



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Aproximación experimental y teórica a las  
carboxipeptidasas pancreáticas y  
reguladoras**

**Verónica Companys García  
Enero 2002**



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**

## **Aproximación experimental y teórica a las carboxipeptidasas pancreáticas y reguladoras**

Tesis presentada para obtener el grado de Doctora en Biología por Verónica Companys García, licenciada en Biología.

Trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona, bajo la dirección del Dr. Josep Vendrell y la Dra. Virtudes Villegas.

Verónica Companys

Dr. Josep Vendrell

Dra. Virtudes Villegas

Bellaterra, 25 de enero de 2002

## **Agradecimientos**

Este trabajo ha sido posible gracias a la disponibilidad y dedicación de mis directores de tesis, el Dr Josep Vendrell y la Dra Virtudes Villegas, así como del director del grupo de investigación, el Dr Francesc X. Avilés.

También quiero expresar mi agradecimiento a mis compañeros PROs por crear un ambiente de trabajo tan agradable. En vosotros he encontrado más que compañeros, amigos.

Y gracias al Dr Lloyd D Fricker por haberme acogido tan bien en su laboratorio y a mis compañeros de grupo de Einstein, de los cuales tuve la oportunidad de aprender mucho.

Para la realización de este trabajo se ha utilizado soporte informático del Laboratorio de Análisis y Fotodocumentación de Electroforesis, Autorradiografía y Luminiscencia (Facultad de Ciencias, UAB).

# **Índice general**

---

# Índice general

I. Introducción .....	9
I.1. Las proteasas y su clasificación.....	11
I.2. Las metalocarboxipeptidasas.....	14
I.3. Estructura y mecanismo catalítico de las carboxipeptidasas .....	16
I.4. Funciones de las carboxipeptidasas.....	17
I.5. Evolución de las metalocarboxipeptidasas .....	22
I.6. Procarboxipeptidasas pancreáticas .....	24
I.6.1. Mecanismo catalítico de las procarboxipeptidasas pancreáticas .....	25
I.6.2. Estructura tridimensional de las procarboxipeptidasas pancreáticas .....	26
I.6.3. Activación de las procarboxipeptidasas.....	33
I.6.3.1. Proceso de activación de la PCPA1 porcina.....	34
I.6.3.2. Proceso de activación de la PCPB porcina .....	35
I.6.3.3. Proceso de activación de la PCPA2 humana .....	38
I.7. Las carboxipeptidasas no pancreáticas E y D.....	39
I.7.1. Carboxipeptidasa E.....	39
I.7.1.1. Distribución y propiedades de la CPE .....	41
I.7.1.2. La mutación <i>Cpe<sup>fat</sup>/Cpe<sup>fat</sup></i> .....	42
I.7.1.3. Funciones fisiológicas de la CPE.....	44
I.7.2. Carboxipeptidasa D .....	45
I.7.2.1. Distribución y propiedades de la CPD.....	47
I.7.2.2. Transporte intracelular de la CPD .....	49
I.7.2.3. Funciones fisiológicas de la CPD .....	50
I.8. Referencias.....	51
 Objetivos .....	 63
 M. Material y métodos .....	 71
Prólogo.....	73
M.1. DNA recombinante .....	74
M.1.1. Material biológico y medios de cultivo .....	74
M.1.1.1. Microorganismos y cepas .....	74
M.1.1.2. Vectores.....	75
M.1.1.3. Medios de cultivo .....	76

---

---

M.1.2. Métodos de DNA recombinante .....	77
M.1.2.1. Extracción con fenol-cloroformo.....	77
M.1.2.1.1. Preparación del fenol .....	77
M.1.2.1.2. Extracción .....	78
M.1.2.1.3. Precipitación del DNA.....	78
M.1.2.2. Determinación de la concentración de DNA .....	79
M.1.2.2.1. Determinación espectrofotométrica .....	79
M.1.2.2.2. Estimación por electroforesis en gel de agarosa .....	79
M.1.2.3. Extracción de DNA plasmídico.....	79
M.1.2.3.1. Procedimiento de la lisis alcalina.....	79
M.1.2.3.2. Extracción con kit comercial .....	80
M.1.2.4. Digestiones enzimáticas de ácidos nucleicos .....	81
M.1.2.4.1. Digestiones con endonucleasas de restricción .....	81
M.1.2.4.2. Tratamiento con RNasa A.....	81
M.1.2.5. Separación del DNA mediante geles de agarosa .....	82
M.1.2.5.1. Electroforesis de DNA.....	82
M.1.2.5.2. Purificación de bandas de geles de agarosa .....	84
M.1.2.6. Clonaje de fragmentos de DNA en plásmidos.....	84
M.1.2.6.1. Defosforilación de los extremos 5' del DNA .....	84
M.1.2.6.2. Ligación de fragmentos de DNA .....	85
M.1.2.7. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	86
M.1.2.8. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	87
M.1.2.9. Mutagénesis dirigida por PCR.....	88
M.1.2.9.1. Extensión por solapamiento.....	88
M.1.2.9.2. Diseño de los cebadores.....	88
M.1.2.9.3. Primera fase de PCR.....	89
M.1.2.9.4. Segunda fase de PCR.....	90
M.1.2.9.5. Secuenciación del DNA.....	90
M.1.2.10. Transformación de <i>P. pastoris</i> . Método de los esferoplastos .....	90
M.2. Métodos de química de proteínas.....	93
M.2.1. Métodos electroforéticos .....	93
M.2.1.1. Electroforesis discontinua en presencia de SDS.....	93
M.2.1.2. Geles de tricina .....	95
M.2.1.3. Densitometría de geles y membranas .....	98
M.2.1.4. Tinción con azul de Coomassie.....	98
M.2.2. Métodos cromatográficos .....	99
M.2.2.1. Cromatografía convencional a presión atmosférica .....	99

---

---

M.2.2.1.1. Cromatografía de interacción hidrofóbica .....	99
M.2.2.1.2. Cromatografía de afinidad .....	100
M.2.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución (FPLC) .....	100
M.2.2.2.1. Columnas de intercambio aniónico.....	101
M.2.2.3. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).....	101
M.2.2.3.1. Columnas de fase reversa .....	102
M.2.3. Métodos espectroscópicos .....	102
M.2.3.1. Determinación de la concentración de proteína: espectro de absorción en ultravioleta .....	103
M.2.3.2. Cuantificación de proteína por el método de Bradford .....	103
M.2.3.3. Determinación espectroscópica de actividades enzimáticas.....	104
M.2.3.3.1. Activación de las fracciones y medida de las actividades enzimáticas .....	104
M.2.3.3.2. Medida de la actividad CPB .....	104
M.2.3.3.3. Medida de la actividad tripsina .....	105
M.2.3.3.4. Medida de la actividad de las carboxipeptidasas reguladoras....	106
M.2.3.4. Espectrometría de masas .....	107
M.2.4. Secuenciación N-terminal de proteínas .....	107
M.2.5. Procedimientos generales .....	108
M.2.5.1. Diálisis.....	108
M.2.5.2. Minidiálisis.....	108
M.2.6. Técnicas de detección inmunológica: inmunotransferencia .....	108
M.3. Purificación y análisis de la PCPB recombinante y sus mutantes.....	110
M.3.1. Proceso de purificación .....	110
M.3.1.1. Obtención del medio extracelular.....	111
M.3.1.2. Primer fraccionamiento cromatográfico.....	111
M.3.1.3. Repurificación de la PCPB y de sus mutantes.....	112
M.3.1.4. Seguimiento y análisis electroforéticos .....	114
M.3.2. Estudio del proceso de activación trípica de los mutantes de la PCPB porcina .....	115
M.3.2.1. Seguimiento de la aparición de actividad carboxipeptidasa B .....	116
M.3.2.2. Seguimiento electroforético.....	117
M.3.2.3. Seguimiento por RP-HPLC .....	117
M.3.2.4. Seguimiento del proceso de activación por espectrometría de masas. 118	
M.4. Clonaje, expresión y purificación de las carboxipeptidasas reguladoras CPE y CPD .....	119
M.4.1. Clonaje y expresión .....	119

---

---

M.4.1.1. CPE.....	119
M.4.1.1.1. Introducción de la diana Mlu I en pPIC 9. Diseño de un adaptador.....	119
M.4.1.1.2. Introducción de los cDNAs en el vector pPIC 9 modificado.....	120
M.4.1.1.3. Transformación de <i>P. pastoris</i> y expresión.....	121
M.4.1.2. CPD.....	122
M.4.1.2.1. Clonaje en el vector de expresión de <i>Pichia pastoris</i> .....	122
M.4.1.2.2. Transformación de <i>P. pastoris</i> y expresión.....	123
M.4.2. Purificación de las carboxipeptidasas reguladoras CPE y CPD.....	125
M.5. Aparatos y reactivos.....	126
M.5.1. Aparatos.....	126
M.5.2. Reactivos.....	127
M.6. Referencias.....	127
1. Capítulo 1. Descripción detallada de la relación estructura/función en los mecanismos de activación/inhibición de procarboxipeptidasas.....	131
1.1. Summary.....	133
1.2. Introduction.....	134
1.3. Materials and methods.....	135
1.3.1. Materials.....	135
1.3.2. Site-directed mutagenesis by PCR.....	135
1.3.3. Transformation and selection of productive clones.....	138
1.3.4. Expression and purification of pro-CPB mutants.....	138
1.3.5. Proteolytic processing of the recombinant proenzymes.....	138
1.3.6. Chromatographic analysis and purification of the activation products.....	139
1.4. Results and discussion.....	140
1.4.1. Overexpression in yeast, purification and characterization of the different mutants of pro-CPB.....	140
1.4.2. Mapping tryptic targets in pro-CPB-connecting segment.....	140
1.4.3. Relevance of the connecting segment in the pro-CPB tryptic activation.....	149
1.4.4. Determinants of pro-CPB inhibition.....	151
1.5. References.....	154
2. Capítulo 2. Estructura cristalina del dominio II de carboxipeptidasa D de pato: un prototipo para la subfamilia de las metalocarboxipeptidasas reguladoras.....	157
2.1. Summary.....	159

---



---

2.2. Introduction.....	159
2.3. Results and discussion .....	162
2.3.1. Overall structure of CPD-2 .....	162
2.3.2. Subdomain interactions.....	166
2.3.3. The active site .....	166
2.3.4. Detailed comparison of CPD-2 catalytic subdomain with other proteases.....	167
2.4. Conclusions.....	172
2.5. Materials and methods.....	172
2.5.1. Cloning, expression and purification of CPD .....	172
2.5.2. Crystallization and data collection .....	173
2.5.3. Structure solution and refinement .....	176
2.5.4. Miscellaneous.....	177
2.6. References .....	178
3. Capítulo 3. Estructura cristalina del dominio 2 de CPD acompañado con un inhibidor y modelado de otras carboxipeptidasas reguladoras.....	185
3.1. Abstract.....	187
3.2. Introduction.....	188
3.3. Materials and methods.....	191
3.3.1. Crystallization .....	191
3.3.2. Model building.....	194
3.4. Results .....	195
3.4.1. Structure of the complex CPD2-GEMSA .....	195
3.4.2. Sequence alignments, model building and refinement.....	197
3.4.3. Conserved interactions between GEMSA and the different models .....	199
3.5. Discussion.....	201
3.5.1. Structural basis of the inhibitor action .....	201
3.5.2. Overall comparison of the models .....	202
3.5.3. Active site and substrate binding subsites.....	204
3.5.4. Accessibility of the active site.....	206
3.6. References .....	208
Discusión general .....	215
Conclusiones .....	227

---