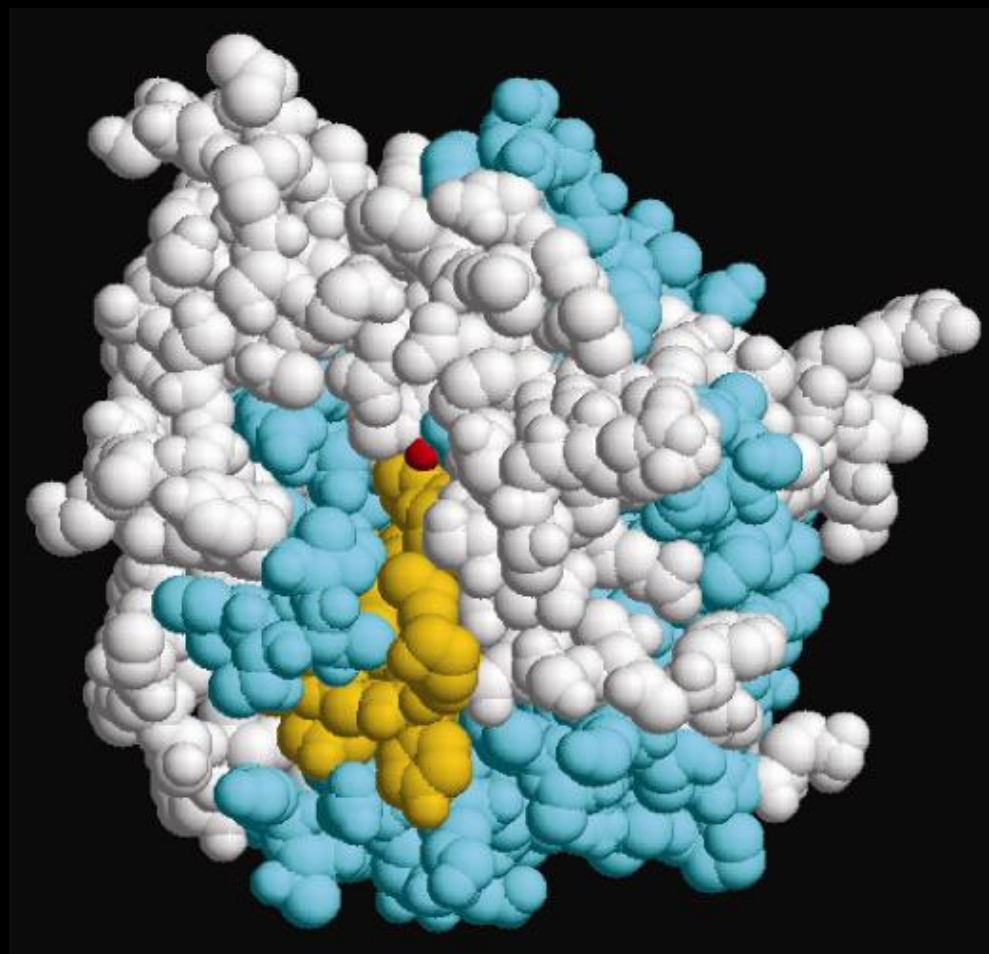


CARBOXYPEPTIDASES I INHIBIDORS



Empar Crespo, Sílvia Fernàndez, Fernando
Marqués, Núria Murtra, Eva Pla.

INTRODUCCIÓ CARBOXIPEPTIDASES

- enzims amb funció proteasa d'ALTA ESPECIFICITAT.
- FAMÍLIES PROTEASES:
 - serin- : tripsina, quimiotripsina
 - cistein- : tiolproteases
 - aspartat- : pepsina
 - metalo- : CPA1 humana (M14) → exopeptidasa

DIFERENTS CLASSIFICACIONS DE M14

- Segons especificitat per al substrat:

- CP A-like: preferència de residus Ct hidrofòbics
 - A1 : preferència per alifàtics
 - A2 : preferència per aromàtics
- CP B-like: escindeixen formes bàsiques (Lys, Arg)

- Segons estructura i homologia de seqüència:

- CP A : domini enzimàtic de 310 residus
- CP E : domini enzimàtic més gran de 310 residus

dins de cada subfamília hi ha 40% identitat i entre subfamílies 15-20%

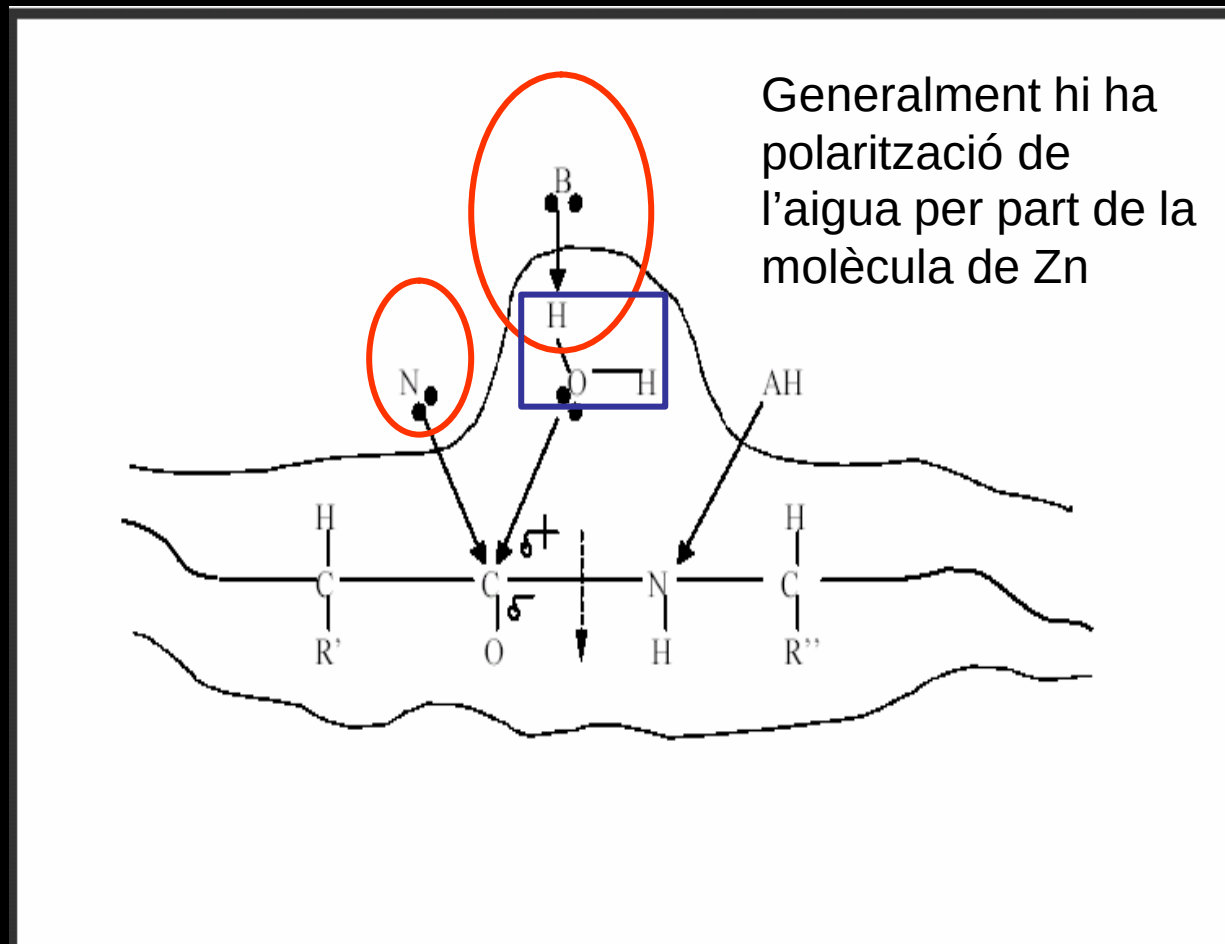
- Segons funcions fisiològiques:

- CP pancreàtiques: enzimàtiques (A1, A2 i B)
- CP reguladores: diferents funcions

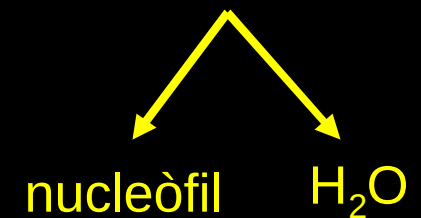
CP	Funció
A- mastòcits **	Hidrolitza proteïnes en resposta de mastòcits
CP U **	Inhibidor de fibrolisis activable per trombina
CP N	Protegix de pèptids de potent acció (anafilotoxines i quinines)

**** CP pancreàtiques-like: 40% d'identitat amb pancreàtiques i úniques sintetitzades amb propèptid de la mateixa mida que les pancreàtiques**

Mecanisme d'acció : ATAC NUCLEOFÍLIC

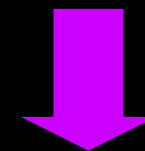


- **Possibilitats:**



- **Desestabilitza enllaç**

- **Pas d'electrons a N**



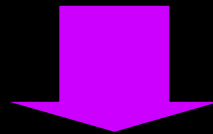
TRENCAMENT ENLLAÇ

PROCARBOXYPEPTIDASES

CP sintetitzades com a precursors (zimògens) :

CP + PROSEGMENT

- Prosegments: 94-96 residus (**UNIÓ COVALENT**)
- Formació de complexos mono o oligomèrics (segons espècies)
- Activació de procarboxipeptidasa per tripsina

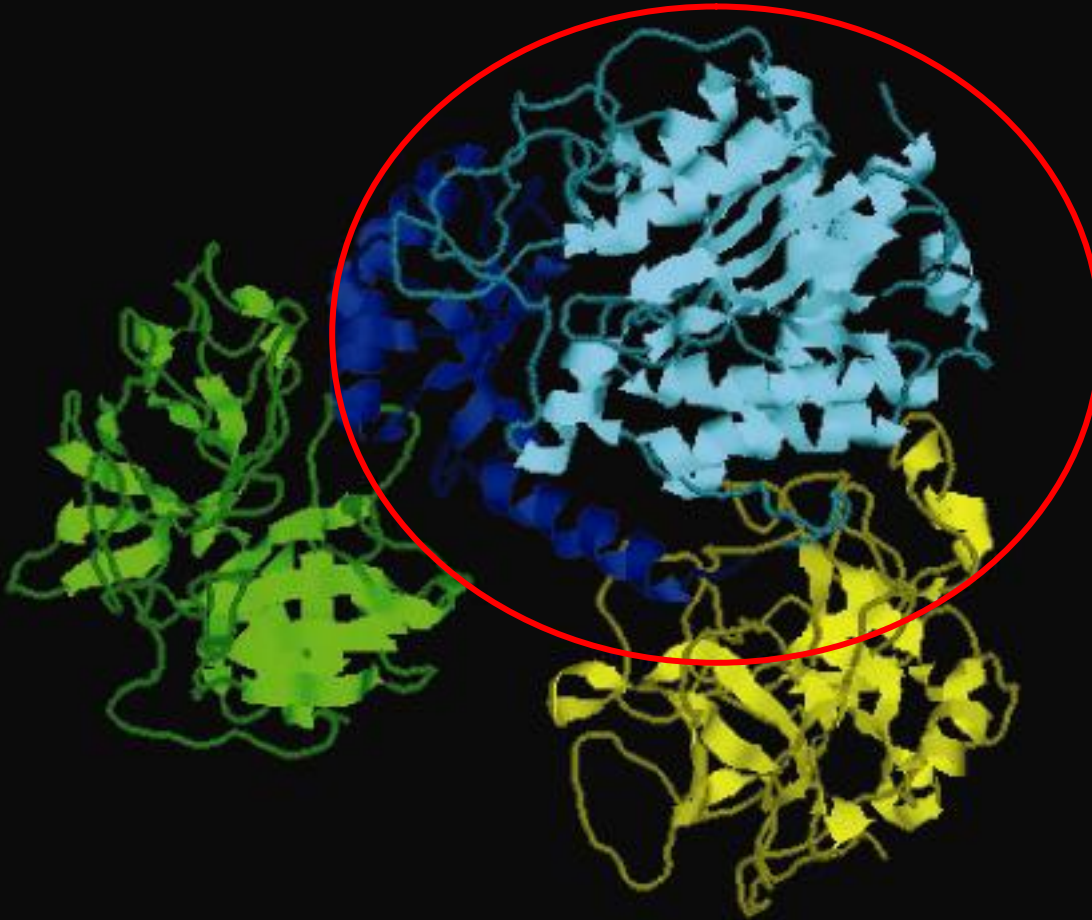


MECANISME D'AUTOREGULACIÓ DE LA FUNCIO
en espai i temps

PROCARBOXYPEPTIDASA A - BOVINA



Complex ternari:



Verd: proproteinasa E
Blau fosc : prosegment
Blau clar: CPA bovina
Groga : quimiotripsinògen

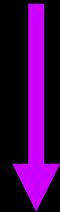
Complex no covalent

Activació de ProCP-A bovina:

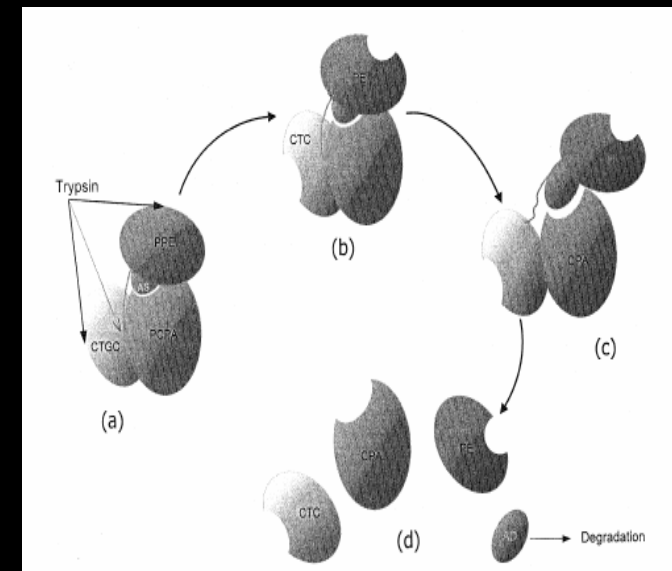
1. Reconeixement de tripsina a target de quimiotripsinogen i proproteinasa E → TALL

DESESTABILITZACIÓ DEL COMPLEX

2. Reconeixement de 2 targets en proCP:
 - 1r target permet desestabilitzar unió prosegment – CP
 - 2n target permet trencar la unió covalent

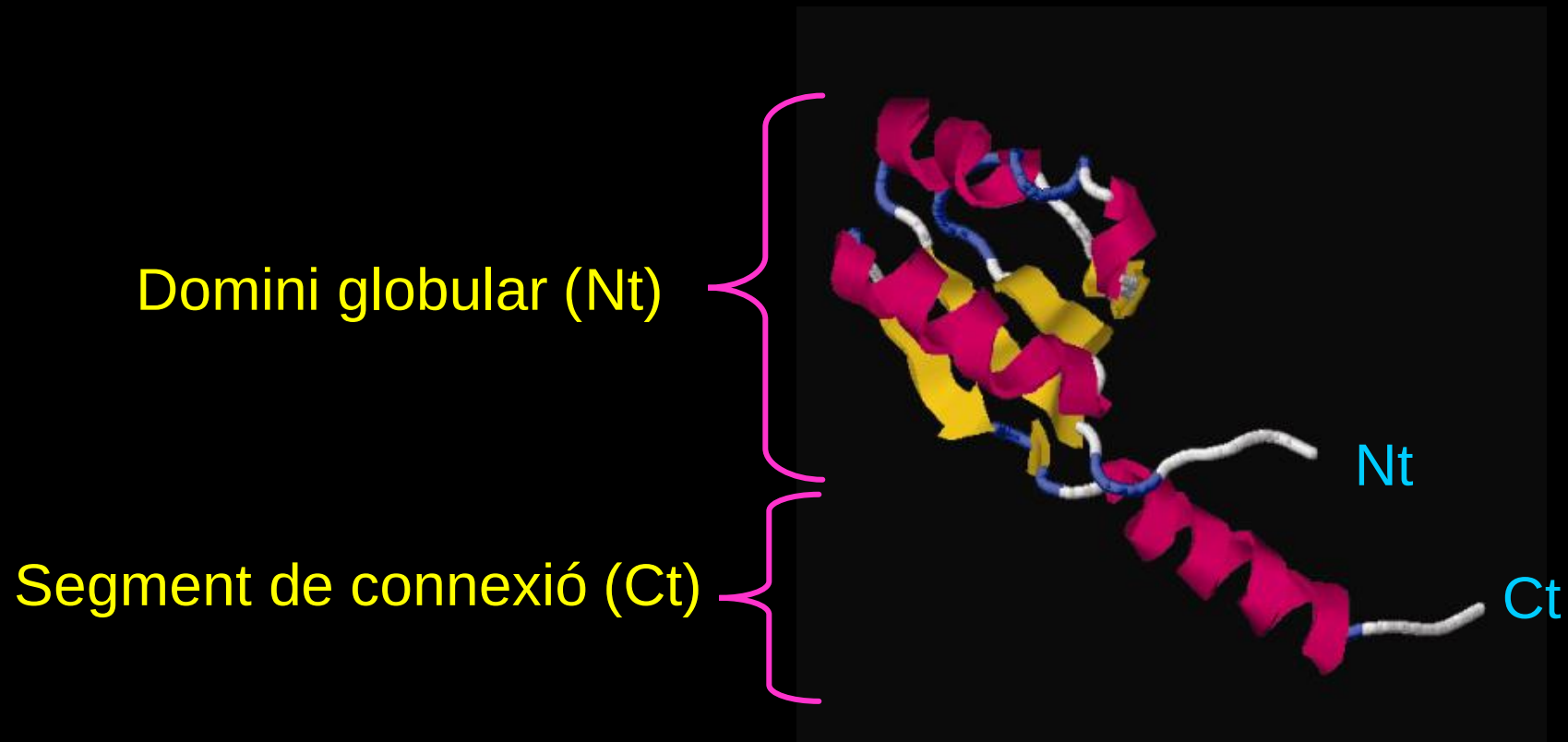


CPA amb activitat completa
+
Degradació del prosegment



PROSEGMENT

- Situat a la part Nt de la molècula CP



DIVISIÓ PROSEGMENT:

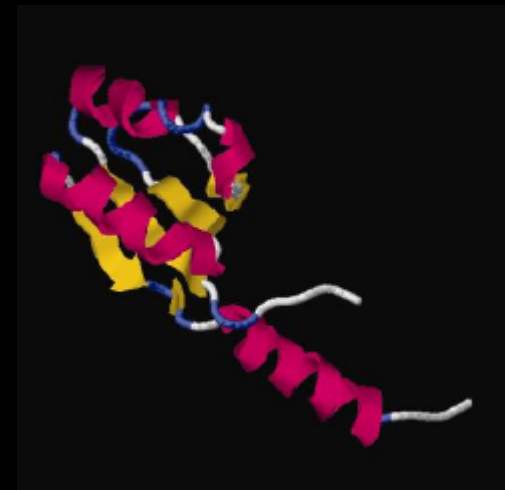
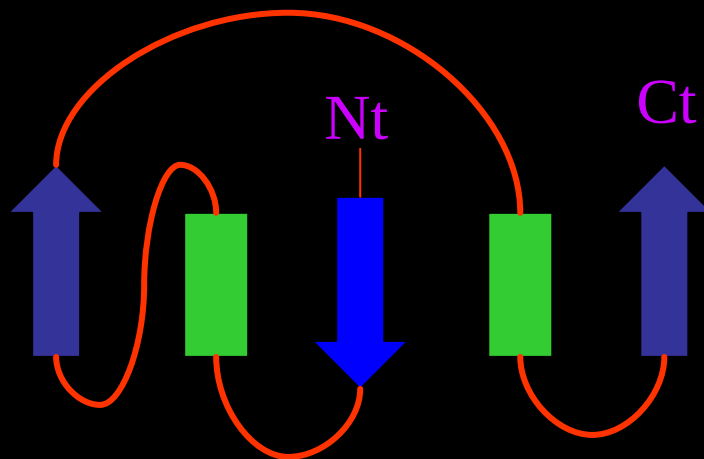
- Domini globular (Nt) → open sandwich antiparal.lel α/β

PROTEGIX LLOC ACTIU

- Segment connexió (Ct) → Llarga hèlix α

UNIX PROSEGMENT AMB ENZIM

MAPA TOPOLÒGIC DOMINI GLOBULAR:



CARBOXYPEPTIDASES

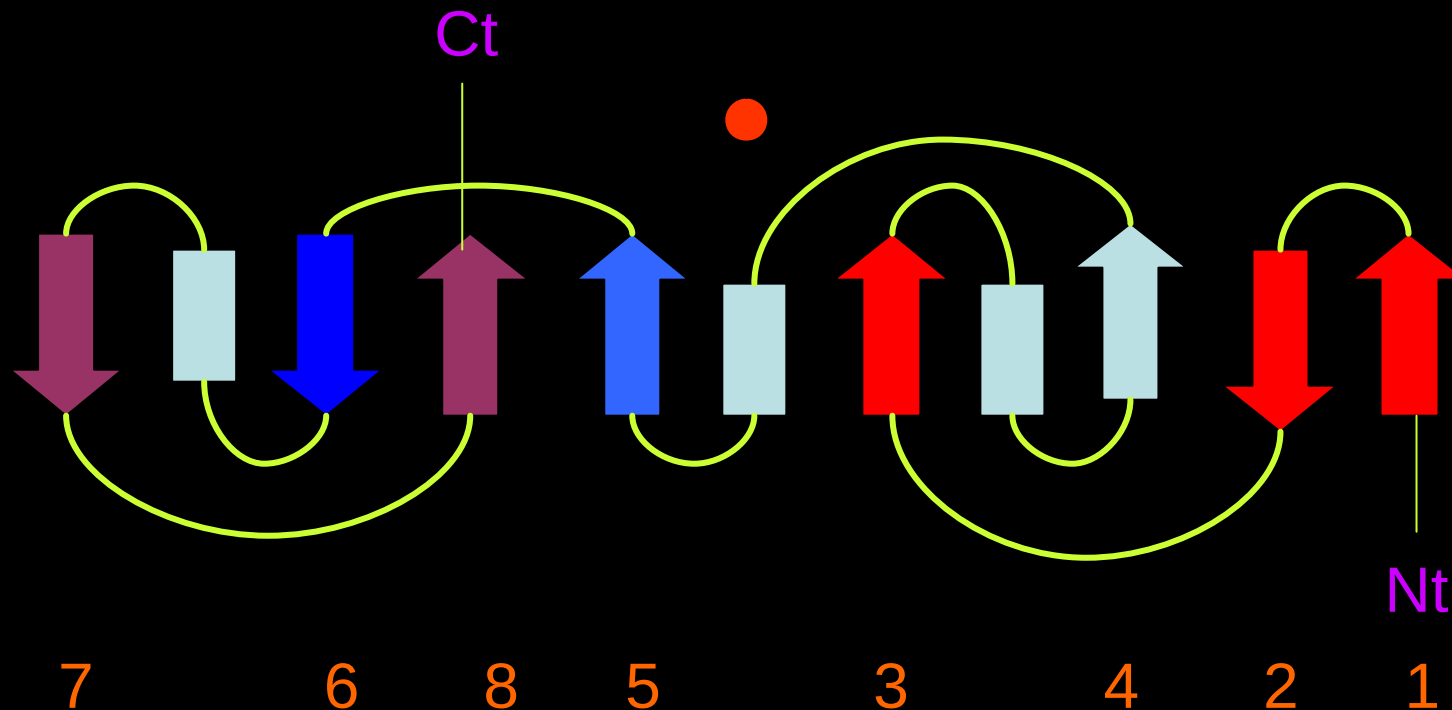


ESTRUCTURA

- Plegament: família α / β
- Domini d'unió a Zn
- Domini d'unió al substrat
- Manteniment de l'estructura

Plegament a/b

Mapa topològic:



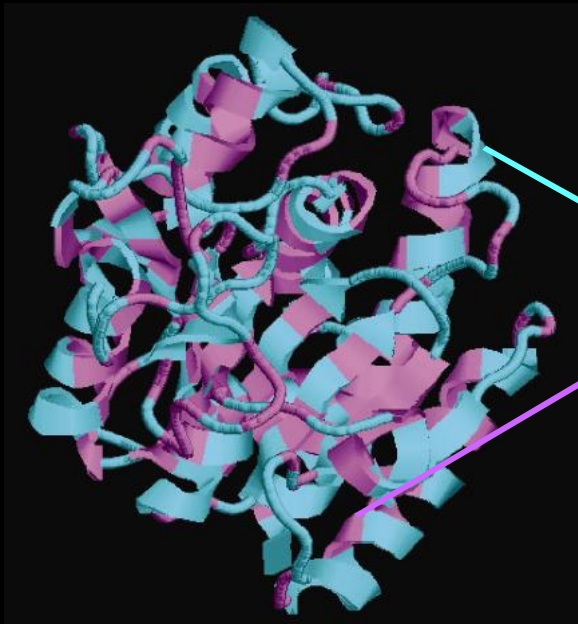
307 aa.

4 cadenes β paral.leles : (8 5 3 4)

- 9 hèlix α :

- corresponen al 35.83% de l'estructura

- formen una hèlix amfipàtica:

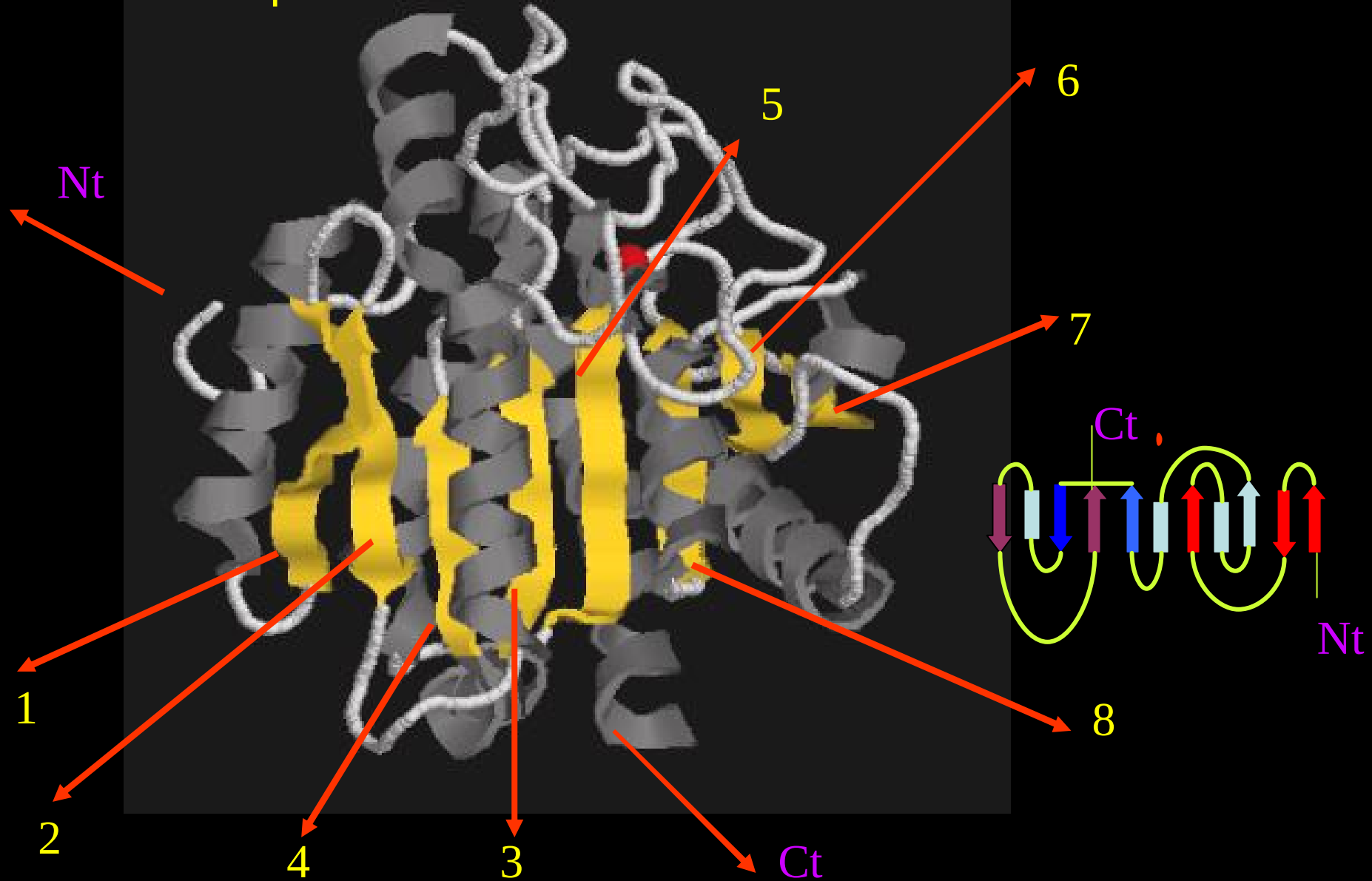


part hidrofílica → externa (abundants Lys)

part hidrofòbica → interna

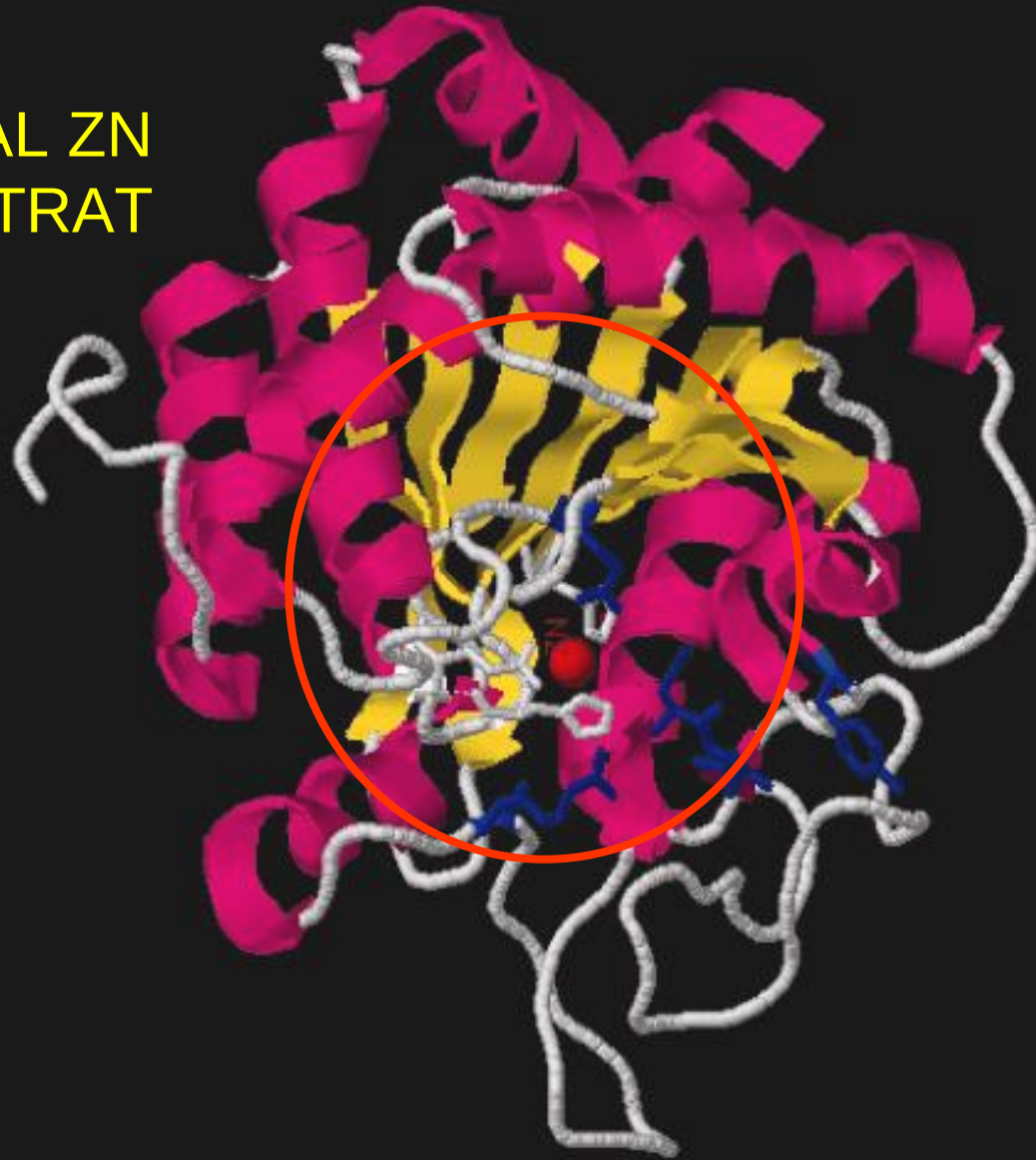
- 8 cadenes b → NECESSÀRIES PER ACTIVITAT

- correspon al 14.66% de l'estructura



Centre actiu

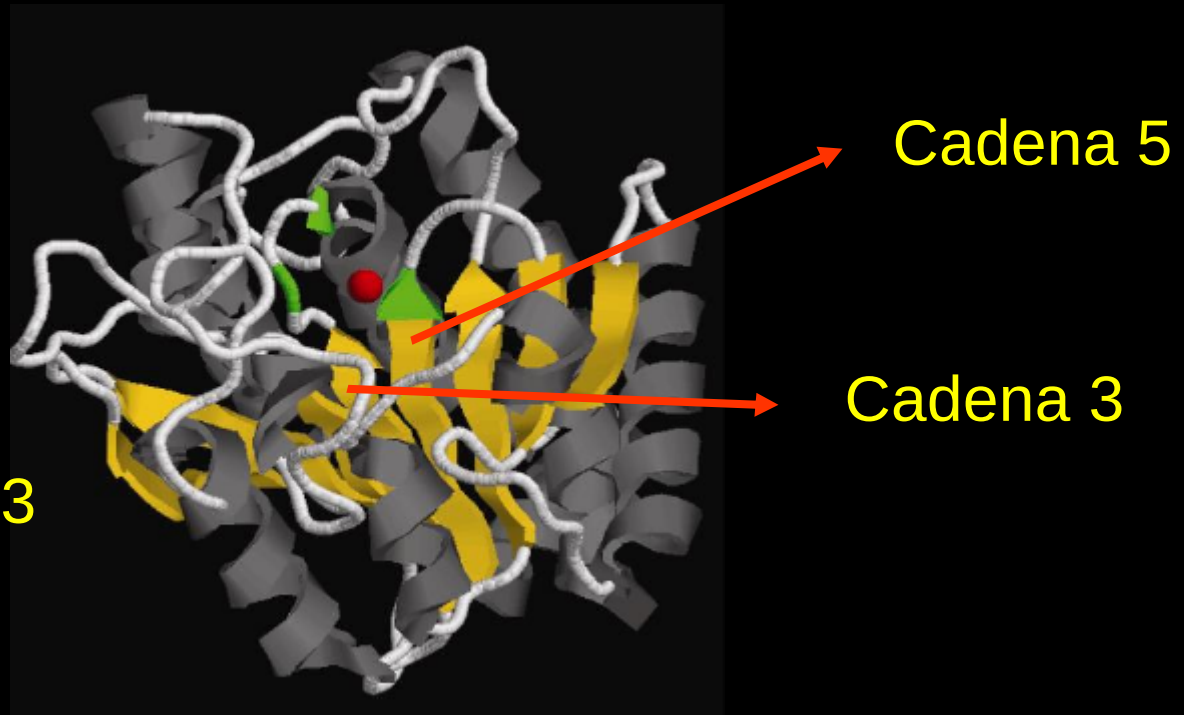
1. DOMINI UNIÓ AL ZN
2. UNIÓ AL SUBSTRAT

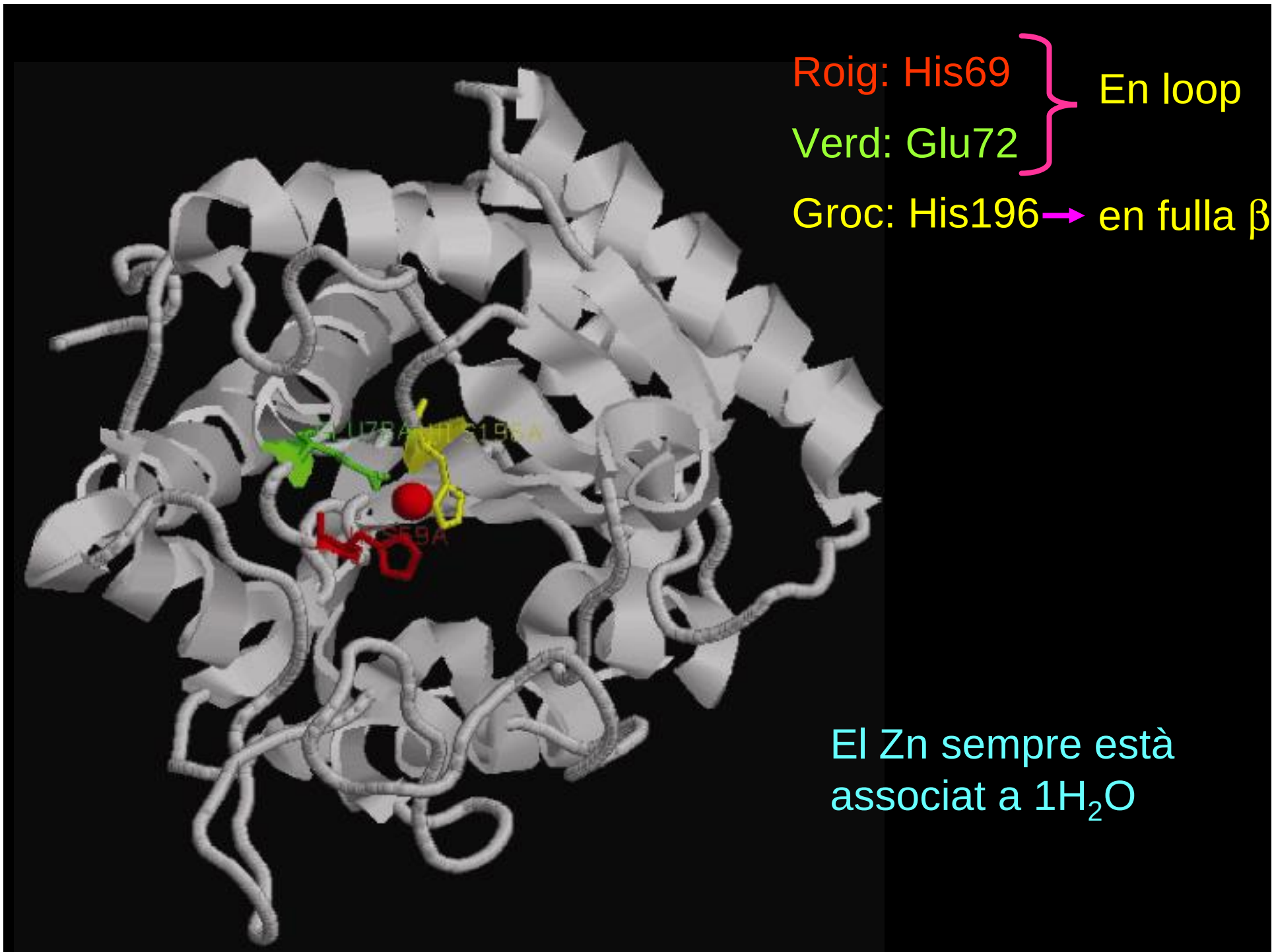


Domini unió al Zn → HXXE...H

- | | | |
|---|----------|---|
| { | - His69 | En loop α -hèlix entre cadena β 3 i cadena β 5 |
| | - Glu72 | |
| | - His196 | |

Switch point:
entre cadena 5 i 3





Unió al substrat

REGIONS DE LA CP:

- Sublocs :

S1' Asn 144, Arg 145, Tyr 248 → neutralitza Ct del substrat

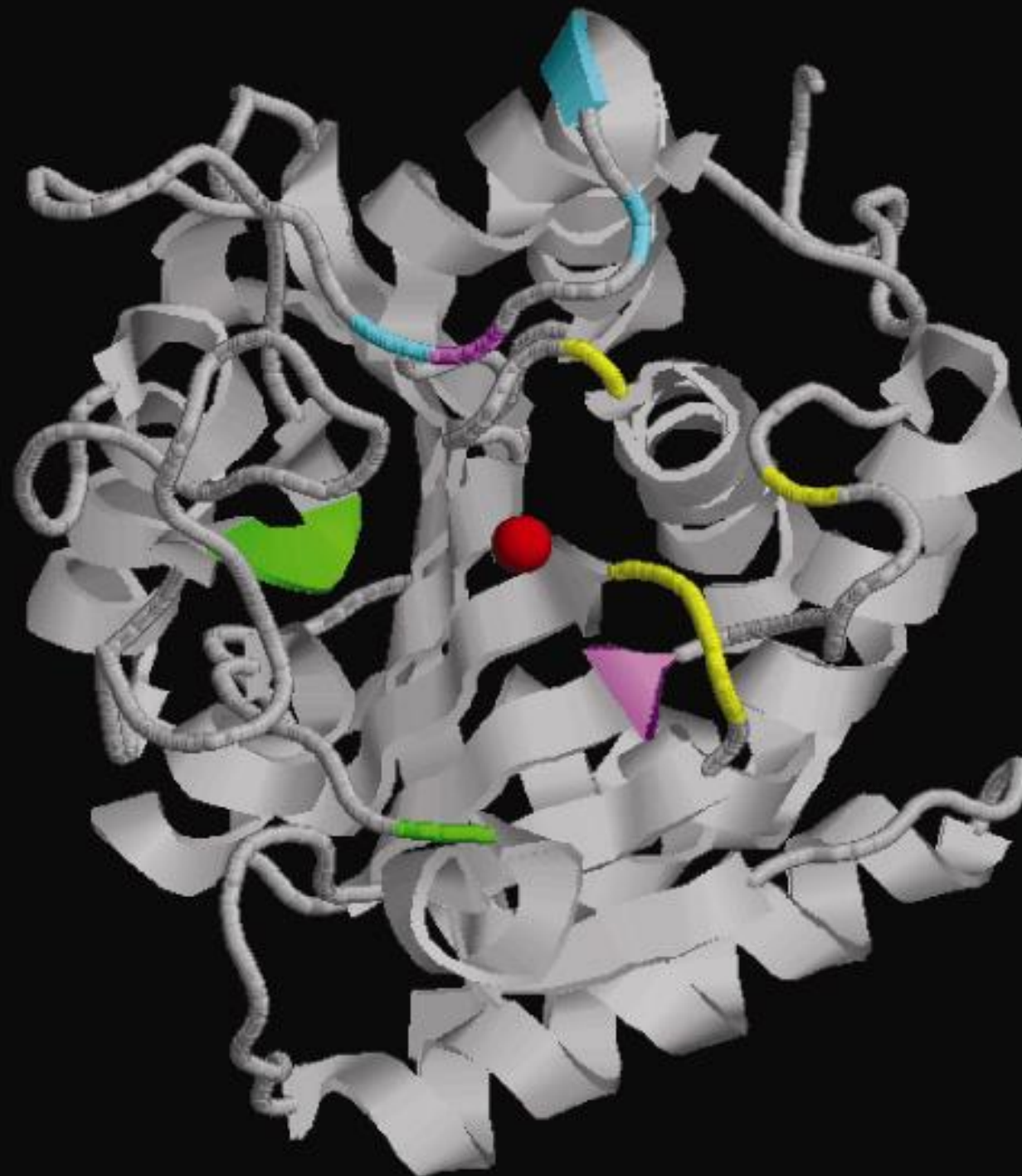
S1 Arg 127, Glu 270 → atac nucleofílic

S2 Arg 71, Ser 197, Tyr 198 i Ser 199

S3 Gly279

} Torsió substrat

S4 Gln 122, Arg 124, Lys 128 → variabilitat d'especificitat



Unió al substrat

S1'

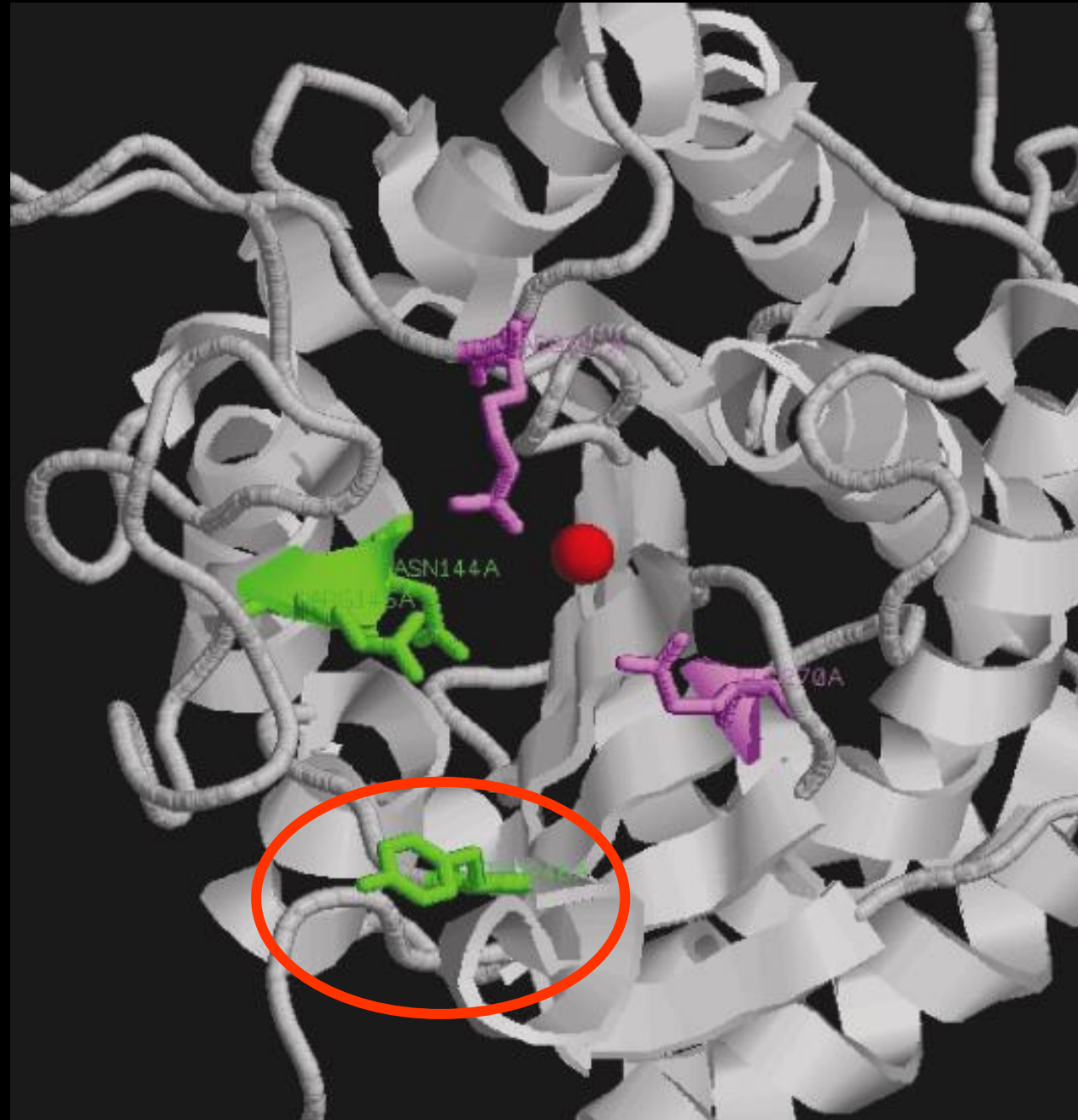
S1

S2

S3

S4

Unió al substrat (S1' + S1):



Quan unix el substrat, canvia de conformació

Asn144, Arg145, Tyr248

Arg127, Glu270

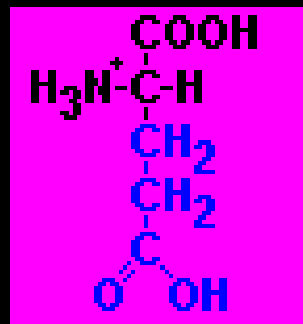
MECANISME DE CATÀLISI:

1. TRENCAMENT ENLLAÇ PEPTÍDIC:

Zn: polaritza la molècula d'aigua

Glu 270: actua com a nucleòfil

Trencament
enllaç peptídic



2. TRENCAMENT ÈSTER (C = O)

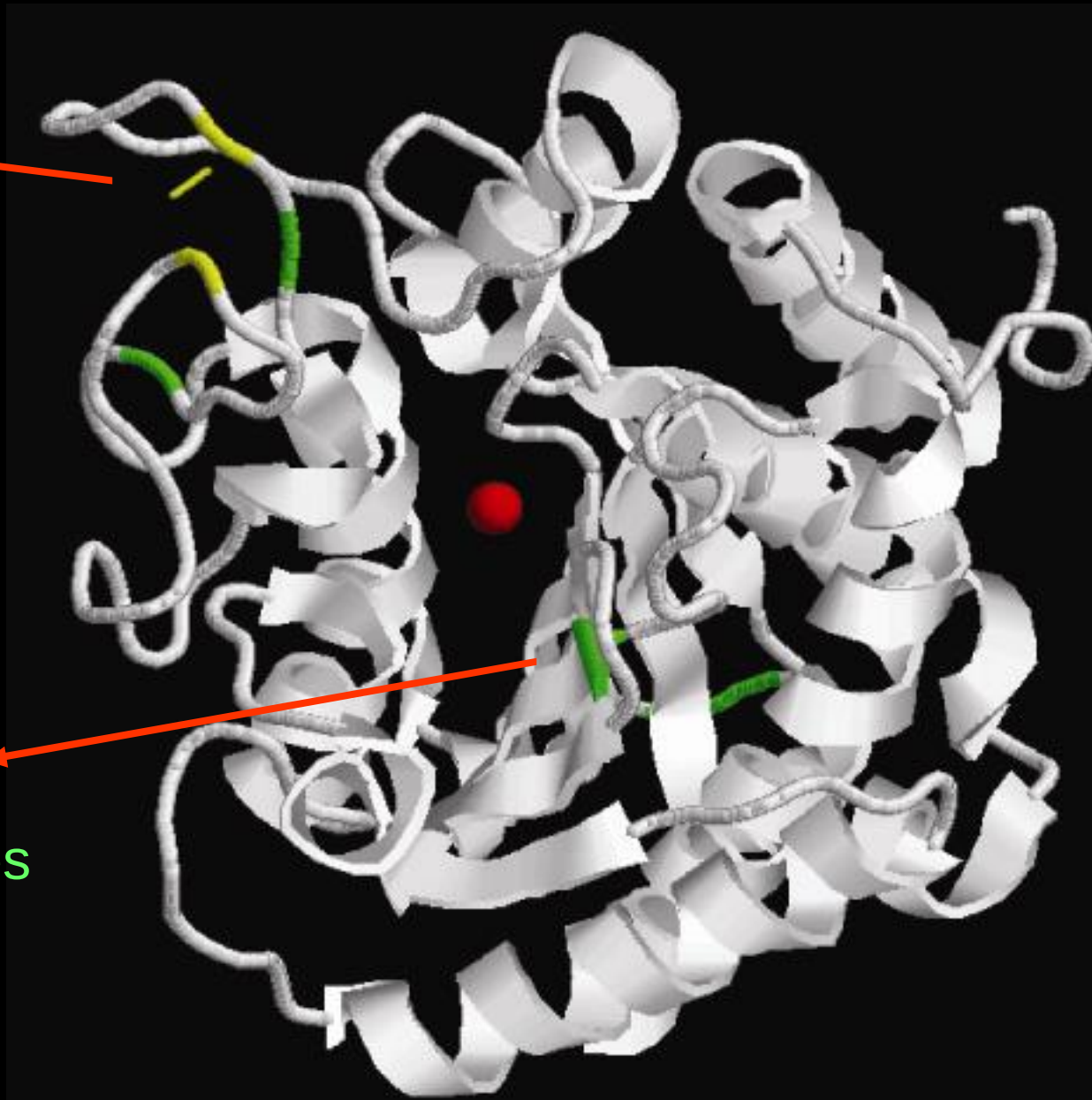
Glu270 actua com a àcid fort

Sense requeriment d'aigua

Interaccions que faciliten l'estructura de la molècula:

Ponts
disulfur

Unions de
dihedre
desfavorables



CONSERVACIÓ DE LES METALOCARBOXIPEPTIDASES

- Alineament de 24 seqüències

Bos taurus, Homo sapiens, Ratus norvegicus, Mus musculus, Sus scrofa, Canis familiaris, Anopheles gambiae, Streptomyces capreolus, Streptomyces griseus

- Conservació dels residus del centre actiu
- Altres residus conservats sense funció coneguda

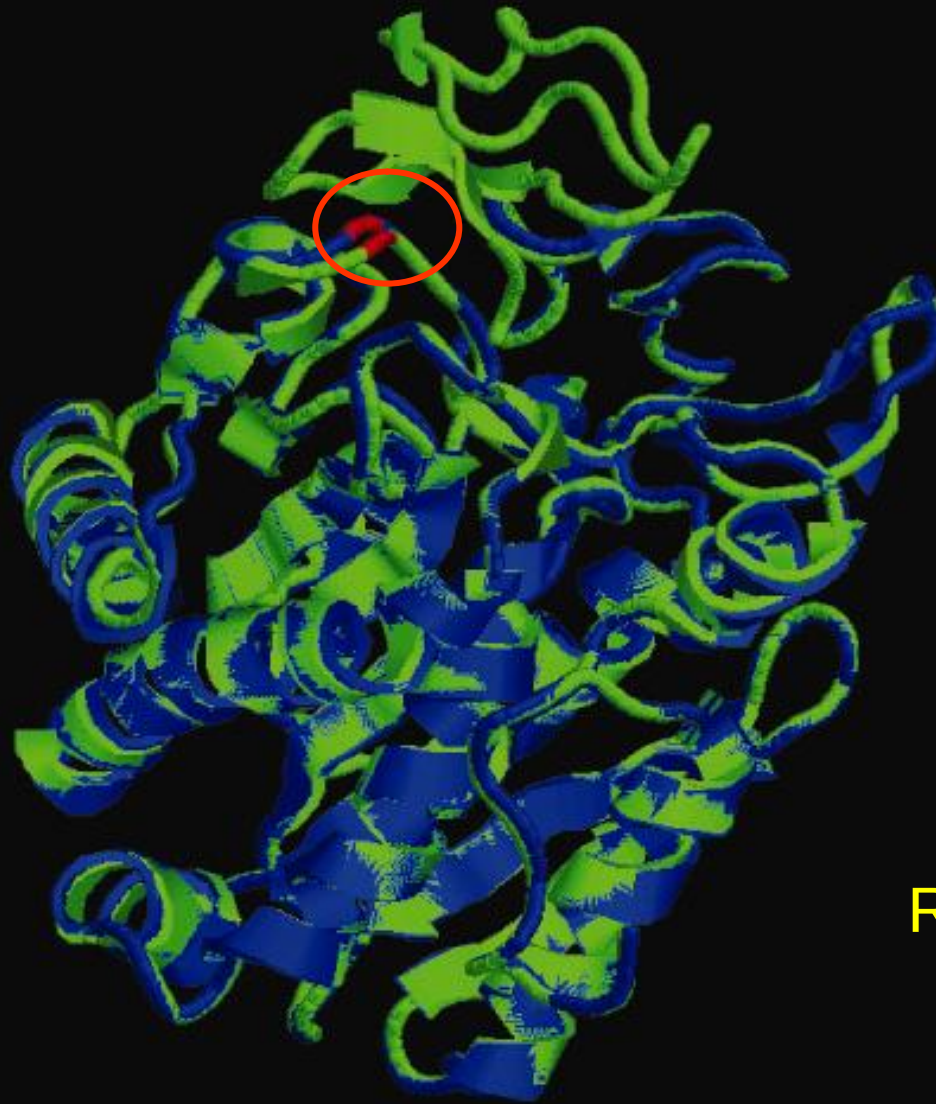
Alineament de seqüència amb HMM:

CBPA1_B	IWIDLGHSREWITQATGVWFAKKFTEDYGQDPSFTAILDSMDIFLEIVT
CBPA1_H	IWIDTGHHSREWVTQASGVWFAKKITQDYGQDAAFTAILDTLDIFLEIVT
CBPA2_H	IWLDAGIHAREWVTQATALWTANKIVSDYGKDPSITSILDALDIFLLPVT
CBPA4_H	VVLNAGHSREWISQATAIWTARKIVSDYQORDPAITSILEKMDIFLLPVA
CBPA5_H	IWIDTGHHSREWITHATGIWTANKIVSDYGKDRVLTLDILNAMDIFIELVT
CBPA6_H	VWIDCGIHAREWIGPAFCQWFVKEALLTYKSDPAMRKMLNHLFFYIMPVF
CBPB1_H	IFMDCGFHAREWISPAFCQWFVREAVRTYGREIQVTELLDKLDFYVLPVL
CBPB2_H	IWIDCGIHAREWISPAFCLWFIGHITQFYGIIGQYTNLLRLVDFYVMPVV
CBPA3_H	IFMDCGFHAREWVSPAFCQWFVYQATKTYGRNKIMTKLLDRMNFYILPVF
CBPA5_M	IWIDTGHHSREWITHATGIWISQKIVNAYGKDHVLKRILNTMDIFIEIVT
CBPA6_M	VWIDCGIHAREWIGPAFCQWFVREAILTYKTDPAKKMLNHLFFYIMPVF
CBPB2_M	IWIDCGIHAREWISPAFCLWFIGYVTQFHGKENLYTRLLRHVDFYIMPVM
CBPA3_M	IFMDCGFHAREWISPAFCQWFVYQATKSYGKNKIMTKLLDRMNFYVLPVF
CBPA1_R	IWIDTGHHSREWVTQASGVWFAKKITKDYGQDPTFTAVLDNMDIFLEIVT
CBPA2_R	IWLDAGIHAREWVTQATALWTANKIASDYGTDPAITSLNLTLDIFLLPVT
CBPB1_R	IFIDCGFHAREWISPAFCQWFVREAVRTYNQEIHMKQLLDELDFYVLPVV
CBPB2_R	IWIDCGIHAREWISPAFCLWFIGYVTQFHGKENTYTRLLRHVDFYIMPVM
CBPA3_R	IFMDCGFHAREWVSPAFCQWFVYQAAKSYGKNKIMTKLLDRMNFYVLPVF
CBPA1_P	IWIDTGHHSREWVTQASGVWFAKKITEDYGQDPAFTAILDNLDIFLEIVT
CBPB1_P	IFMDCGFHAREWISHAFCQWFVREAVLTYGYESHMTEFLNKLDFYVLPVL
CBPB1_C	IFMDCGFHAREWISPAFWQWFVREXIRTYGQEIHMTELLDKLDFYVLPVG
CBPA_A	VFLEGGIHAREWISPATVTYILNQLLTS--EDAKVRALAEKFDUYVFPNA
CBPS_SC	VLFTCNMHAREHLTVEMCLRIIKQYTDGYATNPTIKNLVDSREIWIIPMV
CBPS_SG	VLFTAHQHAREHLTVEMALYLLRELGGYGSDSRITQAVNGRELWIVPDM
#=GC RF	XX

HXXE

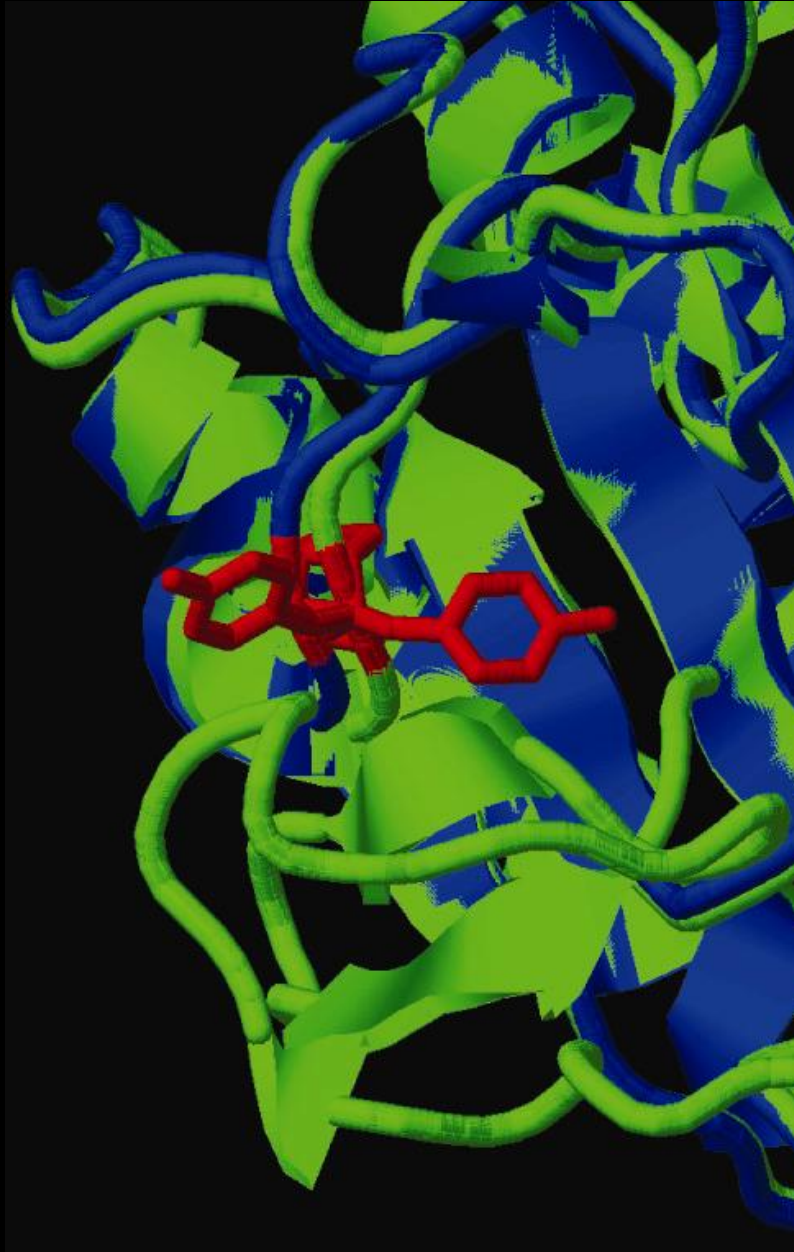
ALINEAMENT ESTRUCTURAL

Superposició estructural CP-inhibidor vs CP:



RMSD : 0.405

Ampliació de la regió



Observem un moviment de la **Tyr248** que permet el canvi de conformació per ser actiu l'enzim

INHIBIDORS DE CARBOXYPEPTIDASES

a) Inhibidors autòlegs : pro-segment

b) Inhibidors heteròlegs : CPI

c) Inhibició per excés de Zinc

a) Pro-segment

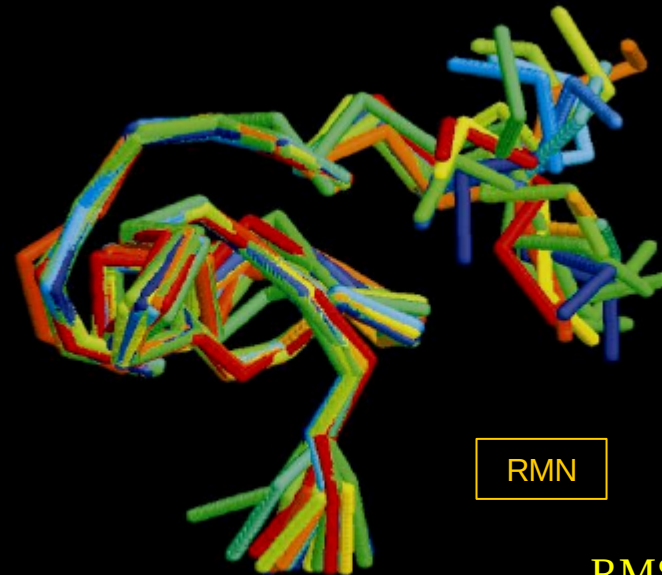


b) CPI : inhibidor de la carboxipeptidasa de patata

- Classificació :
 - **Classe** : Small proteins
 - **Plegament** : knottins (small inhibitors, toxins, lectins)
 - **Superfamília / Família** : inh. de plantes de proteïnases i amilases
 - **Domini**: Inh. de la carboxipeptidasa.



Cristal·lografia



RMN

RMSD: 0.31

ESTRUCTURA: DOMINIS

39 residus (4300 Da):

N-TERMINAL (7)

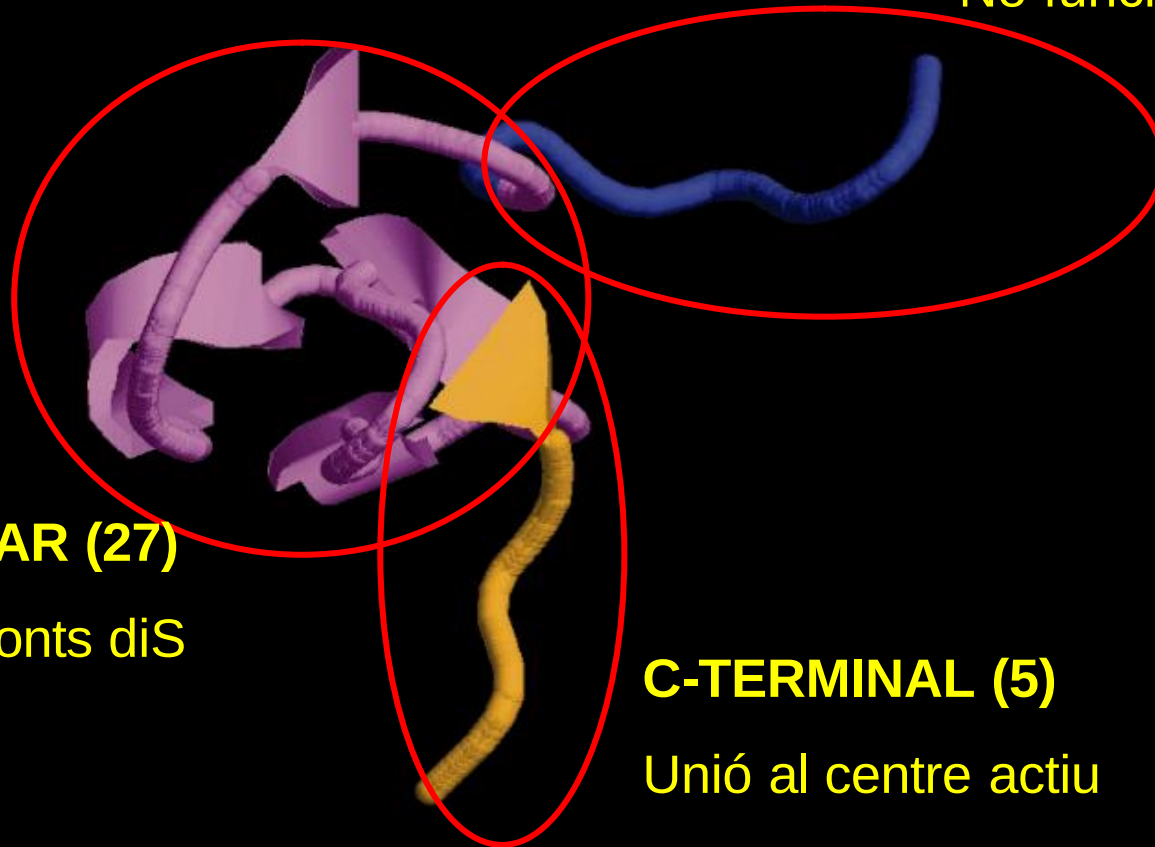
No funcional

CORE GLOBULAR (27)

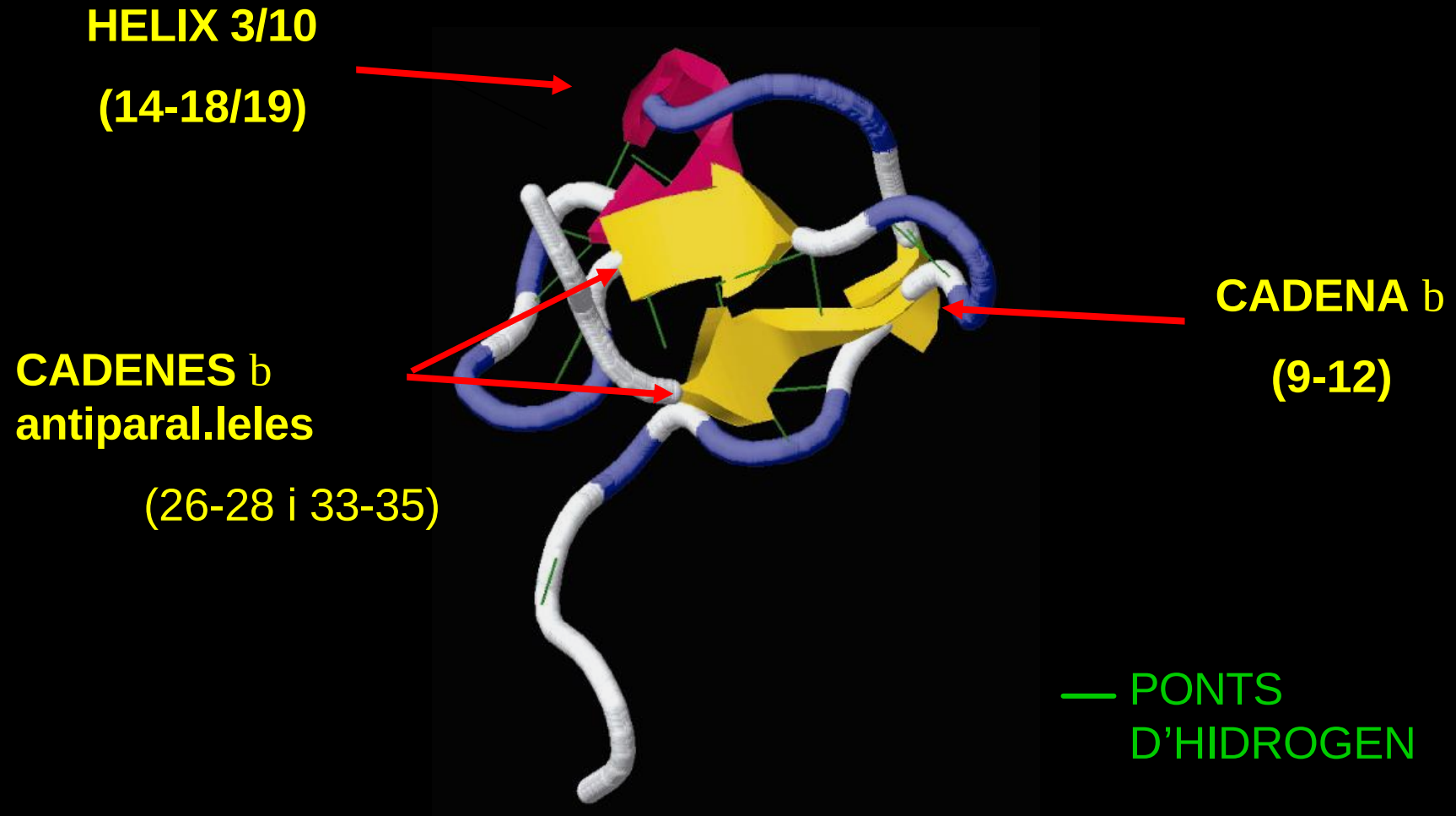
Estabilitzat per ponts diS

C-TERMINAL (5)

Unió al centre actiu

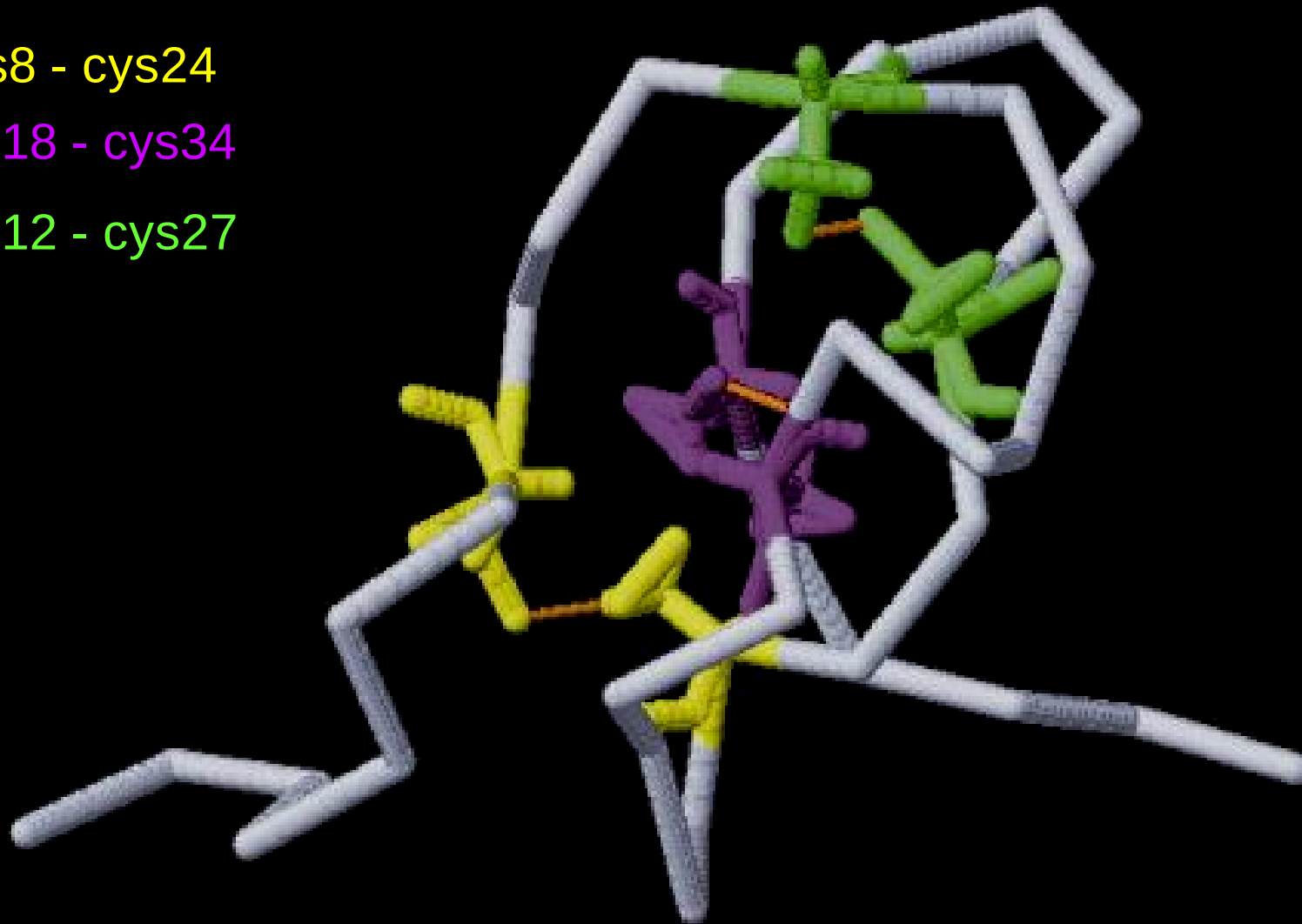


ESTRUCTURA SECUNDÀRIA → poc definida excepte:



Ponts disulfur —

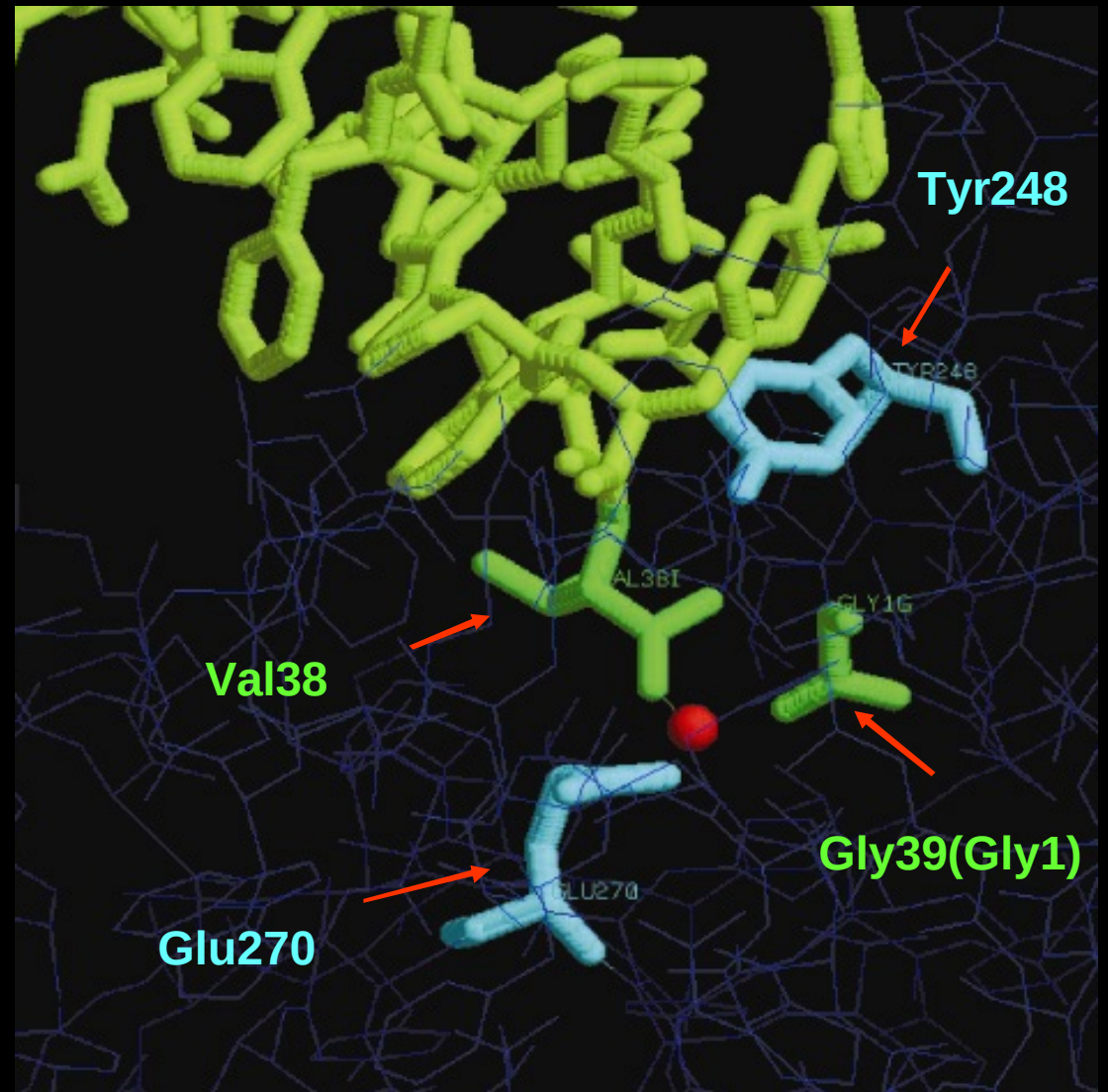
- cys8 - cys24
- cys18 - cys34
- cys12 - cys27



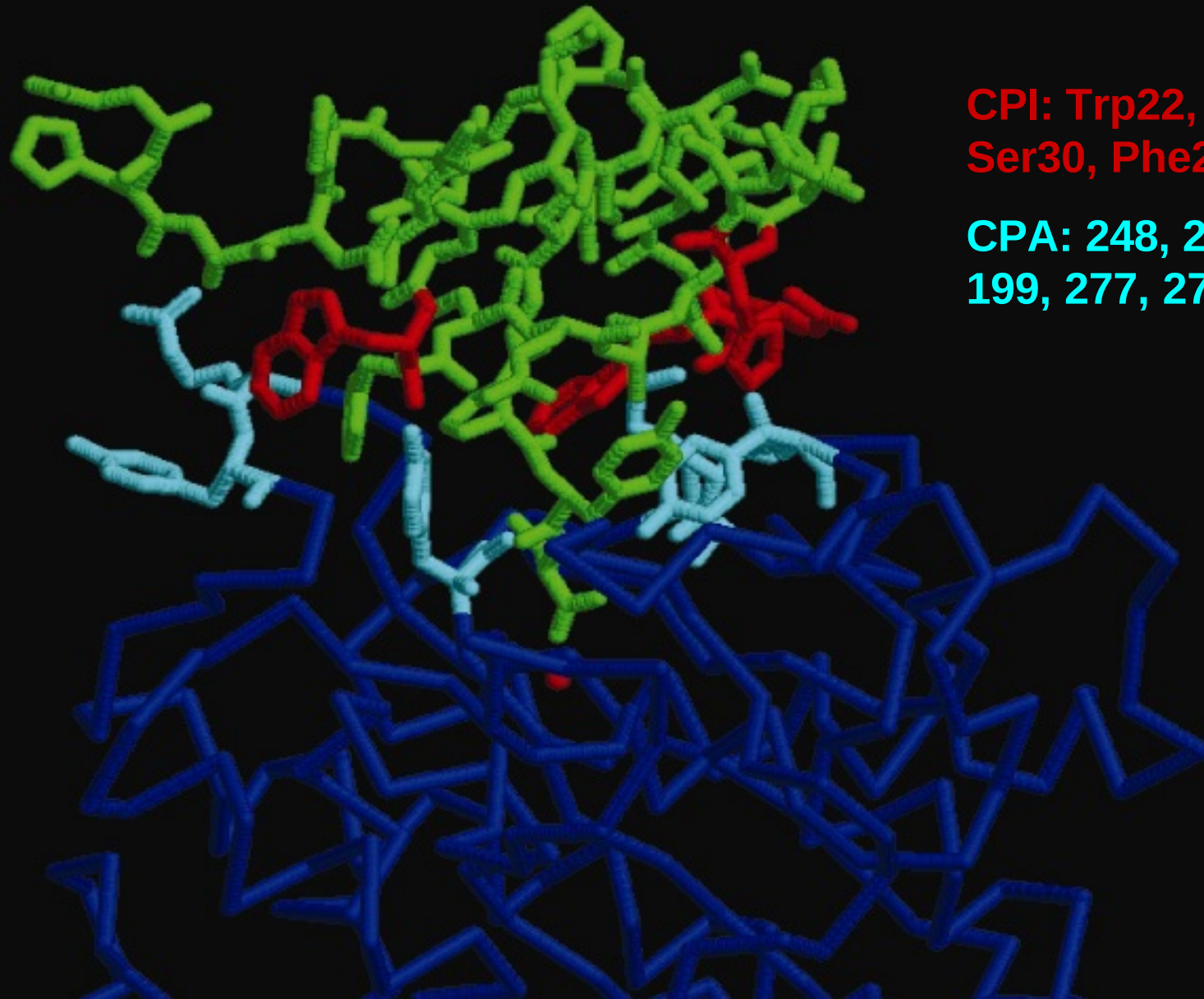
Interacció CPI-CPA (inhib. Competitiva)

- 1r contacte : Unió de la cua C-terminal al centre actiu

- Escissió de Gly-39
- Unió Val-38 al Zn
- Unió a S1'



- 2n contacte : Unió del CPI (core) a la CPA (centre actiu)

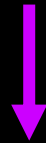


**CPI: Trp22, His15, Trp28-
Ser30, Phe23, Asn29**

**CPA: 248, 247, 239, 198,
199, 277, 276**

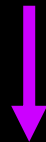
CPI en teràpia antitumoral

EGF + EGFR ||



|| PROLIFERACIÓ

CEL.LULAR



TUMOR

EGF || CPI



EGFR



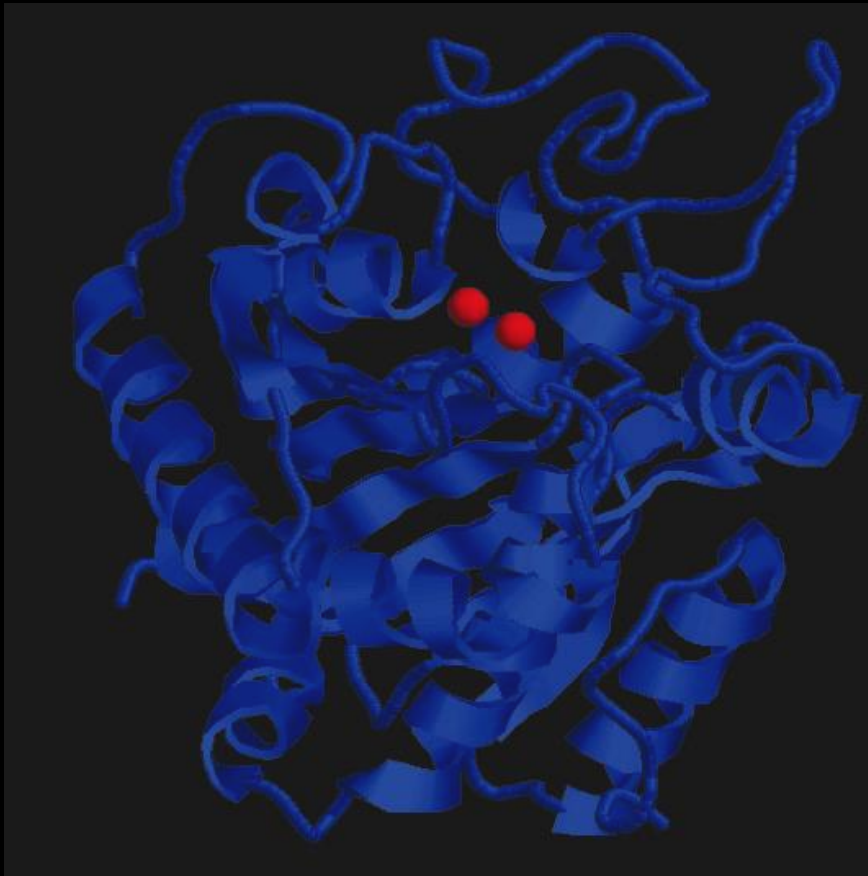
CPI+EGFR



ATURADA
PROLIFERACIÓ
CEL.LULAR

c) Excés de zinc

- Inhib. Competitiva de CPs en presència ZnCl_2 al medi (mM)
- En condicions de $\text{pH} = 7-10$
- 2n Zn s'uneix a 3,3 Å del Zn catalític (centre actiu) → *complex de coordinació tetrahèdric*



Glu270
 H_2O
 Cl^-
 OH^-

MÈTODES

- Rasmol
- HMMER
- Clustalw
- STAMP

BIBLIOGRAFIA

LLIBRE:

Brandem C.&Tooze,J. Introduction to Protein Structure. 2a ed. Ed. Garland Publishing,1998.

WEBS:

•www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/2004/durham_mcdowall/downloads/cpa-struct.pdf (visitada el 10-05-2005).

•wbiomed.curtin.edu.au/teach/biochem/tutorials/cpa/CPA.html (visitada el 9-V-05)

PAPERS:

•Vendrell J. et al., *Metallo-carboxypeptidases and their protein inhibitors structure, function and biomedical properties*. Biochimica et Biophysica Acta (2000): 1477, 284-298.

- Barbosa Pereira P.J. et al., Human procarboxypeptidase B: *Three dimensional structure and Implications for Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*. JMB (2002): 321, 537-547.
- Reverter D. et al., *Crystal structure of human Carboxypeptidase M, a membrane –bound enzyme that regulates peptide hormone activity*. JMB (2004): 338, 257-269.
- Cho J. et al. *The role of Tyr248 probed by mutant bovine carboxypeptidase A: Insight into the catalytic mechanism of Carboxypeptidase A*. Biochemistry (2001): 40, 10197- 10203.
- González, C et al. *Structure and dynamics of the potato carboxypeptidase inhibitor by ^1H and ^{15}N NMR*. Proteins: Structure, function and genetics (2003): 50, 410-422.
- Gomez- Ortiz, M. et al *Inhibition of carboxypeptidase A by excess of zinc: Analysis of the structural determinants by X-ray crystallography*. FEBS Letters (1997): 400, 336- 340.
- García-Sáez, I. et al. *The three-dimensional structure of human procarboxypeptidase A2. Deciphering the basis of the inhibition, activation and intrinsic activity of the zymogen*. The EMBO Journal (1997): Vol. 16 No 23: 6906-6913
- C.Rees, D et al. *Structure of potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5 Å resolution*. Biochemistry (1980): vol.77, num 8 : 4633- 4637.
- Arolas J.L, et al. *Secondary binding site of the potato carboxypeptidase inhibitor. Contribution to its structure, founding and biological properties*. Biochemistry (2004): 43, 7973-7982.
- McDowall M., *The structure of carboxypeptidase A and the architecture of the active site*. (2004).

PREGUNTAS PEM

1- El prosegment de la Carboxipeptidasa pot actuar com a inhibidor de la proteïna?

- a) No, perquè un cop separat de la proteïna és degradat ràpidament
- b) No, perquè es troba unit a la proteïna en la seva forma activa
- c) Si, però només en determinades condicions
- d) No, perquè l'inhibidor de la Carboxipeptidasa es troba a la patata
- e) Cap és correcta

La resposta correcta és la c

2- El complex ternari de la procarboxipeptidasa A bovina:

- a) És igual en totes les espècies
- b) Totes les seves unions són covalents
- c) Regula l'activitat de la proteïna en l'espai i en el temps
- d) No és important en la regulació
- e) Es manté unit per ponts d'hidrogen

La resposta correcta és la c

3. En les carboxipeptidases, la presència de ZnCl_2 al medi:

- a) augmenta l'eficiència catalítica
- b) permet que un segon àtom de Zn formi un complex de coordinació octahèdric amb el Zn del centre actiu provocant el canvi de conformació necessari per a la unió del substrat.
- c) Provoca una inactivació irreversible de la carboxipeptidasa per canvi en l'estat d'oxidació del Zn del centre actiu.
- d) Inhibeix competitivament la carboxipeptidasa per formació d'un complex de coordinació tetrahèdric al centre actiu.
- e) Cap de les anteriors.

Resposta correcta: d

4. L'alta especificitat de les carboxipeptidases depèn de:

- a) Cada organisme
- b) De les condicions fisico-químiques del medi (temperatura i pH)
- c) Les dues anteriors són correctes
- d) Del tipus de carboxipeptidasa
- e) Totes les anteriors són correctes

Resposta correcta: e

5. Senyala la resposta FALSA referent a la família de les carboxipeptidases:

- a) El mecanisme d'acció de totes les carboxipeptidases és un atac nucleofílic en què participen determinats aminoàcids i una molècula d'aigua associada al Zinc
- b) Es sintetitzen com a precursors (zimpogens)
- c) Són enzims d'alta especificitat que degraden extrems C-terminal
- d) Són metaloproteases de la família M14
- e) Totes són correctes

Resposta correcta: e

6. Quina característica és la més important del CPI (inhibidor de la carboxipeptidasa de patata)? Assenyala la resposta correcta:

- a) La seva estructura secundària
- b) La seva estabilitat gràcies als ponts d'hidrogen
- c) Es pot cristal·litzar fàcilment
- d) Alta proporció de ponts disulfur
- e) S'uneix a la carboxipeptidasa per la part N-terminal

Resposta correcta: d

7. Respecte al centre actiu de les carboxipeptidases, assenyala la resposta correcta:

- a) Hi ha una conservació del domini d'unió al Zn^{2+} al llarg de l'evolució
- b) L'estructura es manté gràcies a l'establiment d'un pont disulfur entre les 2 úniques Cys de la molècula.
- c) Les dues anteriors.
- d) En el mecanisme de catàlisi participa una molècula d'aigua.
- e) Totes les anteriors.

Resposta correcta: d

8. Quins tipus d'inhibició de la carboxipeptidasa A existeixen?

- a) CPI (inhibidor de la carboxipeptidasa de patata)
- b) La presència d'un segon àtom de zinc al centre actiu
- c) Les dues anteriors són correctes
- d) Una inhibició irreversible per part de la lipasa pancreàtica
- e) Totes són correctes

Resposta correcta: c

9. En relació a la teràpia antitumoral, l'inhibidor de la carboxipeptidasa de patata (CPI):

- a) És el primer antagonista d'EGF descrit i actua per inhibició competitiva
- b) Un excés de CPI aturaria la proliferació cel·lular en els tumors d'origen epitel·lial
- c) Les dues anteriors són correctes
- d) Forma un complex amb EGF que impedeix la unió al seu receptor (EGFR)
- e) Totes les anteriors són correctes

Resposta correcta: c

10. Les carboxipeptidases es caracteritzen per:

- a) tindre un plegament $\alpha+\beta$ on totes les α es disposen en la part N_t i les cadenes β en la C_t .
- b) disposar totes les α -hèlix en una cavitat hidrofòbica envoltades per cadenes β .
- c) presentar un plegament α/β on la disposició de les cadenes β expliquen l'activitat exopeptidasa que presenten.
- d) no presentar cap estructura regular 2aria.
- e) estar formades únicament per hèlix α disposades de manera que formen angles de 40°

Resposta correcta: c

PREGUNTES D'ASSAIG

a) Explica breument els tres mecanismes principals d'inhibició de les carboxipeptidases.

Trobem la inhibició autòloga (pel prosegment), la inhibició heteròloga (per exemple per l'inhibidor de carboxipeptidasa de patata o CPI) i la inhibició per un excés de Zn.

La inhibició pel prosegment de la carboxipeptidasa es dona per la unió d'aquest al centre actiu, impeditint la unió del substrat (inhibició competitiva).

El CPI és un inhibidor competitiu que s'uneix al centre actiu mitjançant dos contactes. El primer consisteix en la unió de l'extrem c-terminal de CPI al centre actiu, i el segon contacte s'estableix entre el core de CPI i la superfície de la proteïna.

En presència de ZnCl_2 al medi, un segon àtom de zinc forma un complex de coordinació tetrahèdric amb el centre actiu i ions del medi.

b) En les carboxipeptidases, els aminoàcids d'unió al Zn, que formen part d'un loop, es troben conservats en diferents espècies. Com explicaries aquest fenomen?

Podem explicar que hi hagi conservació en un loop pel fet que els aminoàcids d'unió al zinc són claus per a la funció de les carboxipeptidases, ja que el zinc participa en el mecanisme catalític.

Per tant, tot i no haver-hi una estructura secundària definida, el loop adquireix caràcter d'estructura regular.