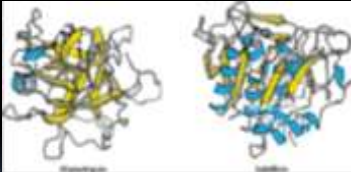
## Peptidasas de Serina

- 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

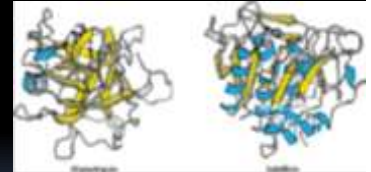
- La superfamilia de la quimotripsina (eucariotas)
  - Tripsina
  - quimotripsina
  - Elastasa
  - Trombina
- La superfamilia de subtilisina (procariotas)



36

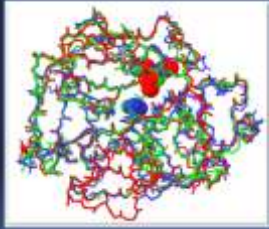
## Evolucion convergente ha generado dos tipos de peptidasas de serina

- 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%.

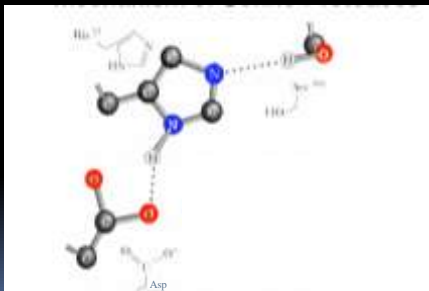
38

## 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

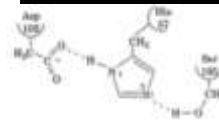
39

## La tríada catalítica



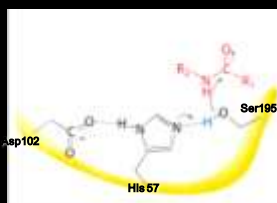
40

## La tríada catalítica



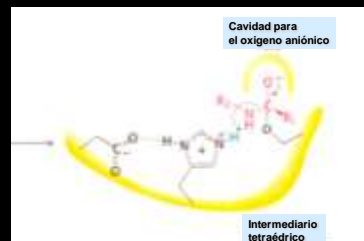
- El par de electrones sobre el nitrógeno del imidazol de la **histidina 57** tiene la habilidad de aceptar el H del grupo -OH de la Ser, coordinando el ataque al enlace peptídico.
- Este par de electrones es mucho más electronegativo por el tironeamiento del H unido al N1 del anillo imidazólico por 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

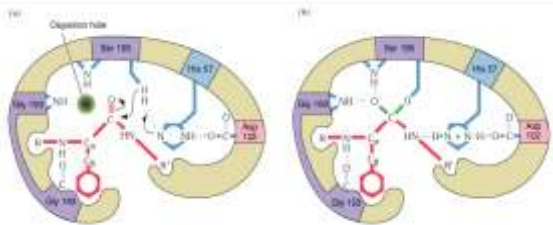
42



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

43

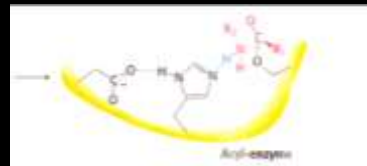
## La catálisis en las peptidasas de Ser es COVALENTE



Wu, Yuhua; Li, Anqi; Zhou, P.; and Shen, J. *Proteomics* 11: 1002-1010 (2011)

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".

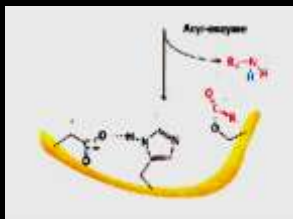
44



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

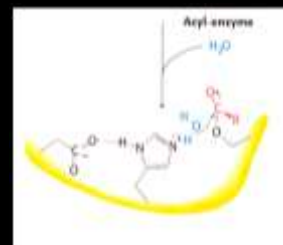
- La ruptura del enlace peptídico
- La reconstrucción del doble enlace del carbonilo
- Formación de los dos productos finales que permanecen unidos a la enzima.

45



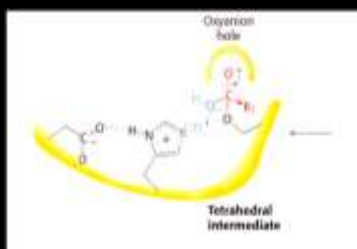
- El siguiente paso consiste en la expulsión del grupo saliente (proteína con un extremo N-terminal nuevo).
- El otro péptido permanece unido a la E formando la "acil-enzima", que ahora se encuentra unido mediante enlace éster a la Ser195.

46



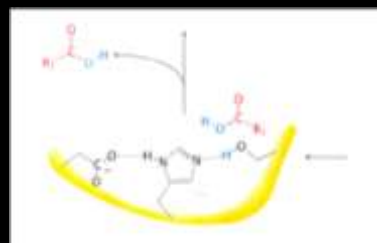
Para hidrolizar el enlace éster se introduce una molécula de agua que actúa como **nucleófilo**, atacando el carbonilo

47



Generando un nuevo intermediario tetraédrico que debilita la unión ES

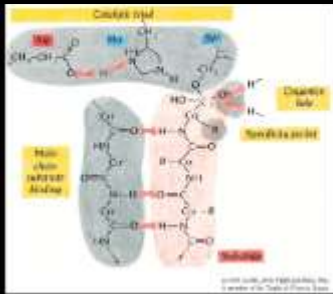
48



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

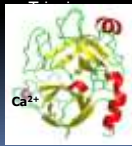
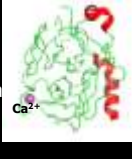
## LAS SER-PEPTIDASAS INTESTINALES

61

### Activación de Tripsinógeno

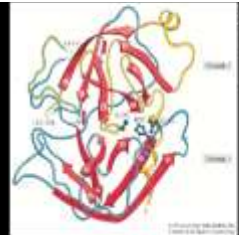
- Catalizada por enteropeptidasa (producida por las células del epitelio intestinal) y tripsina
- Las diferencias en la estructura primaria de tripsinógeno y tripsina son menores
  - Sólo pierde 6 aminoácidos del extremo N-terminal
- La estructura tridimensional se ve drásticamente afectada, la enzima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

#### Tripsinógeno



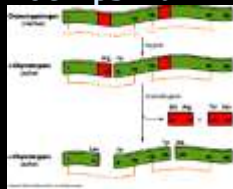
### Quimotripsina

- 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  $\beta$  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

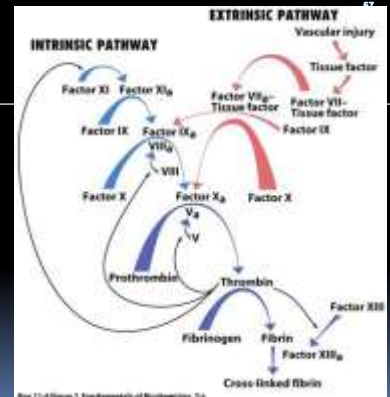
## Elastasa

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

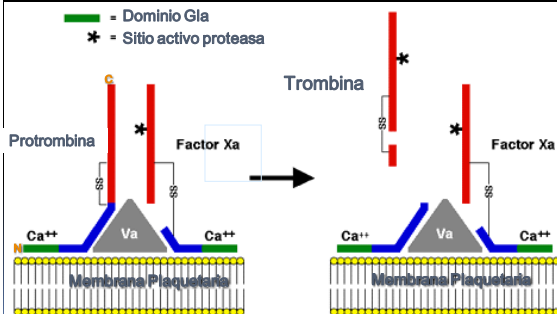
El nuevo residuo N-terminal, Val16, forma un puente salino con el Asp194, como la Ile N-terminal en quimotripsina.



Coagulación



## Complejo de activación de Protrombina (Protrombinasa)



## Complejo trombina-fibrinógeno



CATALISIS COVALENTE

## PEPTIDASAS DE CISTEÍNA

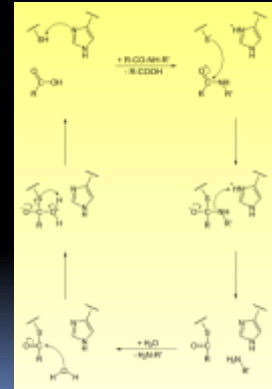
- Presentan una Cys esencial para la actividad
- Pertenecen a esta familia
  - Las proteasas de vegetales:
    - Papaina (papaya)
    - Actinidina (kiwi)
    - Bromelaina (anana)
    - Ficina (higos)
  - De mamíferos:
    - las catepsinas lisosomales
    - caspasas (apoptosis)
    - las calpains
  -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

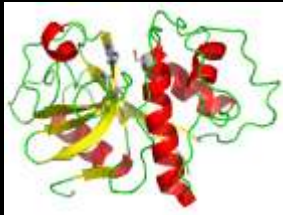
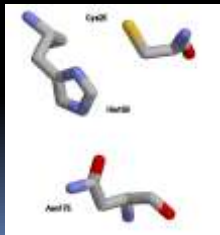
- La molécula de agua entra más tarde para formar el intermediario tetraédrico con el péptido que saldrá como segundo producto.



63

## Papaina

- 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 Ca<sup>2+</sup>**, seguida por el auto-clivaje de un fragmento N-terminal.
- Las dos enzimas más estudiadas son  $\mu$ - y  $m$ -calpains.
  - Su nombre deriva de las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> requerida para activarlas:  $\mu$ M en un caso y mM en el otro
  - Bajo condiciones normales ambas son inactivas dado que la concentración de Ca<sup>2+</sup> 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 papaina
- 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



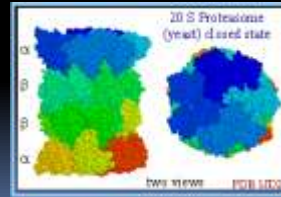
CATÁLISIS COVALENTE

## 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