



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

LA CATEPSINA D1 DE LA LANGOSTA AMERICANA,
Homarus americanus: ESTUDIO DE ACTIVACIÓN
TERMODINÁMICA, ESTABILIDAD Y ESPECIFICIDAD

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

Presenta

Betsaida Bibo Verdugo

La Paz, Baja California Sur, Octubre de 2014

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13 horas del día 12 del Mes de Agosto del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"LA CATEPSINA D1 DE LA LANGOSTA AMERICANA, *Homarus americanus*: ESTUDIO DE ACTIVACIÓN TERMODINÁMICA, ESTABILIDAD Y ESPECIFICIDAD"


Presentada por el alumno:

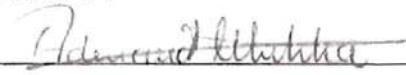
Betsaida Bibo Verdugo


Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biotecnología**


Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


Dr. Fernando Luis García Carreño
DIRECTOR DE TESIS


Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán
CO-TUTOR


Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo
CO-TUTOR


DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

Conformación de comités

La presente tesis fue dirigida por:

Dr. Fernando García Carreño CIBNOR

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Fernando García Carreño CIBNOR

Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán CIAD

Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo CIAD

El comité revisor estuvo integrado por:

Dr. Fernando García Carreño CIBNOR

Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán CIAD

Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo CIAD

Miembros del jurado de defensa de tesis:

Dr. Fernando García Carreño CIBNOR

Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán CIAD

Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo CIAD

Dra. Liliana Carolina Rojo Arreola (Suplente) CIBNOR

La catepsina D1 de la langosta americana, *Homarus americanus*: Estudio de activación termodinámica, estabilidad y especificidad

Resumen

Las enzimas adaptadas al frío son sintetizadas por los organismos ectotermos que habitan ambientes de baja temperatura para asegurar su desempeño fisiológico. Estas enzimas son de gran interés biotecnológico debido a que poseen mayor eficiencia catalítica y menor estabilidad térmica que sus homólogos de organismos adaptados a temperaturas superiores; se ha sugerido que una mayor flexibilidad estructural es responsable de dichas características. La langosta americana (*Homarus americanus*) es un organismo ectotermo cuyo hábitat marino varía en temperatura en el rango de 0–25 °C, y por lo tanto la síntesis de peptidasas digestivas adaptadas al frío es indispensable para asegurar un nivel suficiente de proteólisis digestiva. La proteólisis digestiva en la langosta americana se basa en peptidasas de las clases aspártico y cisteíno. En estudios anteriores se ha demostrado que la aspártico peptidasa catepsina D1 del jugo gástrico de la langosta americana, en comparación con la catepsina D bovina, posee mayor eficiencia catalítica en el rango de 4–25 °C. En este trabajo se investigó si la catepsina D1 es una enzima adaptada al frío con base en estudios de activación termodinámica, estabilidad y especificidad por sustrato de la enzima purificada del jugo gástrico. Con fines comparativos se incluyeron homólogos de organismos endotermos, la catepsina D bovina y la pepsina gástrica porcina. La tasa de recambio (k_{cat}) de la catepsina D1 es mayor que la de sus homólogos de bovino y de porcino en el rango de 5 a 55 °C. La mayor eficiencia catalítica de la catepsina D1 de la langosta también se manifestó en una menor energía de activación del complejo enzima-sustrato (ΔG^\ddagger). El ΔG^\ddagger se optimiza con el decremento de la entalpía de activación (ΔH^\ddagger) y/o el aumento de la entropía de activación (ΔS^\ddagger), dado que $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$. Al igual que otras enzimas adaptadas al frío, la catepsina D1 optimiza el valor de ΔH^\ddagger a expensas de un valor de ΔS^\ddagger desfavorable. Así, el ΔH^\ddagger es la principal característica de las enzimas adaptadas al frío, lo que permite reducir la dependencia a la temperatura de la velocidad de reacción. Se puede especular que el efecto antagónico de ΔS^\ddagger podría deberse a un incremento en la flexibilidad, de tal manera que el estado basal del complejo enzima-sustrato ocupa una distribución más amplia de estados conformacionales, lo que se traduce en una mayor entropía de este estado en comparación con los homólogos de organismos endotermos. La estabilidad térmica de las enzimas se analizó por fluorometría en ausencia/presencia de pepstatina A, un inhibidor análogo al estado de transición de sustrato. La catepsina D1 se desnaturalizó a menor temperatura que sus contrapartes y la interacción con pepstatina A tiene mayor efecto estabilizante en catepsina D1, este resultado sustenta la hipótesis de la mayor flexibilidad de la catepsina D1. La especificidad se analizó usando una colección de 124 tetradecapéptidos diseñada de tal manera que presenta un total de 1612 posibles sitios de hidrólisis diferentes, los sitios de hidrólisis se identificaron por LC-MS/MS. La catepsina D1 conserva la especificidad de sus homólogos de bovino y de porcino, hidroliza enlaces peptídicos con residuos hidrofóbicos en P1 y P1' (Phe, Trp, Tyr, Met, Leu) y es una endopeptidasa. El análisis de secuencias mostró que la catepsina D1 conserva en general la estructura terciaria de las peptidasas aspárticas tipo pepsina, así también conserva los residuos involucrados en los subsitios de interacción con el sustrato, pero presenta diferencias en el contenido de residuos de prolina y glicina. Las características de la catepsina D1 de la langosta americana sustentan que es una enzima adaptada al frío.

Cathepsin D1 of the American lobster, *Homarus americanus*: Study of thermodynamic activation, stability, and specificity

Abstract

Cold-adapted enzymes are the main molecular adaptive strategy of ectothermic animals inhabiting cold environments to achieve normal metabolic rates. Cold-adapted enzymes are of high biotechnological value, given their high catalytic efficiency and low thermal stability in comparison to homologous enzymes from organisms adapted to warmer temperatures, a higher flexible structure could be responsible for such characteristics. The American lobster (*Homarus americanus*) is an ectothermic animal which marine habitat varies on temperature in the range 0–25 °C; therefore, the synthesis of cold-adapted digestive peptidases is required for digestive proteolysis. Previous investigations have shown that the aspartic peptidase cathepsin D1 from the gastric juice of the American lobster is catalytically more efficient in the temperature range of 4–25 °C compared to bovine cathepsin D. The aim of this work was to determine if lobster cathepsin D1 is a cold-adapted enzyme. We investigated the enzyme thermodynamic activation, its stability and its specificity. Homologous enzymes such as the bovine cathepsin D and the porcine pepsin were included for comparison. First, we calculated the Michaelis-Menten kinetic parameters of the lobster enzyme in the temperature range of 5–55 °C. The lobster cathepsin D had a higher catalytic constant (k_{cat}) compared to the homologous bovine and porcine enzymes in the full experimental temperature range. Cathepsin D1 also had a lower Gibbs activation energy of the enzyme-substrate complex (ΔG^\ddagger). The ΔG^\ddagger decreased either by a reduction in the activation enthalpy (ΔH^\ddagger) or by an increase in the activation entropy (ΔS^\ddagger), according to the equation $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$. The higher catalytic efficiency of the lobster cathepsin D1 is also reflected in a lower ΔG^\ddagger : 64, 73.4, and 66.8 kJ/mol for lobster cathepsin D1, bovine cathepsin D, and porcine pepsin, respectively. Like many cold adapted enzymes, lobster cathepsin D1 optimizes ΔH^\ddagger at the expense of ΔS^\ddagger . The antagonistic effect of ΔS^\ddagger could be explained as a consequence of the higher structural flexibility of cold-adapted enzymes, which allows a wider distribution of conformation in the enzyme-substrate ground state and higher entropy of this state, in comparison with homologous enzymes from organisms adapted to warmer temperatures. Thermal stability was analyzed by differential scanning fluorescence in the absence/presence of pepstatin A, a transition state substrate analog inhibitor. Lobster cathepsin D1 is denatured at a lower temperature than its bovine and porcine homologues. Also, the interaction with pepstatin A induced a highly stable state in cathepsin D1. This result also supports the hypothesis that lobster cathepsin D1 is a more flexible protein. Substrate specificity was analyzed using 124 tetradecapeptides (14-amino acid polypeptides) substrates containing a total of 1612 possible cleavage sites. Cleaved sites were identified by LC-MS/MS. The specificity of lobster cathepsin D1 is similar to that of its homologous enzymes from bovine and porcine, hydrolyzing peptide bonds composed of bulky hydrophobic residues at P1 and P1' (Phe, Trp, Tyr, Met, Leu) and carried out peptide bond hydrolysis in an endopeptidase mode of action. Cathepsin D1 kept the pepsin-like aspartic peptidase tertiary structure and the residues involved in the sub-sites of substrate interaction, where differences reside mainly in the content of proline and glycine residues, a characteristic that enhances flexibility of proteins. The results support the premise that cathepsin D1 is a cold-adapted enzyme.

A las llamas de mi corazón: Enrique G., Edgar y Miguel

Agradecimientos

A CIBNOR por la formación académica en el Programa de posgrado.

A CONACYT por el financiamiento al proyecto No. 177954, otorgado a FLGC, y beca de postgrado No. 277859, otorgada a BBV.

Al Comité Tutorial: Dr. Fernando Luis García Carreño, Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán y Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo, por las críticas y las sugerencias constructivas que llevaron a la presentación de este documento de tesis.

A la Dra. Liliana C. Rojo Arriola y al Dr. Anthony J. O'Donoghue, por su colaboración, muchas gracias.

Al Dr. Julio Humberto Córdova Murueta y la Dra. Patricia Hernández Cortés, por el apoyo académico en el Laboratorio de Bioquímica.

A la Técnico María de los Ángeles Navarrete del Toro, responsable del Laboratorio de Bioquímica, por el entrenamiento técnico en manejo de equipo, técnicas y de laboratorio en general.

Por los buenos momentos y el apoyo, a los compañeros estudiantes del laboratorio: Magui, Claudia, Diana, Balam e Iván.

A Loreto, Obed, Aleyda, Edgar y Enrique, por todo el amor e impulso que me dan.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Las enzimas adaptadas al frío.....	5
2.2 Las aspártico peptidasas tipo pepsina.....	10
2.3 La catepsina D.....	16
2.3 La langosta Americana.....	18
2.4 La aspártico peptidasa catepsina D1 de langosta Americana.....	18
2.5 Planteamiento de la investigación.....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVO.....	23
5.1 Objetivo general.....	23
5.2 Objetivos específicos.....	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
6.1 Las enzimas.....	24
6.1.1 Langostas y obtención de jugo gástrico.....	24
6.1.2 Purificación de la peptidasa aspártica de langosta Americana.....	24
6.1.3 SDS-DTT-PAGE y S-SDS-PAGE.....	25
6.1.4 Peptidasas aspárticas empleadas como referencia.....	26
6.2 Estudio de la termodinámica de activación.....	26
6.2.1 Medición de la velocidad de reacción.....	26
6.2.2 Cálculo de parámetros cinéticos.....	28
6.2.3 Cálculo de parámetros termodinámicos de activación.....	28
6.3 Estudio de estabilidad.....	30
6.3.1 Análisis de estabilidad por fluorometría de barrido.....	30
6.3.2 Cálculo de la temperatura media de desnaturalización.....	31
6.4 Estudio de especificidad.....	31
6.4.1 Ensayo de actividad de aspártico y cisteíno peptidasa.....	31
6.4.2 Ensayo de especificidad.....	32
6.4.3 Identificación de los sitios de hidrólisis por espectrometría de masas.....	33
6.5 Análisis estructural de la catepsina D1 de langosta y de sus homólogos de organismos endotermos.....	34
7. RESULTADOS.....	35
7.1 Los parámetros cinéticos y la activación termodinámica de la catepsina D1 y sus homólogos de organismos endotermos.....	35
Figura 6. Constante de Michaelis-Menten (Km) de la catepsina D1 y sus homólogos de organismos endotermos en el rango de 5 a 55°C.....	35
7.2 La estabilidad de la catepsina D1 y sus homólogos de organismos endotermos.....	37

7.3 Estudio de especificidad por sustrato de la catepsina D1 y sus homólogos de organismos endotermos.	39
7.4 Características estructurales de la catepsina D1 de langosta y de sus homólogos de organismos endotermos.	42
8. DISCUSIÓN.....	45
9. CONCLUSIÓN.....	56
10. LITERATURA CITADA.....	57
11. ANEXOS.....	67
11.1 Evaluación de la concentración de sitios de activos de aspártico peptidasa por titulación con pepstatina A.	67
11.2 Cálculo de parámetros cinéticos de aspártico peptidasa bajo condiciones de temperatura controlada.	70
11.3 Sitios de hidrólisis identificados por LC-MS/MS para catepsina D1.....	74
11.4 Sitios de hidrólisis identificados por LC-MS/MS para catepsina D1 tratada previamente con E-64.	76
11.5 Sitios de hidrólisis identificados por LC-MS/MS para pepsina gástrica porcina.	77
11.6 Sitios de hidrólisis identificados por LC-MS/MS para catepsina D de bazo bovino.	78

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama del cambio en energía de Gibbs en el transcurso de una reacción representada por la ecuación 2. El complejo enzima-sustrato (ES) tiene menor energía que la enzima (E) y sustrato (S) individuales, la energía de activación de la reacción ΔG^\ddagger es la diferencia en energía entre ES y el complejo activado enzima-sustrato (ES)[‡].....7
- Figura 2.** Representación de la estructura tridimensional de la pepsina A humana el prototipo de las aspártico peptidasas tipo pepsina (PDB 1PSO, Fujinaga et al., 1995). Se muestra a la peptidasa en complejo con el inhibidor pepstatina A (azul), se resaltan los residuos catalíticos de ácido aspártico (rojo) y el residuo de tirosina del “flap” que es parte del subsitio de interacción con sustrato S1 (verde).....11
- Figura 3.** Representación del sitio de unión al sustrato de la endotiapepsina a resolución atómica, basada en la estructura cristalográfica de la enzima en complejo con el inhibidor H261 (PDB 1OEX, Erskine et al., 2003). La superficie de la enzima se representa de acuerdo a la carga, mientras que H261 se representa con bastones. Los residuos del inhibidor que hacen contacto con los subsitios de la enzima (S4-S3') se numeran de P4-P3'. Código de colores del inhibidor: verde = carbono, azul = nitrógeno, rojo = oxígeno. Tomado de Wlodawer et al. (2013).....12
- Figura 4.** Diagrama del sitio catalítico de las aspártico peptidasas. **A.** Diagrama de los residuos catalíticos de ácido aspártico y los puentes de hidrógeno que forma con la molécula de agua catalítica, A-E son las distancias de los puentes de hidrógeno que varían en las diferentes aspártico peptidasas. **B.** Diagrama de distribución de cargas y puentes de hidrógeno entre los residuos catalíticos de Asp, la molécula de agua catalítica y otros residuos de la enzima que interaccionan con los residuos de Asp. Tomado de Wlodawer et al. (2013).....14
- Figura 5.** Mecanismo de catálisis de las aspártico peptidasas. **A.** El estado basal del sitio activo de la enzima. **B.** Formación del intermediario tetrahédrico. **C.** Protonación del grupo saliente. **D.** Ruptura del enlace. Tomado de Wlodawer et al. (2013).....16
- Figura 6.** Constante de Michaelis-Menten (K_m) de la catepsina D1 y sus homólogos de organismos endotermos en el rango de 5 a 55°C.35
- Figura 7.** Gráfico de Arrhenius que relaciona el inverso de la temperatura con el logaritmo natural de la constante catalítica (k_{cat}) de la catepsina D1 y sus homólogos de organismos endotermos. Las líneas punteadas representan las curvas generadas por regresión lineal con la ecuación de Arrhenius. La constante catalítica a diferentes temperaturas se muestra en el recuadro interior.....36
- Figura 8.** Análisis de la desnaturalización de la catepsina D1 y sus homólogos de organismos endotermos en ausencia y presencia de pepstatina A. Los círculos abiertos presentan las curvas de desnaturalización en ausencia de pepstatina A, mientras que los círculos cerrados presentan las curvas de desnaturalización en presencia de pepstatina A. Se aumentó la temperatura a 1°C/min de 25 a 100 °C y se registró la fluorescencia emitida por SYPRO ORANGE al final de cada minuto.....38

Figura 9. Perfil de hidrólisis de la catepsina D1. **A.** SDS-PAGE del jugo gástrico de langosta Americana (1) y de catepsina D1 después de la purificación por cromatografía de afinidad. **B.** La actividad específica de aspártico y cisteíno peptidasa del jugo gástrico de langosta Americana y después de la cromatografía de afinidad. **C y D.** Perfil de hidrólisis de la fracción que contiene a catepsina D1 después de la cromatografía de afinidad en ausencia y presencia de E-64, respectivamente.....40

Figura 10. Perfil de hidrólisis de la catepsina D1 de langosta americana y sus homólogos de organismos endotermos. **A, B y C.** iceLogo generado de los aminoácidos que fueron enriquecidos o empobrecidos en las posiciones P4 a P4' de los sitios de hidrólisis generados por las aspártico peptidasas de langosta, bovino y porcino, respectivamente. **D.** Diagrama del número de sitios de hidrólisis producidos por las aspártico peptidasas, el número donde se solapan los tres círculos es el número de sitios de hidrólisis que comparten las tres peptidasas, los números del solapamiento de dos círculos indica el número de sitios de hidrólisis que se comparten por pares de peptidasas, y el número más exterior es el número de sitios de hidrólisis únicos para cada una de las peptidasas. **E.** Gráfico del número de sitios de hidrólisis identificados por posición en los tetradecapéptidos empleados como sustratos.....42

Figura 11. Comparación de las estructuras primaria y secundaria y subitios de interacción con el sustrato de la catepsina D1 y de sus homólogos de organismos endotermos. Catepsina D1 (H.am_CD; GenBank: EU687261.1), la catepsina D bovina (B.ta_CD; GenBank: BAB21620.1); pepsina porcina (S.sc_PEP; PDB: 3PEP). Los sitios residuos de los subitios de interacción con el sustrato se resaltan con sombra gris, en el caso de la catepsina D1 se indican los residuos homólogos a los de catepsina D bovina. Las flechas rojas indican las placas- β y las barras azules las hélices- α de catepsina D1. La estructura secundaria se analizó usando el programa Jpred3. En los recuadros se muestran: 1 y 4) los lazos que contienen los residuos catalíticos de Asp (marcados en negritas); 2) el “flap” que contiene al residuo de Tyr importante en la interacción con el sustrato; 3) El lazos de procesamiento de las catepsinas D; y 5) El “*poly-proline loop*” característico de las catepsinas D.....44

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Parámetros cinéticos y termodinámicos de algunas enzimas adaptadas al frío y de sus homólogos de organismos adaptados a temperaturas superiores.....	8
Tabla II. Parámetros termodinámicos de activación de la catepsina D1 y de sus homólogos de organismos endotermos a 15 °C.....	37
Tabla III. Temperatura media de desnaturalización de la catepsina D1 y de sus homólogos de organismos endotermos en ausencia y presencia de pepstatina A. La temperatura media de desnaturalización fue identificada como el punto de inflexión en las curvas de desnaturalización de la figura 8.....	38

1. INTRODUCCIÓN

La temperatura es uno de principales factores ambientales que determinan la supervivencia de los seres vivos ya que afecta la velocidad de las reacciones bioquímicas. Cuando la temperatura disminuye, los procesos metabólicos son más lentos y esto disminuye la energía disponible para los procesos fisiológicos del organismo. Por otra parte, si la temperatura es muy alta las reacciones bioquímicas caen en desbalance debido a la inestabilidad de las enzimas y de las biomoléculas en general. Por lo tanto, los organismos deben encontrar un hábitat en que no imponga temperaturas extremas. O bien, desarrollar adaptaciones de compensación térmica que permitan estabilizar su metabolismo a la temperatura de su ambiente (Hickman et al., 2001). Para los organismos que habitan ambientes fríos, la compensación térmica constituye adaptaciones como la síntesis de proteínas de choque frío (Phadtare et al., 1999), la síntesis de moléculas anticongelantes (Jia y Davies, 2002), la dormancia estacional (Robinson, 2001) y las adaptaciones enzimáticas, entre las cuales la síntesis de enzimas adaptadas al frío es considerada la principal adaptación (Hochachka y Somero, 1984; Georlette et al., 2004).

La principal característica de las enzimas adaptadas al frío es su alta eficiencia catalítica; sin embargo, esta característica es generalmente acompañada de una estructura caracterizada por una baja estabilidad térmica (Feller y Gerday, 1997; D'Amico et al., 2002). La hipótesis más aceptada para explicar las principales características de las enzimas adaptadas al frío sugiere que hay una correlación entre la actividad, la flexibilidad y la estabilidad de estas enzimas (Feller et al., 1997; Gerday et al., 1997; D'Amico et al., 2002, 2006). Tal flexibilidad es atribuida a un menor número o interacciones estabilizantes más débiles, que se traduce en

mayor fluctuación entre conformaciones de la enzima que le permiten llevar a cabo la catálisis con menor energía de activación de sustrato (Zecchinon et al., 2001; Feller y Gerday, 2003).

Las enzimas adaptadas al frío reportadas hasta la fecha conservan la estructura terciaria de sus homólogos de organismos adaptados a temperaturas superiores, así también los residuos catalíticos y las cadenas laterales que se dirigen hacia el sitio catalítico se encuentran estrictamente conservadas, esto significa a su vez que los mecanismos de reacción también se conservan (Feller, 2003). Otra característica importante de las enzimas adaptadas al frío es que a menudo el sitio activo es más accesible a los ligandos, debido a que se presenta como una cavidad más cóncava. Esta característica puede tener al menos dos implicaciones: 1) La enzima puede acomodar en el sitio activo y activar el sustrato a menor costo energético y 2) Podría influenciar la especificidad por sustrato de la enzima. Las enzimas adaptadas al frío podrían ser más promiscuas, esto porque sustratos con diferencias en tamaño y conformaciones podrían entrar y unirse al sitio activo (Tsigos et al., 1998; Feller, 2003).

Las peptidasas son enzimas hidrolíticas que rompen los enlaces peptídicos por medio de un ataque nucleofílico al grupo carbonilo del enlace. Las peptidasas son clasificadas de acuerdo al sitio de hidrólisis en exopeptidasas y endopeptidasas. Las exopeptidasas hidrolizan enlaces peptídicos en el extremo amino o carboxilo de las proteínas o péptidos, dando como productos aminoácidos, dipéptidos, tripéptidos, etc. Las endopeptidasas hidrolizan enlaces peptídicos al centro de las proteínas. Las endopeptidasas se clasifican de acuerdo a la naturaleza química de los residuos de aminoácido responsables de la actividad catalítica en: serino, cisteína, aspártico y metalo peptidasas (García-Carreño y Navarrete Del Toro, 1997).

Las serino y cisteíno peptidasas catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos por medio de catálisis tipo covalente, en que la enzima emplea un nucleófilo fuerte para atacar al átomo de carbono del grupo carbonilo del sustrato. Los nucleófilos son los grupos hidroxilo y tiol de la cadena lateral de los aminoácidos Ser y Cys, respectivamente (Rawlings y Barrett, 2013a). Por otro lado, en las metalo y aspártico peptidasas la catálisis es de tipo ácido-base y el nucleófilo es una molécula de agua activada. En el caso de las aspártico peptidasas, la molécula de agua activada es coordinada en el sitio activo por dos residuos de ácido aspártico, mientras que en las metalo peptidasas es coordinada por un ión metálico (Rawlings y Barrett, 2013b).

Aunque se asume que las serino peptidasas son los componentes proteolíticos más abundantes del sistema digestivo de los crustáceos, en la langosta americana se ha demostrado que abundan principalmente las aspártico (Navarrete Del Toro et al., 2006; Rojo et al., 2010a, 2010b, 2013) y las cisteíno peptidasas (Laycock et al., 1989, 1991). Las aspártico peptidasas de esta langosta son catepsinas D (Rojo et al., 2010a), mientras que las cisteíno peptidasas son catepsinas L (Laycock et al., 1991).

La catepsina D es una aspártico peptidasa que conserva la topología de la pepsina A humana, se ubica en los lisosomas de todas las células y aunque por largo tiempo se asumió que su función única es la hidrólisis de la proteína celular, evidencia reciente sugiere que está involucrada en otros procesos celulares y extracelulares (Benes et al., 2008; Fusek et al., 2013). La participación de la catepsina D en la hidrólisis de proteína del alimento es un fenómeno que se ha reportado en diversos invertebrados (Brunelle et al., 1999; Brindley et

al., 2001; Williamson et al., 2002; Boldbaatar et al., 2006; Ahn y Zhu-Salzman, 2009; Matsumoto et al., 2009; Padilha et al., 2009; Ranjit et al., 2009; Rojo et al., 2010a).

La catepsina D1 de la langosta americana (*Homarus americanus*) y de la langosta europea (*H. gammarus*), es una enzima digestiva por encontrarse en el jugo gástrico, que es el producto de secreción de las células de la glándula digestiva hacia el lumen de los túbulos de la misma glándula. La catepsina D1 es la única aspártico peptidasa digestiva en crustáceos que se ha estudiado a detalle, hasta la fecha se ha caracterizado desde el punto de vista bioquímico y molecular (Rojo et al., 2010a, 2010b, 2013). Rojo y colaboradores (2013) han estudiado y comparado las características catalíticas de la catepsina D1 de langosta con su homólogo de bovino, y se ha encontrado que la catepsina D1 es una enzima más eficiente en términos de k_{cat}/K_m en el rango de temperatura de 4–25 °C. Por otro lado, la catepsina D1 de langosta pierde actividad a una tasa mayor que la catepsina D bovina a temperatura media y moderada, lo cual habla de una menor estabilidad térmica. La langosta americana es un organismo ectotermo de ambiente frío, y por lo tanto las funciones fisiológicas han de llevarse a cabo a temperatura baja, incluyendo la digestión de la proteína del alimento. Las características bioquímicas de la catepsina D1 de langosta indican que podría tratarse de una enzima adaptada al frío.

El objetivo de este trabajo fue investigar si la catepsina D1 es una enzima adaptada al frío, y la pregunta se abordó por medio de la caracterización de la termodinámica de activación y la estabilidad térmica; por otro lado, también se estudió la especificidad por sustrato, una característica que depende también de la estructura, y que es influenciada entre otros factores por la flexibilidad estructural.

2. ANTECEDENTES

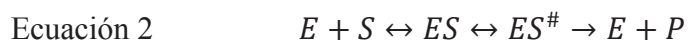
2.1 Las enzimas adaptadas al frío

El 80% de la biósfera presenta temperaturas de alrededor de 5°C. Bajo estas condiciones se desarrollan organismos de taxonomía variada en equilibrio térmico con el ambiente, incluyendo organismos de los tres dominios (Eucaria, Archea y Bacteria) (Margesin y Schinner, 1999; Russell, 2000; Cavicchioli et al., 2002; D'Amico et al., 2002; Siddiqui y Cavicchioli, 2006; Casanueva et al., 2010). Estos organismos han desarrollado adaptaciones enzimáticas que les permiten realizar sus funciones bioquímicas a tasas suficientes para asegurar su supervivencia (Georlette et al., 2004). Entre estas adaptaciones encontramos: el incremento en la concentración de enzima (Crawford y Powers, 1989, 1992), la expresión de isoenzimas adaptadas cinéticamente a diferentes temperaturas (Hochachka y Somero, 1984), la síntesis de enzimas caracterizadas por tener tasas de reacción independientes de la temperatura y la síntesis de enzimas adaptadas al frío (Georlette et al., 2004). Las enzimas adaptadas al frío tienen dos características que las tipifican: 1) Mayor actividad a temperaturas baja y moderada y 2) Menor estabilidad térmica, que sus homólogos de organismos adaptados a temperaturas superiores (Feller, 1996, 2003; Russell, 2000; Gianese et al., 2001; D'Amico et al., 2002).

La dependencia de la velocidad de las reacciones enzimáticas con la temperatura se define por la ecuación de Arrhenius (Ecuación 1).

Ecuación 1
$$k_{\text{cat}} = Ae^{-E_a/RT}$$

Donde k_{cat} es la constante catalítica o tasa de recambio, que corresponde al número máximo de moléculas de sustrato convertidas a producto por sitio activo por unidad de tiempo, A es un factor relacionado con factores estéricos y con la frecuencia de colisión molecular, R es la constante universal de los gases ideales (8.314 kJ/mol) y T es la temperatura absoluta en grados Kelvin. Las reacciones enzimáticas son descritas por el modelo de Michaelis-Menten, que asume la existencia del complejo enzima-sustrato ES . La teoría del complejo activado propone la formación de un estado de transición llamado ES^\ddagger en equilibrio con el estado basal ES , como se describe en la ecuación 2. Finalmente ocurre la reacción y se obtienen productos y la enzima.



Entonces, la dependencia entre la constante catalítica y la temperatura se da de acuerdo a la ecuación 3 (Lonhienne et al., 2000).

Ecuación 3
$$k_{\text{cat}} = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT}$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann ($1.3808 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), h es la constante de Plank ($6.6256 \times 10^{-34} \text{ J s}$) y ΔG^\ddagger es la energía libre de activación o la variación de la energía de Gibbs entre el complejo enzima-sustrato activado ES^\ddagger y ES (Figura 1).

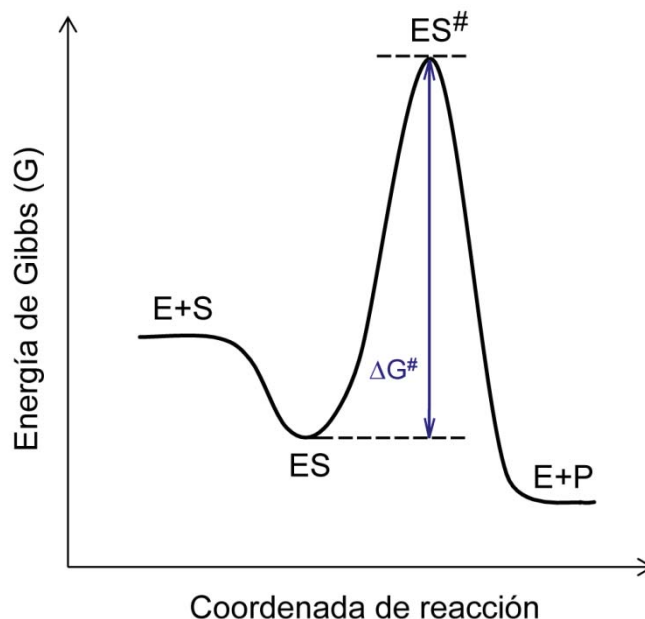


Figura 1. Diagrama del cambio en energía de Gibbs en el transcurso de una reacción representada por la ecuación 2. El complejo enzima-sustrato (ES) tiene menor energía que la enzima (E) y sustrato (S) individuales, la energía de activación de la reacción ΔG^\ddagger es la diferencia en energía entre ES y el complejo activado enzima-sustrato (ES)[#].

De acuerdo a la ecuación 3, ΔG^\ddagger está directamente relacionado con k_{cat} y representa la barrera energética que ha de superarse para que el complejo enzima-sustrato ES tenga la mayor probabilidad de dar lugar a la formación de producto (Lonhienne et al., 2000). La ΔG^\ddagger se relaciona con la entalpía (ΔH^\ddagger) y la entropía (ΔS^\ddagger) de activación, de acuerdo a la ecuación 4, y juntos constituyen los parámetros termodinámicos de activación (Lonhienne et al., 2000).

Ecuación 4
$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

Los parámetros termodinámicos de activación son de especial interés en el estudio de las enzimas adaptadas al frío debido a que constituyen una herramienta que permite analizar las características catalíticas y compararlas con enzimas homólogas de organismos adaptados a

temperaturas superiores (Lonhienne et al., 2000; Russell, 2000). Se han registrado los parámetros termodinámicos de activación de múltiples pares de enzimas adaptadas al frío y de enzimas homólogas adaptadas a temperaturas superiores, principalmente de microorganismos y peces (Siddiqui y Cavicchioli, 2006). En general, las enzimas adaptadas al frío exhiben parámetros termodinámicos de activación menores que enzimas homólogas adaptadas a temperaturas superiores (Tabla I).

Tabla I. Parámetros cinéticos y termodinámicos de algunas enzimas adaptadas al frío y de sus homólogos de organismos adaptados a temperaturas superiores.

Enzima	Fuente	T	k_{cat}	ΔG^\ddagger	ΔH^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$
		(°C)	(s ⁻¹)	(kJ/mol)		
Tripsina ¹	Ectotermo Bacalao	5	82.0	57.7	33.0	-24.5
	Endotermo Bovino		27.7	60.2	53.9	-6.2
Amilasa ^{2,3}	Psicrófilo <i>Alteromonas</i>	15	495.2	55.6	73.6	18.0
	Mesófilo <i>Bacillus</i>		90.5	59.7	99.6	39.9
Quitinasa ⁴	Psicrófilo <i>Arthrobacter</i>	15	98.0	59.5	44.7	-14.8
	Mesófilo <i>Serratia</i>		18.0	63.5	71.5	8.0

¹(Simpson y Haard, 1984); ^{2,3}(Feller et al., 1992, 1998); ⁴(Lonhienne et al., 2001)

La hipótesis más aceptada para explicar las características típicas de las enzimas adaptadas al frío sugiere una correlación entre la actividad, la flexibilidad estructural y la estabilidad térmica (Feller et al., 1997; Gerday et al., 1997; D'Amico et al., 2002, 2006). Las enzimas adaptadas al frío poseen mayor flexibilidad estructural, lo que permite contrarrestar el limitado número de movimientos moleculares causados por la baja temperatura, de tal manera que durante el proceso de activación de sustrato se requiere la ruptura de menor número de interacciones intramoleculares (Lonhienne et al., 2000; D'Amico et al., 2002;

Feller, 2003; Feller y Gerday, 2003). Dicha flexibilidad es producto de un menor número de interacciones estabilizantes de la estructura, dando como resultado baja estabilidad (Feller y Gerday, 1997; Gerday et al., 2000; D'Amico et al., 2002, 2006; Georlette et al., 2004). No obstante, aunque a la fecha ya se han aplicado varias técnicas para medirla, la flexibilidad es una propiedad difícil de apreciar especialmente cuando se estudia a nivel local (Svingor et al., 2001). Además, aún no es posible precisar qué componente de la flexibilidad es más importante en la optimización de la actividad catalítica, la flexibilidad dinámica y/o la flexibilidad dinámica. La flexibilidad estática constituye el rango de distribución del número y variedad estructural de las posibles conformaciones de una enzima; mientras que la flexibilidad dinámica es una medida de la rapidez con que la estructura de una enzima puede cambiar de una conformación a otra (D'Amico et al., 2002; Siddiqui y Cavicchioli, 2006).

La comparación de las estructuras de enzimas adaptadas al frío y de sus homólogos adaptados a temperaturas superiores obtenidas por difracción de rayos X y de los modelos obtenidos por homología, han llevado a la identificación de las características estructurales asociadas a la adaptación al frío (Siddiqui y Cavicchioli, 2006). En general, las enzimas adaptadas al frío conservan el plegamiento global y los residuos de aminoácidos involucrados en la catálisis de enzimas homólogas adaptadas a temperaturas superiores (D'Amico et al., 2002), esto implica que las enzimas adaptadas al frío conservan también los mecanismos catalíticos (Feller, 2003). Se ha encontrado que todos los factores estructurales actualmente conocidos por estabilizar a las proteínas se encuentran atenuados en fuerza y cantidad en las enzimas adaptadas al frío (D'Amico et al., 2002). Incluyendo mayor contenido de residuos de glicina, menor contenido de residuos de prolina en lazos, menor contenido de residuos de arginina,

menor número de interacciones aromáticas, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, entre otros (D'Amico et al., 2002; Siddiqui y Cavicchioli, 2006).

Por otro lado, algunas enzimas adaptadas al frío poseen un sitio activo más amplio y por lo tanto más accesible a ligandos. Esta característica se alcanza por medio de deleciones en lazos que rodean el sitio activo y sustitución de residuos de un aminoácido por otros de cadenas laterales más pequeñas (Feller, 2003). La mayor accesibilidad hacia el sitio activo podría tener como consecuencia que las enzimas adaptadas al frío acomoden su sustrato a menor costo energético (Zecchinon et al., 2001). Dicho costo energético está definido en términos de los cambios conformacionales que sufren las enzimas en el proceso de catálisis, y por lo tanto de la menor energía de activación requerida durante la activación del complejo enzima-sustrato. La mayor accesibilidad a ligandos puede tener al menos dos consecuencias: 1) Las enzimas capaces de aceptar varios sustratos pueden presentar especificidad más amplia, de tal manera que sustratos con conformaciones o tamaños diferentes pueden entrar y unirse al sitio activo, y 2) Los sustratos pueden tener menor fuerza de unión al sitio activo, lo que lleva a valores mayores de K_m (Feller, 2003).

2.2 Las aspártico peptidasas tipo pepsina

Las aspártico peptidasas reciben su nombre de los residuos de Asp que coordinan la molécula de agua activada que actúa como nucleófilo en su mecanismo de catálisis (Rawlings y Barrett, 2013b). Las aspártico peptidasas se encuentran en un amplio rango de organismos tales como vertebrados, plantas, hongos y retrovirus (Davies, 1990) y son inhibidas por la pepstatina A (Fruton, 1976).

Se conoce como aspártico peptidasas tipo pepsina a los miembros de la familia A1 del clan AA del sistema de clasificación MEROPS, siendo el prototipo de este grupo la pepsina A humana. Las peptidasas tipo pepsina se distribuyen en eucariotas y se conocen pocos representantes en bacterias (Rawlings y Bateman, 2009). Todos los miembros conocidos de esta familia son endopeptidasas y la mayoría tienen un pH óptimo ácido. La familia incluye enzimas digestivas de mamíferos, como la pepsina y la quimosina, así como enzimas intracelulares como las catepsinas D y E (Rawlings y Barrett, 2013b). Las aspártico peptidasas tipo pepsina son enzimas bilobuladas y cada lóbulo conforma un dominio, el dominio N-terminal y el dominio C-terminal (Fujinaga et al., 1995) (Figura 2).

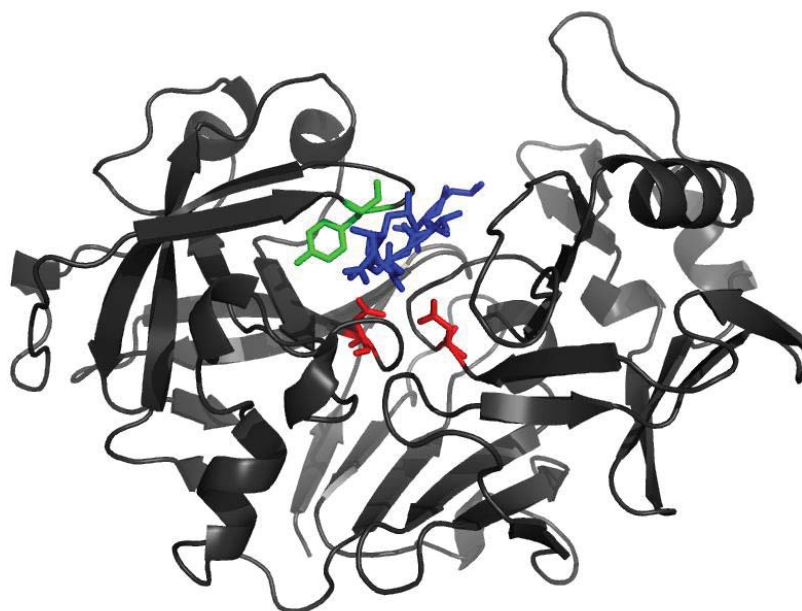


Figura 2. Representación de la estructura tridimensional de la pepsina A humana el prototipo de las aspártico peptidasas tipo pepsina (PDB 1PSO, Fujinaga et al., 1995). Se muestra a la peptidasa en complejo con el inhibidor pepstatina A (azul), se resaltan los residuos catalíticos de ácido aspártico (rojo) y el residuo de tirosina del “flap” que es parte del subsitio de interacción con sustrato S1 (verde).

Aunque muchas enzimas tienen plegamiento bilobulado, la resolución de la estructura cristalográfica de la retropepsina indica que los lóbulos en las peptidasas tipo pepsina se generaron por duplicación de genes (Fitzgerald et al., 1990). Cada lóbulo contiene uno de los residuos de Asp de la diada catalítica y la estructura secundaria consiste principalmente en hojas- β , con tan sólo algunas hélices- α (Fujinaga et al., 1995) (Figura 2).

El sitio de unión al sustrato de las peptidasas tipo pepsina se extiende de 7 a 8 residuos de aminoácido (aproximadamente de P5 a P3', en la nomenclatura de Schechter y Berger, 1967) y se localiza en la interfase de los dos dominios (Erskine et al., 2003) (Figura 3).

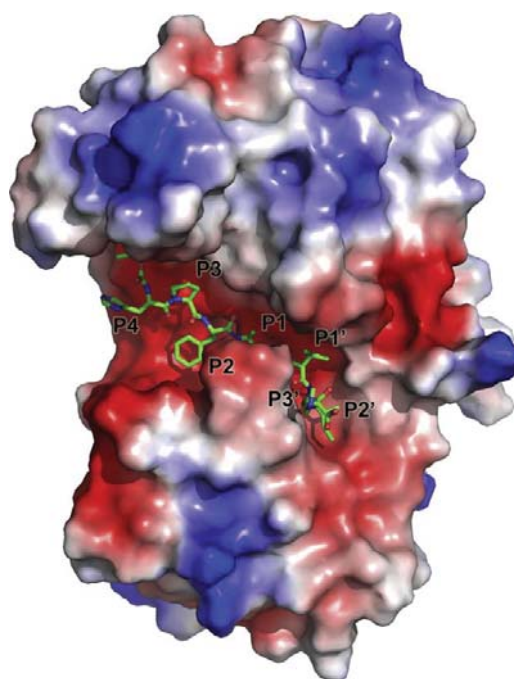


Figura 3. Representación del sitio de unión al sustrato de la endotiapepsina a resolución atómica, basada en la estructura cristalográfica de la enzima en complejo con el inhibidor H261 (PDB 1OEX, Erskine et al., 2003). La superficie de la enzima se representa de acuerdo a la carga, mientras que H261 se representa con bastones. Los residuos del inhibidor que hacen contacto con los subsitios de la enzima (S4-S3') se numeran de P4-P3'. Código de colores del inhibidor: verde = carbono, azul = nitrógeno, rojo = oxígeno. Tomado de Wlodawer et al. (2013).

La secuencia de aminoácidos de las peptidasas tipo pepsina maduras es de 330–350 residuos de aminoácidos en promedio. A 30–35 residuos de aminoácidos del extremo amino se localiza uno de los dos residuos de Asp catalítico en una secuencia tipo DTG, como Xaa-Xaa-Asp-Xbb-Gly-Xbb, en donde Xaa es un residuo hidrofóbico y Xbb es Ser o Thr. Cuarenta y cinco residuos de aminoácidos hacia el extremo carboxilo del primer residuo catalítico de Asp, se localiza un lazo tipo β -horquilla llamado “*flap*” o tapa que contiene residuos de importancia para la especificidad (Tyr y Thr) que interactúan con el sustrato y son parte del sub-sitio S1. Después, 135 residuos más hacia el extremo C-terminal, se localiza el segundo residuo catalítico de Asp, albergado de la misma manera que el primero en una secuencia tipo DTG. Esta repetitividad en la secuencia es responsable de la estructura bilobulada de las peptidasas tipo pepsina (Rawlings y Barrett, 2013b).

La figura 4 es una representación del sitio catalítico de las aspártico peptidasas en estado basal deducida de diversas evidencias experimentales (Cornish-Bowden y Knowles, 1969). El residuo de Asp32 se encuentra protonado, mientras que el residuo Asp215 se encuentra cargado negativo (Wlodawer et al., 2013).

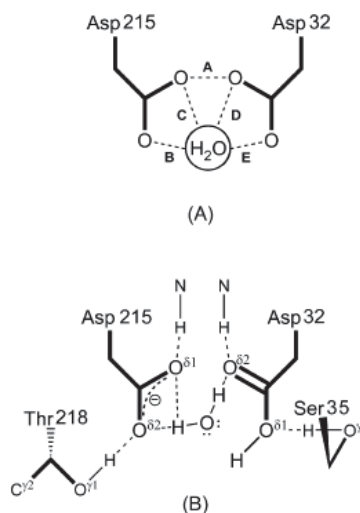


Figura 4. Diagrama del sitio catalítico de las aspártico peptidasas. **A.** Diagrama de los residuos catalíticos de ácido aspártico y los puentes de hidrógeno que forma con la molécula de agua catalítica, A-E son las distancias de los puentes de hidrógeno que varían en las diferentes aspártico peptidasas. **B.** Diagrama de distribución de cargas y puentes de hidrógeno entre los residuos catalíticos de Asp, la molécula de agua catalítica y otros residuos de la enzima que interaccionan con los residuos de Asp. Tomado de Wlodawer et al. (2013).

De acuerdo a los estudios de James et al. (1992) y a la interpretación de Wlodawer et al. (2013), el mecanismo de catálisis de las aspártico peptidasas está representado en la figura 5, mismo que se subdivide en cuatro etapas:

- A) El estado basal del sitio catalítico de la enzima. El sustrato se aproxima al sitio catalítico de la enzima con la cadena lateral de P1 en el sitio de unión S1. La molécula de agua activada a ión hidroxilo por los grupos carboxilo de Asp32 y Asp215 es un nucleófilo ubicado para atacar al átomo de carbono del enlace peptídico.
- B) Se forma el intermediario tetrahédrico. El grupo hidroxilo de la molécula de agua activada ataca al átomo de carbono del grupo carbonilo del enlace peptídico, en este paso es asistido por el efecto estereo-electrónico de los pares de electrones del átomo de oxígeno del grupo carbonilo y del átomo de nitrógeno del enlace peptídico que se

arreglan de forma anti-periplanar a la dirección del ataque nucleofílico. El intermediario tetrahédrico es estabilizado por la formación de puentes de hidrógeno con el gem diol del intermediario y por su proximidad al extremo positivo del anillo de fenilo de Tyr75.

- C) Protonación del grupo saliente. Para que el enlace peptídico pueda escindirse, el átomo de nitrógeno del enlace peptídico, que es ahora un átomo de nitrógeno tetrahédrico sp^3 , se debe protonar para constituir un buen grupo saliente ($-NH_2$). El átomo de nitrógeno invierte su configuración cambiando la posición del par de electrones, para permitir la protonación de Asp215.
- D) Ruptura del enlace. La transferencia del protón del átomo de oxígeno más lejano del gem diol al carboxilato de Asp32 (base general en este caso), resulta en la ruptura del enlace peptídico para liberar un grupo amino libre ($R'-NH_2$) y un grupo carboxilato libre ($R-COOH$). La disociación de estos dos grupos y la nueva asociación de los grupos carboxilo del sitio activo con la molécula de agua regenera la forma activa de la enzima.

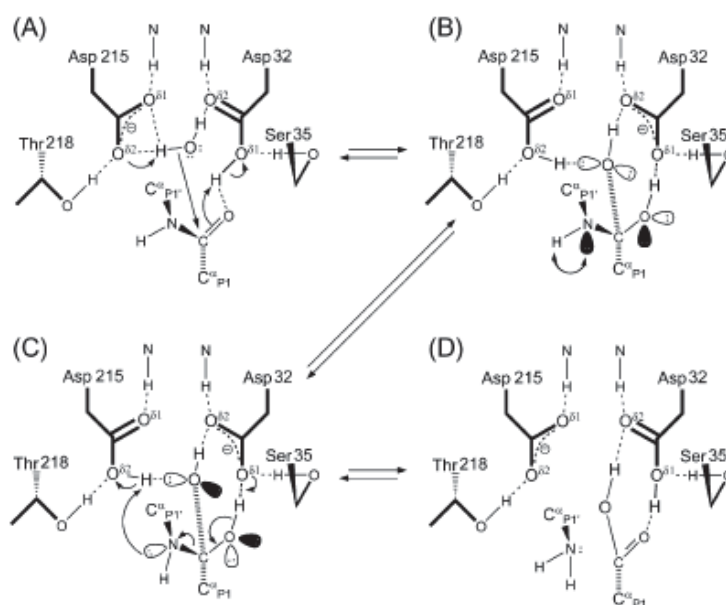


Figura 5. Mecanismo de catálisis de las aspártico peptidasas. **A.** El estado basal del sitio activo de la enzima. **B.** Formación del intermediario tetrahédrico. **C.** Protonación del grupo saliente. **D.** Ruptura del enlace. Tomado de Wlodawer et al. (2013).

2.3 La catepsina D

La catepsina D es una aspártico peptidasa de la familia de la pepsina, que en mamíferos se encuentran en los lisosomas de todas las células y está involucrada en la hidrólisis de proteínas en procesos celulares tales como apoptosis y autofagia (Zaidi et al., 2008), y por ende, asociada a patologías (Benes et al., 2008). La ruta celular de síntesis y de modificación post-traducciona de la catepsina D de los mamíferos ha sido ampliamente estudiada, se sintetiza en el retículo endoplásmico rugoso como pre-pro-enzima (Benes et al., 2008), el péptido señal es removido durante la translocación co-traducciona a través de la membrana del retículo endoplásmico para dar lugar a la pro-enzima. La pro-enzima es modificada mediante la adición de oligosacáridos a sitios de N-glicosilación, y transportada a los

lisosomas vía la ruta manosa-6-fosfato (Kornfeld y Mellman, 1989; Fortenberry et al., 1995; Zaidi et al., 2008).

En los invertebrados, se han reportado peptidasas tipo catepsina D con participación en la hidrólisis de proteína del alimento, estas han sido estudiadas en artrópodos tales como las garrapatas *Ixodes ricinus* y *Haemaphysalis longicornis* (Burley y Petsko, 1988; Boldbaatar et al., 2006; Sojka et al., 2012), la mosca *Musca domestica* (Padilha et al., 2009), los escarabajos de las especies *Callosobruchus maculatus*, *Sitophilus zeamais* y *Leptinotarsa decemlineata* (Brunelle et al., 1999; Ahn y Zhu-Salzman, 2009; Matsumoto et al., 2009; Babbie et al., 2010) y las langostas *Homarus americanus* y *H. gammarus* (Rojo et al., 2010a) así como de algunos helmintos hematófagos como *Schistosoma mansoni* y *Necator americanus* (Brindley et al., 2001; Williamson et al., 2002; Ranjit et al., 2009).

La catepsina D tiene pH óptimo en el rango de 3.5 a 5, estas endopeptidasas son específicas para hidrolizar residuos de aminoácido hidrofóbicos (Sun et al., 2013). Además, la especificidad secundaria parece tener un papel importante en este tipo de peptidasas, especialmente en el residuo P2, el que muestra preferencia por Glu y el residuo P2' con preferencia por residuos básicos (Scarborough et al., 1993; Beyer y Dunn, 1998; Dunn y Hung, 2000). En la catepsina D bovina, los residuos de aminoácido que forman el sub-sitio de reconocimiento S1 son Val31, Asp33, Gly35, His77, Tyr78, Phe126, Phe131, Ile134 y Asp231, mientras que los que forman el sub-sitio S1' son Gly35, Ser36, His77, Tyr78 y Thr234.

La catepsina D conserva en general la estructura tridimensional de las peptidasas tipo pepsina. Algunas catepsinas D están conformadas por dos cadenas polipeptídicas, y algunas

otras por solo una, esto dependiendo del último paso de procesamiento que involucra la hidrólisis llevada a cabo por otras peptidasas lisosomales en la maduración de la enzima. Aquellas catepsinas D de doble cadena polipeptídica presentan cuatro puentes disulfuro, mientras que aquellas de una sola cadena, presentan sólo tres puentes disulfuro. Las catepsinas D presentan dos lazos adicionales, el lazo rico en prolina formado por los residuos 312-317 que ocurren únicamente en la catepsina D y la renina y que se localiza próximo al sitio activo, y el lazo de procesamiento formado por los residuos 95-105, que únicamente se localiza en las catepsinas D (Metcalf y Fusek, 1993; De Luca et al., 2009).

2.3 La langosta Americana

La langosta americana, *Homarus americanus*, es un crustáceo decápodo de la familia Nephropidae, dicha familia es coloquialmente conocida como el grupo de las langostas queladas (Porter et al., 2005). Esta especie habita en la costa Oeste del Atlántico del Norte desde Carolina del Norte, en Estados Unidos hasta Newfoundland, en Canadá (Cobb y Phillips, 1980). La langosta americana es un organismo ectotermo que habita ambientes cuya temperatura varía entre 0 y 25 °C, la cual depende de diversos factores, entre ellos la latitud, variaciones estacionales, mareas y vientos (Cobb y Phillips, 1980).

2.4 La aspártico peptidasa catepsina D1 de langosta Americana

La fisiología de la digestión proteica en los decápodos ha sido materia de diversos estudios. Se ha encontrado que peptidasas de clase serino, cisteíno, aspártico y metalo, se encuentran en el sistema digestivo de especies del orden Decápoda. Las peptidasas de la clase serino, en especial la tripsina y la quimotripsina, son los componentes proteolíticos más abundantes

en las especies de decápodos que se han estudiado a la fecha (Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2003) incluyendo langostas, *Panulirus interruptus* (Celis-Guerrero et al., 2004) y *P. argus* (Perera et al., 2008a, 2008b), peneidos, *Penaeus vannamei* (Hernández-Cortés et al., 1997) y *Penaeus monodon* (Tsai et al., 1991), y cangrejos, *Callinectes bellicosus* y *C. arcuatus* (Díaz-Tenorio et al., 2006). Sin embargo, a partir del descubrimiento de actividad proteolítica a pH ácido en el jugo gástrico de la langosta espinosa de California (*P. interruptus*), se cuestionó la exclusividad de las serino peptidasas (Celis-Guerrero et al., 2004) y pronto se descubrió que las aspártico y cisteíno peptidasas también podrían intervenir en la digestión de proteína en diversas especies de decápodos (Navarrete Del Toro et al., 2006).

Las peptidasas de tipo aspártico (Rojo et al., 2010a, 2010b, 2013) y cisteíno (Laycock et al., 1989, 1991) se han purificado a partir del jugo gástrico de *H. americanus*. La aspártico peptidasa del jugo gástrico de la langosta americana se identificó como catepsina D por la secuenciación del extremo N-terminal por espectrometría de masas y por la secuenciación del ADN complementario (Rojo et al., 2010a). La primera peptidasa identificada fue llamada catepsina D1, para distinguirla de otra peptidasa del mismo tipo llamada catepsina D2, de posible función intracelular (Rojo et al., 2010a). La función digestiva de la catepsina D1 se basa en dos hechos: 1) la presencia de la enzima activa en el jugo gástrico de la langosta y 2) por análisis de transcritos en diversos tejidos, estando expresado únicamente en la glándula digestiva, mientras que los transcritos de la catepsina D2 se encontraron expresados en todos los tejidos evaluados (Rojo et al., 2010a).

Las características bioquímicas de la catepsina D1 se compararon con las de catepsina D bovina. Se estudió de relación de los de los parámetros cinéticos y la temperatura (K_m y k_{cat} , a 5, 10 y 25 °C). La K_m de la catepsina D1 resultó independiente de la temperatura, mientras que la K_m de su homólogo bovino sí presentó dependencia (Rojo et al., 2013). La eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de la enzima de langosta fue superior a la de la enzima bovina en el rango de temperatura estudiado (Rojo et al., 2013). También se estudió la estabilidad de la catepsina D1 y de la catepsina D bovina. La catepsina D1 se desnaturalizó en menor tiempo a 50 y 60 °C, lo que demuestra que es una enzima menos estable. El estudio de comparación de la estructura por modelación, demostró que a diferencia de su homólogo bovino, la catepsina D1 de langosta carece del lazo de procesamiento dado que está constituida por una sola cadena polipeptídica (Rojo et al., 2010b). La catepsina D1 también carece de los residuos de prolina en el lazo identificado como “*poly-proline loop*” en la catepsina D de los mamíferos y que se ha identificado como un sitio de interacción con sustrato (Rojo et al., 2010b). Esta característica estructural podría permitir que el sitio de unión de sustrato sea más flexible y ser responsable de la mayor eficiencia catalítica encontrada en catepsina D1 (Rojo et al., 2013). Las características encontradas en catepsina D1, son típicas de las enzimas de organismos adaptados a bajas temperaturas, las llamadas enzimas adaptadas al frío.

2.5 Planteamiento de la investigación

Existen variadas estrategias adaptativas para lograr un nivel adecuado de proteólisis en organismos ectotermos que habitan ambientes de baja temperatura. A nivel enzimático, la principal estrategia es la síntesis de enzimas adaptadas al frío, que han incrementado su eficiencia catalítica a expensas de la estabilidad térmica. La catepsina D1 de la langosta

Americana es la primera peptidasa digestiva de la familia de la pepsina caracterizada a detalle en los decápodos, que al compararse con la catepsina D de bazo bovino, su homólogo de endotermo, exhibe mayor eficiencia catalítica y ausencia de estructuras tipo lazo características de estas enzimas como el lazo de poli-prolinas y el lazo de maduración. Dichas diferencias podrían constituir adaptaciones que le permiten a la catepsina D1 catalizar su sustrato a baja temperatura. A fin de definir si la catepsina D1 es una enzima adaptada al frío, se estudió la relación entre la constante catalítica y la temperatura, se calcularon los parámetros termodinámicos de activación y la estabilidad a la temperatura, que son los dos criterios que tipifican a estas enzimas. Además, se estudió la especificidad de la enzima catepsina D1 y se comparó con las propiedades de sus homólogos de organismos endotermos, la catepsina D bovina y la pepsina porcina.

3. JUSTIFICACIÓN

Las enzimas adaptadas al frío constituyen modelos útiles para el estudio de la evolución y el plegamiento de proteínas, así como para entender la relación entre la flexibilidad, actividad y estabilidad (Feller y Gerday, 2003). Las enzimas adaptadas al frío son también de interés en el ámbito de la biotecnología (Russell, 1998; Gerday et al., 2000; Demirjian et al., 2001). Dada su mayor eficiencia catalítica, se requiere menor concentración de enzima para alcanzar una determinada tasa de reacción. Por otra parte, estas enzimas pueden inactivarse a temperaturas moderadas, lo que permite detener los procesos enzimáticos sin comprometer la integridad de los productos (Gerday et al., 2000; Cavicchioli et al., 2002; Feller, 2013). El estudio de la activación termodinámica y la estabilidad de la catepsina D1 permitirán determinar si la enzima es adaptada al frío; además, el estudio de especificidad de la catepsina D1 permitirá ampliar el conocimiento sobre sus propiedades bioquímicas. Este estudio es importante para cimentar investigaciones futuras que permitan explorar las características estructurales responsables de la adaptación al frío y el potencial biotecnológico de esta enzima.

4. HIPÓTESIS

Si la catepsina D1 es una enzima adaptada al frío, entonces exhibirá valores de parámetros termodinámicos de activación y estabilidad menores a los de enzimas homólogas de organismos endotermos, además exhibirá menor especificidad por el sustrato.

5. OBJETIVO

5.1 Objetivo general

Estudiar la activación termodinámica, la estabilidad térmica y la selectividad de sustrato de la catepsina D1 del jugo gástrico de langosta Americana, *H. americanus*, y comparar con los de enzimas homólogas de organismos endotermos.

5.2 Objetivos específicos

1. Calcular los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten y los parámetros termodinámicos de activación de la catepsina D1 del jugo gástrico de langosta Americana y comparar con enzimas homólogas de organismos endotermos.
2. Estudiar la estabilidad térmica de la catepsina D1 del jugo gástrico de langosta Americana y comparar con enzimas homólogas de organismos endotermos.
3. Estudiar la selectividad de sustrato de la catepsina D1 del jugo gástrico de langosta Americana y comparar con enzimas homólogas de organismos endotermos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Las enzimas

6.1.1 Langostas y obtención de jugo gástrico

Cinco especímenes de langosta Americana fueron adquiridos en un mercado en San Francisco, California, EU. El jugo gástrico se obtuvo inmediatamente, para ello se empleó una jeringa de 5 mL adaptada a una sonda plástica de 8 cm. La sonda se introdujo en la cavidad oral y el jugo gástrico se obtuvo por succión con el émbolo de la jeringa. El jugo gástrico colectado se almacenó en tubos de plástico de 1.5 mL y se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, el jugo gástrico se centrifugó a $10,000\times g$ y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min para la remoción de sólidos del mismo. El sobrenadante fue colectado, liofilizado y almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

6.1.2 Purificación de la peptidasa aspártica de langosta Americana

La purificación de la peptidasa aspártica de la langosta Americana se llevó a cabo siguiendo la metodología reportada por Rojo y colaboradores (2010b), mediante cromatografía de afinidad en 1 mL de matriz de pepstatina A-agarosa (P2032, Sigma Aldrich) empacada en una columna abierta de 4 mL de volumen total, de 0.7 cm de diámetro y 10 cm de altura. El jugo gástrico liofilizado se reconstituyó a una concentración de 25 mg/mL en amortiguador de equilibrio (citrato de sodio-ácido cítrico 50 mM, pH 4.0), y se cargó 0.5 mL a la columna previamente equilibrada. La columna fue lavada con 5 mL del mismo amortiguador. Las proteínas adsorbidas en la matriz se eluyeron en tres pasos sucesivos, primero con 5 mL de amortiguador citrato de sodio-ácido cítrico 50 mM, NaCl 1M, pH 4.0; luego con 5 mL de

Tris-HCl 100 mM, NaCl 1 M, pH 7.0; y finalmente con 5 mL de Tris-HCl 100 mM, NaCl 1 M, pH 7.5. Se colectaron fracciones de 0.5 mL, las cuales fueron analizadas por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-DTT-PAGE) y por zimograma en gel semi-desnaturizante de poliacrilamida (S-SDS-PAGE). La aspártico peptidasa fue colectada en el último paso de elución, las fracciones que contuvieron la aspártico peptidasa y que mostraron una sola banda en SDS-DTT-PAGE y S-SDS-PAGE se concentraron por ultrafiltración en un filtro Amicon (corte de 10 kDa) a $4000 \times g$ y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. La enzima fue almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

6.1.3 SDS-DTT-PAGE y S-SDS-PAGE

Para el análisis de las fracciones de cromatografía de afinidad se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% de acuerdo al método de Laemmli (1970). Las proteínas se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-DTT-PAGE), mientras que la actividad se reveló por zimograma en gel de poliacrilamida semi-desnaturizante (S-SDS-PAGE). Las electroforesis se realizaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a corriente constante de 15 mA por gel, en una cámara de electroforesis SE250/SE260 (Hoeffer) conectada a una fuente de poder 3000P (VWR).

Para el análisis de composición de proteínas, 10 μL de cada fracción se trataron con 5 μL de amortiguador de carga 2X con dodecil sulfato de sodio (SDS) y ditioneitol (DTT), las muestras se incubaron en agua en ebullición por 2 min y luego se cargaron en gel. Después de la electroforesis, el gel se tiñó por 2 h con solución de azul de Coomassie R-250 al 0.05%, metanol al 40% y ácido acético al 7%; luego se destiñó con solución de metanol al 40% y

ácido acético al 7%, para revelar las bandas azules correspondientes a proteínas separadas en el gel.

Por otro lado, para el monitoreo de la actividad proteolítica, se cargaron en el gel 10 μL de cada fracción tratados con 5 μL de amortiguador de carga 2X que contenía SDS. Después de la electroforesis, el gel se lavó 3 veces en amortiguador glicina-HCl 100 mM, pH 3.0 por 10 min, y se incubó a 4 °C por 30 min en solución de sustrato hemoglobina bovina 0.25% en amortiguador glicina-HCl 100 mM, pH 3.0; finalmente se incubó en la misma solución por 90 min a temperatura ambiente. Después de la incubación con el sustrato, el gel se tiñó por 2 h con solución azul de Coomassie R-250 siguiendo el procedimiento antes mencionado para revelar bandas claras en un fondo azul correspondientes a las endopeptidasas activas separadas en el gel.

6.1.4 Peptidasas aspárticas empleadas como referencia

Para el estudio comparativo de la catepsina D1 de langosta americana se emplearon dos enzimas homólogas: la catepsina D de bazo bovino (Calbiochem 219396) y la pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma P6887).

6.2 Estudio de la termodinámica de activación

6.2.1 Medición de la velocidad de reacción

Para el estudio de la termodinámica de activación se midió la velocidad de reacción en régimen de estado estacionario con el sustrato fluorogénico 7-metoxicumarin-4-ácido acético-Gly-Lys-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys-(2,4-dinitrofenil)-D-Arg-NH₂ (EnzoLife Sciences BML-P145-0001), descrito por Yasuda (1999). Por cada réplica del

ensayo de actividad se emplearon 3 tubos negros de 1.5 mL, correspondientes a cada tiempo de medición. En cada uno de los tubos se añadieron 25 μL de mezcla amortiguador/sustrato, que consistió en 70 μL de sustrato 6X disuelto en DMSO y 280 μL de amortiguador de reacción (acetato de sodio-ácido acético 50 mM, tritón 0.01%, pH 4.0).

Para medir la actividad, cada reacción se inició mediante la adición de 5 μL de enzima diluida en amortiguador de reacción, y se detuvo mediante la adición de 170 μL de ácido tricloroacético al 5% después de 0, 10 y 20 min; posteriormente, los tubos se agitaron en vórtex y se centrifugaron a $10000 \times g$ durante 3 min a temperatura ambiente. En el ensayo se incluyó un control negativo, en el que la enzima se reemplazó por amortiguador de reacción al cual se le añadieron 170 μL de ácido tricloroacético al 5% al final de los 20 min.

Se midió la fluorescencia de 100 μL de cada sobrenadante de la reacción en un lector de microplaca Synergy 4 (Biotek) a una longitud de onda de 328 y 393 nm de excitación y emisión, respectivamente. La velocidad de reacción se calculó mediante una curva estándar de 7-metoxicumarin-4-ácido acético (MCA) que es el fluoróforo liberado por hidrólisis del sustrato. La velocidad de reacción (v) en $\text{nmol L}^{-1} \text{min}^{-1}$, se calculó de acuerdo a la ecuación 5.

Ecuación 5

$$v = \frac{\Delta\text{UFR}}{\text{UFR}_{1\text{nmol}} \times V_r \times \Delta t}$$

En donde ΔUFR es el cambio en unidades relativas de fluorescencia respecto a un periodo determinado de tiempo en minutos (Δt), $\text{UFR}_{1\text{nmol}}$ son las unidades relativas de fluorescencia registradas por 1 nmol de MCA y V_r es el volumen de reacción en L.

6.2.2 Cálculo de parámetros cinéticos

Con la finalidad de calcular los parámetros cinéticos de las enzimas en estudio, se determinaron la velocidad máxima (V_{\max}) y la constante de Michaelis-Menten (K_m). La velocidad de reacción se midió a diferentes concentraciones de sustrato inicial, en el rango de 1–200 μM . Los parámetros cinéticos se calcularon usando el programa Prism 5 (GraphPad software, Inc.).

Para caracterizar la termodinámica de activación, los parámetros cinéticos se calcularon a diferentes temperaturas en el rango de 5–55 °C. La temperatura de las reacciones fue controlada en un equipo ThermoStat plus (Eppendorf) con soporte para tubos de 1.5 mL. La constante catalítica (k_{cat}) expresada en nmol de MCA liberados por segundo por sitio activo de enzima, se calculó de acuerdo a la ecuación 6.

Ecuación 6
$$k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E]_0$$

En donde $[E]_0$ es la concentración molar de enzima en la reacción que se calculó por titulación de sitios activos siguiendo la estrategia descrita por Knight (1995). La concentración de sitios activos fue de 0.310 nM, 0.788 nM y 0.318 nM para la catepsina D1 de langosta, la catepsina D bovina y la pepsina porcina, respectivamente. La metodología detallada para la titulación de sitios activos se encuentra en la sección de anexos 11.1.

6.2.3 Cálculo de parámetros termodinámicos de activación

Se construyó el gráfico de Arrhenius empleando $1/T$ como valores de la abscisa y $\ln(k_{\text{cat}})$ como valores de la ordenada y se calculó la Energía de activación (E_a) por regresión lineal empleando la ecuación 7.

Ecuación 7
$$\ln k_{\text{cat}} = \frac{E_a}{RT} + \ln A$$

Los parámetros termodinámicos de activación se calcularon de acuerdo a Lonhienne et al. (2000), usando las ecuaciones 8–10.

Ecuación 8
$$\Delta G^\# = RT \left(\ln \frac{k_B T}{h} - \ln k_{\text{cat}} \right)$$

Ecuación 9
$$\Delta H^\# = E_a - RT$$

Ecuación 10
$$T\Delta S^\# = \Delta H^\# - \Delta G^\#$$

En donde T es la temperatura absoluta, R es la constante de los gases ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), A es una constante relacionada con la frecuencia de colisión, k_B es la constante de Boltzmann ($1.3805 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), h es la constante de Plank ($6.6256 \times 10^{-34} \text{ J s}$), y $\Delta G^\#$, $\Delta H^\#$, and $\Delta S^\#$ son la energía libre de Gibbs, la entalpía y la entropía de activación, respectivamente.

Se consideró a la catepsina D1 de langosta, como la enzima adaptada al frío (p) y las peptidasas catepsina D bovina y pepsina gástrica porcina como las enzimas adaptadas a temperaturas moderadas (m). Se calcularon los dobles diferenciales de energía libre de Gibbs ($\Delta(\Delta G^\#)_{p-m}$), entalpía de activación ($\Delta(\Delta H^\#)_{p-m}$) y entropía de activación ($T\Delta(\Delta S^\#)_{p-m}$) de acuerdo a lo sugerido en literatura reciente (Lonhienne et al., 2000). La metodología detallada para el cálculo de los parámetros termodinámicos de activación se encuentra en la sección de anexos 11.2.

6.3 Estudio de estabilidad

6.3.1 Análisis de estabilidad por fluorimetría de barrido

La estabilidad de las peptidasas aspárticas se analizó por fluorimetría. Las proteínas se mezclaron con Sypro Orange (Life Technologies S-6650), una molécula que funciona como reportera de la desnaturalización de proteínas, que es soluble y no emite fluorescencia en ambiente hidrofílico, pero que emite fluorescencia bajo condiciones hidrofóbicas, como es el caso de los residuos hidrofóbicos que son expuestos por las proteínas durante la desnaturalización (Niesen et al., 2007). Aunque esta técnica no es convencional para el estudio de la estabilidad de proteínas, se ha propuesto su aplicación para el estudio de proteínas adaptadas a diferentes condiciones térmicas (Biggar et al., 2012).

En este estudio, todas las proteínas se ensayaron a 8 μM de concentración final, evaluando la absorbancia a 280 nm y usando el coeficiente de extinción molar calculado por el método descrito por Pace et al. (1995). Las reacciones con un volumen final de 20 μL , incluyeron amortiguador acetato de sodio-ácido acético 100 mM, NaCl 150 mM, pH 4.0, y 5X Sypro Orange, se depositaron en una placa para PCR en tiempo real con tapas ópticas y luego se sometieron a un programa de calentamiento a una tasa de 1°C/min, de 25 a 100 °C, en un termociclador Stratagene Mx3005p, en donde se registró la fluorescencia a 492 y 610 nm de longitud de onda de excitación y emisión, respectivamente. Se analizó la desnaturalización bajo dos tratamientos, en ausencia y en presencia de pepstatina A 10 μM . Los ensayos en ausencia de pepstatina A incluyeron al solvente DMSO. Se incluyeron controles negativos en ausencia de proteína. Todas las proteínas fueron ensayadas en la misma placa y por

triplicado, con la media de los tres registros se construyeron gráficos en que se representa la fluorescencia registrada respecto a la temperatura.

6.3.2 Cálculo de la temperatura media de desnaturalización

Los datos de temperatura y fluorescencia fueron exportados y analizados en el programa Prism 5 (GraphPad software, Inc.) para el cálculo de la temperatura media de desnaturalización (T_m) por ajuste a la ecuación de Boltzman (ecuación 11).

$$\text{Ecuación 11} \quad y = LL + \frac{(UL-LL)}{1+e^{\left(\frac{T_m-x}{a}\right)}}$$

En donde y es la fluorescencia registrada a una temperatura dada x , LL y UL son los límites inferior y superior de intensidad de fluorescencia de todo el set de datos, y a es la pendiente de la curva en T_m . La T_m se localiza en los gráficos como un punto de inflexión en la curva de transición.

6.4 Estudio de especificidad

6.4.1 Ensayo de actividad de aspártico y cisteíno peptidasa

Se midió la actividad de la catepsina D1 de langosta americana, catepsina D de bazo bovino, y pepsina gástrica porcina. La actividad de aspártico peptidasa se monitoreó por hidrólisis del sustrato 7-metoxicumarin-4-ácido acético-Gly-Lys-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys-(2,4-dinitrofenil)-D-Arg-NH₂ (EnzoLife Sciences BML-P145-0001). Mientras que la actividad de cisteíno peptidasa se monitoreó por hidrólisis del sustrato Z-Phe-Arg-7-amino-4-metilcumarin. Las reacciones tuvieron un volumen total de 200 μ L y 10 μ M concentración final de sustrato, en buffer de acetato de sodio-ácido acético 100 μ M, DTT 1.5 mM (pH 4.0).

La fluorescencia se monitoreó en un fluorómetro Flex Station (Molecular Devices) por 1 h. Para la actividad de aspártico peptidasa se monitoreó la fluorescencia a 328 y 393 nm longitud de onda de excitación y de emisión, respectivamente. Mientras que para la actividad de cisteíno peptidasa se monitoreó la fluorescencia a 380 y 460 nm longitud de onda de excitación y de emisión, respectivamente. La actividad se midió en unidades arbitrarias de fluorescencia por minuto de reacción.

6.4.2 Ensayo de especificidad

La especificidad por el sustrato de las peptidasas depende de las características físico-químicas y estéricas de los sitios de reconocimiento de la enzima y de las interacciones de estos sitios con el sustrato. Para estudiar la especificidad de catepsina D1 y de sus homólogos de organismos endotermos, la catepsina D bovina y la pepsina porcina, se empleó una colección de 124 tetradecapéptidos sintéticos de composición altamente diversificada, que fue diseñada de tal manera que la secuencia de cada péptido es única y el conjunto de péptidos presenta un total de 1612 posibles sitios de hidrólisis (O'Donoghue et al., 2012). La colección de sustratos incluye todos los aminoácidos comunes en la estructura de las proteínas, excepto cisteína debido al potencial de formación de enlaces disulfuro, y la metionina es remplazada por norleucina debido a que la metionina es propensa a oxidación (O'Donoghue et al., 2012).

Para el ensayo de especificidad se incluyeron 30 U de actividad de aspártico peptidasa de cada una de las muestras cuantificadas, como se describe arriba. Para obtener información sobre la especificidad de la catepsina D1, se analizó y comparó el perfil de proteólisis con el de sus homólogos de origen endotermo, la catepsina D bovina y la pepsina porcina. La

muestra de catepsina D1 se analizó también en presencia de 2 μM E-64 para descartar potenciales sitios de hidrólisis asociados a cisteína peptidasa.

Las muestras se incubaron en dos tubos de reacción con 62 tetradecapéptidos cada uno a concentración equimolar de 0.5 μM , en buffer de acetato de sodio-ácido acético 100 mM, DTT 1.5 mM (pH 4.0) y en un volumen total de 125 μL . Se retiraron 30 μL de cada tubo de reacción a los 0, 60, 240 y 1200 min y se mezclaron con 7.5 μL de 20% ácido fórmico para detener la reacción, inmediatamente después se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Se incluyó un control sin enzima para descartar la posible hidrólisis espontánea de los péptidos.

6.4.3 Identificación de los sitios de hidrólisis por espectrometría de masas

Antes del análisis las muestras se desalaron por retención en puntas C18 Zip (Millipore) y se rehidrató en ácido fórmico 0.1%. Se cargaron 0.1 μg de péptidos a un sistema de LC-MS/MS. Se empleó un espectrómetro de masas LTQ-FT (Thermo Scientific) equipado con un instrumento de UPLC nanoACUITY (Waters). Los productos se separaron por cromatografía de fase reversa con una columna C18 (BEH130, 1.7 μ de tamaño de partícula, 100 $\mu\text{m} \times 100$ mm). El sistema de LC se operó a un flujo de 600 nL/min, y los péptidos se separaron por gradiente lineal durante 42 min de 2% a 30% de solución B en solvente A (A: ácido fórmico al 0.1%, B: acetonitrilo al 70% en ácido fórmico al 0.1%). Se analizaron las señales de masa/carga en el rango de 350–1800 m/z .

La lista de picos de espectrometría de masas se generó usando el software PAVA y los péptidos se identificaron usando el software Protein Prospector v.5.10.0 (UCSF), la búsqueda se realizó en la base de datos que contenía la secuencia de los 124 péptidos iniciales. Los datos de sitios de hidrólisis se extrajeron del programa Protein Prospector usando el script

llamado programa “MSP-extractor” (<http://www.craiklab.ucsf.edu/extractor.html>) que identifica y extrae la secuencia de los enlaces hidrolizados comparando los péptidos producto con los péptidos originales.

Para la comparación de la especificidad por el sustrato, se empleó el software iceLogo (<http://code.google.com/p/icelogo/>) para generar los diagramas tipo logo en base a los aminoácidos a ± 4 posiciones adyacentes a los sitios de hidrólisis identificados.

6.5 Análisis estructural de la catepsina D1 de langosta y de sus homólogos de organismos endotermos.

Para el análisis y comparación de las características estructurales de la catepsina D1 y de sus homólogos bovino y porcino se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos usando el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). También se analizaron los elementos de estructura secundaria de catepsina D1 usando el programa Jpred3 (Cole et al., 2008). Otros elementos de la estructura de la catepsina D1, como los sitios de unión al sustrato, se analizaron en base los estudios cristalográficos de sus homólogos bovino y porcino (Abad-Zapatero et al., 1990; Metcalf y Fusek, 1993).

7. RESULTADOS

7.1 Los parámetros cinéticos y la activación termodinámica de la catepsina D1 y sus homólogos de organismos endotermos.

En el estudio de los parámetros cinéticos, la K_m de la catepsina D1 de langosta presentó variación no significativa en el rango de los 5–25 °C y aumentó de forma significativa a temperaturas superiores. La K_m de la pepsina porcina tuvo un comportamiento similar al de la catepsina D1. Por otro lado, la K_m de la catepsina D bovina fue afectada de mayor forma por la temperatura (Figura 6).

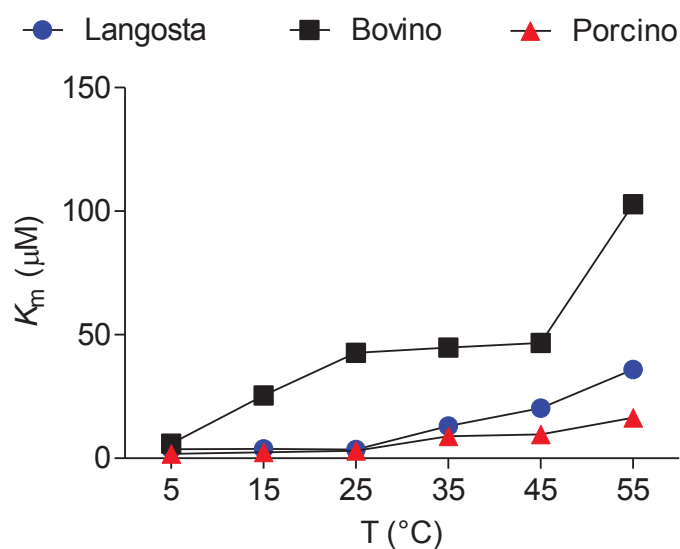


Figura 6. Constante de Michaelis-Menten (K_m) de la catepsina D1 y sus homólogos de organismos endotermos en el rango de 5 a 55°C.

La constante catalítica (k_{cat}) de la catepsina D1 fue superior que aquella de sus homólogos de endotermos en todo el rango de temperatura estudiado. La k_{cat} de la catepsina D1 y de la pepsina porcina presentó un aumento gradual hasta 55 °C, la temperatura máxima evaluada. Por otro lado, la k_{cat} de la catepsina D bovina alcanzó el valor máximo a 45 °C y la actividad

disminuyó a 55 °C (Figura 7, recuadro interior). El gráfico de Arrhenius se muestra en la figura 7.

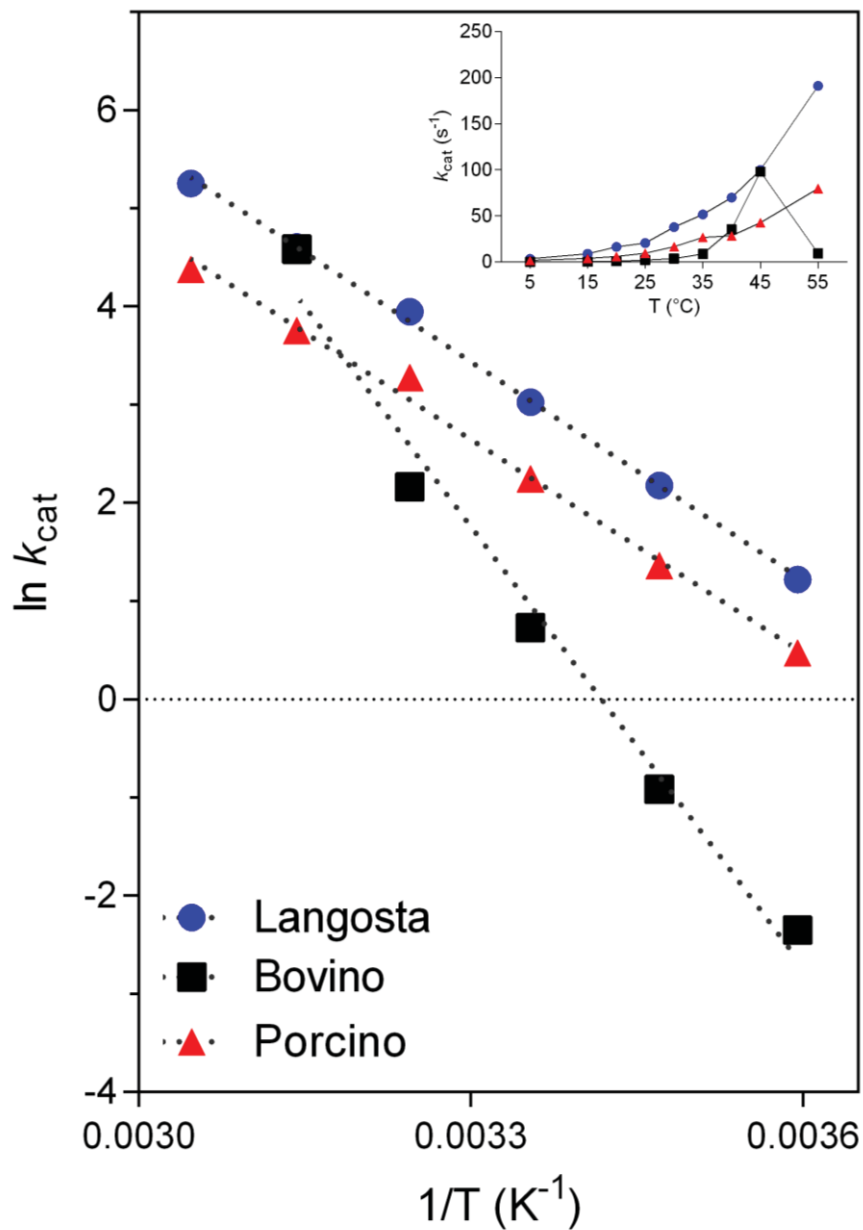


Figura 7. Gráfico de Arrhenius que relaciona el inverso de la temperatura con el logaritmo natural de la constante catalítica (k_{cat}) de la catepsina D1 y sus homólogos de organismos endotermos. Las líneas punteadas representan las curvas generadas por regresión lineal con la ecuación de Arrhenius. La constante catalítica a diferentes temperaturas se muestra en el recuadro interior.

En la tabla II se muestran los valores de los parámetros termodinámicos de activación de las tres peptidasas estudiadas. A 15 °C el doble diferencial de la energía libre de activación ($\Delta(\Delta G^\#)_{p-m}$) de la catepsina D1 fue negativo en comparación con ambas enzimas de endotermos. Los dobles diferenciales de $\Delta(\Delta H^\#)_{p-m}$ y de $T\Delta(\Delta S^\#)_{p-m}$ de la catepsina D1 resultaron también presentaron valores negativos en comparación con ambas enzimas de endotermos.

Tabla II. Parámetros termodinámicos de activación de la catepsina D1 y de sus homólogos de organismos endotermos a 15 °C.

Enzima		T (°C)	k_{cat} (s ⁻¹)	$\Delta G^\#$ (kJ/mol)	$\Delta H^\#$ (kJ/mol)	$T\Delta S^\#$ (kJ/mol)	$\Delta(\Delta G^\#)_{p-m}$ (kJ/mol)	$\Delta(\Delta H^\#)_{p-m}$ (kJ/mol)	$T\Delta(\Delta S^\#)_{p-m}$ (kJ/mol)
Catepsina D	Langosta	15	8.8	65.3	54.0	-11.2			
	Bovino		0.4	72.7	124	51.3	-7.4	-69.9	-62.6
Pepsina	Porcino		3.9	67.2	57.9	-9.30	-1.90	-3.9	-1.9

7.2 La estabilidad de la catepsina D1 y sus homólogos de organismos endotermos.

En ausencia de pepstatina A, la temperatura media de desnaturalización de la catepsina D1 es menor que la de sus homólogos de bovino y porcino (Figura 8 y Tabla III). Después del tratamiento con el inhibidor pepstatina A, la temperatura media de desnaturalización de la catepsina D1 de langosta y de la pepsina porcina fue mayor que en ausencia del inhibidor. En la catepsina D bovina se observó una mínima diferencia respecto al tratamiento en ausencia del inhibidor. Esto indica que el pepstatina A tiene un efecto estabilizante en la catepsina D1 y en la pepsina porcina. Cabe destacar que el efecto estabilizante por interacción

con pepstatina A fue mayor en la catepsina D1 de langosta, ya que se encontró un aumento de 38 °C en la temperatura media de desnaturalización (Figura 8 y Tabla III).

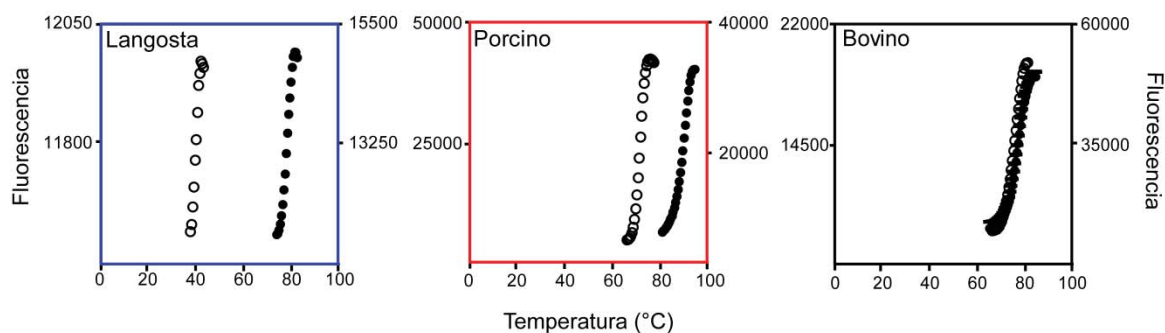


Figura 8. Análisis de la desnaturalización de la catepsina D1 y sus homólogos de organismos endotermos en ausencia y presencia de pepstatina A. Los círculos abiertos presentan las curvas de desnaturalización en ausencia de pepstatina A, mientras que los círculos cerrados presentan las curvas de desnaturalización en presencia de pepstatina A. Se aumentó la temperatura a 1°C/min de 25 a 100 °C y se registró la fluorescencia emitida por SYPRO ORANGE al final de cada minuto.

Tabla III. Temperatura media de desnaturalización de la catepsina D1 y de sus homólogos de organismos endotermos en ausencia y presencia de pepstatina A. La temperatura media de desnaturalización fue identificada como el punto de inflexión en las curvas de desnaturalización de la figura 8.

Enzima	T _m (°C)	
	Pepstatina A (-)	Pepstatina A (+)
Catepsina D1 langosta	40.13 ± 3.069	78.09 ± 0.684
Pepsina gástrica porcina	71.02 ± 0.069	88.68 ± 0.096
Catepsina D bovina	75.39 ± 0.139	76.73 ± 0.110

7.3 Estudio de especificidad por sustrato de la catepsina D1 y sus homólogos de organismos endotermos.

La peptidasa de langosta purificada por cromatografía de afinidad en pepstatina A-agarosa aparece como una sola banda de ~45 kDa en SDS-DTT-PAGE (Figura 9A). La actividad específica de esta aspártico peptidasa aumenta diez veces después de la purificación, mientras que la actividad específica de la cisteíno peptidasa disminuye a 4% de la actividad específica inicial (Figura 9B). Considerando que aún después de la purificación se detectó actividad remanente de cisteíno peptidasa, se evaluó el perfil de hidrólisis de la peptidasa aspártica de langosta en ausencia (Figura 9C) y en presencia de E-64 (Figura 9D). El número de sitios de hidrólisis identificados a los 1200 min de reacción fue de 266 en las reacciones sin E-64 y 44 en las reacciones con E-64; por lo tanto, 222 sitios de hidrólisis son sensibles a E-64 y podrían ser producidos por cisteíno peptidasas que permanecen en las fracciones de elución de catepsina D1 en la cromatografía de afinidad. Aunque la actividad de la cisteíno peptidasa cuantificada con sustrato fluorogénico del eluato es solo el 4% de la actividad inicial en el jugo gástrico, los productos se identifican en el ensayo de especificidad debido a la alta sensibilidad de la técnica empleada. Como puede observarse en las figuras 9C y 9D, el perfil de hidrólisis en estas dos muestras es diferente, enriqueciéndose la presencia de aminoácidos hidrofóbicos en las posiciones P1-P1' tras el tratamiento con E-64. Debido a estos resultados fue pertinente incluir la catepsina D1 de langosta tratada con E-64 para el estudio de. Las secuencias de los sitios de hidrólisis de la catepsina D1 en presencia y ausencia de E-64 se presentan en los anexos 11.3 y 11.4.

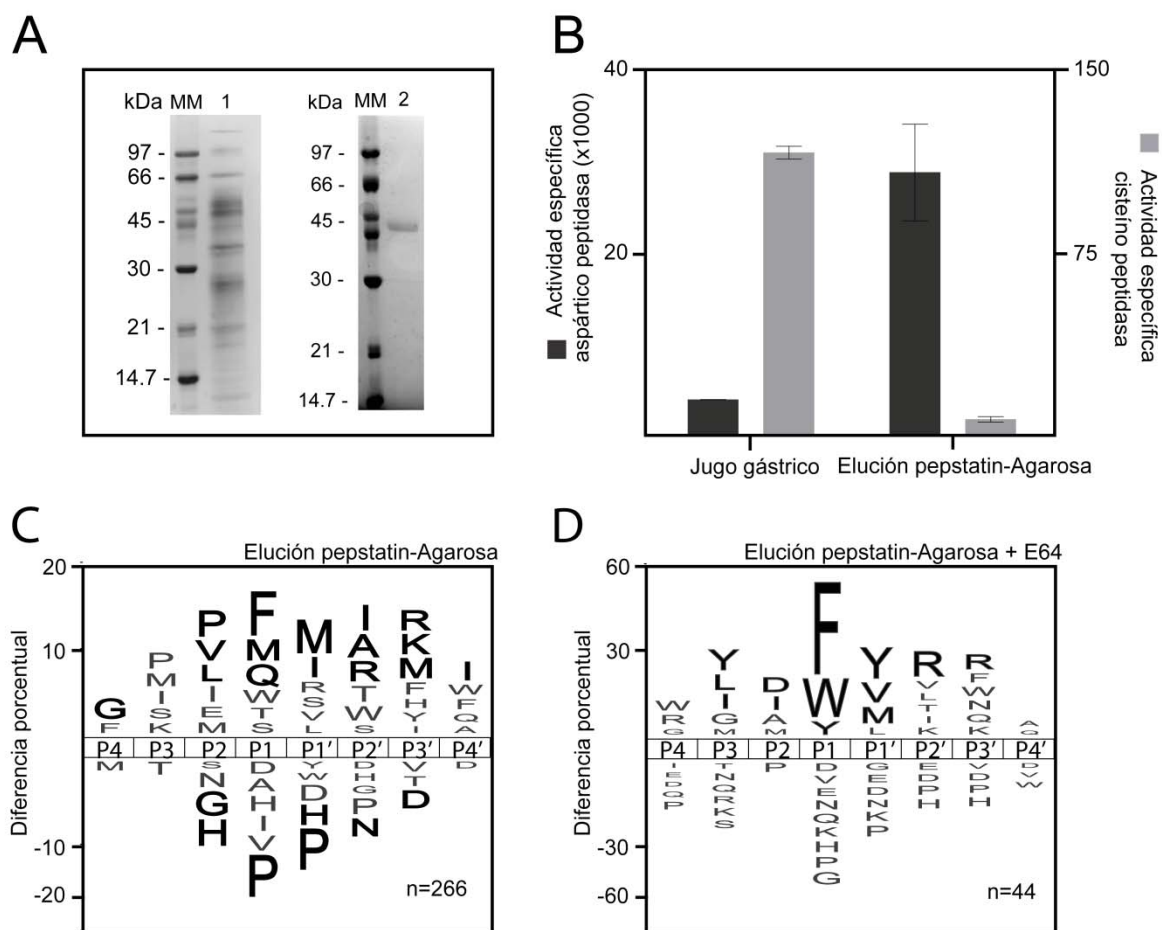


Figura 9. Perfil de hidrólisis de la catepsina D1. **A.** SDS-PAGE del jugo gástrico de langosta Americana (1) y de catepsina D1 después de la purificación por cromatografía de afinidad. **B.** La actividad específica de aspártico y cisteino peptidasa del jugo gástrico de langosta Americana y después de la cromatografía de afinidad. **C y D.** Perfil de hidrólisis de la fracción que contiene a catepsina D1 después de la cromatografía de afinidad en ausencia y presencia de E-64, respectivamente.

Como puede verse en la sección de anexos 11.4, 11.5 y 11.6, el número de sitios de hidrólisis identificados para catepsina D1, catepsina D bovina y pepsina porcina es variable. Después de los 1200 min de reacción se identificaron 116 sitios de hidrólisis de la pepsina porcina, 88 de la catepsina bovina y 44 de la peptidasa aspártica de langosta. Con la finalidad de hacer una comparación que no estuviera influenciada por el número de sitios de hidrólisis

considerados, se tomó el punto de 1200 min de la catepsina D1 de langosta y 240 min de la catepsina D bovina y 60 min de la pepsina porcina, en que se identificaron alrededor de 43 sitios de hidrólisis para las tres peptidasas.

La figura 10 presenta los iceLogos de los sitios de hidrólisis identificados para las tres peptidasas aspárticas. En estos puede observarse que las tres peptidasas aspárticas tienen fuerte preferencia por residuos hidrofóbicos en la posición P1. La posición S1 resultó ser el principal sitio de especificidad de las tres peptidasas. La peptidasa aspártica de langosta mostró preferencia por los residuos hidrofóbicos Phe > Trp > Tyr > norleucina/Leu, pero no por Val y Pro. La catepsina D bovina mostró preferencia por Phe > Leu > Trp > norleucina, pero no por Ala. La pepsina porcina mostró preferencia por Phe > norleucina > Leu > Trp, pero no por Val y Pro. Los residuos hidrofóbicos y no hidrofóbicos no favorecidos aparecen en el panel inferior de los iceLogos. La posición S1' resultó ser menos selectiva que S1, aunque es importante en la especificidad de la peptidasa aspártica de langosta y de la pepsina porcina, sitio en el que pueden aceptar aminoácidos tipo hidrofóbico. Por otro lado, este sitio no resultó ser determinante en la especificidad de la catepsina D bovina.

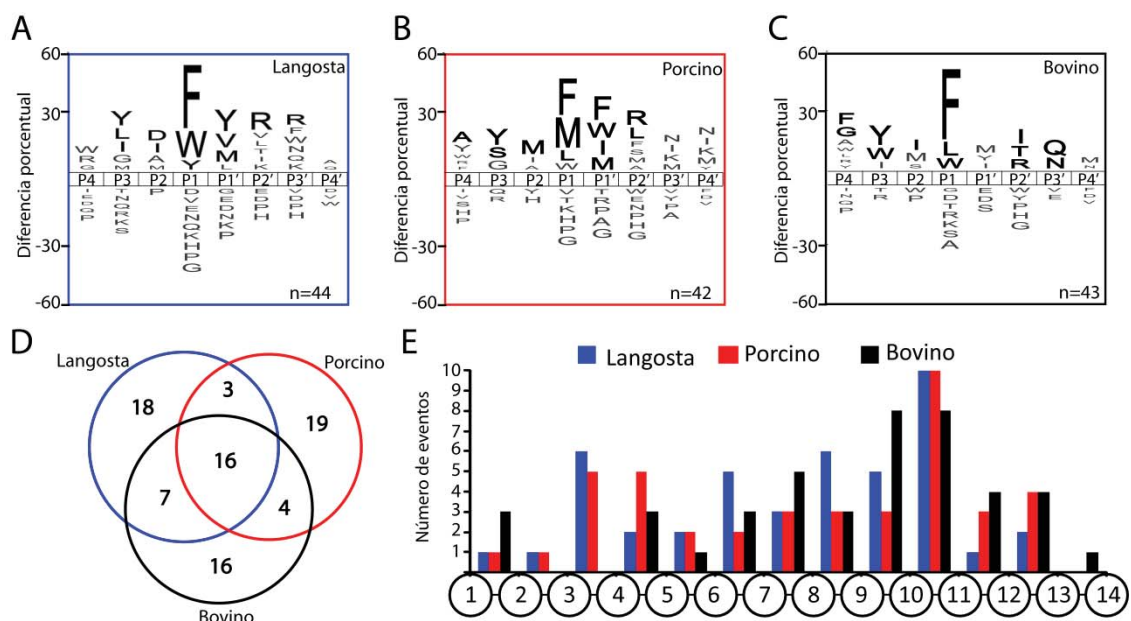


Figura 10. Perfil de hidrólisis de la cathepsina D1 de langosta americana y sus homólogos de organismos endotermos. **A**, **B** y **C**. iceLogo generado de los aminoácidos que fueron enriquecidos o empobrecidos en las posiciones P4 a P4' de los sitios de hidrólisis generados por las aspártico peptidasas de langosta, bovino y porcino, respectivamente. **D**. Diagrama del número de sitios de hidrólisis producidos por las aspártico peptidasas, el número donde se solapan los tres círculos es el número de sitios de hidrólisis que comparten las tres peptidasas, los números del solapamiento de dos círculos indica el número de sitios de hidrólisis que se comparten por pares de peptidasas, y el número más exterior es el número de sitios de hidrólisis únicos para cada una de las peptidasas. **E**. Gráfico del número de sitios de hidrólisis identificados por posición en los tetradecapéptidos empleados como sustratos.

7.4 Características estructurales de la cathepsina D1 de langosta y de sus homólogos de organismos endotermos.

Aunque la cathepsina D1 tiene una similitud del 46% con la cathepsina D bovina y de 38% con la pepsina porcina, esta conserva los elementos de estructura secundaria de sus homólogos. La estructuras secundaria cathepsina D1 coinciden de manera general con las reportadas de sus homólogos bovino y porcino; Rojo et al. (2010b) demostraron como la estructura tridimensional de cathepsina D1 puede sobreponerse a la de la cathepsina D bovina. En ambos

análisis puede observarse que la catepsina D1 presenta abundancia de placas- β con algunas hélices- α .

Tras el análisis de la estructura primaria, se observó que las tres peptidasas conservan una composición similar, con la excepción de los residuos básicos (Arg, His y Lys) que son poco abundantes en la pepsina, lo que produce un punto isoeléctrico por debajo de 1 y que permite a la enzima poseer una estructura activa en el ambiente ácido del estómago (Tang, 2013). Una de las diferencias más conspicuas entre las tres enzimas es el contenido de prolina y glicina. La catepsina D bovina contiene 22 residuos de prolina, mientras la catepsina D1 y la pepsina porcina contienen solamente 15 de estos residuos. Por otra parte la catepsina D bovina contiene 36 residuos de glicina, la pepsina porcina contiene 35, mientras que la catepsina D1 contiene 41.

En la figura 11, también se indican los residuos de aminoácido que están involucrados en el reconocimiento de sustrato de catepsina D bovina y pepsina porcina, deducidos por estudios de cristalografía de rayos X en complejo con el inhibidor pepstatina A (Abad-Zapatero et al., 1991; Metcalf y Fusek, 1993). En el caso de catepsina D1 se indican los residuos homólogos a los de catepsina D bovina. En esta comparación podemos observar que la catepsina D bovina y la pepsina porcina presentan los subsitios de interacción con sustrato en regiones conservadas, aunque entre estas puede haber diferencias sutiles. De la misma manera, la catepsina D1 conserva la mayor parte de los residuos involucrados en la interacción con el sustrato de sus dos homólogos de bovino y porcino.

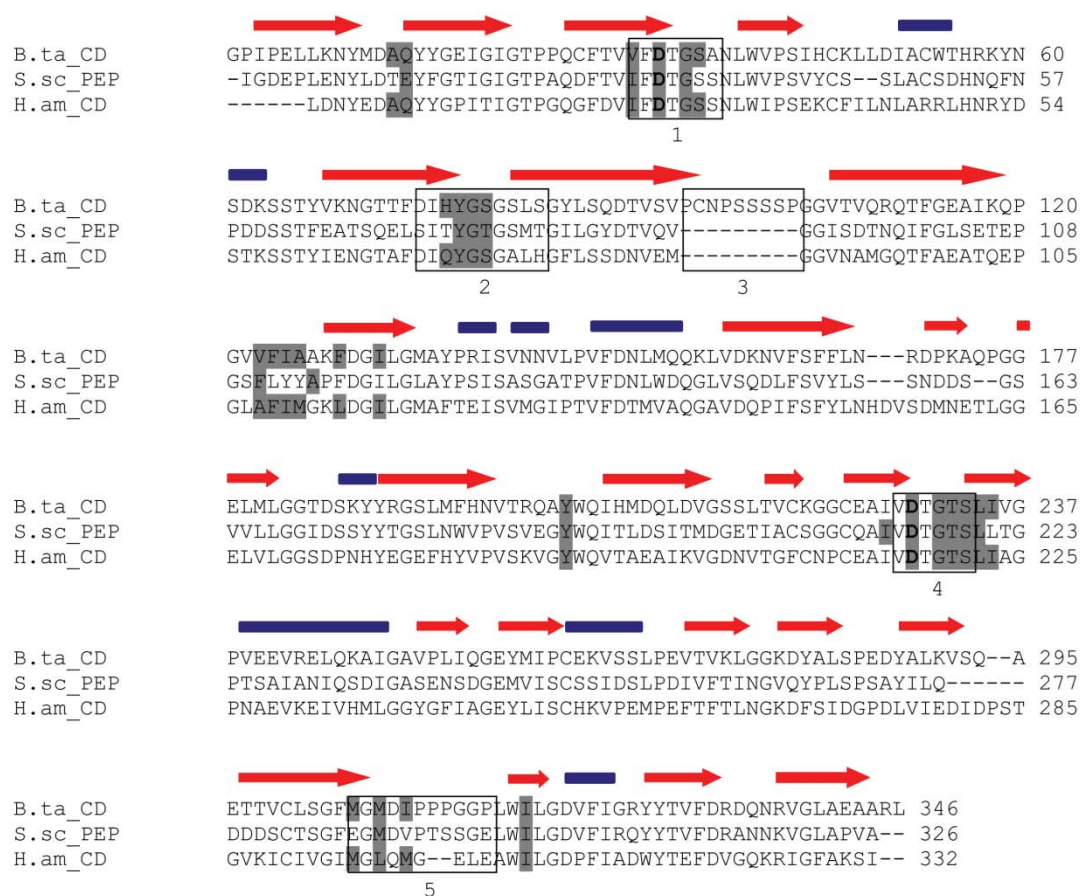


Figura 11. Comparación de las estructuras primaria y secundaria y subitios de interacción con el sustrato de la cathepsina D1 y de sus homólogos de organismos endotermos. Cathepsina D1 (H.am_CD; GenBank: EU687261.1), la cathepsina D bovina (B.ta_CD; GenBank: BAB21620.1); pepsina porcina (S.sc_PEP; PDB: 3PEP). Los sitios residuos de los subitios de interacción con el sustrato se resaltan con sombra gris, en el caso de la cathepsina D1 se indican los residuos homólogos a los de cathepsina D bovina. Las flechas rojas indican las placas- β y las barras azules las hélices- α de cathepsina D1. La estructura secundaria se analizó usando el programa Jpred3. En los recuadros se muestran: 1 y 4) los lazos que contienen los residuos catalíticos de Asp (marcados en negritas); 2) el “flap” que contiene al residuo de Tyr importante en la interacción con el sustrato; 3) El lazos de procesamiento de las cathepsinas D; y 5) El “poly-proline loop” característico de las cathepsinas D.

8. DISCUSIÓN

Los parámetros cinéticos.

Las enzimas adaptadas al frío tienen dos características que las tipifican: 1) Mayor eficiencia catalítica y 2) Menor estabilidad térmica que enzimas homólogas adaptadas a temperaturas superiores (Feller y Gerday, 1997; Fields y Somero, 1998; Russell, 2000; Gianese et al., 2001; D'Amico et al., 2002; Feller, 2003). Tras estudiar los parámetros cinéticos de la catepsina D1 se demostró que es una enzima más eficiente que sus homólogos bovino y porcino en todo el rango de temperatura de 5 a 55 °C (Figura 7, recuadro). Este resultado confirma que la catepsina D1 cumple con la característica 1, y como se verá más adelante los resultados de estabilidad indican que también cumple con la característica 2.

Normalmente, la constante catalítica (k_{cat}) de las enzimas adaptadas al frío sigue una serie de comportamientos: 1) Presentan alta actividad específica a temperaturas bajas y moderadas, 2) La actividad máxima se presenta recorrida hacia temperatura baja, y 3) La adaptación no es completa porque si bien la actividad que presentan a baja temperatura es alta, esta es menor que aquella que presentan enzimas homólogas adaptadas a temperaturas superiores a su temperatura fisiológica (Zecchinon et al., 2001; D'Amico et al., 2002; Feller y Gerday, 2003).

La catepsina D1 de langosta presentó valores de k_{cat} dos veces superior que la pepsina porcina y diez veces superior que la catepsina D bovina en el rango de 5–25 °C. Esto indica la mayor capacidad catalítica de la catepsina D1 a bajas temperaturas. Por arriba de los 25 °C, la k_{cat} de la catepsina D1 de langosta se mantiene superior que la de sus homólogos de organismos endotermos, incluso a 55 °C. La k_{cat} de la pepsina porcina presentó un patrón similar que la

catepsina D1, aunque con valores inferiores. Por otro lado, la catepsina D bovina fue la única que presentó una caída en el valor de k_{cat} a 55 °C (Figura 7, recuadro). Este resultado indica que la catepsina D1 es una enzima activa en un amplio rango de temperatura, este comportamiento se ha reportado en sólo algunas excepciones de enzimas adaptadas al frío (Russell, 2000). Lo anterior indica que el comportamiento de la k_{cat} de la catepsina D1 no es por completo típico de las enzimas adaptadas al frío, aunque es superior a bajas temperaturas, el valor máximo de k_{cat} no se desplaza a bajas temperaturas, e incluso a temperaturas elevadas se mantiene superior a sus homólogos de organismos endotermos.

La unión de un sustrato al sitio activo de una enzima es un fenómeno sensible a la temperatura (Feller y Gerday, 1997). Generalmente, un incremento en la temperatura desestabiliza la interacción con el sustrato, lo que provoca un aumento en K_m (Fields y Somero, 1998). Este efecto es gobernado por la contribución de los diferentes tipos de interacciones involucradas en la formación del complejo enzima-sustrato (Feller, 2003; Siddiqui y Cavicchioli, 2006). Se ha sugerido que debido a la mayor flexibilidad del sitio activo de las enzimas adaptadas al frío, los sustratos se unen con menor afinidad, lo que genera valores mayores de K_m que para enzimas adaptadas a temperaturas superiores (Feller, 2013).

Sin embargo, el comportamiento de la K_m depende de las sustituciones de residuos de aminoácidos en el sitio activo. La necesidad de mantener la estructura apropiada y por lo tanto la función catalítica, a menudo restringe las posibilidades de sustituciones a nivel del sitio de unión de sustrato, es tal vez por ello que algunas enzimas adaptadas al frío se contraponen a este efecto, principalmente aquellas involucradas en pasos regulatorios de una vía metabólica (Siddiqui y Cavicchioli, 2006) y aquellas que trabajan a concentraciones de

sustrato por arriba de la concentración de saturación, como es el caso de las enzimas digestivas (Feller y Gerday, 1997).

Los resultados de este estudio sugieren que la catepsina D1 es una enzima cuya respuesta se contrapone al efecto sugerido de la temperatura sobre la K_m en enzimas adaptadas al frío, es decir presenta mayor k_{cat} , pero no presenta mayor K_m que sus homólogos de organismos endotermos (Figura 6). Por lo tanto, la principal adaptación de la catepsina D1 reside en la constante catalítica (k_{cat}), la cual refleja el potencial catalítico de una enzima bajo condiciones de saturación de sustrato, que es precisamente la condición bajo la cual la catepsina D1 realiza su función digestiva.

Rojo y colaboradores (2013) reportaron que la K_m de la catepsina D1 de langosta se mantiene constante en el rango de 5–25 °C. Este comportamiento indica que la K_m de la catepsina D1 es de tipo II según la clasificación de Simpson y Haard (1987), lo cual se ha reportado para enzimas de organismos ectotermos que habitan a baja temperatura (Hofer et al., 1975). El presente estudio confirma dicho comportamiento en el rango de 5–25 °C, sin embargo, se encontró que la K_m de la catepsina D1 es dependiente de la temperatura por arriba de los 25 °C (Figura 6).

Laycock et al. (1989) estudiaron los parámetros cinéticos de una catepsina L purificada a partir del jugo gástrico de langosta americana, *H. americanus*. Los resultados indicaron que el $\log(k_{cat}/K_m)$ se mantiene constante en el rango de temperatura de 5–60 °C. Los resultados del presente trabajo, y los ya discutidos de Rojo et al. (2013) y Laycock et al. (1989) podrían indicar que las peptidasas digestivas de la langosta americana están adaptadas para llevar a

cabo su función catalítica en el amplio rango de temperatura que habita este organismo ectotermo.

Los parámetros termodinámicos.

Si bien los parámetros cinéticos permiten analizar la eficiencia catalítica de las enzimas, estos dependen a su vez de la magnitud con la que una enzima logra reducir la energía libre de activación del sustrato (ΔG^\ddagger), esta depende a su vez de la entalpía de activación (ΔH^\ddagger) que indica la medida de dependencia de la tasa reacción con la temperatura, y de la entropía de activación (ΔS^\ddagger) que por su parte puede ser un indicativo de la ganancia de flexibilidad estructural a nivel de sitio activo (Lonhienne et al., 2000). Por lo tanto la validación del carácter de “adaptación al frío” de una enzima se logra mediante la caracterización de estos parámetros.

La catepsina D1 presentó valores de $\Delta(\Delta G^\ddagger)_{p-m}$ negativos en comparación con ambas enzimas de endotermos, lo que indica que la catepsina D1 ha reducido la energía libre de activación, ΔG^\ddagger . En la ecuación 3 podemos observar que ΔG^\ddagger se relaciona de manera logarítmica con k_{cat} , por lo tanto el resultado obtenido para este parámetro es un reflejo de la diferencia en la actividad de las enzimas, específicamente de la superioridad en términos de k_{cat} de la catepsina D1 sobre sus homólogos de organismos endotermos (Lonhienne et al., 2000; D’Amico et al., 2002; Feller, 2003; Feller y Gerday, 2003). Por otra parte, también se observó que la catepsina D1 presenta valores de ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger menores que sus homólogos bovino y porcino, y por lo tanto los parámetros $\Delta(\Delta H^\ddagger)_{p-m}$ y $T\Delta(\Delta S^\ddagger)_{p-m}$, al igual que $\Delta(\Delta G^\ddagger)_{p-m}$, también presentaron valores negativos (Tabla II).

El decremento en ΔH^\ddagger o el incremento de ΔS^\ddagger tienen el efecto común de reducir ΔG^\ddagger y por lo tanto de aumentar k_{cat} . La disminución de ΔH^\ddagger es considerada la principal característica adaptativa de las enzimas adaptadas al frío (Lonhienne et al., 2000). Lonhienne et al. (2000) sugieren que el decremento en ΔH^\ddagger , en enzimas adaptadas al frío, es producto de una menor dependencia entre k_{cat} y la temperatura. Contrario a lo que se esperaría, ΔS^\ddagger se contrapone a la reducción de ΔG^\ddagger y por lo tanto a la optimización de k_{cat} , ya que generalmente las enzimas adaptadas al frío tienen valores de ΔS^\ddagger por debajo de aquellos de enzimas adaptadas a temperaturas superiores. Se ha discutido que si ambos parámetros, ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger , fuesen optimizados en enzimas adaptadas al frío, la ganancia en k_{cat} sería varios órdenes de magnitud mayor (Lonhienne et al., 2000).

Se ha sugerido que como consecuencia de la mayor flexibilidad de las enzimas adaptadas al frío, el estado basal del complejo enzima-sustrato tiene una distribución más amplia de estados conformacionales, lo que se traduce en mayor entropía de dicho estado que en el caso de enzimas homólogas adaptadas a temperaturas superiores, lo que lleva al valor negativo de $\Delta(\Delta S^\ddagger)_{\text{p-m}}$ (Fields y Somero, 1998; Lonhienne et al., 2000). Los resultados de este trabajo indican que la catepsina D1, al igual que otras enzimas adaptadas al frío, ha optimizado su eficiencia catalítica en base a la optimización de ΔH^\ddagger y a expensas de ΔS^\ddagger .

La estabilidad térmica.

La catálisis enzimática involucra cambios conformacionales que permiten el acomodo del sustrato en el sitio activo, y la facilidad con que ocurren dichos cambios es determinante de la eficiencia catalítica, esto se conoce como flexibilidad estructural (Georlette et al., 2004).

La flexibilidad de una enzima tiende a equilibrarse de manera tal que permite a la proteína realizar su función catalítica a una tasa adecuada en la temperatura fisiológica óptima del organismo, pero permitiendo al mismo tiempo retener la estructura terciaria apropiada (Arnold et al., 2001; Georlette et al., 2004). La flexibilidad estructural es optimizada por la disminución en número o fuerza de las interacciones covalentes y no covalentes en una proteína, que son también responsables de la estabilidad de la misma (Siddiqui y Cavicchioli, 2006). Es por ello, que a la par de la optimización de la eficiencia catalítica, las enzimas adaptadas al frío son a menudo menos estables que enzimas adaptadas a temperaturas superiores (Arnold et al., 2001; D'Amico et al., 2002; Siddiqui y Cavicchioli, 2006). En este estudio se demostró que la catepsina D1 sufre desnaturalización a menor temperatura que sus homólogos de organismos endotermos (Figura 8, Tabla III), de tal manera que la flexibilidad podría estar relacionada con la optimización de la eficiencia catalítica.

La unión específica de un ligando a una proteína estabiliza su estructura, como es el caso de la unión de un sustrato al sitio activo de una enzima. Al estudiar la estabilidad de la catepsina D1 en presencia de pepstatina A, un inhibidor análogo al estado de transición de sustrato en el mecanismo de las peptidasas aspárticas (Rich y Sun, 1980), se observó un efecto estabilizante en la estructura de la catepsina D1 y de la pepsina porcina, dicho efecto fue significativamente mayor en catepsina D1 que en la pepsina porcina (Figura 8, Tabla III).

El efecto estabilizante debido a la unión de análogos de sustratos no hidrolizables en el sitio activo de enzimas adaptadas al frío se ha interpretado como evidencia que soporta la hipótesis de que las enzimas adaptadas al frío poseen mayor flexibilidad en el sitio activo (Struvay y Feller, 2012). La mayor estabilización por este tipo de interacciones en las enzimas adaptadas

al frío, en comparación con homólogos adaptados a temperaturas superiores, se ha interpretado como evidencia de que estas presentan mayores cambios conformacionales entre los estados de enzima libre y de enzima-sustrato (D'Amico et al., 2003; Feller, 2007; Struvay y Feller, 2012).

La especificidad por el sustrato.

Tras la purificación de la catepsina D1, la actividad de aspártico peptidasa se enriquece, sin embargo existe actividad de cisteíno peptidasa remanente, lo que no fue detectado por análisis de electroforesis. También se encontró que el perfil de hidrólisis de la catepsina D1 cambia en presencia de E-64 (Figura 9). Esto puede explicarse por la presencia en el jugo gástrico de la langosta de una elevada actividad de cisteíno peptidasas, como se ha reportado con anterioridad (Laycock et al., 1989, 1991). Es por ello que para el estudio comparativo de la especificidad, se analizó a la catepsina D1 previamente tratada con E-64, un inhibidor específico de cisteíno peptidasas.

El estudio de especificidad indica que S1 es el subsitio más importante en la selectividad de sustrato de las tres peptidasas, en que estas aceptan principalmente residuos hidrofóbicos grandes (Phe, Trp, Met y Leu) (Figura 10A–C). Esta característica de las aspártico peptidasas tipo pepsina ha sido reportada en múltiples ocasiones. La catepsina D1 y la catepsina D bovina tienen mayor especificidad por Phe en S1, mientras que la pepsina porcina se comportó como una enzima más promiscua en este sitio. En las tres peptidasas, S1' es menos selectivo que S1, aunque también acepta preferencialmente residuos hidrofóbicos. La especificidad de las aspártico peptidasas tipo pepsina por residuos hidrofóbicos en P1 y P1' es determinada principalmente por la interacción con los residuos del “*flap*”. El “*flap*”

consiste en una estructura tipo “ β -hairpin” de aproximadamente 20 residuos en el dominio N-terminal (residuos 66 a 85 en la pepsina porcina) (Tang y Koelsch, 1995), varios de sus residuos forman parte de los subsitios de interacción con el sustrato S1 y S1’ (Abad-Zapatero et al., 1991; Metcalf y Fusek, 1993). La principal función del “flap” es proporcionar un ambiente hidrofóbico al sitio catalítico, principalmente por interacción con el residuo Tyr75, determinando la especificidad por residuos hidrofóbicos en P1 y P1’ (Tang y Koelsch, 1995). Los demás subsitios resultaron ser menos selectivos que S1 y S1’, y únicamente destacan S3 y S2’. S3 tiene preferencia por Tyr, lo cual corresponde con la hidrofobicidad y amplitud de este sub-sitio en peptidasas aspárticas tipo pepsina (Dunn y Hung, 2000). S2’ acepta Arg, entre otros aminoácidos. S2’ podría ser considerado un subsitio de relevancia en la unión del sustrato en aspártico peptidasas tipo pepsina porque la preferencia por Arg también se ha reportado en catepsina D humana, en que los sustratos que contienen Arg en P2’ son hidrolizados con mayor eficiencia (Beyer y Dunn, 1998).

La catepsina D1 se asemeja a la pepsina porcina en que no hidrolizaron sustratos peptídicos que contuvieron residuos de prolina desde P1 a P3’, este fenómeno se ha reportado anteriormente en estudios de especificidad de la pepsina porcina (Hamuro et al., 2008). En la catepsina D humana, se ha demostrado que la hidrofobicidad general de los subsitios adyacentes a P1, aunado a la presencia misma de residuos hidrofóbicos en P1, es el principal aspecto que rige la selectividad del sustrato en este tipo de peptidasas (Sun et al., 2013). Esto podría explicar por qué ninguna de las tres peptidasas hidrolizó eficientemente sustratos que contuviesen residuos no hidrofóbicos en las posiciones P1 y P1’. En la figura 10D, podemos observar que las tres peptidasas comparten 16 de los sitios de hidrólisis identificados, y

presentan alrededor de 16 sitios de hidrólisis únicos. En los sitios de hidrólisis únicos dominan también los residuos hidrofóbicos en P1 y P1'. Los sitios de hidrólisis identificados de las tres peptidasas, se ubican en enlaces peptídicos internos de los sustratos y no cerca de los extremos N- y C-terminal (Figura 10E). Esto indica que la catepsina D1 conserva la propiedad de ser una endopeptidasa, al igual que todas las aspártico peptidasas reportadas hasta la fecha (Rawlings y Barrett, 2013b). Lo discutido anteriormente, indica que la catepsina D1 de langosta no es más promiscua que sus homólogos de bovino y porcino.

Las características estructurales.

Aunque las principales adaptaciones estructurales de las enzimas adaptadas al frío ocurren a nivel del sitio catalítico, otras regiones de la estructura pueden o no ser objeto de la adaptación (Feller, 2003). El estudio de diversas enzimas adaptadas al frío ha llevado a concluir que éstas pueden presentar una disminución de cualquiera de los factores estructurales reconocidos por estabilizar a las proteínas, lo cual conlleva a la ganancia en flexibilidad (D'Amico et al., 2002). Rojo et al. (2010b) reportaron la secuencia y un modelo estructural de la catepsina D1 de langosta y demostraron que conserva los elementos de estructura secundaria y por lo tanto la estructura terciaria de su homólogo bovino.

En el presente estudio se encontró que las diferencias más conspicuas a nivel de estructura primaria entre la catepsina D1 y sus homólogos bovino y porcino residen en el menor contenido de residuos de prolina y mayor contenido de residuos de glicina. Cada aminoácido dentro de una proteína está asociado con dos ángulos de rotación (ϕ y ψ) alrededor del carbono α , la combinación de estos ángulos determina las diferentes conformaciones que una

proteína puede adoptar. La mayoría de combinaciones de ángulos ϕ y ψ no están permitidos para la mayor parte de los aminoácidos debido a impedimentos estéricos entre las cadenas laterales y la cadena principal. La glicina, con sólo un átomo de hidrógeno como cadena lateral puede adoptar un mayor rango de conformaciones que los otros aminoácidos (Branden y Tooze, 1999). Por otra parte, la pirrolidina de la prolina restringe los ángulos dihédricos disponibles para el residuo de aminoácido que le precede, lo que se traduce en un menor número de conformaciones entre las que puede fluctuar esa parte de la proteína, es decir menor flexibilidad (Feller et al., 1994; Branden y Tooze, 1999).

Como puede observarse en la figura 11, la diferencia en el contenido de prolina en catepsina D1 reside en dos estructuras características de las catepsinas D, el lazo de procesamiento y el “*poly-proline loop*” (Yonezawa et al., 1988; Metcalf y Fusek, 1993). Al ser monómeros, la catepsina D1 y la pepsina porcina no presentan el lazo de procesamiento, que es el sitio en que ocurre el procesamiento post-traducciona de proteólisis en las catepsinas D, y que en la catepsina D bovina presenta tres residuos de prolina. Por otra parte, la catepsina D1 no presenta residuo de prolina alguno en la región equivalente al “*poly-proline loop*”, mientras que la pepsina presenta un residuo de prolina y la catepsina D bovina presenta cuatro. Esta estructura forma parte de los sub-sitios S2 y S2' en catepsina D bovina y pepsina porcina (Abad-Zapatero et al., 1990, 1991; Metcalf y Fusek, 1993). La diferencia en contenido de residuos de prolina y de glicina en la estructura homóloga al “*poly-proline loop*” en la catepsina D1 podría dar lugar a una mayor flexibilidad, que podría ser responsable de la mayor tasa de recambio de esta enzima.

La similitud en especificidad de la catepsina D1 con sus homólogos de bovino y porcino podría deberse a que esta conserva los residuos involucrados en los subsitios de especificidad (Figura 11). Las regiones contiguas a los subsitios de interacción con sustrato, podrían influenciar la flexibilidad del sitio de reconocimiento de sustrato en catepsina D1. Por ejemplo, en el “*poly-proline loop*” los residuos que en catepsina D bovina forman parte de subsitios de reconocimiento de sustrato, se conservan en catepsina D1, sin embargo, en el mismo lazo se observa que ninguno de los residuos de prolina se conserva en esta región. Esta característica como ya se explicó anteriormente puede proveer flexibilidad a este sitio. Es importante destacar que este análisis es meramente especulativo puesto que se basa en un estudio de modelación y requiere análisis posteriores.

9. CONCLUSIÓN

Los resultados de esta tesis sugieren que la catepsina D1 de langosta Americana, *H. americanus*, es una enzima adaptada al frío. En comparación con sus homólogos de organismos endotermos, la catepsina D1 ha optimizado principalmente la k_{cat} , mientras que la K_m se mantiene en el rango de sus homólogos de organismos endotermos. Esta característica podría ser consecuencia de su papel como enzima digestiva. La catepsina D1 posee menor energía libre de activación que sus homólogos de organismos endotermos. Al igual que en muchas otras enzimas adaptadas al frío, esta optimización se basa principalmente en la entalpía de activación, mientras que la entropía de activación se contrapone. La catepsina D1 también mostró menor estabilidad que sus homólogos de organismos endotermos y fue estabilizada por interacción con un inhibidor análogo al estado de transición del sustrato. Estas características podrían deberse a una estructura más flexible, que posiblemente esté asociada con su menor contenido de residuos de prolina y mayor contenido de residuos de glicina. La evidencia experimental indica que la catepsina D1 posee especificidad similar a la de sus homólogos de organismos endotermos y conserva además la característica de ser endopeptidasa. Esto convalida la función de la catepsina D1 como enzima de propósito general, involucrada en la degradación de proteínas y podría deberse a que conserva los residuos de aminoácido involucrados en la interacción con el sustrato.

10. LITERATURA CITADA

- Abad-Zapatero, C., T.J. Rydel, y J. Erickson. 1990. Revised 2.3 A structure of porcine pepsin: Evidence for a flexible subdomain. *Proteins: Structure, Function and Genetics*. 8(1):62–81.
- Abad-Zapatero, C., T.J. Rydel, D.J. Neidhart, J. Luly, y J.W. Erickson. 1991. Inhibitor binding induces structural changes in porcine pepsin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 306:9–21.
- Ahn, J.-E. y K. Zhu-Salzman. 2009. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin. *Journal of Insect Physiology*. 55(8):678–85.
- Arnold, F.H., P.L. Wintrode, K. Miyazaki, y A. Gershenson. 2001. How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends in Biochemical Sciences*. 26(2):100–6.
- Babtie, A., N. Tokuriki, y F. Hollfelder. 2010. What makes an enzyme promiscuous? *Current Opinion in Chemical Biology*. 14(2):200–7.
- Benes, P., V. Vetvicka, y M. Fusek. 2008. Cathepsin D-Many functions of one aspartic protease. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 68, 12–28p.
- Beyer, B.M. y B.M. Dunn. 1998. Prime region subsite specificity characterization of human cathepsin D: the dominant role of position 128. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. 7(1):88–95.
- Biggar, K.K., N.J. Dawson, y K.B. Storey. 2012. Real-time protein unfolding: a method for determining the kinetics of native protein denaturation using a quantitative real-time thermocycler. *BioTechniques*. 53(4):231–8.
- Boldbaatar, D., C. Sikalizyo Sikasunge, B. Battsetseg, X. Xuan, y K. Fujisaki. 2006. Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 36(1):25–36.
- Branden, C. y J. Tooze. 1999. *Introduction to Protein Structure*. Garland Publishing, New York. 410p.
- Brindley, P.J., B.H. Kalinna, J.Y.M. Wong, B.J. Bogitsh, L.T. King, D.J. Smyth, C.K. Verity, G. Abbenante, R.I. Brinkworth, D.P. Fairlie, M.L. Smythe, P.J. Milburn, H. Bielefeldt-Ohmann, Y. Zheng, y D.P. McManus. 2001. Proteolysis of human hemoglobin by schistosome cathepsin D. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 112(1):103–112.

- Brunelle, F., B. Nguyen-Quoc, C. Cloutier, y D. Michaud. 1999. Protein hydrolysis by colorado potato beetle, *leptinotarsa decemlineata*, digestive proteases: the catalytic role of cathepsin D. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 42(1):88–98.
- Burley, S.K. y G.A. Petsko. 1988. Weakly polar interactions in proteins. *Advances in Protein Chemistry*. 39:125–189.
- Casanueva, A., M. Tuffin, C. Cary, y D.A. Cowan. 2010. Molecular adaptations to psychrophily: The impact of “omic” technologies. *Trends in Microbiology*, 18, 374–381p.
- Cavicchioli, R., K.S. Siddiqui, D. Andrews, y K.R. Sowers. 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 253–261p.
- Celis-Guerrero, L.E., F.L. García-Carreño, y M.A. Navarrete Del Toro. 2004. Characterization of proteases in the digestive system of spiny lobster (*Panulirus interruptus*). *Marine Biotechnology*. 6(3):262–269.
- Cobb, J.S. y B.F. Phillips. 1980. *The biology and management of lobsters*. Academic Press, New York, NY. 390p.
- Cole, C., J.D. Barber, y G.J. Barton. 2008. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*. 36(suppl 2):
- Cornish-Bowden, A.J. y J.R. Knowles. 1969. The pH-dependence of pepsin-catalysed reactions. *The Biochemical journal*. 113(2):353–362.
- Crawford, D.L. y D.A. Powers. 1989. Molecular basis of evolutionary adaptation at the lactate dehydrogenase-B locus in the fish *Fundulus heteroclitus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86(23):9365–9369.
- Crawford, D.L. y D.A. Powers. 1992. Evolutionary adaptation to different thermal environments via transcriptional regulation. *Molecular biology and evolution*. 9(5):806–813.
- D’Amico, S., P. Claverie, T. Collins, D. Georlette, E. Gratia, . Hoyoux, M.-A. Meuwis, G. Feller, y C. Gerday. 2002. Molecular basis of cold adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 357(1423):917–925.
- D’Amico, S., T. Collins, J.-C. Marx, G. Feller, y C. Gerday. 2006. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Reports*. 7(4):385–389.

- D'Amico, S., J.-C. Marx, C. Gerday, y G. Feller. 2003. Activity-stability relationships in extremophilic enzymes. *The Journal of biological chemistry*. 278(10):7891–7896.
- Davies, D.R. 1990. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*. 19:189–215.
- Demirjian, D.C., F. Moris-Varas, y C.S. Cassidy. 2001. Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 144–151p.
- Diaz-Tenorio, L.M., F.L. Garcia-Carreno, y M.A. Navarrete del Toro. 2006. Characterization and comparison of digestive proteinases of the Cortez swimming crab, *Callinectes bellicosus*, and the arched swimming crab, *Callinectes arcuatus*. *Invertebrate Biology*. 125(2):125–135.
- Dunn, B.M. y S.H. Hung. 2000. The two sides of enzyme-substrate specificity: Lessons from the aspartic proteinases. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477, 231–240p.
- Erskine, P.T., L. Coates, S. Mall, R.S. Gill, S.P. Wood, D.A.A. Myles, y J.B. Cooper. 2003. Atomic resolution analysis of the catalytic site of an aspartic proteinase and an unexpected mode of binding by short peptides. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 12(8):1741–1749.
- Feller, G. 1996. Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiology Reviews*. 18(2-3):189–202.
- Feller, G. 2003. Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 648–662p.
- Feller, G. 2007. Life at low temperatures: Is disorder the driving force? *Extremophiles*, 11, 211–216p.
- Feller, G. 2013. Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology. *Scientifica*. 2013:512840.
- Feller, G., J.L. Arpigny, E. Narinx, y C. Gerday. 1997. Molecular adaptations of enzymes from psychrophilic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology*, 118, 495–499p.
- Feller, G., S. D'Amico, A.M. Benotmane, F. Joly, J. Van Beeumen, y C. Gerday. 1998. Characterization of the C-terminal propeptide involved in bacterial wall spanning of alpha-amylase from the psychrophile *Alteromonas haloplanctis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(20):12109–12115.

- Feller, G. y C. Gerday. 1997. Psychrophilic enzymes: Molecular basis of cold adaptation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53, 830–841p.
- Feller, G. y C. Gerday. 2003. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews. Microbiology*. 1(3):200–208.
- Feller, G., T. Lonhienne, C. Deroanne, C. Libioulle, J. Van Beeumen, y C. Gerday. 1992. Purification, characterization, and nucleotide sequence of the thermolabile α -amylase from the antarctic psychrotroph *Alteromonas haloplanctis* A23. *The Journal of Biological Chemistry*. 267(8):5217–5221.
- Feller, G., F. Payan, F. Theys, M. Qian, R. Haser, y C. Gerday. 1994. Stability and structural analysis of α -amylase from the antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanctis* A23. *European Journal of Biochemistry*. 222(2):441–447.
- Fields, P.A. y G.N. Somero. 1998. Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A4 orthologs of Antarctic notothenioid fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(19):11476–11481.
- Fitzgerald, P.M.D., B.M. McKeever, J.F. VanMiddlesworth, J.P. Springer, J.C. Heimbach, C.T. Leu, W.K. Herber, R.A.F. Dixon, y P.L. Darke. 1990. Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type 1 protease and acetyl-pepstatin at 2.0-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*. 265(24):14209–14219.
- Fortenberry, S.C., J.S. Schorey, y J.M. Chirgwin. 1995. Role of glycosylation in the expression of human procathepsin D. *Journal of Cell Science*. 108(5):2001–2006.
- Fruton, J.S. 1976. The specificity and mechanism of pepsin action. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., 401–443p.
- Fujinaga, M., M.M. Chernaiia, N.I. Tarasova, S.C. Mosimann, y M.N. James. 1995. Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 4(5):960–972.
- Fusek, M., M. Mares, y V. Vetvicka. 2013. Chapter 8 – Cathepsin D. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, 54–63p.
- Garcia-Carreno, F.L. y M.A. Navarrete Del Toro. 1997. Classification of proteases without tears. *Biochemical Education*, 25, 161–167p.
- Georlette, D., V. Blaise, T. Collins, S. D'Amico, E. Gratia, A. Hoyoux, J.C. Marx, G. Sonan, G. Feller, y C. Gerday. 2004. Some like it cold: Biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiology Reviews*. 28(1):25–42.

- Gerday, C., M. Aittaleb, J.L. Arpigny, E. Baise, J.P. Chessa, G. Garsoux, I. Petrescu, y G. Feller. 1997. Psychrophilic enzymes: A thermodynamic challenge. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1342(2):119–131.
- Gerday, C., M. Aittaleb, M. Bentahir, J.P. Chessa, P. Claverie, T. Collins, S. D'Amico, J. Dumont, G. Garsoux, D. Georlette, A. Hoyoux, T. Lonhienne, M.A. Meuwis, y G. Feller. 2000. Cold-adapted enzymes: From fundamentals to biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 18(3):103–107.
- Gianese, G., P. Argos, y S. Pascarella. 2001. Structural adaptation of enzymes to low temperatures. *Protein Engineering*. 14(3):141–148.
- Hamuro, Y., S.J. Coales, K.S. Molnar, S.J. Tuske, y J.A. Morrow. 2008. Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 22(7):1041–1406.
- Hernández-Cortés, P., J.R. Whitaker, y F. García-Carreño. 1997. Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei*. *Journal of Food Biochemistry*. 21(1):497–514.
- Hickman, C.P., L.S. Roberts, y A. Larson. 2001. *Integrated Principles of Zoology*. 899p.
- Hochachka, P. y G. Somero. 1984. *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press, Princeton. 537p.
- Hofer, R., H. Ladurner, A. Gattringer, y W. Wieser. 1975. Relationship between the temperature preference of fishes, amphibians and reptiles, and the substrate affinities of their trypsin. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*. 99:345–355.
- James, M.N., A.R. Sielecki, K. Hayakawa, y M.H. Gelb. 1992. Crystallographic analysis of transition state mimics bound to penicillopepsin: difluorostatine- and difluorostatone-containing peptides. *Biochemistry*. 31(15):3872–3886.
- Jia, Z. y P.L. Davies. 2002. Antifreeze proteins: An unusual receptor-ligand interaction. *Trends in Biochemical Sciences*. 27(2):101–106.
- Knight, C.G. 1995. Active-site titration of peptidases. *Methods in Enzymology*. 248:85–101.
- Kornfeld, S. y I. Mellman. 1989. The biogenesis of lysosomes. *Annual Review of Cell Biology*. 5:483–525.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Annual Review of Cell Biology*. 227(5259):680–685.
- Laycock, M. V., T. Hirama, S. Hasnain, D. Watson, y A.C. Storer. 1989. Purification and characterization of a digestive cysteine proteinase from the American lobster (*Homarus americanus*). *Biochemical Journal*. 263(2):439–444.
- Laycock, M. V., R.M. MacKay, M. Di Fruscio, y J.W. Gallant. 1991. Molecular cloning of three cDNAs that encode cysteine proteinases in the digestive gland of the American lobster (*Homarus americanus*). *FEBS Letters*. 292(1-2):115–120.
- Lonhienne, T., C. Gerday, y G. Feller. 2000. Psychrophilic enzymes: Revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1543(1):1–10.
- Lonhienne, T., J. Zoidakis, C.E. Vorgias, G. Feller, C. Gerday, y V. Bouriotis. 2001. Modular structure, local flexibility and cold-activity of a novel chitobiase from a psychrophilic Antarctic bacterium. *Journal of Molecular Biology*. 310(2):291–297.
- De Luca, V., G. Maria, G. De Mauro, G. Catara, V. Carginale, G. Ruggiero, A. Capasso, E. Parisi, S. Brier, J.R. Engen, y C. Capasso. 2009. Aspartic proteinases in Antarctic fish. *Marine Genomics*, 2, 1–10p.
- Margesin, R. y F. Schinner. 1999. *Cold-Adapted Organisms—Ecology, Physiology, Enzymology and Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin. 416p.
- Matsumoto, I., T. Asakura, T. Ohmori, T. Tamura, y K. Abe. 2009. Cathepsin D-like aspartic proteinase occurring in a maize weevil, *Sitophilus zeamais*, as a candidate digestive enzyme. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 73(10):2338–2340.
- Metcalf, P. y M. Fusek. 1993. Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site. *The EMBO Journal*. 12(4):1293–1302.
- Muhlia-Almazán, A. y F.L. García-Carreño. 2003. Digestion physiology and proteolytic enzymes of crustacean species of the Mexican Pacific Ocean. *Contributions to the Study of East Pacific Crustaceans*. 77–91p.
- Navarrete Del Toro, M.D.L.A., F. García-Carreño, M.D. López, L. Celis-Guerrero, y R. Saborowski. 2006. Aspartic proteinases in the digestive tract of marine decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*. 305(8):645–654.

- Niesen, F.H., H. Berglund, y M. Vedadi. 2007. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature protocols*. 2(9):2212–2221.
- O'Donoghue, A.J., A.A. Eroy-Reveles, G.M. Knudsen, J. Ingram, M. Zhou, J.B. Statnekov, A.L. Greninger, D.R. Hostetter, G. Qu, D.A. Maltby, M.O. Anderson, J.L. DeRisi, J.H. McKerrow, A.L. Burlingame, y C.S. Craik. 2012. Global identification of peptidase specificity by multiplex substrate profiling. *Nature Methods*. 9(11):1095–1103.
- Pace, C.N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, y T. Gray. 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. 4(11):2411–2423.
- Padilha, M.H.P., A.C. Pimentel, A.F. Ribeiro, y W.R. Terra. 2009. Sequence and function of lysosomal and digestive cathepsin D-like proteinases of *Musca domestica* midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 39(11):782–791.
- Perera, E., F.J. Moyano, M. Díaz, R. Perdomo-Morales, V. Montero-Alejo, E. Alonso, O. Carrillo, y G.S. Galich. 2008a. Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*. 150(3):247–254.
- Perera, E., F.J. Moyano, M. Díaz, R. Perdomo-Morales, V. Montero-Alejo, L. Rodríguez-Viera, E. Alonso, O. Carrillo, y G.S. Galich. 2008b. Changes in digestive enzymes through developmental and molt stages in the spiny lobster, *Panulirus argus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*. 151(3):250–256.
- Phadtare, S., J. Alsina, y M. Inouye. 1999. Cold-shock response and cold-shock proteins. *Current Opinion in Microbiology*. 2(2):175–180.
- Porter, M.L., M. Pérez-Losada, y K.A. Crandall. 2005. Model-based multi-locus estimation of decapod phylogeny and divergence times. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 37(2):355–369.
- Ranjit, N., B. Zhan, B. Hamilton, D. Stenzel, J. Lowther, M. Pearson, J. Gorman, P. Hotez, y A. Loukas. 2009. Proteolytic degradation of hemoglobin in the intestine of the human hookworm *Necator americanus*. *The Journal of infectious diseases*. 199(6):904–912.
- Rawlings, N.D. y A.J. Barrett. 2013a. Chapter 559 – Introduction: Serine Peptidases and Their Clans. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier, 2491–2523p.
- Rawlings, N.D. y A.J. Barrett. 2013b. Chapter 1 - Introduction: Aspartic and Glutamic Peptidases and Their Clans. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, 3–19p.

- Rawlings, N.D. y A. Bateman. 2009. Pepsin homologues in bacteria. *BMC Genomics*. 10:437.
- Rich, D.H. y E.T.O. Sun. 1980. Mechanism of inhibition of pepsin by pepstatin. Effect of inhibitor structure on dissociation constant and time-dependent inhibition. *Biochemical Pharmacology*. 29(16):2205–2212.
- Robinson, C.H. 2001. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist*. 151(2):341–353.
- Rojo, L., F. García-Carreño, y M. de los Angeles Navarrete del Toro. 2013. Cold-Adapted Digestive Aspartic Protease of the Clawed Lobsters *Homarus americanus* and *Homarus gammarus*: Biochemical Characterization. *Marine Biotechnology*. 15(1):87–96.
- Rojo, L., A. Muhlia-Almazan, R. Saborowski, y F. García-Carreño. 2010a. Aspartic Cathepsin D Endopeptidase Contributes to Extracellular Digestion in Clawed Lobsters *Homarus americanus* and *Homarus gammarus*. *Marine Biotechnology*. 12(6):696–707.
- Rojo, L., R. Sotelo-Mundo, F. García-Carreño, y L. Gráf. 2010b. Isolation, biochemical characterization, and molecular modeling of American lobster digestive cathepsin D1. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*. 157(4):394–400.
- Russell, N.J. 1998. Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: potential for biotechnological applications. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 61:1–21.
- Russell, N.J. 2000. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*. 4(2):83–90.
- Scarborough, P.E., K. Guruprasad, C. Topham, G.R. Richo, G.E. Conner, T.L. Blundell, y B.M. Dunn. 1993. Exploration of subsite binding specificity of human cathepsin D through kinetics and rule-based molecular modeling. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. 2(2):264–276.
- Siddiqui, K.S. y R. Cavicchioli. 2006. Cold-adapted enzymes. *Annual Review of Biochemistry*. 75:403–433.
- Simpson, B. y N. Haard. 1987. Cold-adapted enzymes from fish. En: Knorr D. (eds.) *Food Biotechnology*. New York. 495–527p.
- Simpson, B.K. y N.F. Haard. 1984. Trypsin from Greenland cod, *Gadus ogac*. Isolation and comparative properties. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*. 79(4):613–622.

- Sojka, D., Z. Franta, H. Frantova, P. Bartosova, M. Horn, J. Vachova, A.J. O'Donoghue, A.A. Eroy-Reveles, C.S. Craik, G.M. Knudsen, C.R. Caffrey, J.H. McKerrow, M. Mares, y P. Kopacek. 2012. Characterization of Gut-associated Cathepsin D Hemoglobinase from Tick *Ixodes ricinus* (IrCD1). *Journal of Biological Chemistry*. 287(25):21152–21163.
- Struvay, C. y G. Feller. 2012. Optimization to Low Temperature Activity in Psychrophilic Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(9):11643–11665.
- Sun, H., X. Lou, Q. Shan, J. Zhang, X. Zhu, J. Zhang, Y. Wang, Y. Xie, N. Xu, y S. Liu. 2013. Proteolytic Characteristics of Cathepsin D Related to the Recognition and Cleavage of Its Target Proteins. *PLoS ONE*. 8(6):
- Svingor, A., J. Kardos, I. Hajdú, A. Németh, y P. Závodszy. 2001. A better enzyme to cope with cold. Comparative flexibility studies on psychrotrophic, mesophilic, and thermophilic IPMDHs. *The Journal of biological chemistry*. 276(30):28121–28125.
- Tang, J. 2013. Chapter 3 - Pepsin A. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, 27–35p.
- Tang, J. y G. Koelsch. 1995. A possible function of the flaps of aspartic proteases: the capture of substrate side chains determines the specificity of cleavage positions. *Protein Peptide Letters*. 2:257–266.
- Tsai, I.H., P.J. Lu, y J.L. Chuang. 1991. The midgut chymotrypsins of shrimps (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus penicillatus*). *Biochimica et Biophysica Acta -Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1080(1):59–67.
- Tsigos, I., K. Velonia, I. Smonou, y V. Bouriotis. 1998. Purification and characterization of an alcohol dehydrogenase from the Antarctic psychrophile *Moraxella* sp. TAE123. *European Journal of Biochemistry*. 254(2):356–362.
- Williamson, A.L., P.J. Brindley, G. Abbenante, P. Prociv, C. Berry, K. Girdwood, D.I. Pritchard, D.P. Fairlie, P.J. Hotez, J.P. Dalton, y A. Loukas. 2002. Cleavage of hemoglobin by hookworm cathepsin D aspartic proteases and its potential contribution to host specificity. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 16(11):1458–1460.
- Wlodawer, A., A. Gustchina, y M.N.G. James. 2013. Chapter 2 - Catalytic Pathways of Aspartic Peptidases. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. academic Press, 19–26p.
- Yasuda, Y., T. Kageyama, A. Akamine, M. Shibata, E. Kominami, Y. Uchiyama, y K. Yamamoto. 1999. Characterization of new fluorogenic substrates for the rapid and

sensitive assay of cathepsin E and cathepsin D. *Journal of Biochemistry*. 125(6):1137–1143.

Yonezawa, S., T. Takahashi, X.J. Wang, R.N. Wong, J.A. Hartsuck, y J. Tang. 1988. Structures at the proteolytic processing region of cathepsin D. *The Journal of Biological Chemistry*. 263(31):16504–16511.

Zaidi, N., A. Maurer, S. Nieke, y H. Kalbacher. 2008. Cathepsin D: A cellular roadmap. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 376(1):5–9.

Zecchinon, L., P. Claverie, T. Collins, S. D'Amico, D. Delille, G. Feller, D. Georlette, E. Gratia, A. Hoyoux, M.A. Meuwis, G. Sonan, y C. Gerday. 2001. Did psychrophilic enzymes really win the challenge? *Extremophiles*. 5(5):313–321.

11. ANEXOS

11.1 Evaluación de la concentración de sitios de activos de aspártico peptidasa por titulación con pepstatina A.

Reactivos

- Buffer de acetato de sodio 50 mM.
- Enzima a una dilución tal que despliegue una cinética lineal evaluada de acuerdo a la metodología indicada en la sección 6.4.1.
- Pepstatina A 12.5 nM.
- Sustrato fluorogénico 7-metoxicumarin-4-ácido acético-Gly-Lys-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys-(2,4-dinitrofenil)-D-Arg-NH₂ (EnzoLife Sciences BML-P145-0001) 2 μ M diluido en buffer.

Materiales

- Micropipeta.
- Puntas para micropipeta.
- Microplaca negra.
- Lector de microplaca de fluorescencia.
- Tubos de 1.5 mL.

Método

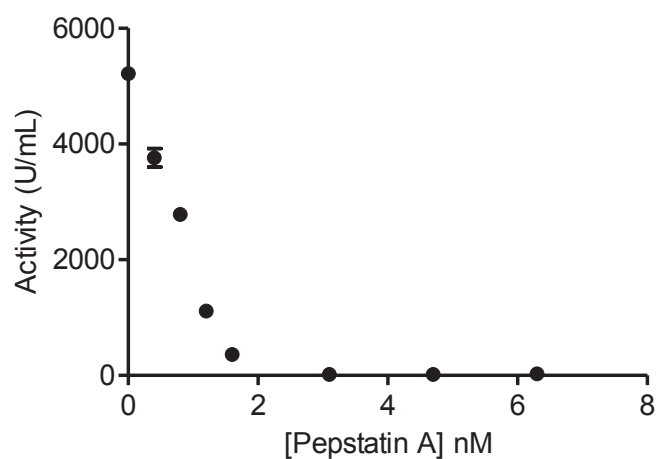
1. En diferentes tubos hacer las siguientes mezclas:

Solución*	A	B	C	D	E	F	G	H
Enzima	40	40	40	40	40	40	40	40
Pepstatina A 12.5 nM	0	2.5	5	7.5	10	20	30	40
Buffer	40	37.5	35	32.5	30	20	10	0
[Pepstatina A] (nM)	0	0.4	0.8	1.2	1.6	3.1	4.7	6.3

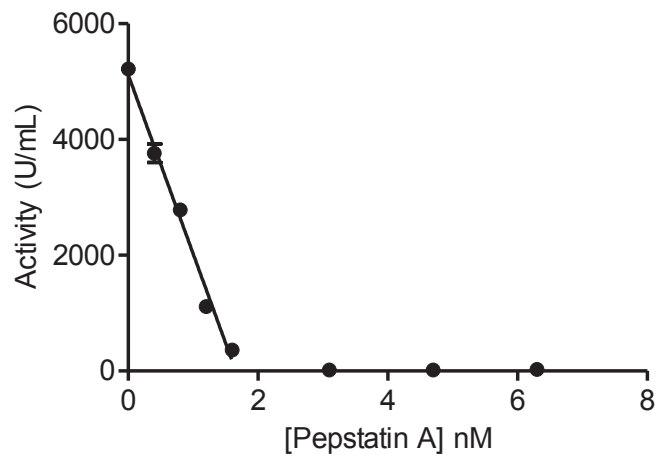
*Los volúmenes están dados en μ L.

2. Incubar las mezclas de enzima-inhibidor por 1 h a temperatura ambiente.
3. Cuantificar actividad de aspártico peptidasa en cada mezcla de enzima-inhibidor en microplaca siguiendo la metodología descrita en la sección 6.4.1.
4. Elaborar una tabla de concentración de inhibidor y la actividad en cada una de las mezclas de enzima-inhibidor y graficar de acuerdo al siguiente ejemplo (ver NOTA):

[Pepstatina A] (nM)	Activity (U/mL)
0	5121.4
0.4	3604.0
0.8	2750.4
1.2	1087.5
1.6	354.1
3.1	0
4.7	0
6.3	0



5. Realizar análisis de correlación lineal empleando aquellos puntos de concentración de inhibidor en que se registra un decremento lineal en la actividad de la peptidasa, como los que se indican a continuación:



6. De la ecuación de correlación lineal obtenida, calcular el valor de concentración de pepstatina A en que la actividad es igual a cero, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$y = ax + b$$

Cuando $y = 0$:

$$x = -\frac{b}{a}$$

Donde:

y = Actividad de aspártico peptidasa remanente tras haber sido incubada con una concentración "x" de inhibidor.

a = el valor de pendiente obtenido en el análisis de regresión lineal.

b = el valor del intercepto obtenido en el análisis de regresión lineal.

7. Calcular la concentración molar de sitios activos con la siguiente ecuación:

$$[E] = F_D \times x$$

Donde:

F_D = el factor de dilución de la enzima en la mezcla enzima-inhibidor.

x = el valor de x en la ecuación de correlación lineal cuando la actividad es igual a cero ($y=0$), calculado en el paso 6.

Nota

El incremento en la concentración de pepstatina A tiene el efecto de reducir la actividad, debido a que la interacción entre enzima inhibidor tiene estequiometría de 1:1 es posible correlacionar la cantidad de inhibidor empleado para inhibir el 100% de la actividad con la concentración de enzima. Si la concentración indicada en este protocolo no reduce al 100% la actividad, entonces es recomendable ir aumentando o disminuyendo la concentración del inhibidor en múltiplos de 10 hasta encontrar un rango de concentración adecuado para hacer la titulación.

Bibliografía

Knight, C.G. 1995. Active-site titration of peptidases. *Methods in Enzymology*. 248:85–101.

11.2 Cálculo de parámetros cinéticos de aspártico peptidasa bajo condiciones de temperatura controlada.

Reactivos

- Buffer de acetato de sodio 50 mM. 0.01% tritón, pH 4.0.
- Enzima.
- Sustrato fluorogénico 7-metoxicumarin-4-ácido acético-Gly-Lys-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys-(2,4-dinitrofenil)-D-Arg-NH₂ (EnzoLife Sciences BML-P145-0001) 1 mM en DMSO.
- DMSO.
- TCA 5% en agua destilada.

Materiales

- Pipetas
- Puntas para pipeta
- Tubos negros
- Microplacas negras
- Cronómetro
- Vórtex
- Equipo controlador de temperatura para tubos de 1.5 mL (ThermoStat Plus de Eppendorf).
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL.
- Lector de microplaca para fluorescencia.

Método

1. Iniciar el equipo controlador de temperatura y fijar la temperatura de ensayo de los parámetros cinéticos.
2. Atemperar todos los reactivos a temperatura ambiente.
3. Preparar 80 μ L de solución de sustrato 6X en DMSO de acuerdo a la siguiente tabla (Ver NOTA 1), agitar y centrifugar por 20 seg a 10,000 x g:

[S] ₀	6X [S] ₀	Sustrato 1 mM (μ L)	DMSO (μ L)
150	900	72	8
100	600	48	32
50	300	24	56
25	150	12	68
10	60	4.8	75.2
1	6	0.48	79.52

4. Preparar la mezcla de buffer-sustrato: 280 μ L de buffer + 70 μ L de sustrato diluido en DMSO (6X [S]₀).
5. Etiquetar tubos negros de la siguiente manera (NOTA 2):

Tubos de reacciones				Tubos de blancos
R1 0'	R1 10'	R1 20'	R1 30'	B1
R2 0'	R2 10'	R2 20'	R2 30'	B2
R3 0'	R3 10'	R3 20'	R3 30'	B3

6. Programar el cronómetro a 30 min.

7. Pipetear lo siguiente en los tubos:

Solución*	Reacciones	Blancos
Mezcla Buffer-sustrato	25	25
Buffer	-	5
Centrifugar todos los tubos por 20 segundos a 10000 g		
Enzima	5	-
*Los volúmenes están dados en μL .		

8. Tras haber depositado la enzima en el último tubo, detener la reacción en los tubos de tiempo cero agregando 170 μL de TCA 5%. Hacer lo mismo a los 10, 20 y 30 minutos. Agregar 170 μL de TCA 5% a los blancos al finalizar los 30 min de reacción.

9. Centrifugar todos los tubos de reacción por 5 min a 10000 $\times g$.

10. Pipetear en una microplaca negra 100 μL del contenido de cada tubo.

11. Registrar fluorescencia a 328, 393 nm de longitud de onda de excitación y emisión, respectivamente.

12. Calcular la tasa de reacción de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$v = \frac{\Delta\text{UFR}}{\text{UFR}_{1\text{nmol}} \times V_r \times \Delta t}$$

Donde:

ΔUFR = Cambio en unidades relativas de fluorescencia respecto a un periodo determinado de tiempo en minutos (Δt).

$\text{UFR}_{1\text{nmol}}$ = Unidades relativas de fluorescencia registradas por 1 nmol de MCA bajo las condiciones de ensayo.

V_r = Volumen de reacción en litros.

13. Repetir la cuantificación de velocidad de reacción a diferentes concentraciones iniciales de sustrato.

14. Construir tabla de velocidad de reacción y concentración de sustrato, calcular los parámetros cinéticos (K_m y V) en el programa GraphPad Prism.

15. Calcular la k_{cat} con la siguiente ecuación:

$$k_{\text{cat}} = V/[E]_0$$

Donde

k_{cat} = Constante catalítica o tasa de recambio.

V = Velocidad máxima de reacción

$[E]_0$ = Concentración molar de enzima en la reacción que se obtiene tras dividir la concentración molar de sitios activos de la solución de enzima (calculado como se

indica en el ANEXO 11.6) entre el factor de dilución de la enzima empleada para estimar los parámetros cinéticos.

16. Calcular los parámetros cinéticos de la enzima a diferentes temperaturas (NOTA 3).
 17. Elaborar tabla de temperatura absoluta y la constante catalítica obtenida para cada una de las temperaturas, por ejemplo:

T (K)	$k_{cat}(s^{-1})$	1/T	$\ln k_{cat}$
278.15	5.3	0.0035	1.6802
288.15	8.7	0.0034	2.1747
293.15	16.2	0.0034	2.7905
298.15	20.5	0.0033	3.0233
303.15	37.7	0.0032	3.6317
308.15	51.6	0.0032	3.9447
313.15	69.9	0.0031	4.2472
318.15	99.8	0.0031	4.6035
328.15	191.1	0.00304	5.2530

18. Hacer análisis de correlación lineal con los datos de 1/T y $\ln k_{cat}$. Se obtendrá la ecuación de Arrhenius:

$$\ln k_{cat} = \frac{E_a}{RT} + \ln A$$

19. Calcular la energía de activación (E_a) usando la siguiente ecuación:

$$E_a = m * R$$

Donde m es la pendiente obtenida en el análisis de correlación lineal de los datos de 1/T y $\ln k_{cat}$, mientras que R es la constante de los gases (8.314 J/mol K).

20. Calcular la energía libre de activación ($\Delta G^\#$), la entalpía de activación ($\Delta H^\#$) y la entropía de activación ($\Delta S^\#$), usando las siguientes ecuaciones:

$$\Delta G^\# = RT \left(\ln \frac{k_B T}{h} - \ln k_{cat} \right)$$

$$\Delta H^\# = E_a - RT$$

$$T\Delta S^\# = \Delta H^\# - \Delta G^\#$$

Donde T es la temperatura absoluta, R es la constante de los gases (8.314 J mol⁻¹ K⁻¹), A es una constante relacionada con la frecuencia de colisión, k_B es la constante de Boltzmann (1.3805x10⁻²³ J K⁻¹), h es la constante de Plank (6.6256x10⁻³⁴ J s).

21. Para la comparación con una enzima mesofílica o de origen homeotérmico, calcular los parámetros termodinámicos de activación, siguiendo la misma metodología, y calcular la diferencia, de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\Delta(\Delta G^\#)_{p-m} = \Delta G^\#_p - \Delta G^\#_m$$

$$\Delta(\Delta H^\#)_{p-m} = \Delta H^\#_p - \Delta H^\#_m$$

$$T\Delta(\Delta S^\#)_{p-m} = T\Delta S^\#_p - T\Delta S^\#_m$$

Donde $\Delta(\Delta G^\#)_{p-m}$, $\Delta(\Delta H^\#)_{p-m}$ y $T\Delta(\Delta S^\#)_{p-m}$ denotan la diferencia en energía libre de activación, entalpía de activación y entropía de activación entre la enzima psicofílica y la enzima mesofílica, indicadas con los subíndices p y m, respectivamente.

Notas

1. Donde $[S]_0$ es la concentración inicial de sustrato en la reacción, $6X [S]_0$ es la solución de sustrato a seis veces la concentración inicial de sustrato en la reacción. La dilución del sustrato en DMSO permite mantener la concentración de DMSO constante independientemente de la concentración inicial de sustrato ($[S]_0$) que se emplee para la reacción.
2. Cada tubo corresponde a un punto de reacción, las reacciones se hacen por triplicado.
3. El rango de concentración inicial de sustrato puede variar a diferentes temperaturas, dependiendo del comportamiento de K_m de la enzima; sin embargo, la concentración inicial de la enzima debe ser constante en todas las evaluaciones de tasa de reacción a todas las temperaturas.

Bibliografía

Yasuda, Y., T. Kageyama, A. Akamine, M. Shibata, E. Kominami, Y. Uchiyama, y K. Yamamoto 1999. Characterization of new fluorogenic substrates for the rapid and sensitive assay of cathepsin E and cathepsin D. *Journal of Biochemistry*. 125(6):1137–1143.

11.3 Sitios de hidrólisis identificados por LC-MS/MS para catepsina D1. Se incluyen los octapéptidos que corresponden a los subsitios P4-P4'. En los sitios de hidrólisis ocurridos en los extremos de los péptidos, se marcan con una X los subsitios no ocupados. M=norleucina (Nle).

0-15 min	0-60 min	0-240 min		
FIVFILWR	AVEGIKMW	AETSIKVF	MANFLRGP	XGMYKRF
KYIWVQQT	AVMFMSKX	AKVWSTYS	MIALYWGR	XNLSEDWA
LYRMIRQE	FGIFYLNG	AMMKIGEV	NLSEDAF	XQPGMRHS
MANFLRGP	FIVFILWR	ASMRIYIE	NMLKDDMG	XVMFLREK
RVIFFRLN	FMAFMKWH	AVEGIKMW	NRDEGWAL	XXGSQVFS
SLYRMIRQ	GRFGVWKA	AWKFGIFY	NRVGKWSY	XXIARQPW
WLIFVSNA	GWLNTSRQ	DDRQKEYS	NWPQRRGM	XXXFYAWK
XVMFLREK	HAMFRKYP	EFATGGYH	PNGQMIRW	XXXVHSDA
YDFWIQNL	KARSAFAE	EQFTNMYX	PNITREWL	XXYEQTHN
YKRFMAHW	KRISQMMW	FATGGYHP	QFTNMYXX	YDFWIQNL
	KYIWVQQT	FGIFYLNG	QLRIQNRK	YKRFMAHW
	LKDDMGXX	FIVFILWR	QYPMFVKI	YPMFVKIS
	LYRMIRQE	FKPTGPMX	RAVEGIKM	AVMFMSKX
	MANFLRGP	FMAFMKWH	RDEGWALQ	LKDDMGXX
	MIALYWGR	FPMHNGRV	RGWYLAIQ	LYRMIRQE
	NWPQRRGM	FYAWKFGI	RIMQGKKA	YIWVQTA
	RAVEGIKM	FYLGRSVP	RPVMEFAT	
	RVIFFRLN	GHETRWLI	RVIFFRLN	
	SLYRMIRQ	GIKMWQSM	SEQFTNMY	
	SVPQWHEX	GIQSTYFH	SLYRMIRQ	
	TYDFWIQN	GIYRMHVQ	SPWTMANF	
	TYSWVARG	GMSFMMXX	SVPQWHEX	
	VKISTTHW	GMYYKRFM	SYEKQRFH	
	VYDWAfri	GPTAAYHX	TFQESMLD	
	WHAMFRKY	GRFGVWKA	TSIKVFMP	
	WLIFVSNA	GRLWIHKX	TYDFWIQN	
	XAPSLIAK	GWLNTSRQ	TYSWVARG	
	XGIQSTYF	GWYLAIQA	VGKWSYRM	
	XNLSEDWA	HAMFRKYP	VIFFRLNT	
	XVMFLREK	HFYTSQIP	VKISTTHW	
	YDFWIQNL	HLWERTIV	VLTKAAPV	
	YIWVQTA	HMIALYWG	VPPRSAGX	
	YKRFMAHW	HNAGMSFM	VSRGLYFI	
		IGLQVHMR	VYDWAfri	
		IGPTAAYH	WHAMFRKY	
		IKMWQSMX	WHTWMKIF	
		IKVFMPYY	WKFGIFYL	
		IMQGKKAP	WLIFVSNA	
		KAILSQPP	WLNTSRQA	
		KARSAFAE	XAPSLIAK	
		KRISQMMW	XDPGSFKN	
		KYIWVQQT	XEAWMTFI	
		LNTSRQAE	XGIQSTYF	

11.3 Sitios de hidrólisis identificados por LC-MS/MS para catepsina D1. Se incluyen los octapéptidos que corresponden a los subsitios P4-P4'. En los sitios de hidrólisis ocurridos en los extremos de los péptidos se marcan con una X los subsitios no ocupados. M=norleucina (Nle). *Continuación...*

0-1200 min						
AEIMQTTQ	FNAMTWPS	IKMWQSMX	NLSEDAF	SLYRMIRQ	XGMYKRF	FYAWKFGI
AETSIKVF	FPMHNGRV	IKVFMPYY	NMLKDDMG	SMLDIPKQ	XHAWFSVI	KAILSQPP
AHLFNAMT	FQESMLDI	IMEMLRXX	NNPIDWHH	SMRIYIEP	XKARSAFA	TSIKVFMP
AILSQPPX	FTQRAGIL	IMQGGKAP	NRDEGWAL	SPWTMANF	XKYVLGWL	WKFGIFYL
AKVWSTYS	FYLGRSVP	IMQTTQMX	NRVGKWSY	SQVKHMEX	XLFDVNI	YPMFVKIS
AMFRKYPI	FYTSQIPA	ISQWMWEI	NWPQRRGM	SVPQWHEX	XLPGQMI	LKDDMGXX
AMMKIGEY	GDIMEMLR	KARSAFAE	PASQTARW	SYEQRFH	XLVATVYE	LYRMIRQE
APSLIAKW	GEVARPLG	KERLFFWA	PDFYLGRS	TFQESMLD	XMLDKLMN	YIWIYQTA
AQNEAHMK	GFEYVTAS	KHYSRQWW	PDYQKERL	TKMHAENI	XNLSEDWA	
AQYMMGQX	GHETRWLI	KISTTHWX	PFKVHXXX	TNKRISQW	XPAKVVST	
ASMRIYIE	GIKMWQSM	KKTLVMYN	PGMRHSAV	TQRAGILK	XPDFYLGR	
AVEGIKMW	GIQSTYFH	KMWQSMXX	PLISVMRX	TREWLHPF	XPPNRDEG	
AVMFMSKX	GIYRMHVQ	KRISQMMW	PNGQMIRW	TSPHMIWA	XPSFNMYG	
AWKFGIFY	GLYFITHX	KVNFOQHI	PNITREWL	TWPSGHGX	XQMKKTLV	
DDLMSQF	GMLNIHFK	KWVGFEPH	PPNRDEGW	TYDFWIQN	XQPGMRHS	
DDRQKEYS	GMSFMMXX	KYIWIYVQT	PSVDMXXX	TYSWVARG	XRPVMEFA	
DHFYTSQI	GMYKRFM	KYVLGWLN	PVSRGLYF	VGKWSYRM	XSAMMKIG	
DIMEMLRX	GPFHIVKW	LDHFYTSQ	PWTMANFL	VIFFRLNT	XSETIAHF	
DKLMNWPQ	GPTAAYHX	LGRSVPQW	QDDLMSQF	VKISTTHW	XSLNQAYG	
DMPVDMX	GRFGVWKA	LGWLNTSR	QFTNMYXX	VLTKAAPV	XVMFLREK	
DPKAGRXX	GRLWIHKX	LIQVPVKH	QKEYSWMN	VMEFATGG	XWQKNSDG	
DRQKEYSW	GSMGANHT	LNTSRQAE	QLRIQNRK	VNFQQHIX	XXGIQSTY	
DSIRHQGP	GSRGLYTX	LQHTFXXX	QPVSRLY	VPPRSAGX	XXGSQVFS	
DSQESARD	GTQMIQAP	LQVHMRYI	QPWNMLKD	VQLGGAAX	XXIARQPW	
DTKMHAEN	GWLNTSRQ	LRIQNRKY	QVDLYDKS	VSRGLYFI	XXXSHTND	
DWAFRIRS	GWYLAIQA	LSQDQAFK	QVHMRYIN	VYDQAFRI	XXPAKVVS	
DYQKERLF	GYDLQTAQ	LVATVYEF	QYPMFVKI	WALQHTFX	XXPDFYLG	
EFAFGGYH	HAMFRKYP	LWERTIVN	RAVEGIKM	WHAMFRKY	XXPNITRE	
EHPEMVHY	HDVMGSRG	MAIGARSD	RDEGWALQ	WHTWMKIF	XXWQKSND	
EIMQTTQM	HEGPKXXX	MANFLRGP	RGLYFITH	WLIQVNSA	XXXFYAWK	
EPETFQDX	HFTQRAGI	MEPHSKVN	RGWYLAIQ	WLNTSRQA	XXXKARSA	
EQFTNMYX	HFYTSQIP	MFVKISTT	RIMQGGKA	WMNLIQXX	XXXVHSDA	
EQTHNYRP	HIGLQVHM	MHVQLGGA	RISQMMWE	WNMLKDDM	XXYEQTHN	
ERLFFWAX	HLPQAIMQ	MIALYWGR	RIYIEPET	WPDHGXXX	XXYMDSIR	
ETVYADSS	HLWERTIV	MKIGEVAR	RLFFWAXX	WPQRRGMX	XYMDSIRH	
FATGGYHP	HMIQLYWG	MKKTLMVY	RPDMEWQX	WSYRMXXX	YDFWIQNL	
FDYTLKGE	HNAGMSFM	NAGMSFMM	RPVMEFAT	XAETSIVK	YDLQTAQX	
FGAQLRIQ	HSPWTMAN	NFHMAIGA	RRVYLTSP	XAPSLIAK	YDQAFRIR	
FGIFYLNG	HTFQESML	NFPHLWER	RSQFAEMW	XAQNEAHM	YEQRFQHP	
FGVWKAIL	HWQRVIFF	NGEAVMFM	RVIFFRLN	XASMRIYI	YGRLWIHK	
FIVFILWR	IGEVARPL	NHTVVVKA	SEDQAFKP	XDPGSFKN	YKRFMAHW	
FKPTGPMX	IGLQVHMR	NITREWLH	SEQFTNMY	XEAWMTFI	YMDSIRHQ	
FMAFMKWH	IGPTAAYH	NKRISQWM	SGMLNIHF	XGIQSTYF	YSWMNLIQ	

11.4 Sitios de hidrólisis identificados por LC-MS/MS para catepsina D1 tratada previamente con E-64. Se incluyen los octapéptidos que corresponden a los subsitios P4-P4'. En los sitios de hidrólisis ocurridos en los extremos de los péptidos se marcan con una X los subsitios no ocupados. M = norleucina (Nle).

0-15 min	0-60 min	0-240 min	0-1200 min
FIVFILWR	FGIFYLNG	AVMFMSKX	AVMFMSKX
KYIWVQQT	FIVFILWR	FGIFYLNG	AWKFGIFY
LYRMIRQE	KYIWVQQT	FIVFILWR	FGIFYLNG
MANFLRGP	LYRMIRQE	FMAFMKWH	FIVFILWR
RVIFFRLN	MANFLRGP	HMIALYWG	FMAFMKWH
TYDFWIQN	RVIFFRLN	KYIWVQQT	GFEYVTAS
TYSWVARG	SLYRMIRQ	MANFLRGP	GIKMWQSM
WLIFVSNA	TYDFWIQN	MWSLYRMI	GMSFMMXX
XVMFLREK	WLIFVSNA	RVIFFRLN	GYDLQTAK
YDFWIQNL	XMAIHGFE	SLYRMIRQ	HMIALYWG
	XVMFLREK	TYDFWIQN	KYIWVQQT
	YDFWIQNL	TYSWVARG	LDHFYTSQ
	YIWVQTA	VYDWAfri	MANFLRGP
	TYSWVARG	WHAMFRKY	MIALYWGR
		WLIFVSNA	MWSLYRMI
		XGMYKRF	NHTWVKA
		XPDFYLGR	RGLYFITH
		XVMFLREK	RGWYLAIQ
		YDFWIQNL	RLFFWAXX
		YIWVQTA	RVIFFRLN
		YPMFKIS	SEDWAfKP
		LYRMIRQE	SEQFTNMY
		XMAIHGFE	TYDFWIQN
			TYSWVARG
			VGKWSYRM
			VIFFRLNT
			VYDWAfri
			WHAMFRKY
			WHTWMKIF
			WLIFVSNA
			WLNTSRQA
			XEAWMTFI
			XGMYKRF
			XLVATVYE
			XPDFYLGR
			XVMFLREK
			XXGSQVFS
			XXXFYAWK
			YDFWIQNL
			YIWVQTA
			SLYRMIRQ
			YPMFKIS
			LYRMIRQE
			XMAIHGFE

11.5 Sitios de hidrólisis identificados por LC-MS/MS para pepsina gástrica porcina. Se incluyen los octapéptidos que corresponden a los subsitios P4-P4'. En los sitios de hidrólisis ocurridos en los extremos de los péptidos se marcan con una X los subsitios no ocupados. M = norleucina (Nle).

0-15 min	0-60 min	0-240 min	0-1200 min			
APSLIAKW	AGMSFMMX	AGMSFMMX	TYSWVARG	AEIMQTTQ	LYRMIRQE	WNMLKDDM
ASMRIYIE	APSLIAKW	APSLIAKW	WHAMFRKY	AGILKLMP	MAHWVGIX	XAHLFNAM
AVMFMSKX	ASMRIYIE	ASMRIYIE	WLIFVSNA	AGMSFMMX	MANFLRGP	XASMRIYI
FIVFILWR	AVMFMSKX	AVMFMSKX	WMNLIQXX	APSLIAKW	MGSRLGYT	XEAWMTFI
FYAWKFGI	AYNMWSLY	AYNMWSLY	XASMRIYI	AQYMMGQX	MIALYWGR	XHAWFSVI
GIKMWQSM	DIMEMLRX	DIMEMLRX	XEAWMTFI	ASMRIYIE	MSEQFTNM	XKQDDLMS
KERLFFWA	DTKMHAEN	DTKMHAEN	XHAWFSVI	AVMFMSKX	MWSLYRMI	XLVATVYE
KYIWVQQT	EAVMFMSK	EAVMFMSK	XKQDDLMS	AYNMWSLY	NAGMSFMM	XMAIHGFE
LSEDWAFK	FGIFYLNG	FGIFYLNG	XMAIHGFE	DDLMEQF	NMAFMKW	XNLSEDWA
MANFLRGP	FIVFILWR	FIVFILWR	XNLSEDWA	DIMEMLRX	NGEAVMFM	XPDFYLGR
MSEQFTNM	FYAWKFGI	FMAFMKWH	XPDFYLGR	DSQESARD	NGQMIRWH	XPSFNMYG
NGEAVMFM	GIKMWQSM	FYAWKFGI	XSAMMKIG	DTKMHAEN	PSFNMYGY	XSAMMKIG
QFTNMYXX	GMSFMMXX	GIKMWQSM	XVMFLREK	DWAFRIRS	PVMEFATG	XTNMYQAG
RGLYFITH	KERLFFWA	GMSFMMXX	XXGIQSTY	EAVMFMSK	QDDLMEQ	XVMFLREK
RLFFWAXX	KYIWVQQT	GTQMIEAP	XXIARQPW	ETFDKXXX	QESMLDIP	XXGIQSTY
RVIFFRLN	LSEDWAFK	HFSENXXX	XXXELFDN	ETVYADSS	QFTNMYXX	XXGMYKCR
TYDFWIQN	LYRMIRQE	HGFEYVTA	XXXFYAWK	FGAQLRIQ	QNSDPKAG	XXHHFTQR
WLIFVSNA	MANFLRGP	HMIALYWG	YDFWIQNL	FGIFYLNG	QVDLYDKS	XXIARQPW
WMNLIQXX	MSEQFTNM	KERLFFWA	YDWAFRIR	FIVFILWR	QVHMRYIN	XXXELFDN
XKQDDLMS	MWSLYRMI	KVFMPIYG	YGRLWIHK	FMAFMKWH	QYPMFVKI	XXXFYAWK
XNLSEDWA	NAGMSFMM	KYIWVQQT	YIYWVQTA	FPHLWERT	RAVEGIKM	YDFWIQNL
XSAMMKIG	NGEAVMFM	LDHFYTSQ	YKRFMAHW	FYAWKFGI	RDEGWALQ	YDWAFRIR
XVMFLREK	QFTNMYXX	LFNAMTWP	YPMFVKIS	GDIMEMLR	RGLYFITH	YGRLWIHK
YDFWIQNL	QYPMFVKI	LSEDWAFK	YSWMNLIQ	GIKMWQSM	RISQWMWE	YIYWVQTA
YGRLWIHK	RGLYFITH	LYRMIRQE		GLYFITHX	RLFFWAXX	YKRFMAHW
YSWMNLIQ	RLFFWAXX	MANFLRGP		GMSFMMXX	RVIFFRLN	YPMFVKIS
	RVIFFRLN	MSEQFTNM		GTQMIEAP	RWHFSENX	YSWMNLIQ
	TYDFWIQN	MWSLYRMI		HDVLLRPX	RWHTWMKI	YTSQIPAX
	WHAMFRKY	NAGMSFMM		HFSENXXX	SAMMKIGE	
	WLIFVSNA	NGEAVMFM		HGFEYVTA	SEDWAFKP	
	WMNLIQXX	PVMEFATG		HMIALYWG	SEQFTNMY	
	XEAWMTFI	QDDLMEQ		HMRVINVM	SFNMYGYD	
	XKQDDLMS	QESMLDIP		HSDAYVTE	SMQFNVKS	
	XNLSEDWA	QFTNMYXX		KAILSQPP	SMRIYIEP	
	XSAMMKIG	QNSDPKAG		KERLFFWA	TMANFLRG	
	XVMFLREK	QVDLYDKS		KTDWWAYX	TYDFWIQN	
	XXGIQSTY	QYPMFVKI		KVFMPIYG	TYSWVARG	
	XXXELFDN	RGLYFITH		KYIWVQQT	VMEFATGG	
	YDFWIQNL	RISQWMWE		LDHFYTSQ	WERTIVNH	
	YGRLWIHK	RLFFWAXX		LFNAMTWP	WHAMFRKY	
	YPMFVKIS	RVIFFRLN		LGWLNTSR	WHTWMKIF	
	YSWMNLIQ	RWHFSENX		LPAEIMQT	WLIFVSNA	
		SMRIYIEP		LSEDWAFK	WLNTSRQA	
		TYDFWIQN		LVATVYEF	WMNLIQXX	

11.6 Sitios de hidrólisis identificados por LC-MS/MS para catepsina D de bazo bovino. Se incluyen los octapéptidos que corresponden a los subsitios P4-P4'. En los sitios de hidrólisis ocurridos en los extremos de los péptidos se marcan con una X los subsitios no ocupados. M = norleucina (Nle).

0-15 min	0-60 min	0-240 min	0-1200 min	
AVMFMSKX	AVMFMSKX	AEIMQTTQ	AEIMQTTQ	RGWYLAIQ
FIVFILWR	FGIFYLNG	ALQHTFXX	AGMSFMMX	RLFFWAXX
FYAWKFGI	FIVFILWR	AVMFMSKX	AILSQPPX	RVIFFRLN
GIKMWQSM	FMAFMKWH	AWKFGIFY	AMMKIGEV	SEDWAFKP
KYIWYVQT	FYAWKFGI	DWAFRIRS	AQYMMGQX	SEQFTNMY
LYRMIRQE	GHTFQESM	EYSWMNLI	ASMRIYIE	SMRIYIEP
RLFFWAXX	GIKMWQSM	FFRLNTPX	AVMFMSKX	SWMNLIQX
TYDFWIQN	KYIWYVQT	FGIFYLNG	AWKFGIFY	TMANFLRG
WLIFVSNA	LYRMIRQE	FIVFILWR	DIMEMLRX	TYDFWIQN
XXXELFDN	MWSLYRMI	FMAFMKWH	DKLMNWPQ	TYSWVARG
YDFWIQNL	RLFFWAXX	FYAWKFGI	DWAFRIRS	VIFFRLNT
YKRFFMAHW	SEQFTNMY	GHTFQESM	EYSWMNLI	VLTKAAPV
	TYDFWIQN	GIKMWQSM	FGIFYLNG	VMFLREKQ
	WLIFVSNA	GMSFMMXX	FIVFILWR	VYDWAFRI
	WMNLIQXX	GWYLAIQA	FMAFMKWH	WHAMFRKY
	XXXELFDN	GYDLQTAK	FMAHWVGI	WHTWMKIF
	XXXIARQP	HAMFRKYP	FYLGRSVP	WKFGIFYL
	YDFWIQNL	HEGPKXXX	GIKMWQSM	WLIFVSNA
	YKRFFMAHW	KYIWYVQT	GMSFMMXX	WLNTSRQA
	YPMFVKIS	LDHFYTSQ	GWYLAIQA	WMNLIQXX
		LIQVPVKH	GYDLQTAK	WNMLKDDM
		LYRMIRQE	IAKWVGFE	XGIQSTYF
		MANFLRGP	IKVFMPIY	XHAWFSVI
		MSEQFTNM	IMEMLRXX	XNLSEDWA
		MWSLYRMI	KAILSQPP	XVMFLREK
		RGLYFITH	KERLFFWA	XXXELFDN
		RLFFWAXX	KVFMPIYG	XXXIARQP
		RVIFFRLN	KWVGFEPH	XXXMYFKY
		SEQFTNMY	KYIWYVQT	YGRLWIHK
		SWMNLIQX	LAIQAVXX	YKRFFMAHW
		TYDFWIQN	LDHFYTSQ	YPMFVKIS
		TYSWVARG	LFNAMTWP	ALQHTFXX
		VIFFRLNT	MANFLRGP	FFRLNTPX
		VQLGGAAX	MSEQFTNM	FYAWKFGI
		WLIFVSNA	MSFMMXXX	GHTFQESM
		WMNLIQXX	NDVNI FEI	HAMFRKYP
		WNMLKDDM	NHTWVKA	HEGPKXXX
		XXXELFDN	NMLKDDMG	LIQVPVKH
		XXXIARQP	PSVDMXXX	LYRMIRQE
		XXXVHSDA	QDDL MSEQ	MWSLYRMI
		YDFWIQNL	QFTNMXXX	VQLGGAAX
		YKRFFMAHW	QNSDPKAG	XXXVHSDA
		YPMFVKIS	QVDLYDKS	YDFWIQNL
			RGLYFITH	