



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina  
Licenciatura en Biomedicina

Instituto de Fisiología  
Laboratorio de Bioquímica Celular

**“Expresión y actividad de las protein-convertasas PC1/3, PC2 y Furina en la línea celular CHO-DL1 que sobreexpresa Proencefalina recombinante”.**

Para obtener el título de:  
Licenciado en Biomedicina

Presenta:  
Ismael Luna Reyes

Director experto:  
Dra. en C. Maria Rosa Padrós Semorile

Director metodológico:  
MC. Cenobia Silvia Duran Gonzales

Puebla 2016

Esta investigación fue realizada con el apoyo del  
Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla

## ***Agradecimientos.***

A la doctora María Rosa Padrós por haberme permitido dar el primer paso en el camino de la ciencia. Por su dedicación, paciencia, su consejo, apoyo y su buena disposición al trabajo.

A Silvia Durán, por su incondicional apoyo en todas las situaciones que surgían en el laboratorio, sus historias y compañía.

A los miembros del jurado, al doctor Fabian Galindo y al doctor Celso Cortes, por sus aportaciones al proyecto y a mi formación como biomédico.

A mis papás, Venerando Luna y Yesenia Reyes, a mis hermanos Tavo y Laura, por su apoyo a lo largo de la carrera.

A mis amigos de biome; Oscar, Pastor, Josue, Ceci, Thalía, Faby, Cristian, Abraham y Carlos, por todas las aventuras de estos cinco años y por todas las trastocadas discusiones científicas.

A Chivis, Salo, Teo, Isa y Yess, por su incondicional amistad y por creer en mí.

A Thalí, por todos esos impredecibles momentos.

A mi familia, por su apoyo y confianza.

A mis compañeros de laboratorio, por permitirme trabajar y aprender junto con ellos.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>3. ANTECEDENTES</b>	4
3.1. Antecedentes generales	4
3.1.1. La familia de las Pro-proteína Convertasas	6
3.1.1.1 Las convertasas PC1/3 y PC2	10
3.1.1.1.1 PC 1/3	11
3.1.1.1.1.1 Estructura y Biogénesis de PC1/3	11
3.1.1.1.1.2 Actividad Catalítica de PC1/3	13
3.1.1.1.2 PC2	15
3.1.1.1.2 .1. Estructura y Biogénesis de PC2	15
3.1.1.1.2.2 Actividad Catalítica de PC2	17
3.1.1.2. Furina	18
3.1.1.2.1. Estructura y biogénesis de furina	19
3.1.1.2.2 Actividad catalítica de furina	20
3.1.2. Moléculas o proteínas precursoras de encefalinas	21
3.1.2.1 Proencefalina	21
3.1.2.1.1 Procesamiento de PENK por las PC's	23
3.1.2.1.2 Liberación de sinencefalina	24
3.1.2. Moléculas o proteínas precursoras de encefalinas	21
3.2. Antecedentes específicos	26
3.2.1. Cepa CHO	26
3.2.1.1 La cepa CHO-DL1	27
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	27
<b>5. HIPÓTESIS</b>	28
<b>6. OBJETIVOS</b>	28

6.1. Objetivo General	28
6.2. Objetivos Particulares	28
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
7.1. Cultivo celular	29
7.2. Obtención de los Extractos celulares	29
7.3. Cuantificación de proteínas totales	30
7.4. Western blot	31
7.5. Anticuerpos	33
7.6. Transfecciones transitorias de los plásmidos que contienen furina, PC1 o PC2	34
7.7. Densitometría	35
7.8. Análisis de datos	35
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>37</b>
8.1. Expresión de la proteína BIP	37
8.2. Expresión de PC1/3	38
8.2.1. Pcsk1	38
8.2.2. DAM1	40
8.2.3. DAM7	42
8.3. Expresión de Furina	45
8.4. Expresión de PC2	48
8.5. Secreción de PENK de 32-34 kDa y 8.5 kDa posterior a la transfección de las diferentes convertasas	51
8.5.1. Transfección con pFurina	51
8.5.2. Transfecciones con pPC1/3 y pPC2	53
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>55</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>61</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>62</b>

## 1. Resumen

Las protein-convertasas son una familia de enzimas compuesta por nueve miembros. Estas proteínas comparten características estructurales y funcionales en común. Dentro de esta familia los siete primeros miembros descritos (Furina, PC1/3, PC2, PC4, PC5 A/B, PC6/PACE y PC7) son serina proteasas con función de endoproteasas que llevan a cabo reacciones proteolíticas en péptido que presentan secuencias (Arg/Lys)-X<sub>n</sub>-(Arg/Lys) donde X es cualquier aminoácido excepto cisteína y n es 0, 2, 4 o 6.

Dos de las protein-convertasas de mayor importancia para este proyecto son PC2 y PC1/3, estas enzimas son consideradas proteasas neuroendocrinas y participan en la proteólisis dirigida en proteínas precursoras como PENK, PMOC, PNPY, etc. La tercera protein-convertasa de nuestro interés es Furina que, a diferencia de PC2 y PC1/3, es expresada de forma ubicua, pero presenta distinta afinidad para los sustratos que puede procesar. Las tres enzimas se sintetizan como zimógenos y por procesos catalíticos postraduccionales se originan sus formas maduras activas dentro de diferentes compartimientos intracelulares.

PENK es una de las proteínas precursoras de péptidos opioides, los cuales están inmersos dentro de la secuencia peptídica de la forma precursora (32-34 kDa) y son liberados por la escisión de los sitios dibásicos que rodean estas moléculas, proceso que es mediado por la actividad de protein-convertasas.

A pesar de que en los últimos años el interés estuvo centrado en la liberación de los péptidos con actividad opioide, en los últimos años diversos trabajos han aportado pruebas para la existencia de procesamiento proteico en la porción no opioide de la molécula de PENK (sinencefalina). Este procesamiento comenzaría con la liberación de la molécula íntegra de sinencefalina, un péptido de 8.5 kDa, mediada por la proteólisis de un sitio dibásico al término de esta secuencia. Hasta ahora este procesamiento solo había sido observado en células del sistema nervioso y del sistema inmune.

La cepa CHO-DL1 fue desarrollada por Lindberg y colaboradores con la finalidad de obtener una cepa que sobreexpresara PENK recombinante útil para el análisis de los

péptidos derivados de esta molécula. En trabajos recientes se encontró que esta línea secreta al medio de cultivo la molécula intacta de PENK (32-434 kDa) además de otro péptido de 8.5 kDa.

En este trabajo de Tesis estudiamos la presencia de las protein-convertasas Furina, PC1/3 y PC2 en la cepa CHO-DL1 utilizando la metodología de western blot e inmunorevelando con diferentes anticuerpos específicos para cada una de estas enzimas. Encontramos que las células CHO-WT y CHO-DL1 (que sobreexpresa PENK recombinante) expresan las formas de la convertasa Furina: precursor de 110 kDa, madura activa de 98 kDa y soluble de 80-82 kDa. Además que tanto la cepa CHO-DL1 como la cepa silvestre sintetizan las formas de PC1/3 de 97, 87 y 66 kDa; y las formas de PC2 con pesos moleculares de 76, 71 y 64 kDa. Todas las formas de PC1/3 y PC2 ya han sido reportadas en otros trabajos de investigación.

Por otra parte, la presencia de PC1/3 de 87 y 66 kDa y de PC2 de 64 kDa demuestran que ambas convertasas se derivan por un proceso autocatalítico de sus respectivos precursores. Los niveles de expresión de estas enzimas se ven afectados por el porcentaje de suero en el que son cultivadas las células. En células de la cepa silvestre cultivadas en bajas condiciones de suero hay un incremento de la expresión de Furina y muy ligeramente de PC2.

Otros hallazgos importantes de este trabajo de Tesis demuestran que estas enzimas participan en el procesamiento de la molécula de PENK 32-34 kDa hacia el péptido de 8.5KDa, cuando se realizaron los experimentos de transfecciones transitorias con los plásmidos de cada una de estas convertasas en células de la cepa CHO-DL1. Los resultados indican que las tres enzimas participan en la generación de la molécula de 8.5 kDa pero que es PC2 la que produce una mayor concentración de este péptido en el medio de secreción, por lo que esta enzima sería la más efectiva en la generación del mismo.

## **2. Introducción**

Muchas de las proteínas que conocemos son sintetizadas inicialmente como zimógenos o precursores. En muchos casos los precursores corresponden a formas no maduras de las proteínas que presentan variaciones con respecto al péptido final. Muchas de estas variaciones son necesarias para la maduración de dichas proteínas hacia su producto final.

Existen una gran cantidad de modificaciones postraduccionales que son distintos procesos que se llevan a cabo sobre una cadena peptídica primaria que finalmente conducen a la formación del péptido final.

Una de las modificaciones postraduccionales más importantes es la proteólisis dirigida. Este proceso se lleva a cabo en zonas específicas dentro de la cadena peptídica para permitir la separación de los productos peptídicos finales de estructuras intermedias que solo son necesarias durante el proceso de síntesis y maduración de la proteína.

Siete miembros de la familia de las protein-convertasas tienen un papel importante en la proteólisis dirigida sobre diversas proteínas. Los miembros de esta familia de enzimas realizan cortes en sitios dibásicos dentro de la secuencia proteica para llevar a cabo la liberación de productos finales o intermedios.

En el presente trabajo se analiza la expresión y la participación de las protein-convertasas Furina, PC1/3 y PC2 para la generación de un péptido de 8.5 kDa que deriva del extremo amino-terminal de la molécula de proencefalina en la cepa CHO-DL1. El cual puede ser liberado por la proteólisis dirigida en un sitio dibásico en la secuencia de esta molécula.



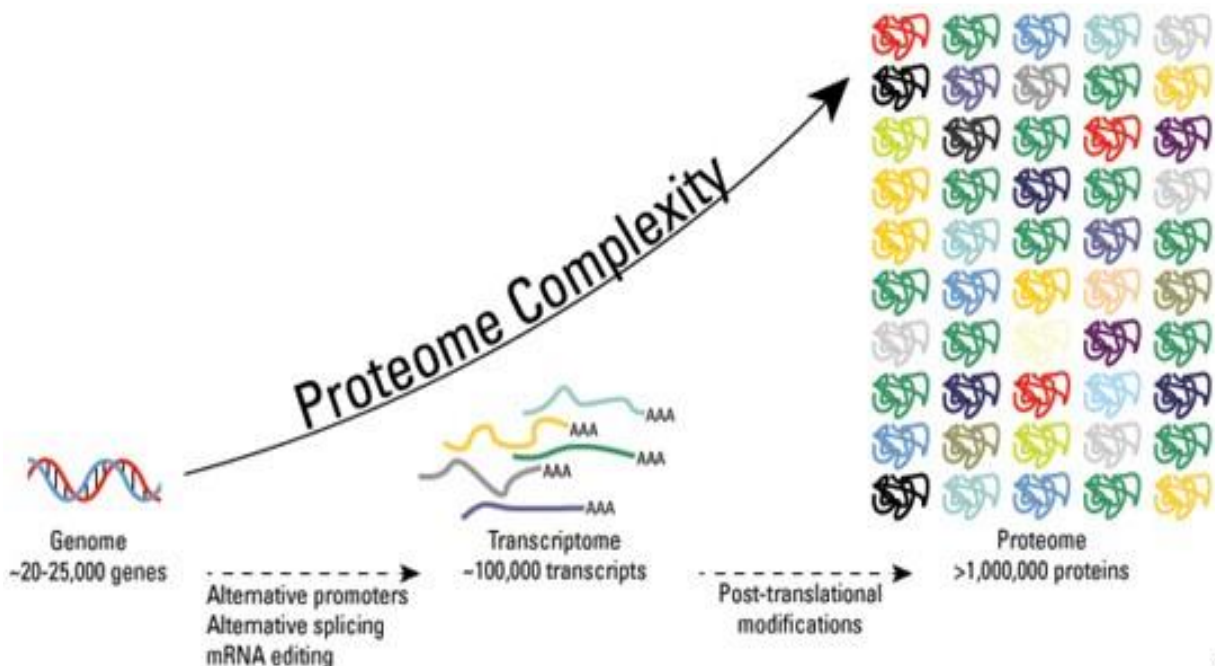
### 3. Antecedentes

#### 3.1. Antecedentes generales

A pesar del gran tamaño y complejidad del genoma humano la expresión funcional de éste pareciera ser bastante limitada. Con el término del HGP (*Human Genome Project*; Proyecto del genoma humano por sus siglas en inglés) se determinó que la longitud del genoma humano era de alrededor de 3.8 Gbp. Sin embargo éste sólo contiene la información necesaria para codificar alrededor de 21,000 proteínas diferentes (Hattori, 2005; Lander, 2011). Este número resulta bastante limitado cuando se considera que otros organismos con genomas bastante menores poseen información genética para codificar un número de proteínas similar o inclusive mayor al del ser humano (Seidah et al., 2011).

Sin embargo, diferentes procesos permiten que una célula sea capaz de sobrellevar esta situación para aumentar la capacidad funcional de su genoma. Estos eventos pueden dividirse, de forma general, en aquellos que actúan sobre los ácidos nucleicos y los que actúan sobre las proteínas (Seidah, 2013)

**Figura 1. Modificaciones postraduccionales.** El genoma humano tiene una capacidad limitada de expresión a cerca de 25,000 genes, sin embargo diversos procesos permiten ampliar esta situación: durante la transcripción ocurren modificaciones de los transcritos primarios para generar hasta 10,000 mRNA diferentes, y de forma posterior las modificaciones postraduccionales sobre las cadenas peptídicas aumentan la variedad de proteínas sintetizadas a más de un millón (Eipper, 2014)



Los procesos que modifican el ADN pueden actuar sobre una gran parte del genoma o sobre un gen en particular. Eventos como la recombinación somática y la recombinación homóloga son fenómenos que permiten que cantidades importantes del DNA modifiquen su estructura primaria y con ello se generen variantes para diferentes genes, los cuales al ser transcritos y traducidos producen una mayor variedad de proteínas. Otros procesos como el corte y empalme alternativo, la poliadenilación alternativa y el inicio alternativo de la transcripción modifican la estructura del RNA mensajero el cual al ser transcrito genera diferentes péptidos a partir de un mismo gen (Modrek & Lee, 2002).

Por otro lado, la modificación directa de la estructura proteica también está asociada con la generación de un mayor número de péptidos que pueden tener diferentes actividades biológicas. Estos cambios en la estructura proteica se conocen como modificaciones postraduccionales e incluyen más de 200 diferentes fenómenos (Nabil G. Seidah et al., 2013; Nabil G. Seidah, 2011).

Una de las formas más importantes de modificación postraducciona l es la proteólisis limitante o proteólisis dirigida. Éste es un proceso irreversible por el cual una cadena peptídica primaria o precursor es escindida por una enzima proteolítica en sitios específicos y conservados. Después del corte se generan al menos dos nuevos péptidos de los cuales uno puede considerarse un producto y en muchos casos la remoción de la otra secuencia peptídica o prodominio permite que éste adquiera actividad biológica. (Steiner et al., 1967; von Eggelkraut-Gottanka & Beck-Sickinger, 2004). La proteólisis limitante es un proceso de vital importancia para la modulación de la actividad de diversos péptidos que inicialmente se sintetizan como zimógenos. Pero además permite generar un amplio repertorio de moléculas de una misma proteína precursora, este tipo de proteínas son conocidas como multiproteínas y poseen diversos sitios susceptibles a proteólisis los cuales pueden ser cortados en diferentes patrones dando lugar a un amplio espectro de productos de procesamiento.

Los procesos proteolíticos son llevados a cabo por enzimas conocidas como proteasas o peptidasas las cuales catalizan la hidrólisis del enlace peptídico. Uno de los grupos más abundantes de proteasas son las llamadas serina-proteasas las cuales componen

casi un tercio de todas las proteasas conocidas en la actualidad (Di Cera, 2009; Nabil G. Seidah & Prat, 2012). Estas enzimas se caracterizan por la presencia de un residuo de serina que forma parte de una triada catalítica conservada de Aspartato-Histidina-Serina la cual coordina el ataque nucleofílico hacia el enlace peptídico (Polgár, 2005). Muchas de las serina-proteasas involucradas en la proteólisis limitada son endopeptidasas que cortan pares de residuos básicos dentro de los péptidos precursores (Costa et al., 1987; von Eggelkraut-Gottanka & Beck-Sickinger, 2004). En su mayoría estas endopeptidasas pertenecen a dos grandes familias las proteasas similares a quimiotripsina-tripsina y las proteasas similares a la subtilisina bacteriana, que en conjunto regulan una miríada de procesos celulares. (Artenstein & Opal, 2011; Nabil G. Seidah & Prat, 2012)

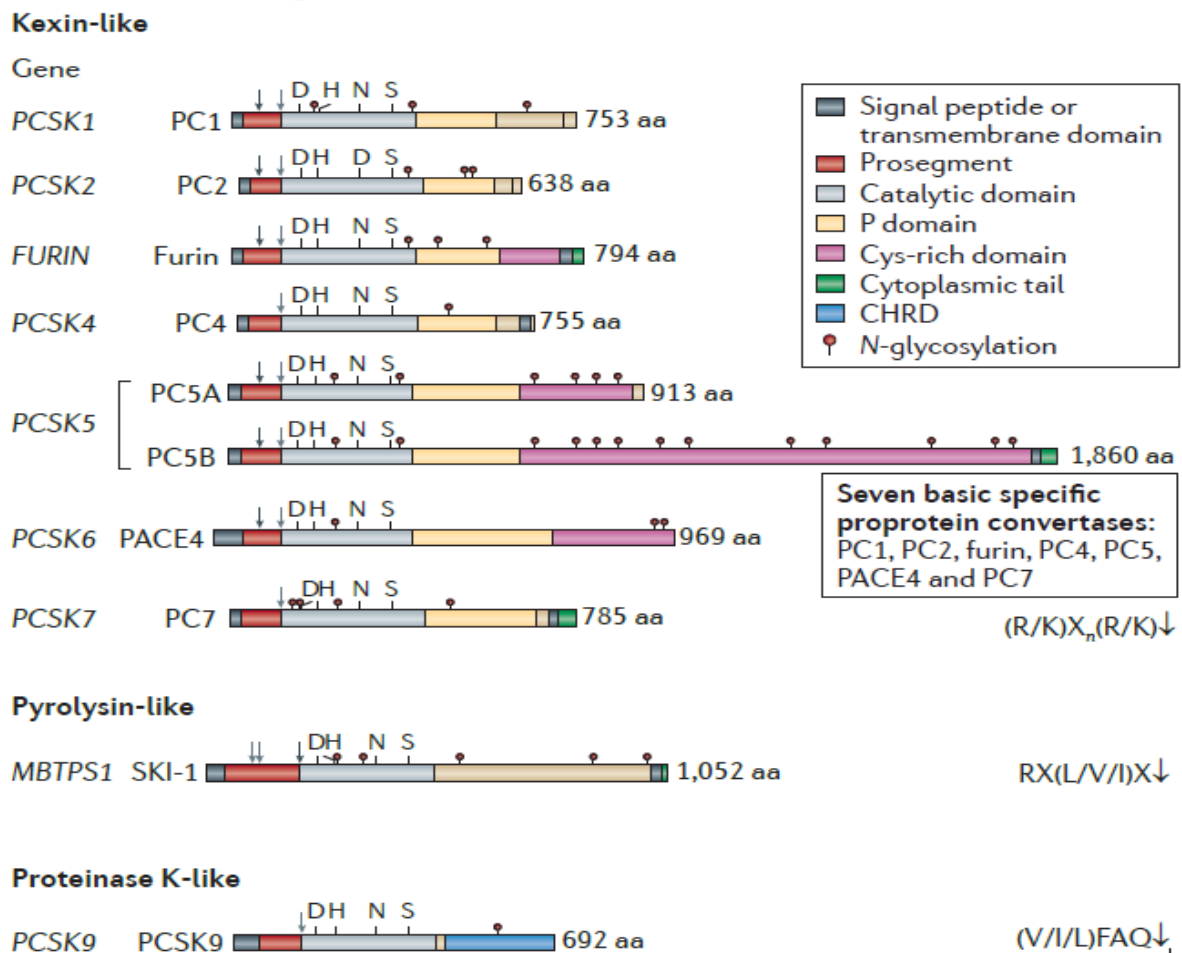
### **3.1.1. La familia de las Pro-proteína Convertasas**

Desde mediados del siglo pasado se observó que diversos péptidos tenían estructuras que parecían corresponder a partes de una proteína o péptido mayor además de que la forma en que están plegadas muchas proteínas sugería que debían derivar de una cadena proteica mayor que facilitara la correcta formación de la estructura. Esta teoría se vio apoyada cuando Steiner reportó la existencia de una proteína que contenía la secuencia de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la insulina asociadas a una cadena peptídica intermedia (Steiner et al., 1967). Sin embargo el descubrimiento de las proteínas precursoras también hizo surgir la necesidad de entender como éstas eran procesadas hacia sus productos finales y cuáles enzimas intervenían en estos procesos (Costa et al., 1987).

Los primeros avances en el entendimiento de estos mecanismos se dieron gracias al descubrimiento de las subtilisinas, las cuales son endoproteasas bacterianas que a pesar de considerarse inespecíficas presentan una mayor afinidad por algunos sustratos y pueden participar en la generación de productos activos derivados de otras proteínas (Richards, 1958).

Más de tres décadas después, a finales de los años 80's, un grupo de investigación en el Colegio Médico de Miyazaky identificó la primera proteasa eucariota homóloga a las subtilisinas bacterianas. La kexina, producto del gen *KEX2*, se describió como una endopeptidasa de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de cortar en sitios dibásicos dentro de una cadena polipeptídica y cuya actividad era dependiente de calcio (Mizuno, Nakamura, Ohshima, Tanaka, & Matsuo, 1989). Un par de años después Van Den Ouweland y colaboradores reportaron la existencia del primer homólogo para kexina en eucariotas superiores, esta proteína es el producto del gen *FUR* y fue denominada furina ( van Den Ouweland et al. , 1990; Fuller, Brake, & Thorner, 1989).

**Figura 2. Integrantes de la familia de las proteín-convertasas.** Comparación estructural de las nueve integrantes de la familia de las protein-convertasas; se observa que todas comparten una estructura común en la que existen dominios que se presentan en el resto de los miembros y conservan un orden similar a pesar de que varían en su tamaño molecular. Además cada protein-convertasa tiene diversos dominios característicos que determinan su distribución y función celular (Nabil G. Seidah & Prat, 2012)



El descubrimiento de esta nueva proteasa sólo fue el inicio para que otros grupos de investigación describieran la existencia de otras proteínas que estaban relacionadas tanto estructural como funcionalmente. Esta nueva familia de proteasas recibió el nombre de proteína convertasas, también llamadas prohormona convertasas o proproteína convertasas, y desde entonces hasta hoy se ha avanzado en el entendimiento de cómo estas enzimas participan en diversos procesos celulares (Rouillé et al., 1995; Nabil G. Seidah & Prat, 2012; Nabil G. Seidah et al., 2008, 2013).

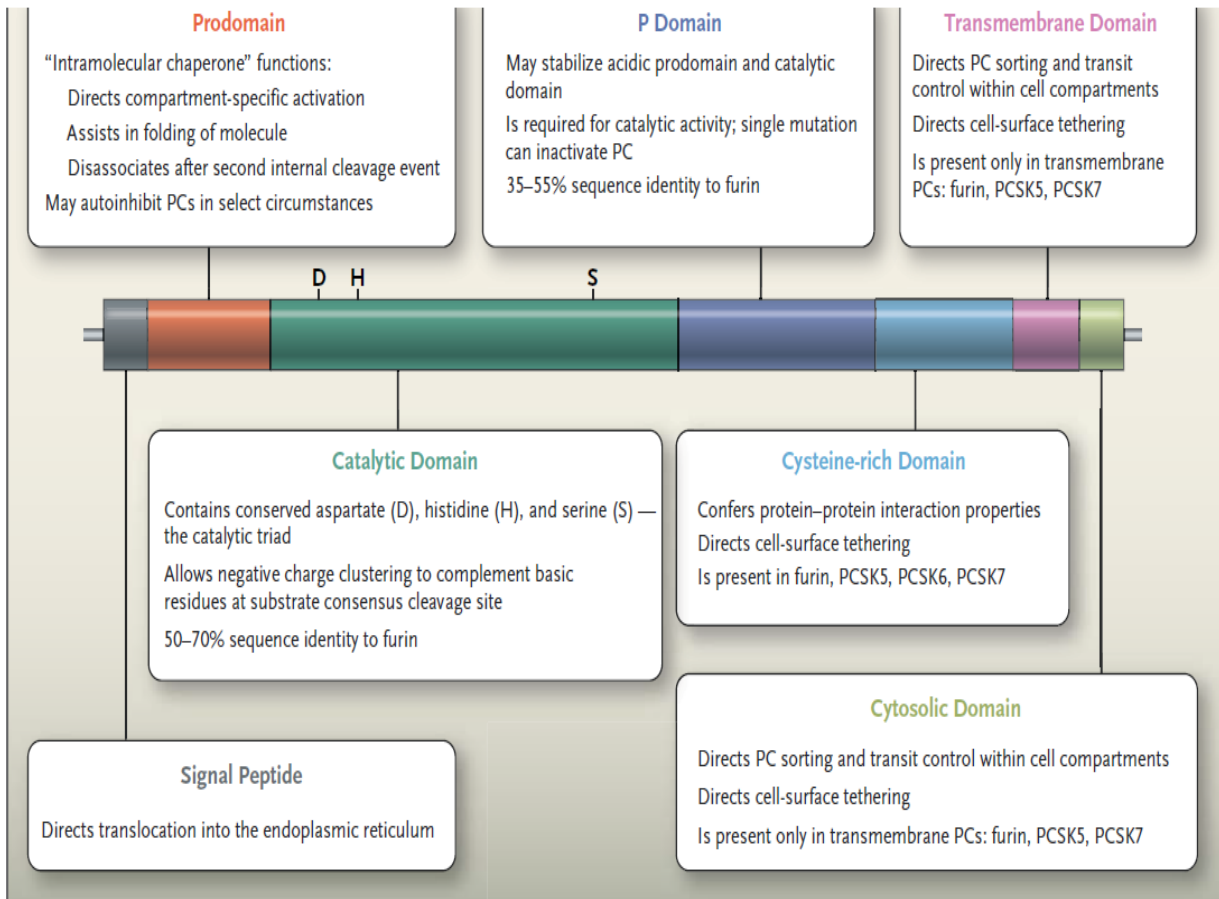
Las proteínas convertasas (PC's) son serina proteasas de la familia S8B que incluye a las proteasas eucariotas similares a subtilisinas y de las cuales se han descrito nueve miembros hasta el momento (Henrich et al., 2005; Polgár, 2005; Nabil G. Seidah & Prat, 2012).

Las primeras siete PC's incluyen a Furina (van Den Ouweland et al., 1990), PC1/3, PC2, PC4 (Nakayama Kim et al., 1992), PC5 A/B (Nakagawa et al., 1993), PC6/PACE y PC7. Estas proteasas cortan en sitios de aminoácidos (aa) básicos o dibásicos con la estructura (Arg/Lys)-X<sub>n</sub>-(Arg/Lys) donde X es cualquier aminoácido excepto cisteína y n corresponde a las posiciones 0, 2, 4, 6. (Nabil G. Seidah et al., 2013).

Además la estructura general de estas proteínas es muy similar y entre ellas comparten varios dominios conservados y con un grado de homología considerable (Artenstein & Opal, 2011; Siezen et al., 1994). En conjunto estas convertasas participan en un gran número de procesos celulares y están involucradas en el correcto desarrollo y funcionamiento de un organismo, y son relevantes en diversas patologías como el cáncer, enfermedades virales y bacterianas (Nabil G. Seidah & Prat, 2012)

La proteína SK1/SP1 fue descrita de forma posterior a las convertasas anteriores y su estructura presenta mayor divergencia de los otros integrantes de esta familia siendo más similar a las pirolisinas lo cual explica la diferencia en el reconocimiento de sustratos donde SK1/SP1 reconoce la secuencia Arg-X-(Val/Iso/Leu)-X siendo X cualquier aminoácido. Algunos de los sustratos más importantes de esta enzima son

**Figura 3. Características estructurales de las protein-convertasas.** Las protein-convertasas mantienen dominios en común. El prodominio, el dominio catalítico y el dominio P están presentes en todos los integrantes de la familia, y cada miembro presenta dominios característicos asociados a la función y localización subcelular. Además se resumen las funciones de cada uno de estos dominios (Artenstein & Opal, 2011)



los SREBP (*sterol response element binding protein*, proteína de unión de elementos de respuesta a esteroides) lo que indica un papel importante de esta proteasa en la regulación del metabolismo del colesterol (Nabil G Seidah & Prat, 2002).

PC9 fue descrita en 2003 por Seidah y colaboradores, al igual que SK1/SP1 tiene un grado menor de similitud con el resto de las proproteína convertasas siendo más similar a proteinasa k. La secuencia sobre la que actúa esta enzima es (Val/Iso/Leu)-Phe-Ala-Glu y el único sustrato conocido hasta el momento es el prodominio de esta misma enzima. Sin embargo se ha demostrado que una vez activa es capaz de interactuar con otras proteínas. Un caso muy importante es el del LDLR (*Low Density Lipoprotein Receptor*, Receptor para Lipoproteínas de Baja Densidad) el cual es regulado negativamente y degradado al interactuar con PC9, disminuyendo la

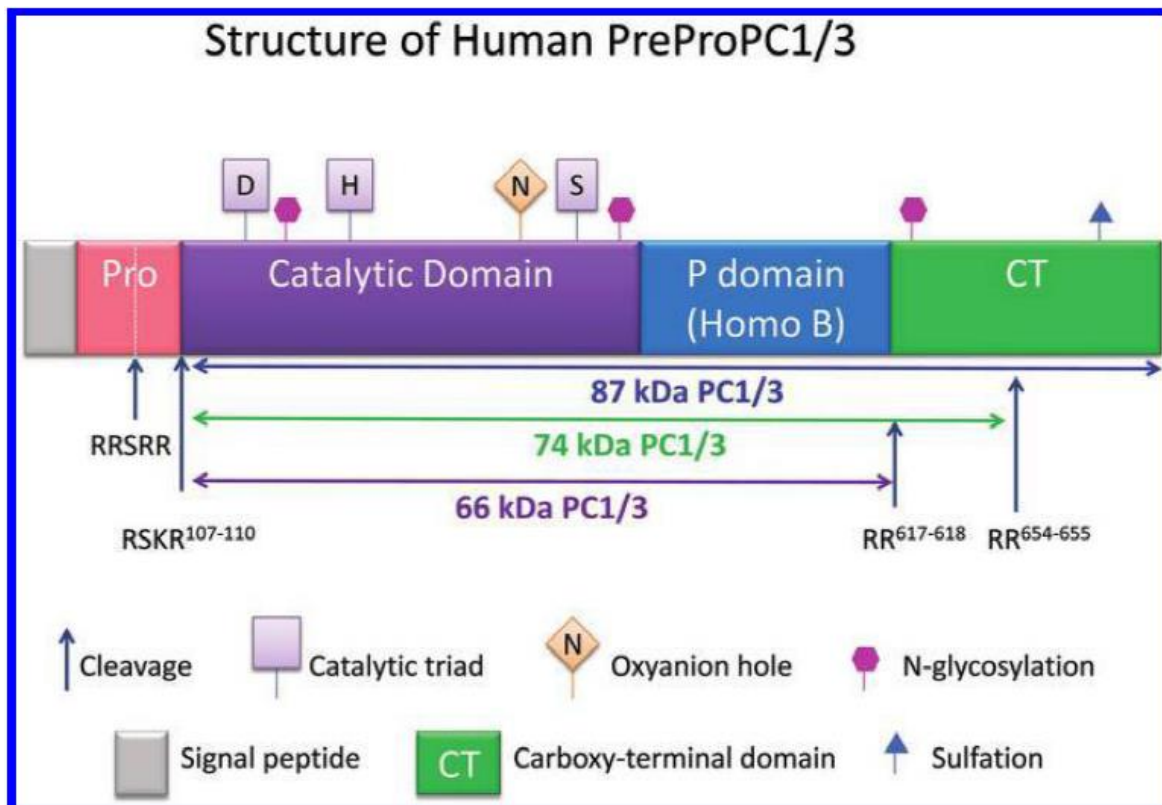
capacidad del individuo para recapturar colesterol. Un aumento de la actividad de PC9 se ha asociado con hipercolesterolemia y un riesgo elevado de padecer enfermedades cardiovasculares (Nabil G. Seidah et al., 2013).

### 3.1.1.1. Las convertasas PC1/3 y PC2

El procesamiento de péptidos en la mayoría de los sistemas nervioso y neuroendócrino está relacionada con la actividad de las enzimas PC1/3 y PC2 cuya presencia ha sido reportada en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis, los islotes pancreáticos, células del sistema inmune y muchos otros tejidos que participan en la secreción regulada de sustancias. (N G Seidah et al., 1991; Marcinkiewicz, et al., 1994; Vindrola et al., 1994)

PC1 y PC2 tienen un papel muy importante en la generación de péptidos derivados de precursores proteicos donde sus acciones opuestas, redundantes o complementarias son necesarias para la correcta generación de los productos finales (Nabil G. Seidah et al., 2013; Turpeinen, Ortutay, & Pesu, 2013)

**Figura 4. Estructura de preproPC1/3.** Dominios que conforman la estructura de PC1/3. Los cuadros indican la posición de los aminoácidos del sitio catalítico. Los círculos rosados corresponden a sitios de N-glicosilación. Las flechas indican los sitios de procesamiento autocatalítico y la secuencia donde sucede (Hoshino & Lindberg, 2012)



### **3.1.1.1.1. PC 1/3**

La proteína convertasa 1 también llamada PC1/3 es una integrante de la familia de las prohormona convertasas que se asocian al procesamiento de moléculas precursoras en tejidos neuroendócrinos de secreción regulada. (Smeekens et al., 1991).

PC1/3 presenta una amplia distribución en los tejidos nerviosos principalmente en aquellos que tienen un mayor potencial para el procesamiento de sustancias lo que justifica la presencia de PC 1/3 en estructuras donde se lleva a cabo el procesamiento de POMC y Proencefalina A (PENK-A) (Thomas et al., 1991; Hook et al., 1996; N G Seidah et al., 1991). La presencia de PC 1/3 en tejidos endócrinos tiene un papel relevante, por ejemplo PC 1/3 presente en células  $\beta$  de los islotes pancreáticos, en conjunto con PC2, participa en el procesamiento de la proinsulina (Marcinkiewicz et al., 1994). La presencia de esta enzima también se ha reportado en células del sistema inmune y se piensa que su expresión también cambia durante una respuesta inmunológica (Vindrola et al., 1994)

#### **3.1.1.1.1.1. Estructura y Biogénesis de PC 1/3**

En el humano el gen de PC 1/3 (*PSK1/NEC1*) está localizado en el brazo largo del cromosoma 15 en los segmentos 15-21 y en el ratón se localiza en el cromosoma 13 en la región c1-c3 (N G Seidah et al., 1991). En el humano este gen tiene una longitud de alrededor de 44 kbp el cual puede generar mRNA's de diferente longitud asociados a la existencia de sitios alternativos de poliadenilación (Lee et al., 1999). Además el RNA mensajero de PC 1/3 puede sufrir un proceso de corte y empalme alternativo el cual genera formas de RNA mensajero que pierden diferentes exones y al ser traducidos generan variantes de PC1, de las cuales se han sido descrito tres.

La cadena completa de PC 1/3 es un péptido de 753 aa la cual presenta la estructura característica de las primeras siete convertasas, pero no cuenta con un dominio rico en cisteína o un dominio de transmembrana. El péptido señal solo está presente en la forma pre-pro-PC 1/3 y es escindido rápidamente entre los residuos 28-29 de la cadena completa (Smeekens et al., 1991).

El prodominio de PC 1/3 está compuesto de 83 aa que es escindido rápidamente en el retículo endoplásmico (RE) o el preGolgi, y al igual que en otras convertasas



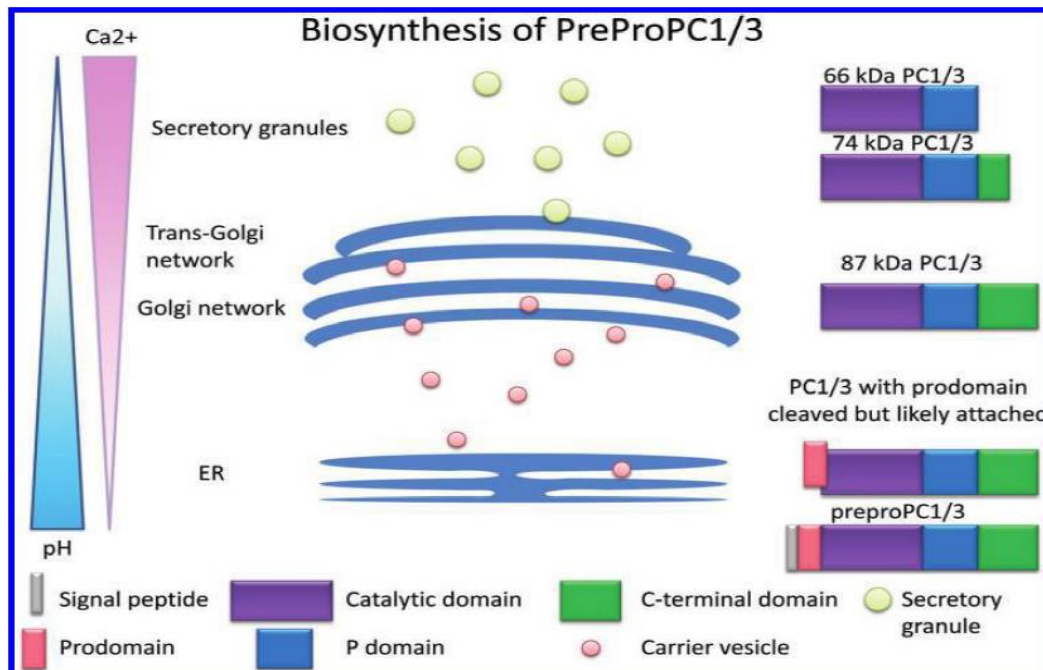
funciona como una chaperona intramolecular que favorece el correcto plegamiento de PC 1/3 al mismo tiempo que limita la activación de la enzima (Benjannet et al., 1993; Nabil G Seidah & Prat, 2002).

El dominio catalítico tiene una longitud de 292 aa, dentro del cual está presente la tríada catalítica Asp-His-Ser en las posiciones 140,181 y 355, respectivamente. Además en la posición 282 posee un residuo conservado de Asn el cual es importante para la actividad de esta enzima y de otras de las integrantes de esta familia. El dominio catalítico de PC 1/3 presenta una homología de 58%, 65% y 50% con PC2, furina y Kexina, respectivamente,(N G Seidah et al., 1991; Smeekens et al., 1991).

El extremo carboxilo terminal de PC1/3 contiene una secuencia anfipática comprendida entre los a.a. Asp-739 y Glu-751, esta secuencia está involucrada en el correcto direccionamiento a través de la vía secretoria(N G Seidah et al., 1991).

Además dentro de la estructura proteica de PC 1/3 existen tres sitios sensibles a glicosilación, doce secuencias dibásicas que pueden ser susceptibles a hidrólisis y otros sitios en los que pueden ocurrir fosforilaciones o sulfataciones (Smeekens et al., 1991).

**Figura 5. Biosíntesis y maduración de PC1/3.** Resumen del proceso de maduración de PC1/3 y de los lugares donde ocurre. En el lado izquierdo se representan la concentración de calcio y el pH. Al centro se observan los distintos compartimentos involucrados en la vía secretoria. A la derecha se esquematizan los distintas escisiones proteolíticas postraduccionales de PC1/3 (Hoshino & Lindberg, 2012)



En un inicio PC 1/3 también es sintetizada como un zimógeno, la forma pre-pro-PC 1/3 es un péptido de alrededor de 94 kDa que es transportado hacia el interior del RE en donde pierde la secuencia señal. También es en este sitio donde se lleva a cabo el plegamiento acompañado de un proceso primario de glicosilación que permite a la proteína transitar hacia los siguientes compartimientos del sistema de endomembranas. A nivel del RE y del aparato de Golgi se produce una rápida escisión autocatalítica del prodominio generando una forma de PC1/3 con un peso molecular de unos 87 kDa, la cual es enzimáticamente activa (Benjannet et al., 1993; Y. Zhou & Lindberg, 1993). Durante el tránsito por la vía secretoria, PC1/3 es escindida en su extremo carboxilo terminal lo que da lugar a las dos formas, una de 74 kDa y otra de 66 kDa que conservan su actividad catalítica. (Vindrola, 1994)

#### **3.1.1.1.2. Actividad Catalítica de PC 1/3**

PC 1/3 tiene la capacidad de hidrolizar enlaces dibásicos mostrando una predilección por el sitio dibásico Arg-Lys en las posiciones P2 y P1, respectivamente. Sin embargo, la presencia de otros aminoácidos que interactúan con el sitio catalítico de PC 1/3 también influye en la afinidad que esta enzima muestra por sus sustratos (Thomas et al., 1991).

El núcleo catalítico presenta la estructura típica para esta familia de enzimas, está constituido por siete hojas beta paralelas, una hoja beta antiparalela rodeado por cinco alfa hélices y dos alfa hélices más que se ubican en la periferia (Henrich et al., 2005).

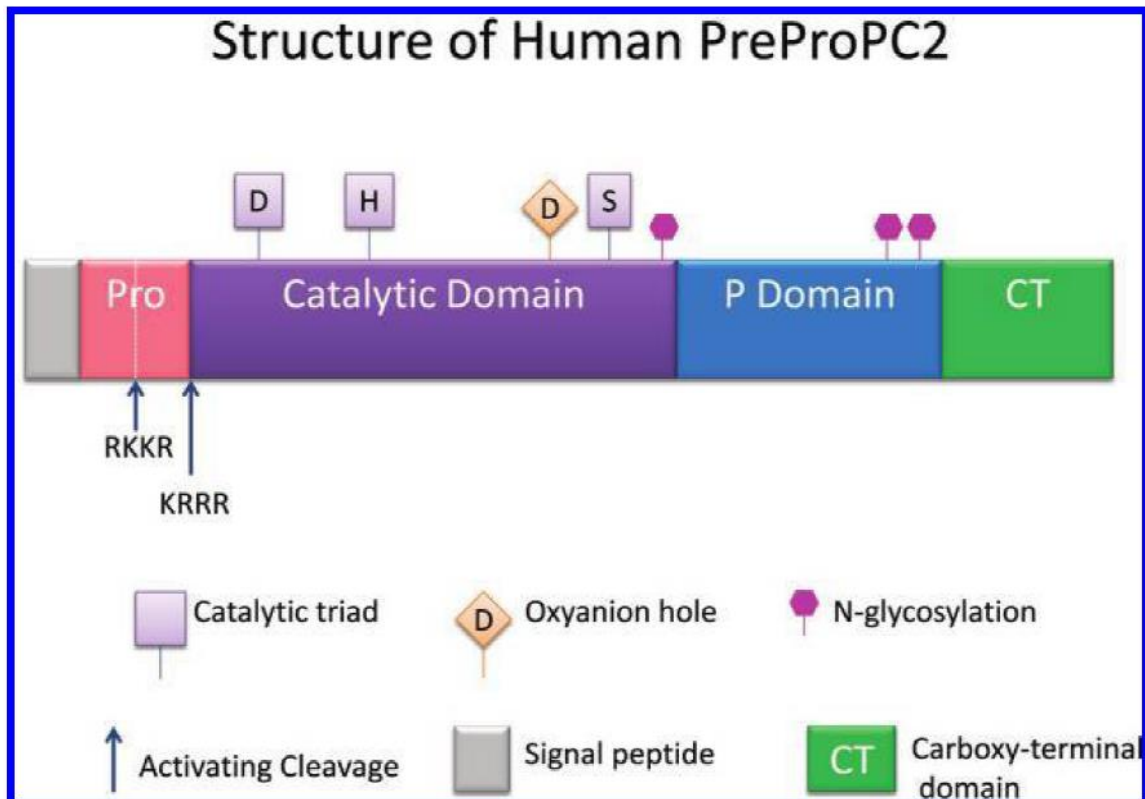
En general PC1 muestra una mayor tolerancia para sustituciones de aa en sus sustratos debido a una presencia menor de cargas negativas en los aa que conforman el sitio catalítico. Además, al igual que furina la presencia de aa con una carga positiva, principalmente en P4, parece influir positivamente en la afinidad de PC1/3 (Breslin et al., 1993; Johanning et al., 1998).

Dentro de la estructura de PC1/3 existen dos sitios de unión a calcio que favorecen la estabilidad de sitios con una gran carga negativa. La concentración óptima de calcio para la actividad de PC1/2 es de 2.5 mM además de requerir un pH ácido, de entre 5.5 a 6.5.(Artenstein & Opal, 2011; Siezen et al., 1994).

Al igual que otras serina-proteasas la actividad de PC1/3 puede ser inhibida por clorometilcetonas así como otros inhibidores con mayor selectividad para las PC's (Henrich et al., 2005; Y. Zhou & Lindberg, 1993). Sin embargo, la actividad de PC 1/3 también está regulada por un conjunto de proteínas conocidas como proSAAS las cuales tienen la capacidad de interactuar con el sitio catalítico de PC 1/3 bloqueando su actividad de forma transiente (Sayah et al., 2001). Dentro de los proSAAS existen sitios susceptibles a ser hidrolizados por PC 1/3 que determinan la disociación del complejo y permiten que PC 1/3 recupere su actividad (Pan et al., 2005).

Para el procesamiento peptídico en diversos tejidos, se ha demostrado que la actividad de PC1/3 es independiente a la de PC2. Sin embargo la presencia de ambas proteínas resulta benéfico para la generación de los péptidos activos, esto indica que PC1/3 y PC2 pueden actuar de forma coordinada pero son independientes (Pan et al., 2005).

**Figura 6. Estructura de preproPC2.** Representación de los dominios que conforman la estructura de PC2 incluyendo el péptido señal. Los aminoácidos que corresponden al sitio catalítico están representados dentro de los cuadros. Los hexágonos rosados indican sitios de N-glicosilación. Las Flechas indican los sitios de autoprosesamiento catalítico y las secuencias de aminoácidos en las que sucede. (Hoshino & Lindberg, 2012)



### **3.1.1.1.2. PC2**

Al igual que PC 1/3 la proteína convertasa 2 (PC2) es una enzima cuya presencia se ha descrito principalmente en tejidos nervioso y neuroendócrino; y en conjunto con PC 1/3 participa en el procesamiento una gran cantidad de precursores proteicos (Nabil G. Seidah et al., 2013).

La presencia de PC2 se ha observado en melanotrofos del lóbulo intermedio de la hipófisis, la corteza cerebral, el tálamo, el hipocampo y otras estructuras del sistema nervioso central y su papel en el procesamiento de péptidos como PENK-A, POMC y PNPY se ha estudiado bastante (Hook et al., 1996; N G Seidah et al., 1991).

#### **3.1.1.1.2 .1. Estructura y Biogénesis de PC2**

En humanos el gen de PC2 (*PCSK2/NEC2*) se encuentra en el brazo corto del cromosoma 20 en la banda p11-2, mientras que en el ratón está localizado en el cromosoma 2 en los segmentos 2F3-2H2. En el humano el gen de PC2 tiene una longitud mayor a 250 kbp, dentro de ésta se distinguen 12 exones y 14 intrones, los cuales a través de procesos de corte y empalme alternativo dan lugar a las tres variantes de esta proteína (N G Seidah et al., 1991).

La forma completa de PC2 consiste en un polipéptido de 638 aa, su estructura es más similar a PC1/3, debido a que en PC2 no existe un dominio de membrana o un dominio rico en cisteína. Al igual que otras proteínas, PC2 es sintetizada como un precursor además de incluir un péptido señal de 24 aa. Como sucede en PC1/3 la secuencia señal también es escindida de la forma pre-pro-PC2 después de que ésta ingresa al RE. Sin embargo la maduración de PC2 ocurre de forma más lenta que la de PC1/3 (Benjannet et al., 1993; N G Seidah et al., 1990).

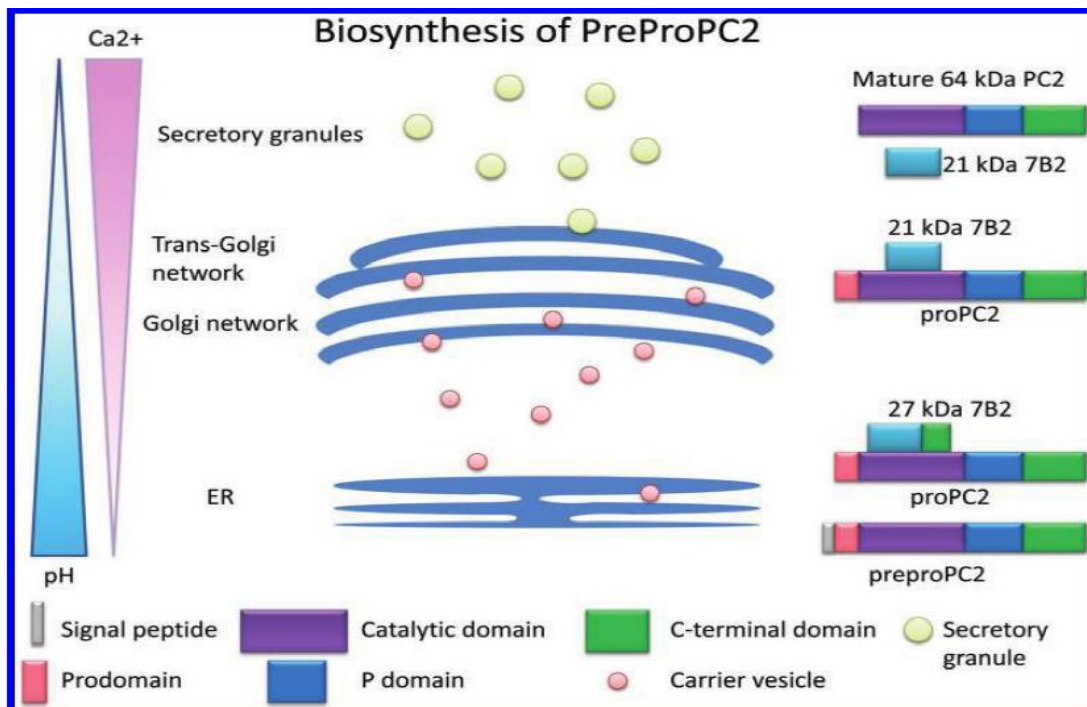
El prodominio de PC2 tiene una longitud de 84 aa y también cumple con la función de una chaperona intramolecular que favorece la correcta adquisición de la estructura terciaria de PC2, además de tener un papel inhibitorio sobre la enzima. Como se ha reportado en otras proteína convertasas la escisión del prodominio de PC2 es realizada de forma autocatalítica (Benjannet et al., 1993; N G Seidah et al., 1990)

El dominio catalítico de PC2 está compuesto por 282 aa, éste presenta una marcada homología con el dominio catalítico de otras convertasas, kexina y subtilisinas. En las posiciones 167, 208 y 389 se encuentran presentes los aminoácidos de la triada catalítica Asp-His-Ser. A diferencia de otras PC's esta enzima presenta un residuo Asp en la posición 310 que sustituye al residuo conservado de Asn. Esta modificación se justifica debido a las condiciones ácidas del microambiente en las que PC2 procesa sus sustratos en donde este residuo de Asp ayuda a estabilizar el sitio catalítico (N G Seidah et al., 1991; Smeekens & Steiner, 1990).

El extremo carboxilo de PC2 también presenta una secuencia anfipática, en los aa 616-634 en el ratón, la cual es necesaria para el tránsito de PC2 a través de la vía secretoria (N G Seidah et al., 1991).

Al igual que PC1/3, dentro de la estructura de PC2 existen tres sitios consenso para N-glicosilación pero además PC2 presenta una región rica en Ser/Trh en la cual pueden ocurrir O-glicosilaciones y se relaciona con la existencia de perfiles de glicosilación más complejos, lo cual concuerda con lo reportado por Benjannet para

**Figura 7. Biosíntesis y maduración de PC2.** Resumen del paso de PC2 a través de la vía secretoria. En el lado derecho se observa una representación de la cadena peptídica y de los cortes que ésta sufre. En el centro se representan los diversos organelos de la vía secretoria en donde sucede el procesamiento postraduccional. En el lado derecho se muestra las variaciones en la concentración de  $Ca^{2+}$  y del pH a lo largo de la vía secretoria (Hoshino & Lindberg, 2012)



explicar la variación en el peso molecular de los péptidos derivados de PC2 (Benjannet et al., 1993; Smeekens & Steiner, 1990)

El proceso de maduración de PC2 inicia en el RE, sin embargo éste no se completa hasta llegar a los gránulos secretorios. El precursor de PC2 es un péptido de unos 72 kDa el cual es escindido autocatalíticamente en su prodominio para formar un nuevo péptido de 64 kDa que corresponde a la forma activa de PC2. A diferencia del resto de las convertasas la correcta maduración de PC2 requiere de la participación de una proteína chaperona adicional conocida como 7B2 (Seidah et al., 1982). Esta chaperona tiene una distribución que coincide con la expresión de PC2, y se ha demostrado que interactúa directamente con la convertasa siendo necesaria para el plegamiento y el tránsito de PC2 además de funcionar como un inhibidor endógeno, homólogo a las proSAAS de PC1/3, que previene la activación prematura de PC2 (Pan et al., 2005). La importancia de 7B2 para la correcta activación de PC2 se ha estudiado en modelos animales y personas deficientes de 7B2, en estos organismos la actividad catalítica de PC2 se ve severamente reducida (Rehfeld, Lindberg, & Friis-Hansen, 2002; Vishnuvardhan, Connolly, Cain, & Beinfeld, 2000; Westphal et al., 1999).

#### **3.1.1.1.2.2. Actividad Catalítica de PC2**

El núcleo catalítico de PC2 cumple con las características del modelo común para las subtilasas eucariotas, resaltando la sustitución del residuo conservado de Asn por Asp que favorece el mantenimiento de la actividad de PC2 en sitios con un pH cercano a cinco (Henrich et al., 2005).

Al igual que PC1/3 la afinidad de PC2 es mayor hacia sitios de aa dibásicos con la secuencia Lys-Arg, aunque PC2 parece ser más sensible hacia las sustituciones dentro del sitio de reconocimiento. La existencia de residuos de aa básicos en las posiciones P4, P6 y P8 del sustrato tiene un efecto positivo en la actividad de PC2. Los sustratos de alta afinidad para PC2 presentan aa alifáticos en las posiciones P1' y P2' también es común encontrar residuos de Prolina en estos sitios. Caso contrario a lo que ocurre en las posiciones P2, P3 y P4 donde la presencia de Prolina es poco frecuente y se asocia con péptidos de baja afinidad. La presencia de residuos de aa ácidos es muy poco frecuente, pero es tolerada en las posiciones P3 y P1'. Como es

común para muchas PC's, hasta hoy no se conocen sustratos con cisteína dentro de la secuencia peptídica que sean reconocidos por la enzima (Pan et al., 2006).

La actividad de PC2 también muestra dependencia del ión calcio, pero la concentración necesaria para esta enzima es mayor a la requerida por las otras integrantes de la familia de convertasas. Para alcanzar su actividad óptima PC2 requiere una concentración de calcio de 10 mM y un pH de entre 5.5 y 6.0 (Artenstein & Opal, 2011).

También resulta importante destacar que a diferencia de furina y PC1, la afinidad de PC2 es independiente de la longitud del péptido; así como la capacidad de PC2 para cortar sitios monobásicos cuando la concentración del sustrato es elevada, sin embargo este proceso se realiza muy lentamente (Johanning et al., 1998).

La actividad de PC2 también presenta sensibilidad a los inhibidores de las serina proteasas y la mayoría de los inhibidores de las prohormona convertasas (Henrich et al., 2005). La activación de PC2 está regulada de forma endógena por la interacción con la chaperona 7B2 la cual se une a PC2 bloqueando su sitio catalítico (Lindberg et al., 1995). Para el desplazamiento de 7B2 se requiere que éste sea escindido por la proteasa en un sitio conservado Lys-Lys, este proceso sucede muy lentamente por lo que PC2 se mantiene en su estado inactivo hasta que alcanza los sitios óptimos para su actividad catalítica (Pan et al., 2006).

### **3.1.1.2. Furina**

Furina es una enzima que presenta una distribución ubicua en eucariotas y tiene una gran importancia para el procesamiento proteolítico de diferentes moléculas peptídicas que son sintetizadas de forma constitutiva en una célula, aunque diversos estudios han demostrado que furina también tiene la capacidad de procesar péptidos de secreción regulada (Breslin et al., 1993).

Esta enzima fue la primera subtilasa en eucariotes superiores en ser descrita (van Den Ouweland et al., 1990) y gracias a diversos estudios realizados en esta enzima se ha logrado comprender mejor la naturaleza de las primeras siete convertasas (Roebroek, Creemers, Ayoubi, & Van de Ven, 1994)..

### 3.1.1.2.1. Estructura y biogénesis de furina

Como la gran mayoría de las convertasas, en los humanos el gen de furina (*FUR*) se localiza en el cromosoma 15 dentro del brazo largo en la banda 26.1, en el ratón el gen *FUR* se localiza en el cromosoma 7 en la región D1-E2. La longitud del gen de furina en el humano abarca 14.8 kbp, dentro de su secuencia este gen presenta 16 intrones y 14 exones.

La cadena peptídica completa de furina tiene una extensión de 794 aa. Furina muestra los dominios característicos de las convertasas, además de un dominio rico en cisteína y un dominio transmembranal. Originalmente esta proteína es sintetizada en su forma un pre-pro-furina pero pierde la secuencia señal rápidamente después de ingresar al RE.

La escisión del pro-péptido también sucede en el RE de forma autocatalítica en la secuencia Lys-Arg-Arg-Thr-Lys-Arg. Una vez hidrolizado el prodominio, éste se mantiene unido a la proteína hasta que se encuentra en un microambiente en el cual las concentraciones de calcio y el pH favorecen su completa escisión y disociación, pasando con ello al estado activado de furina.

El núcleo catalítico de furina presenta los aa de la triada catalítica Asp-His-Ser en las posiciones 45, 87 y 261, el residuo conservado de Asn se encuentra en la posición 188. El alineamiento de los dominios catalíticos de furina y kexina muestran una posición conservada de estos aa (van de Ven et al., 1990).

La zona que presenta más variación con respecto a otras convertasas es el extremo carboxilo terminal, en furina esta región contiene un dominio transmembranal y una zona rica en cisteína, lo cual la hace estructuralmente similar al extremo carboxilo de PC5B y PC7 (Zhou, Webb, Zhu, & Steiner, 1999).

Al igual que PC2 y PC1/3, dentro de la estructura proteica de furina se encuentran tres sitios de N-glicosilación, sitios dibásicos y otras zonas sensibles a modificaciones postraduccionales que cambian la estructura de furina.

La molécula intacta de furina tiene un peso de alrededor de 110 kDa, después de su síntesis es transportada hacia el RE donde pierde el péptido señal y se lleva a cabo el



clivaje del prodominio para generar un péptido de unos 98 kDa. La furina de 98 kDa corresponde a la forma activa de esta enzima; sin embargo, no posee actividad catalítica hasta que alcanza el TGN que es donde se disocia el complejo furina-prodominio. Furina es una proteína integral de membrana que actúa principalmente en el TGN y recircula continuamente desde la membrana. Diversos estudios indican que la forma transmembranal de furina es susceptible a un proceso de derivación de ectodominios que genera una forma soluble de furina la cual presenta actividad catalítica en el espacio extracelular.

### **3.1.1.2.2. Actividad catalítica de furina**

El núcleo de furina se arregla con la estructura consensual para las siete primeras convertasas. La presencia de residuos básicos en las posiciones P4 y P1 es una de las características de la mayoría de los sustratos de furina, pero además la presencia de residuos con carga positiva en las posiciones P3, P5 y P6 favorecen la afinidad de furina por sus sustratos. La secuencia Arg-x-Lys/Arg-Arg es considerada el sitio consenso para la endoproteólisis mediada por furina, esto debido a que la composición de los subsitios de furina presentan características que permiten que la interacción con los péptidos que presentan este motivo se vea favorecida (Hosaka et al., 1991; Siezen et al., 1994).

A diferencia de PC1/3 y PC2, Furina es una peptidasa que mantiene su actividad catalítica en un amplio rango de pH de 5 a 8, el requerimiento de calcio para esta enzima es de 1 a 2 mM. Aunque puede conservar hasta un cincuenta por ciento de su actividad catalítica en un pH de 8.5 o con una concentración de 0.2 mM de calcio (Siezen et al., 1994)

De forma endógena el inhibidor serpina PI8 tiene la capacidad de ingresar en la vía secretoria e interactuar de forma estable con furina anulando su actividad. Furina también presenta sensibilidad a los inhibidores de serina proteasa, así como a diversos inhibidores para las proproteína convertasas teniendo una afinidad más marcada para péptidos de L-D- Poliarginina (Henrich et al., 2005).

### **3.1.2. Moléculas o proteínas precursoras de encefalinas**

Existen dos principales encefalinas la Leu-encefalina y la Met-encefalina, ambas son péptidos formados por cinco aminoácidos que conservan la secuencia Tyr-Gly-Gly-Phe y solo cambian en el último residuo en el extremo carboxilo que puede ser Metionina (Met) o Leucina (Leu). Sin embargo, existen además dos formas de la met-encefalina uno de ellos es la met-encefalina-Arg-Phe también conocido como heptapéptido y el otro es la met-encefalina-Arg-Gly-Leu que también es llamado octapéptido

Las encefalinas son sintetizadas como parte de proteínas de mayor tamaño, estas proteínas pueden contener una a más copias de alguna de las encefalinas y la liberación de los péptidos activos está regulado por mecanismo de proteólisis dirigida (Hook et al., 1996).

Actualmente se conocen tres moléculas precursoras de encefalinas. Las cuales están conformados por la prodinorfina cuya principal característica es que solo contiene moléculas de Leu-encefalina, de la cual existen tres pentapéptidos dentro de la secuencia completa de la prodinorfina. También tenemos a la proopiomelanocortina, la cual es una polihormona sintetizada en la hipófisis a partir de la cual se genera una gran número de hormonas de tipo peptídico además de contener una molécula de Met-encefalina cerca de su extremo carboxilo terminal, la cual es proceda como parte de la B endorfina. Finalmente tenemos a la proencefalina (PENK), esta proteína presenta al menos una molécula de los cuatro tipos de encefalinas conocidas y puede ser procesada para generar una gran cantidad de péptidos con actividad opioide o sin ella.

#### **3.1.2.1. Proencefalina**

Esta molécula es uno de los principales precursores opioides cuya presencia se ha descrito en un gran número de organismos eucariotas. En la rata el gen de *PENK* se localiza en el cromosoma cinco y está compuesto por tres exones. En el humano el gen de *PENK* se encuentra en el cromosoma 8 localizado dentro de la banda 12.1 con una longitud aproximada de 10 kbp y cuenta con cuatro exones. Al ser transcrito, este gen produce un mRNA primario que sufre un proceso de corte y empalme alternativo para generar un mRNA maduro de alrededor de 1.4 kbp.

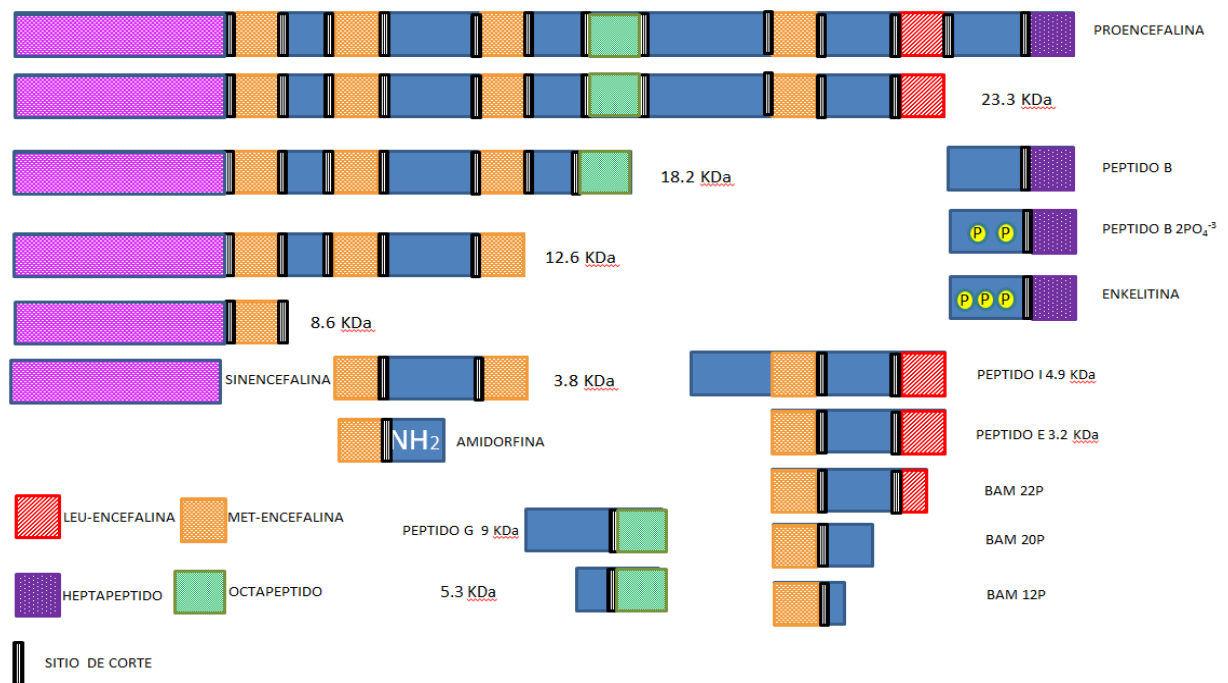
El primer producto obtenido como resultado de la traducción del mRNA de PENK es la forma pre-pro-PENK. Esta molécula tiene una longitud de 267 aa e incluye la secuencia señal que se localiza en los aminoácidos 1-24, la cual es determinante para el ingreso de la misma a la vía secretoria (Böttger & Spruce, 1995).

La PENK que se sintetiza en la vía secretoria es una cadena peptídica de 253 aa. Dentro de la estructura primaria de PENK-A existen cuatro secuencias de met-enkefalina, una de Leu-enkefalina, una molécula del octapéptido, así como una molécula del heptapéptido ubicada en el extremo carboxilo terminal.

La región amino terminal de PENK contiene a la sinencefalina, una molécula peptídica con una longitud de 72 aa que es propia de la PENK, debido a que no existe en los otros precursores opioides, y que no posee actividad opioide (Liston et al., 1983).

En la secuencia primaria de PENK, las moléculas opioides y la sinencefalina se encuentran flanqueadas por secuencias de aa dibásicos; los cuales son necesarios

**Figura 8. Péptidos derivados de PENK.** Diagrama esquemático de los diferentes péptidos que se originan de la molécula precursora de proencefalina por modificaciones postraduccionales. Los cuadros de colores corresponden a las diferentes encefalinas. El rectángulo rosado corresponde a la molécula de sinencefalina, las barras verticales negras dentro de la cadena señalan las zonas dibásicas susceptibles a la escisión proteolítica (Rossier et al., 1980)



para la hidrólisis de los enlaces peptídicos catalizada por las convertasas PC2 y PC1/3 que permiten la liberación de dichos péptidos. (Costa et al., 1987).

#### **3.1.2.1.1. Procesamiento de PENK por las PC´s**

El papel de las convertasas PC1/3 y PC2 en el procesamiento de PENK ha sido tema de interés desde que estas enzimas fueron descritas como un elemento común para la generación de diversas hormonas peptídicas en tejidos nervioso y neuroendócrinos (N G Seidah et al., 1991; Thomas et al., 1991).

Gracias a la creación de modelos silenciados para alguna de estas convertasas ahora se sabe que la actividad de estas enzimas tiene un papel común en el procesamiento de los precursores opioides (Vindrola et al., 1998; Pan et al., 2005, 2006; Peinado et al., 2003).

Ahora se sabe que la molécula de PENK es uno de los sustratos que es procesado por PC1/3, PC2 y en menor grado por furina, y el procesamiento completo de esta molécula sólo se alcanza en células de secreción regulada. Cada una de estas proteasas puede actuar sobre la molécula de PENK, sin embargo la intervención de diversos factores conlleva a la generación de algunos productos particulares para cada una de las enzimas (Breslin et al., 1993; Johanning et al., 1998; Lu, Liu, Li, Woods, & Hook, 2012)

Mediante transfecciones en la línea celular GH4C1, Breslin y colaboradores demostraron que PC1/3, PC2 y furina tienen la capacidad de actuar sobre PENK para generar diversos péptidos opioides y que cada enzima produce un grupo particular de productos. PC1/3 produce péptidos de tamaño intermedio de entre 3-10 kDa, la mayor reactividad observada en este estudio fue para el péptido de 5.3 kDa, el péptido B, así como Leu-encefalina libre. Para el caso de PC2, los péptidos derivados de PENK presentan una mayor diversidad además de que esta enzima es capaz de generar formas libres de Met-encefalina, Leu-encefalina, heptapéptido y el octapéptido. El procesamiento por furina produce una menor cantidad de productos, los cuales en general muestran pesos moleculares intermedios siendo el péptido de 5.3 kDa, el péptido B y una forma de 18 kDa sus principales productos. (Breslin et al., 1993).

La diferencia entre los perfiles de péptidos derivados de PENK generados por cada una de las convertasas está asociada con la forma en que la estructura, el tamaño y las propiedades de la secuencia peptídica actúan favoreciendo o disminuyendo el procesamiento por cada una de estas enzimas (Johanning et al., 1998).

Fuera del sistema nervioso también existe procesamiento de PENK. Este se ha reportado en diferentes tejidos y líneas celulares sin un origen neuronal.

En 1994 Vindrola y colaboradores reportaron la presencia de PENK en macrófagos y neutrófilos de rata. En este estudio se observó que los péptidos se procesan de forma más eficaz en células maduras o activadas, los productos derivados de PENK en estas células muestran pesos moleculares de 32, 28, 21 y 18 kDa y también se encontró la presencia de un péptido de 8.4 kDa en el medio de cultivo. La expresión PC1/3 y PC2 en estas células también fue positiva encontrando formas de 75, 71 y 70 kDa para PC2 y la forma 68 kDa para PC1, esta última molécula se asoció a una mayor producción de derivados de PENK (Vindrola et al., 1994).

La expresión y el procesamiento de PENK también se ha observado en diversos tipos de cáncer, aunque el papel de esta molécula parece estar determinado por diversos factores y aún no es posible definir el papel de PENK en este padecimiento. Brar y Lowry observaron que la expresión de PC1/3 es común en líneas celulares de cáncer de mama que procesan PENK además de que la co-expresión con PC2 permite un mayor procesamiento total, lo cual es un indicio que en células tumorales el procesamiento de esta molécula sucede a través de las dos proteína convertasas mencionadas (B. K. Brar & Lowry, 1999).

#### **3.1.2.1.2. Liberación de sinencefalina**

La sinencefalina es una secuencia peptídica que únicamente se encuentra en la PENK y corresponde a la región amino de este precursor que ha perdido el péptido señal. (Liston et al., 1983).

La longitud de la sinencefalina es de 73 aa, inicia después del péptido señal y termina en un sitio dibásico que la separa de la primera met-enkefalina. Dentro de la secuencia existen siete sitios monobásicos los cuales pueden ser susceptibles a proteólisis para generar péptidos más pequeños. La región ubicada en el extremo carboxilo terminal

de la sinencefalina contiene a los aa Glu-Glu-Ser-His-Leu-Leu-Ala, es una zona que se mantiene en la forma completa de la sinencefalina y los péptidos que derivan de ella; debido a esto se la ha utilizado para la creación de anticuerpos específicos (Stell et al., 1990).

A pesar de que en un principio se pensó que la molécula de sinencefalina no sufría ninguna modificación y era secretada de forma íntegra, diversos estudios han demostrado que esta molécula puede ser procesada hacia péptidos más pequeños y secretada hacia el espacio extracelular.

Vindrola y colaboradores mostraron que en células polimorfonucleares se producen péptidos de bajo peso molecular los cuales no presentan reactividad a opioides, y pueden ser reconocidos en el medio por antisueros reactivos para sinencefalina (Vindrola et al., 1990).

Unos años más tarde, el análisis de los péptidos derivados de sinencefalina en poblaciones de células mononucleares provenientes de la médula ósea o del bazo de ratas sometidas a estímulos estresantes, demostró que la sinencefalina es liberada y procesada con mayor eficacia en los macrófagos que se encuentran en órganos linfoides secundarios (bazo) lo que indica que la capacidad para procesar y liberar este péptido es característica de células que han alcanzado su completa maduración (Saravia et al., 1993).

También existe liberación de sinencefalina en sistema nervioso central, sin embargo, sólo ocurre bajo determinadas circunstancias. En 1993 el trabajo de Rodríguez Vida reportó que el procesamiento de sinencefalina hacia péptidos de menor peso molecular ocurre durante el desarrollo embrionario, ya que los organismos adultos presentan una clara dominancia de la forma completa de la sinencefalina de 8.5 kDa secretada hacia el espacio extracelular (Rodríguez Vida et al., 1994).

A pesar de que aún no se conoce de forma clara los efectos o los mecanismos de acción de los péptidos derivados de la porción no opioide de la PENK, se piensa que éstos juegan un papel importante durante procesos como el desarrollo embrionario, la inflamación y la proliferación de diversos tipos celulares (Trejo, Asai, Matamoros-Trejo, Linares, & Agustín, 2000).

## **3.2. Antecedentes específicos**

### **3.2.1. Cepa CHO**

El uso del hámster chino como un biomodelo de laboratorio comenzó a principios de los años veinte debido a su utilidad para el estudio de infecciones producidas por neumococos y leishmania. Esto conllevó a la domesticación del hámster chino para su uso en el laboratorio.

Además, se aislaron diversos tipos celulares de estos animales con la finalidad de generar líneas celulares para su uso en el laboratorio. En 1957 el Dr. Theodore T. Puck logró generar una línea para cultivo celular que fue obtenida de células de ovario de una hembra de hámster chino, y ésta puede ser considerada la antecesora de las líneas celulares CHO.

Debido a la cruce endogámica, los hámsters comenzaron a presentar diversas enfermedades genéticas y alteraciones en el número de cromosomas, lo que provocó que muchas de las líneas celulares que se aislaron de estos animales presentaran un genotipo hemizigoto para diversos genes. Cuando alguna de estas células sufría una mutación en el alelo restante se producía una línea celular que presentaba deficiencia para generar alguna enzima.

En 1980 Urlaub y colaboradores aislaron una cepa que presentaba una deficiencia para la enzima DHFR (Dihidrofolato reductasa), la cual está encargada de la producción de tetrahidrofolato a partir de ácido fólico, esta molécula tiene un papel muy importante para la síntesis *de novo* de bases nitrogenadas. Esta cepa se distingue por ser autótrofa para glicina, hipoxantina y timidina por lo que su manutención requiere de medios especiales que proporcionen estas moléculas (Urlaub & Chasin, 1980).

Tomando ventaja de las cepas deficientes para la DHFR se diseñaron técnicas para la transfección estable de genes de interés acoplada a la resustitución del gen de la DHFR. Estas técnicas resultaron muy útiles debido a que la expresión de la DHFR también puede ser modulada por la adición de inhibidores específicos, como el MTX (metrotexato), lo cual aumenta la expresión de la DHFR y con ello aumenta la expresión del gen de interés.

Actualmente las líneas de células CHO deficientes en DHFR, como la CHO-G44, son especialmente útiles para la producción en masa de proteínas recombinantes (Jayapal, Wlaschin, Hu, & Yap, 2007).

### **3.2.1.1. La cepa CHO-DL1**

Con la finalidad de estudiar las modificaciones postraduccionales a las que está sujeta la PENK, en 1991 el grupo de la Dra. Iris Lindberg creó una cepa que sobre-expresa el gen *PENK*.

La cepa que fue transfectada correspondía a la CHO-G44 la cual presenta una deficiencia para la síntesis de DHFR y por tanto puede ser co-transfectada con un gen de interés acoplado al gen recombinante de DHFR. Para obtener aquellas candidatas que presentaran una mayor expresión del gen de DHFR, y por tanto del de *PENK*, las células transfectadas se sometieron a un proceso de selección en un medio con baja concentración de SBF dializado (suero bovino fetal) que además contenía MTX, un inhibidor de la DHFR.

Este proceso de selección dio origen a la cepa denominada CHO-DL1 la cual genera grandes cantidades de *PENK* cuando es sometida a períodos de privación de suero. Esta ha sido utilizada en diversos trabajos debido a las ventajas que presenta respecto a otras líneas celulares (Lindberg et al.1991).

De forma posterior se observó que esta cepa libera al medio la molécula intacta de *PENK* y un péptido de 8.5 kDa, el cual se demostró, por estudios de secuenciación, que corresponde a la porción amino terminal de la molécula de *PENK* y podría ser secretado junto con la molécula intacta de *PENK* como un complejo (Acevo, 2014; Velazquez, 2003).

## **4. Planteamiento del problema**

El estudio de *PENK* y de los péptidos que pueden derivar de esta molécula ha sido tema de investigación durante mucho tiempo y gracias a diversos trabajos se ha logrado entender mejor como esta proteína se procesa para dar origen a los diversos péptidos con actividad opioide además de conocer las diferentes enzimas asociadas a su procesamiento postraduccionales.



Sin embargo, existe muy poca información sobre la liberación y el procesamiento de la porción amino terminal de PENK también conocida con sinencefalina que corresponde a los primeros 73 aminoácidos sin el péptido señal y que no tiene actividad opioide. (Liston et al., 1983; Stell et al., 1990). Diversos trabajos realizados han brindado información que indican que la molécula intacta de sinencefalina (8.5 kDa) puede ser procesada hacia péptidos de hasta 1 kDa (Vindrola et al., 1990; Rodriguez Vida et al., 1994; Trejo et al., 2000). La liberación de sinencefalina se ha observado en células nerviosas embrionarias y en células maduras del sistema inmune pero aún no se sabe acerca de las enzimas que intervienen en la generación de esta molécula de 8.5 kDa.

## **5. Hipótesis**

La existencia de un sitio dibásico al final de la sinencefalina es un indicador de que una proteína convertasa (PC1, PC2 o furina) puede actuar sobre dicho sitio para generar el péptido de 8,5 kDa derivado de PENK, el cual es liberado por las células CHO-DL1.

## **6. Objetivos**

### **6.1. Objetivo General**

Demostrar que la cepa CHO-DL1 expresa las proproteín convertasas PC1, PC2 o furina las cuales están involucradas en el procesamiento de PENK de rata hacia el péptido de 8.5 KDa.

### **6.2. Objetivos Particulares**

1. Investigar si las células CHO-DL1 presentan las diferentes formas de las proproteína convertasas PC1, PC2 y furina endógenas.
2. Realizar las transfecciones transitorias de los plásmidos que contienen los cDNA de las convertasas PC1, PC2 o furina, en la cepa CHO DL1.
3. Determinar los niveles de la molécula derivada de 8.5 kDa en el medio de secreción de las células transfectadas del objetivo 2.

## **7. Materiales y métodos**

### **7.1. Cultivo celular**

La cepa utilizada para los experimentos fue la CHO-DL1 donada por la Dra. Iris Lindberg. Estas células presentan una transfección estable para expresar el gen de PENK de rata acoplado a la expresión de DHFR inducible por MTX.

Las células utilizadas se tomaron de un vial mantenido en criopreservación, se sometieron a una descongelación rápida a 37°C y se resuspendieron en medio alfa-Medium suplementado con 10% de SBF, 2 mM de glutamina, 100 UI de penicilina y 100 ug de estreptomicina. Luego las células se centrifugaron durante 10 minutos para remover los restos del criopreservador así como de posibles células muertas.

El pellet obtenido se resuspendió en el medio antes mencionado y las células se cultivaron en un frasco T25 en incubador húmedo con 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C. Una vez que éstas alcanzaron una confluencia del 90 %, se realizó el subcultivo por tripsinización. Y las células se sembraron en frascos T25 o placas de 6 pozos, según el experimento a realizar posteriormente.

Para favorecer la expresión de PENK en la cepa CHO-DL1, se siguió el protocolo establecido por Lindberg en 1991; el cual consiste en realizar una rotación entre medios de cultivo con alto suero (alfa-Medium con 10% de SBF y una concentración de MTX de 50 nM) y medio con bajo SBF (medio IMDM con un 2% de SBF), por un tiempo de 48 hrs cada uno. Este procedimiento favorece la expresión de la DHFR y con ello la expresión del gen de interés acoplado al de esta enzima (Lindberg et al., 1991).

Para este procedimiento se espera a que el recipiente del cultivo alcance una confluencia del 80 %. Después se realizan las tres rotaciones de cada uno de los medios, como se menciona más arriba, y posteriormente se recuperan las células y el medio sobrenadante para ser analizados.

### **7.2. Obtención de los Extractos celulares**

Una vez terminadas las rotaciones de medios de cultivos, el medio IMDM-2% de SBF se retiró, se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C por 30 minutos y se almacenó en tubos de

policarbonato para el análisis de las moléculas de: PC1, PC2, furina, PENK y sus derivados.

Las células se lavaron tres veces con buffer de fosfatos salinos PBS (pH 7.4, NaCl 171 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.83mM, KCl 3.35 mM ) más CaCl<sub>2</sub> 2mM y se agregó la cantidad correspondiente de buffer RIPA, incubando durante cinco minutos en un contenedor con hielo. Las células se removieron mecánicamente con ayuda de un levantador de células, y se homogenizó en forma mecánica con la ayuda de agujas de diferente calibre. Luego los homogenatos se centrifugaron a 14,000 rpm 4°C durante 40 minutos, para obtener todo el material solubilizado en el buffer RIPA. Al término de la centrifugación el homogenato fue trasvasado hacia un nuevo tubo.

Los pellets, homogenatos y medios se mantuvieron almacenados a -20°C con la finalidad de evitar su degradación hasta su posterior uso.

### **7.3. Cuantificación de proteínas totales**

La determinación del contenido de proteínas de los extractos celulares y los medios se realizó utilizando la metodología descrita por Marion Bradford en 1976. Esta metodología es ampliamente utilizada y aprovecha la capacidad de reducirse del cobre cuando éste se asocia a residuos de asparagina en un medio ácido. Esta asociación provoca un cambio en la longitud de onda de refracción, la cual puede ser leída con una longitud de onda de 595 nm emitida por una lámpara de Tungsteno (Bradford, 1976).

Primero se creó una curva estándar a partir de soluciones de albúmina purificada de concentración conocida, y luego se graficaron los valores de densidad óptica obtenida para cada concentración de albúmina, con el programa Graphpad 6.0 para obtener una curva estándar DO/ug de proteína.

Esta curva permite calcular luego la cantidad de proteína presente en soluciones de concentración desconocida interpolando los valores de densidad óptica que éstas presentan.

#### **7.4. Western blot**

El western blot es la metodología utilizada en este trabajo de Tesis para el análisis de las proteínas de los extractos celulares y de los medios sobrenadantes, provenientes de las células CHO-DL1. Se siguieron los pasos utilizados anteriormente por Vindrola y col. en 1998.

Los geles de poliacrilamida son el resultado de la polimerización de la acrilamida y la bis-acrilamida. Variando la cantidad de ambas sustancias obtenemos geles de diferente tamaño de poro.

En la preparación del gel, la polimerización de los monómeros de acrilamida produce cadenas lineales, que al agregarle bis-acrilamida, da lugar a la formación de puntos de ramificación en el polímero, lo que permite la formación de una matriz tridimensional, la poliacrilamida. El agente iniciador de la polimerización es el radical persulfato de amonio que activa al tetrametil-etilenodiamina (TEMED), el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice.

En esta metodología de electroforesis se utilizó la modalidad que se lleva a cabo en presencia del detergente dodecilsulfato sódico (SDS). Se mezclaron las proteínas con el detergente aniónico SDS para mantener a las proteínas desnaturalizadas; además el SDS se une a las proteínas en proporción a su tamaño: 1.4 g SDS/g de proteína. De esta manera se forma un complejo SDS-proteína en la cual la carga de la proteína queda enmascarada, por lo que en esta modalidad de electroforesis, la separación de las proteínas se hace en función de su masa molecular. Además, se ocupa azul de bromofenol como colorante y que sirve de referencia para poder seguir el avance de las muestras durante la corrida.

Para montar la cámara de electroforesis se lavaron perfectamente las placas de vidrio y se prepararon primero el gel separador, que es un gel de poliacrilamida al 8.8%, al 12 % o al 15%, dependiendo del peso molecular de las proteínas de interés (Tris-HCl 1.5 M pH8.8, acrilamida al 8.8%, al 12% o al 15%, bis-acrilamida al 0.23%, SDS al 0.1%, persulfato de amonio al 10% y TEMED), inmediatamente después de haber agregado el gel separador, se le añadió una pequeña cantidad de butanol encima de éste. Una vez que polimeriza el gel se lavó con agua tridestilada para remover

totalmente el butanol, y se secó con un papel de filtro. Después se añadió el gel de empaquetamiento al 4% de poliacrilamida (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, acrilamida al 4%, bis-acrilamida al 0.21%, SDS al 0.1%, persulfato de amonio al 10% y TEMED). Una vez agregado el gel de empaquetamiento, y antes que polimerice se insertó el peine para poder formar los carriles donde se van a colocar las muestras. Después de la polimerización se retiraron los peines de los geles y se colocaron en una cámara de electroforesis, la cual se llenó con el buffer de corrida (glicina 0.19 M, Tris-HC 0.025 M y SDS al 0.1%), quedando listo para la aplicación de las muestras.

Para realizar la electroforesis, se tomó un volumen de muestra con 35 ug de proteínas que se diluyó previamente en buffer Laemmli 2X y se hirvió por 5 minutos, para agregar 40 µl de volumen final en cada carril del gel.

La electroforesis se corrió a un voltaje constante de 100 voltios (V) durante 2 horas; posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con un poro de 0.45 µm de diámetro, con una corriente constante de 190 amperios (A) y un voltaje de 140 V durante 90 minutos dentro de una solución de Tris-HCL 25mM, glicina 102mM y metanol al 20%.

Posteriormente las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora con buffer TBS, Tween al 0.1%, en agitación constante y a temperatura ambiente y después se incubaron con los primeros anticuerpos diluidos en la misma solución de bloqueo, durante toda la noche, con agitación constante y a 4 °C. Al día siguiente se realizaron cuatro lavados de 10 minutos cada uno, con buffer TBS y Tween al 0.1%. Después se incubaron durante 1 hora con el segundo anticuerpo diluido con la solución de bloqueo y luego se realizaron otros cuatro lavados. Finalmente las membranas de nitrocelulosa se expusieron al reactivo de color para fosfatasa alcalina. Los lavados, la incubación con el segundo anticuerpo y el revelado se hicieron con agitación constante y a temperatura ambiente. Para determinar el peso molecular de las proteínas se usaron marcadores de peso molecular de rango completo o de bajo rango.(Amersham, USA).

## 7.5. Anticuerpos

Anticuerpos Utilizados			
Anticuerpo	Dilución	Fuente	Región de reconocimiento
Dam1	1:500	Donado al laboratorio por el Dr. Osvaldo Vindrola	Extremo C-terminal de PC1/3, aa 714-726
Dam7	1:500	Donado al laboratorio por el Dr. Osvaldo Vindrola	Extremo N-terminal de PC1/3, aa 84-100
Pcsk1(J18)	1:200	Santa-Cruz biotechnology, inc	Dominio homo de PC1/3
NH2-PC2	1:500	Obtenido en el laboratorio de Bioquímica Celular	Región amino terminal de PC2
COOH-PC2	1:500	Donado por la Doctora Iris Lindberg	Region C-terminal de PC2
RS-22	1:1000	Donado por el Dr. Donald Steiner	Dirigido contra la molécula completa de PC2
HEPTA-SWARTZ	1:500	Donado al laboratorio por el Dr. Swartz	Heptapéptido de la PENK.
Dam5	1:1000	Donado al laboratorio por el Dr. Osvaldo Vindrola	8 aminoácidos finales de la porción C-terminal de la Synencefalina.

Anti-furina	1:300	Santa-Cruz biotechnology, inc	Residuo 146 y 374
Anti-Actina	1:400	Santa-Cruz biotechnology, inc.	Decapéptido N-terminal
2do anticuerpo FA-IgG anti- conejo	1:10000	Jackson Laboratories, inc.	Cadena ligera y pesada de IgG de conejo
2do anticuerpo FA-IgA , IgG, IgM anti-mouse	1:1000	Sigma-Aldrich laboratorios	Cadena ligera y pesada de IgA , IgG y IgM de ratón

## 7.6. Transfecciones transitorias de los plásmidos que contienen furina, PC1 o PC2

El uso de lípidos catiónicos para realizar la transferencia de ácidos nucleicos en células de mamífero es una técnica ampliamente utilizada, debido a la baja citotoxicidad, la alta eficiencia de la transferencia de los ácidos nucleicos y la posible aplicación en terapia génica. Los lípidos catiónicos han sido usados principalmente para la transfección transitoria de DNA plasmídico. El uso de esta técnica fue reportado desde 1987.

La interacción de la carga positiva de los lípidos catiónicos con la carga negativa del DNA resulta en una formación espontánea de un complejo denominado lipoplex. Este complejo, protege a los ácidos nucleicos de la digestión por DNAsas y facilita su captura por la célula, lo que permite el tráfico del ácido nucleico al núcleo, y por lo tanto la transferencia del transgen hacia el interior de la célula.

En esta transfección se utilizó el lípido catiónico Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen, CA USA); y se realizó sobre  $1.2 \times 10^6$  células CHO-DL1 al inicio de la tercera ronda en cada placa de 60 mm.

Las muestras de DNA plasmídico que se usaron son: el pcDNA™ 3.1(+) que tiene insertado el cDNA del gen *FUR* de humano, llamado en el laboratorio como hFUR; el pcDNA™ 3.1(+) que tiene insertado el cDNA del gen *PC1* de humano, el pcDNA™ 3.1(+) que tiene insertado el cDNA del gen *PC2* de ratón, y como control el pcDNA™ 3.1(+) vacío (sin inserto).

Primero se diluyeron 8 µg de cada muestra de DNA plasmídico en 0.5 ml de medio Opti-MEM® I (GIBCO® InVitrogen, CA, USA) y se mezcló suavemente. Después se diluyó la Lipofectamina™ 20 µl en 0.5ml de Opti-MEM® I, se mezcló suavemente e incubó durante 5 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se mezclaron las diluciones de DNA plasmídico y Lipofectamina™. Posteriormente se dejaron incubar por 20 minutos a temperatura ambiente para que se formen los complejos de DNA/Lipofectamina™ o lipoplex, los cuales se agregaron a cada una de las placas de 60 mm donde se encontraban las células CHO-DL1 previamente lavadas en Opti-MEM® I; se mezcló suavemente y se incubaron las células con los lipoplex a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y en atmósfera húmeda, durante 4 horas.

Finalmente se agregó alfa Medium completo en cada una de las placas y se incubaron en las mismas condiciones por un tiempo de 48 horas. Al término de este tiempo, se cambió el alfa Medium por el IMDM-2% SBF y se dejó incubando por 24 horas para obtener la cantidad suficiente de PENK y su péptido derivado en el medio de cultivo. Después se recuperó el medio sobrenadante para su análisis por western blot.

### **7.7. Densitometría**

Se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas por los diferentes anticuerpos con el método de western blot. Este se llevó a cabo con el programa ImageJ, mediante el cual se obtuvieron unidades de densidad óptica (DO) y se compararon los resultados de los anticuerpos usados para PC1, PC2, PENK, y Furina relacionándolos con los valores de Actina para cada muestra.

### **7.8. Análisis de datos**

Para medir la cantidad de procesamiento proteico se analizó la densidad óptica de las bandas que correspondan a las proteínas o fracciones proteicas de interés, esto



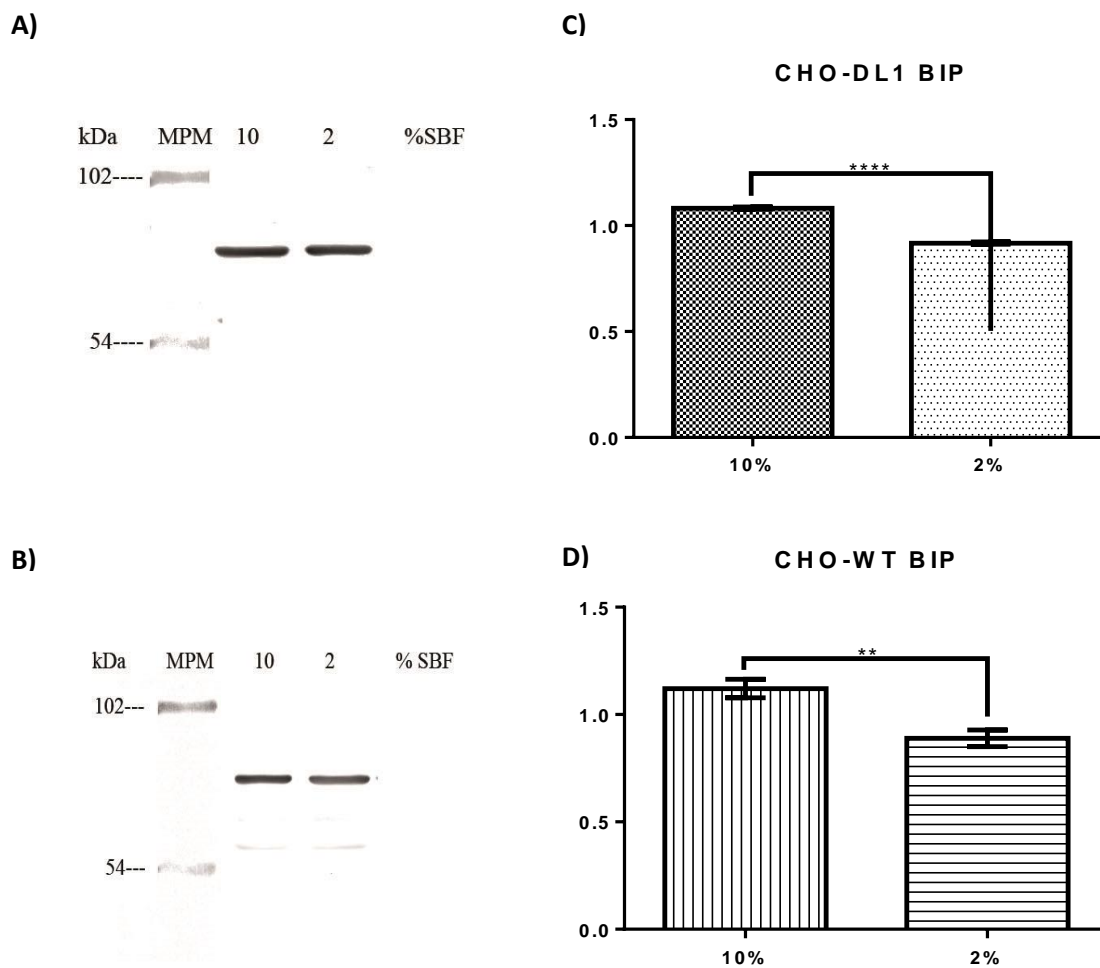
mediante el escaneo de las membranas de nitrocelulosa con la ayuda del software ImageJ.

Para el análisis estadístico se comparó el promedio de las densidades de las diferentes transfecciones, que corresponden a las diversas proteínas convertasas introducidas de forma exógena, así como un control.

Se realizó una ANOVA y una prueba de Tuckey para conocer las diferencias que existen entre cada grupo.

## 8. Resultados

### 8.1. Expresión de la proteína BIP



**Figura 8. Expresión de la proteína BIP.** **A.** Imagen representativa del western blot inmunoreactivo para la proteína BIP en la cepa CHO-DL1. **B.** Imagen representativa del western blot inmunoreactivo para la proteína BIP en células CHO silvestres. **C.** Comparación de la expresión de BIP en células CHO-DL1 al 10% ( $x=1.082 \pm 0.003280$ ,  $n=3$ ) contra células al 2% de SFB ( $x=0.9172 \pm 0.003300$ ,  $n=3$ ).  $P= <0.0001$  (\*\*\*\*). **D.** Comparación de la expresión de BIP en células CHO-WT al 10% ( $x=1.121 \pm 0.02462$ ,  $n=3$ ) y células CHO-WT al 2% de SFB ( $x= 0.8892 \pm 0.02250$ ,  $n=3$ ).  $P=0.0022$  (\*\*).

Con la finalidad de descartar la posibilidad de estrés en el retículo endoplásmico, se realizó un western blot para observar la expresión de la proteína BIP. Debido a que de forma normal se observa una diferencia de la concentración proteica dependiendo

de la concentración de suero que se utiliza para los cultivos celulares, la expresión de las bandas de la línea DL1 se compararon con las de la línea silvestre.

En la Figura 8A se muestra una imagen representativa de las bandas de la proteína BIP en la línea celular CHO-DL1, mientras que en la Figura 8B se observan bandas representativas de la expresión de BIP en las células CHO-WT.

El análisis densitométrico de las bandas indica que la diferencia significativa entre las concentraciones de BIP en las células CHO-DL1 es de un 15% cuando se comparan con las células crecidas en baja condición de SFB contra las crecidas en una condición normal (Figura 8C).

En lo que respecta a las células CHO- WT, en estas bandas se observó una diferencia significativa para la concentración de la proteína BIP, esta diferencia es de un 20% y al igual que en las células DL1 se presenta al comparar las células al 2% contra las células al 10% SFB (Figura 8D).

## **8.2. Expresión de PC1/3**

### **8.2.1. Pcsk1**

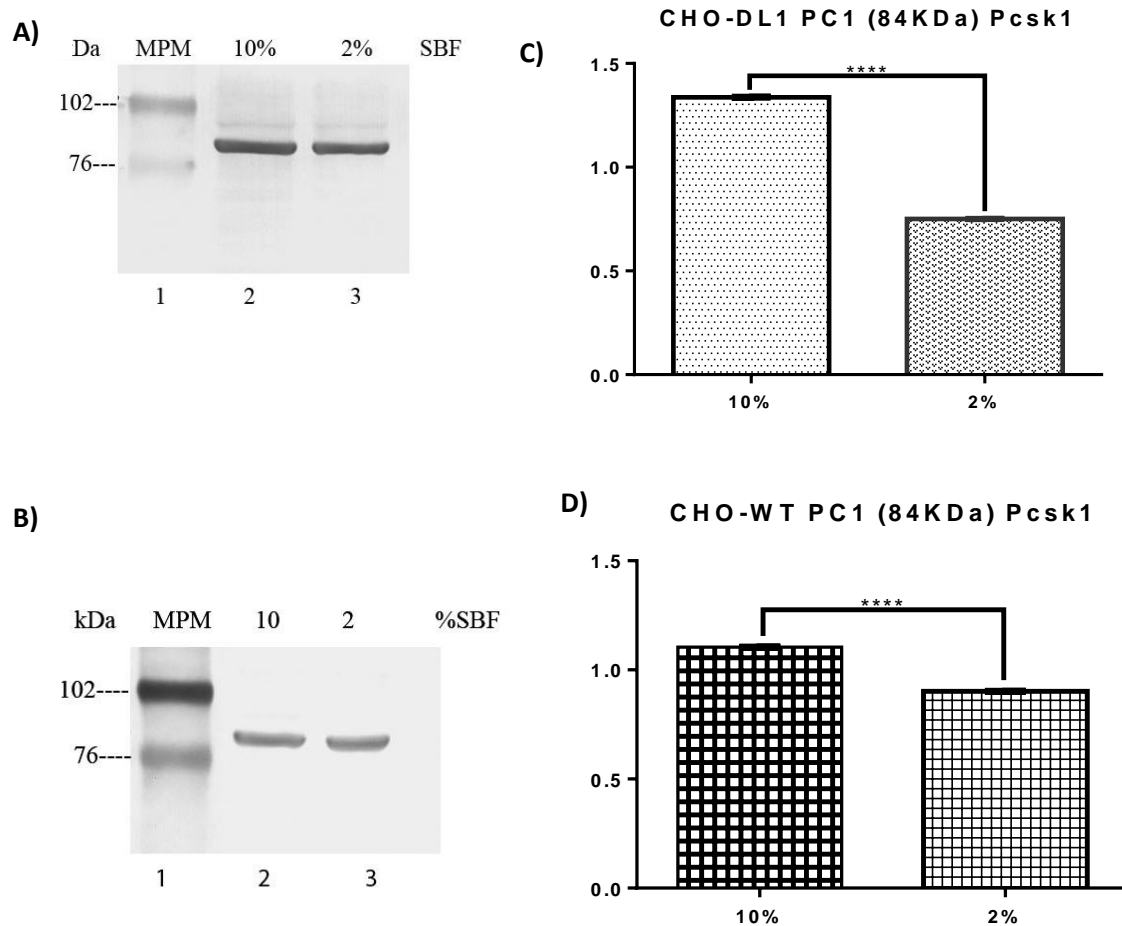
Para analizar la expresión de la protein-convertasa PC1/3 se utilizó el anticuerpo monoclonal PCSK1, en estos análisis se comparó la expresión de la proteína entre células de la misma línea celular cultivadas a diferentes porcentajes de SFB.

En las Figuras 9 A y B se observan las imágenes representativas de los western blot de PC1/3 en células CHO-DL1, y CHO-WT, respectivamente. En ambas figuras se observa que la banda corresponde a la forma de 87 kDA de PC1/3 la cual es enzimáticamente activa.

La Figura 9 C muestra la diferencia de la concentración de PC1/3 en las células de la línea CHO-DL1, donde existe una diferencia significativa en los niveles de PC1/3 de las células cultivadas al 2% con respecto a las células al 10% de SFB, en este caso la disminución es de un 44%.

Algo similar sucede en las células CHO-WT1, donde se observa una disminución de los niveles de esta enzima del 19% en las células al 2% de SFB con respecto a las que se cultivaron al 10% SFB.

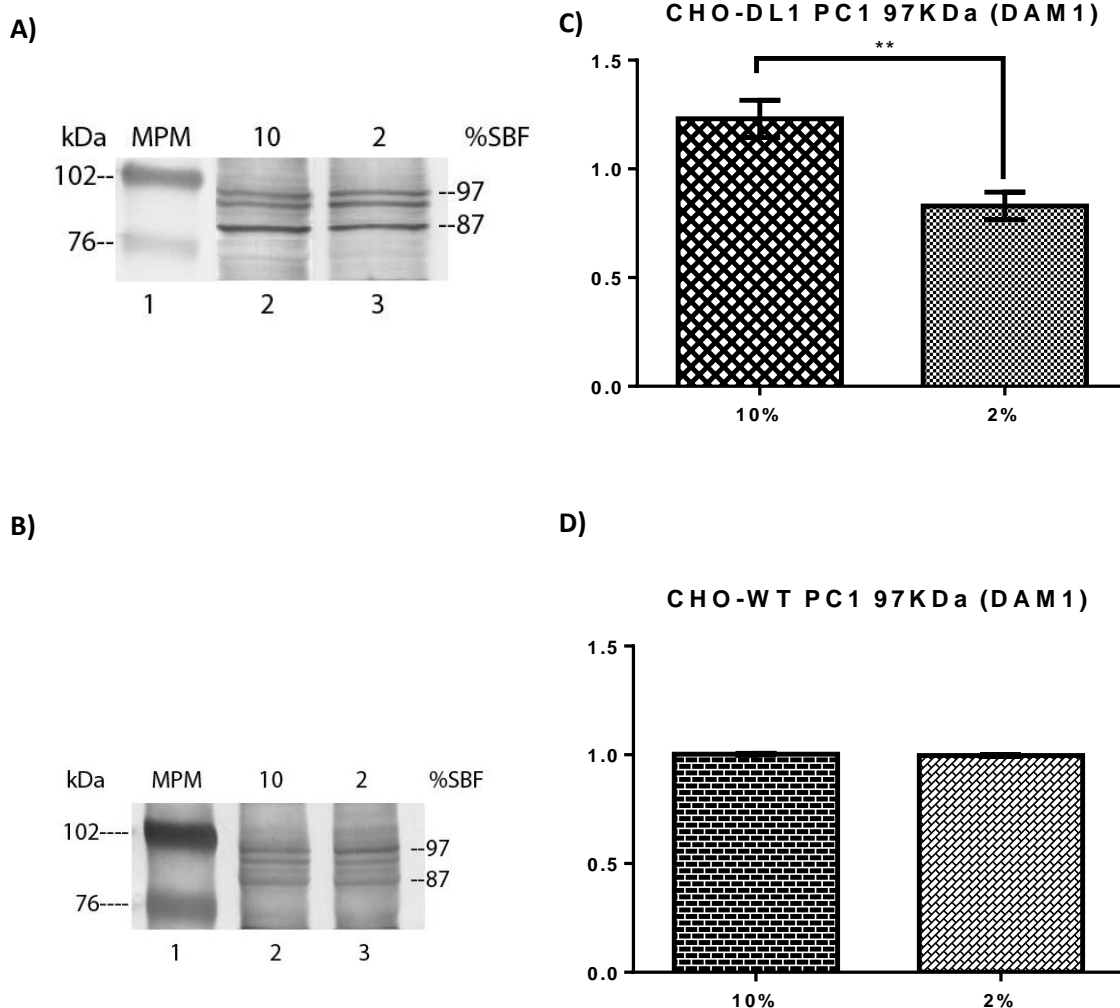
Estos resultados indican que la expresión de esta convertasa en su forma activa de 87 kDa se ve afectada por las condiciones de cultivo (Figura 9D).



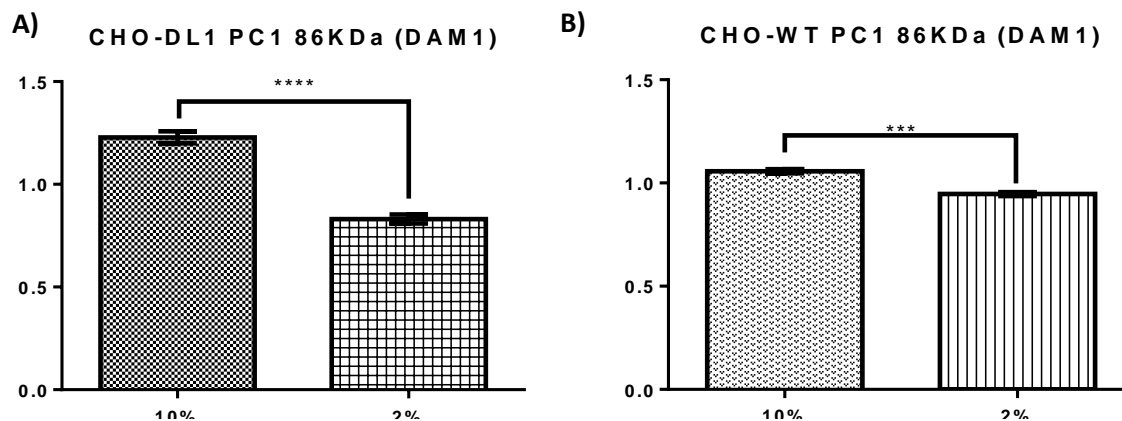
**Figura 9. Expresión de PC1/3 anticuerpo Pcsk1.** A. Western blot de PC1/3 en células CHO-DL1. B. Western blot de PC1/3 en células CHO-WT. C. Comparación de la expresión de PC1/3 87 kDa en la cepa CHO-DL1 al 10% ( $x= 1.337 \pm 0.003178$ ,  $n=3$ ) contra células al 2% de SFB ( $x= 0.7506 \pm 0.002351$ ,  $n=3$ ).  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*). D. Comparación de la expresión de PC1/3 87 kDa en células CHO-WT al 10% ( $x= 1.104 \pm 0.0006246$ ,  $n=3$ ) contra células CHO-WT al 2% de SFB ( $x= 0.9020 \pm 0.0005876$ ,  $n=3$ ).  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*).

### 8.2.2. DAM1

También se realizó el análisis por western blot utilizando el anticuerpo DAM1, esto con la finalidad de observar el precursor y sus formas intermedias proteicas derivadas de PC1/3 del procesamiento proteolítico. Las bandas reveladas con de este anticuerpo fueron la forma activa de 87 kDa y las bandas de los precursores de de 97 kDa y 94 kDa.



**Figura 10. Expresión de PC1/3 anticuerpo DAM1 (97 kDa).** A. Western blot en células CHO-DL1. B. Western blot en células CHO-WT. C. Comparación de la expresión de PC1/3 de 97 kDa en células CHO-DL1 al 10% ( $x=1.230 \pm 0.04918$ ,  $n=3$ ) contra células al 2% de SFB ( $x=0.8297 \pm 0.03638$ ,  $n=3$ ).  $P= 0.0028$  (\*\*). D. Comparación de la expresión de PC1/3 de 97KDa en células CHO-WT al 10% ( $x= 1.088 \pm 0.001346$ ,  $n=3$ ) contra la cepa CHO-WT al 2% de SFB ( $x= 0.9194 \pm 0.001230$ ,  $n=3$ ).  $P= 0.1090$ .



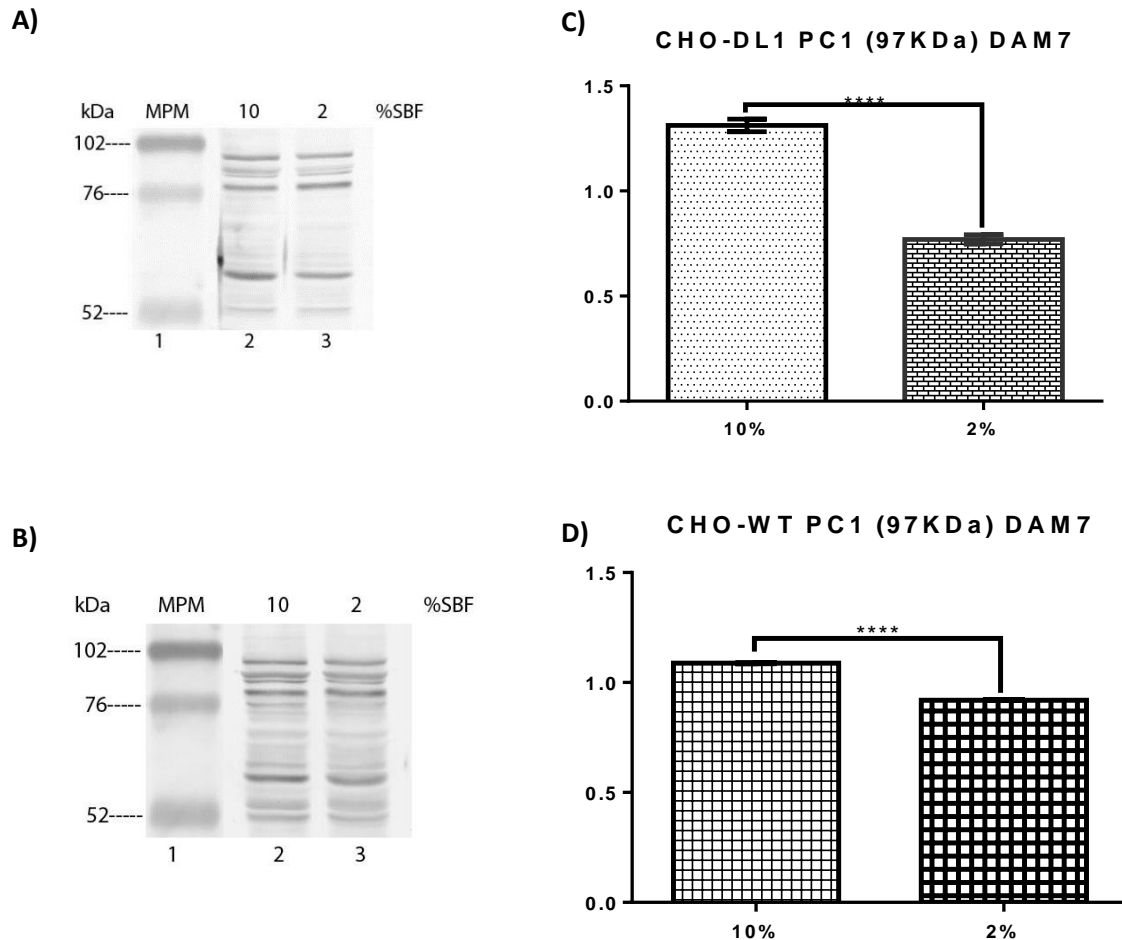
**Figura 11. Expresión de PC1/3 anticuerpo DAM1 (87 kDa).** A. Densitometría de la banda de 87 kDa en células CHO-DL1 al 10% ( $\bar{x}=1.228 \pm 0.01696$ ,  $n=3$ ) contra células al 2% de SFB ( $\bar{x}=0.8310 \pm 0.01254$ ,  $n=3$ ).  $P= < 0.0001$  (\*\*\*\*). B. Densitometría de la banda de 87 kDa en células CHO-WT al 10% ( $\bar{x}=1.057 \pm 0.005643$ ,  $n=3$ ) contra la cepa CHO-WT al 2% de SFB ( $\bar{x}= 0.9466 \pm 0.005308$ ,  $n=3$ ).  $P= 0.0001$  (\*\*\*).

En la Figura 10A se observa el patrón de bandas inmunoreactivas a DAM1 en las células CHO-DL1, en estas células el análisis de la banda correspondiente al precursor de 97kDa indica que existe una disminución del 67% en la expresión de esta molécula para las células que fueron cultivadas al 2% de SFB en comparación con las células en condiciones normales de suero (Figura 10C).

El patrón de bandas de las proteínas reactivas al anticuerpo DAM1 en las células CHO silvestre está representado en la Figura 10B. Como muestra la gráfica de la Figura 10D en estas células, a diferencia de la cepa DL1, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos cultivados al 10% y 2% de SFB.

Los resultados del análisis de la molécula de 87 kDa fueron similares para ambas cepas. En la Figura 11A la gráfica indica que existe una disminución del 32% en la expresión de la PC1/3 de 87 kDa cuando se compara el grupo de células CHO-DL1 al 2% contra el grupo de 10% de SFB. También, en la gráfica de la Figura 11B se describe la disminución de la expresión de la forma de 87 kDa de PC1/3 en las células cultivadas a baja concentración de suero en comparación con las células a un porcentaje normal de suero, en este caso la diferencia es menor y corresponde a un 10% menos.

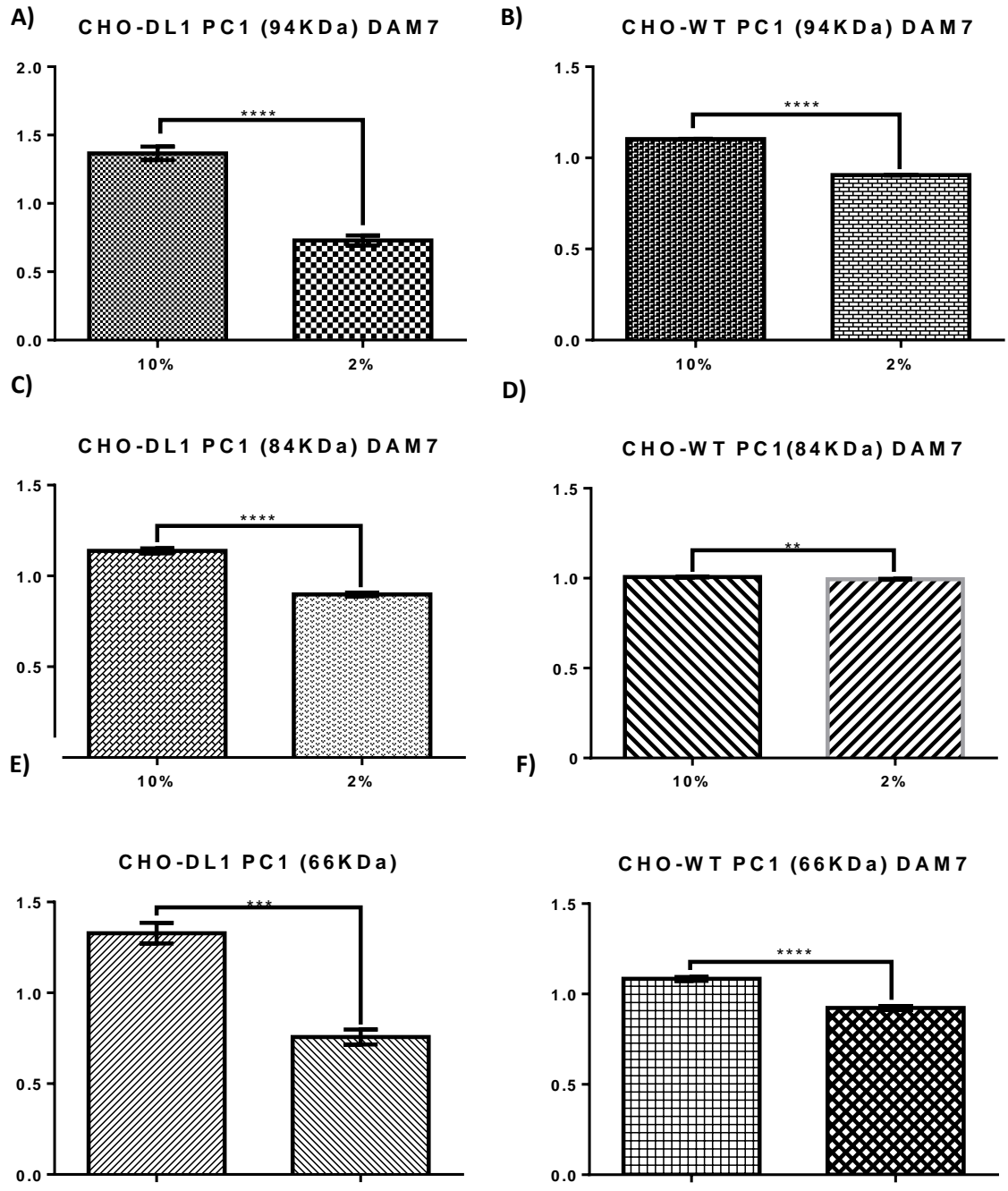
### 8.2.3. DAM7



**Figura 12. Expresión de PC1/3 anticuerpo DAM7 (97 kDa).** **A.** Western blot en células CHO-DL1. **B.** Western blot en células CHO-WT. **C.** Comparación de la expresión de PC1/3 de 97 kDa en células CHO-DL1 al 10% ( $x= 1.312 \pm 0.01720$ ,  $n=3$ ) contra células al 2% de SFB ( $x= 0.7695 \pm 0.01272$ ,  $n=3$ ).  $P= < 0.0001$  (\*\*\*\*). **D.** Comparación de la expresión de PC1/3 de 97 kDa en células CHO-WT al 10% ( $x= 1.088 \pm 0.001346$ ,  $n=3$ ) contra la cepa CHO-WT al 2% de SFB ( $x= 0.9194 \pm 0.001230$ ,  $n=3$ ).  $P= < 0.0001$  (\*\*\*\*).

Para el análisis de PC1/3 también se utilizó el anticuerpo DAM7, este anticuerpo nos permite observar formas de PC1/3 con pesos de 97, 94, 87 y 66 kDa.

Las Figuras 12A y B muestran, respectivamente, el patrón de bandas inmunoreactivas para las células CHO-DL1 y para la cepa silvestre, respectivamente. La primera proteína analizada fue la forma de 97 kDa, como ejemplifica la Figura 12C existe una disminución de los niveles de expresión de esta molécula en las células que fueron cultivadas en baja condición de suero, el valor de la disminución corresponde a un 41% en comparación con las células crecidas en un 10% de SFB.



**Figura 13. Expresión de PC1/3 anticuerpo DAM7 (94, 86 y 66KDa).** **A.** Comparación de los niveles de expresión de PC1/3 DE 94 kDa en células CHO-DL1 al 10% ( $x=1.366 \pm 0.02861$ ,  $n=3$ ) contra células al 2% de SFB ( $x= 0.7289 \pm 0.02116$ ,  $n=3$ ).  $P= < 0.0001$  (\*\*\*\*). **B.** Comparación de los niveles de expresión de PC1/3 DE 94 kDa en células CHO-WT al 10% ( $x= 1.103 \pm 0.0007528$ ,  $n=3$ ) contra la cepa CHO-WT al 2% de SFB ( $x= 0.9057 \pm 0.0006881$ ,  $n=3$ ).  $P= < 0.0001$  (\*\*\*\*). **C.** Comparación de los niveles de expresión de PC1/3 de 87 kDa en células CHO-DL1 al 10% ( $x= 1.138 \pm 0.008035$ ,  $n=3$ ) contra células al 2% de SFB ( $x= 0.8979 \pm 0.005944$ ,  $n=3$ ).  $P= < 0.0001$  (\*\*\*\*). **D.** Comparación de los niveles de expresión de PC1/3 DE 87 kDa en células CHO-WT al 10% ( $x= 1.007 \pm 0.001559$ ,  $n=3$ ) contra la cepa CHO-WT al 2% de SFB ( $x= 0.9938 \pm 0.001425$ ,  $n=3$ ).  $P=0.0036$  (\*\*). **E.** Comparación de los niveles de expresión de PC1/3 DE 66 kDa en células CHO-DL1 al 10% ( $x= 1.329 \pm 0.03257$ ,  $n=3$ ) contra células al 2% de SFB ( $x= 0.7568 \pm 0.02409$ ,  $n=3$ ).  $P= 0.0001$  (\*\*\*\*). **F.** Comparación de los niveles de expresión de PC1/3 de 66 kDa en células CHO-WT al 10% ( $x=1.084 \pm 0.006188$ ,  $n=3$ ) contra la cepa CHO-WT al 2% de SFB ( $x= 0.9232 \pm 0.005655$ ,  $n=3$ ).  $P= < 0.0001$  (\*\*\*\*).



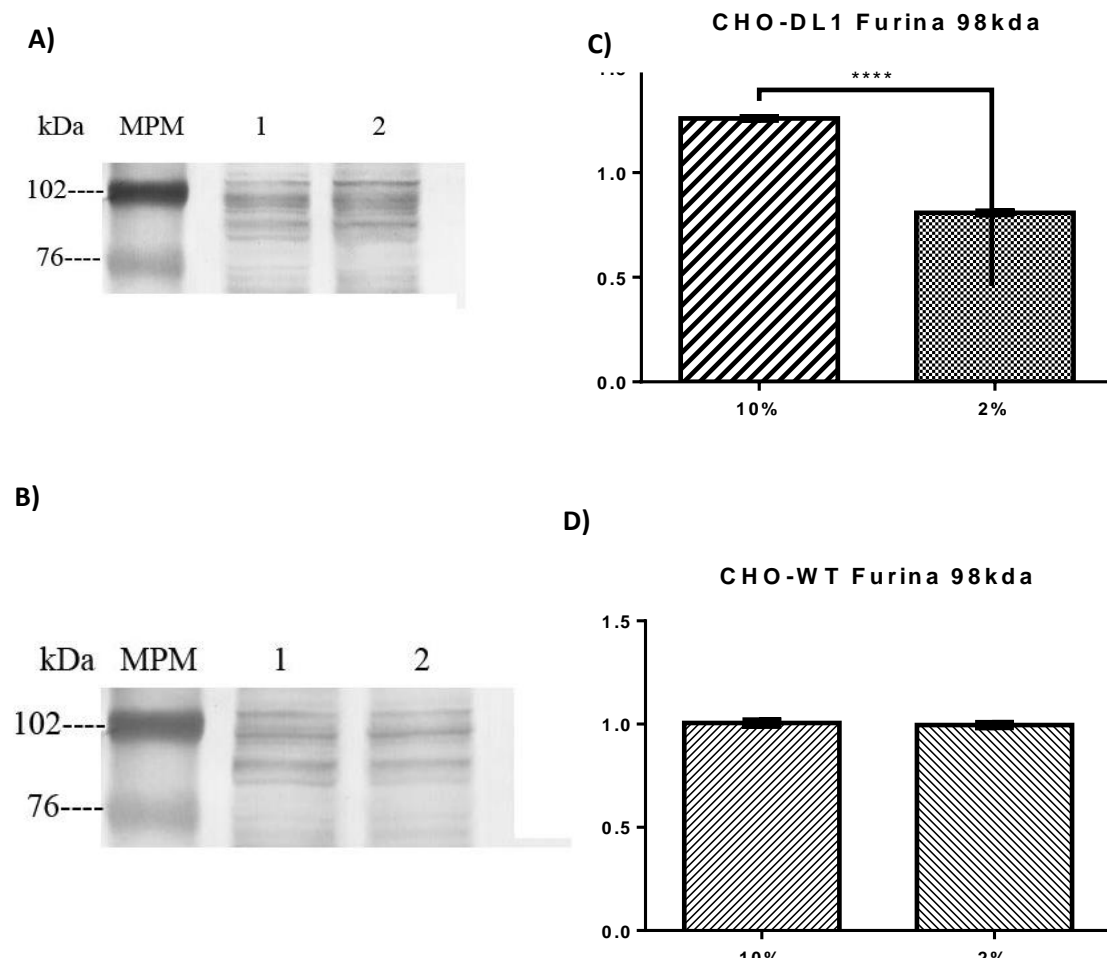
Cuando se analizó la misma molécula en células de la cepa silvestre se encontró que la concentración de la forma de 97 kDa de PC1/3 también se veía disminuida sin embargo dicha disminución era menor a la de las células DL1, con un valor de 15% menos en células al 2% de suero con respecto a las células al 10% de SFB (Figura 12D).

El análisis densitométrico de los niveles de expresión de la forma de 94 kDa de PC1/3 fueron similares a lo que se observa con la molécula de 97 kDa. En la cepa DL1 la disminución en la concentración de esta molécula fue de un 47% en las células al 2% de SFB con respecto a sus iguales crecidas en 10% de suero (Figura 13 A). También hubo una disminución en la expresión de esta misma molécula en células de la cepa silvestre, la figura 13B muestra como la expresión de PC1/3 de 94 kDa disminuye en un 17% cuando se comparan las células al 2% contra las crecidas al 10% de SFB.

La concentración de la molécula de 87 kDa también se vio disminuida en ambas cepas cuando se cultivaban a bajas condiciones de suero. En la Figura 10C se muestra como los niveles de expresión de PC1/3 de 84 kDa en células CHO-DL1 disminuyeron en un 21% en las células cultivadas en bajo suero con respecto a las cultivadas en condiciones normales. El análisis de la misma molécula en la cepa silvestre fue congruente con lo ocurrido en las células DL1 pero la disminución de la expresión de esta molécula era mucho menos notoria en estas células, con una diferencia apenas mayor al 1% (Figura 13D).

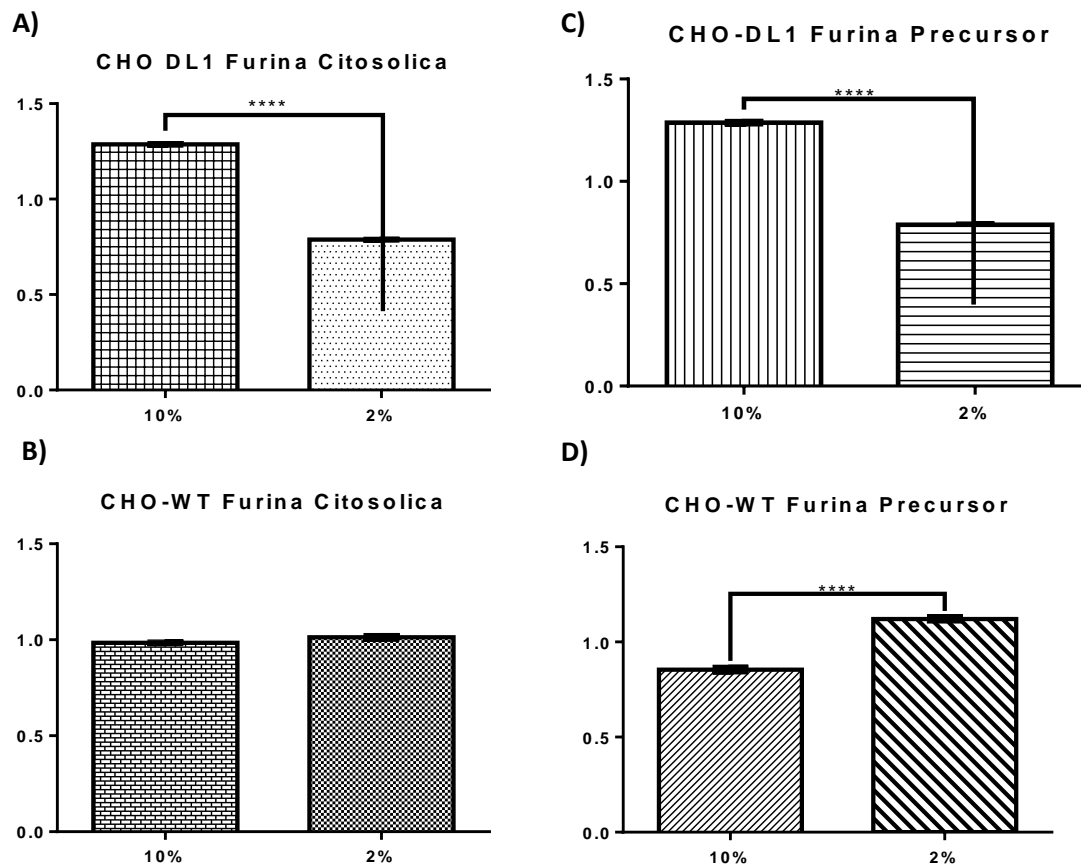
La molécula de 66 kDa derivada de PC1/3 tuvo una expresión similar a la vista en las moléculas analizadas con anterioridad. Como se observa en la Figura 13E, existe una disminución en la expresión de esta molécula en las células CHO-DL1 al 2%, esta diferencia tiene un valor del 43%. La expresión de esta misma molécula en células silvestres muestra una disminución del 14% cuando se comparan las células en condición de bajo suero contra las células a concentración normal de suero (Figura 13F)

### 8.3. Expresión de Furina



**Figura 14. Expresión de Furina madura activa (98 kDa).** A. Western blot en células CHO-DL1. B. Western blot en células CHO-WT. C. Comparación de la expresión de Furina de 98 kDa en células CHO-DL1 al 10% ( $\bar{x} = 1.259 \pm 0.008211$ ,  $n=3$ ) contra células al 2% de SFB ( $\bar{x} = 0.8082 \pm 0.006075$ ,  $n=3$ ).  $P = < 0.0001$  (\*\*\*\*). D. Comparación de la expresión de Furina de 98 kDa en células CHO-WT al 10% ( $\bar{x} = 1.005 \pm 0.009622$ ,  $n=3$ ) contra la cepa CHO-WT al 2% de SFB ( $\bar{x} = 0.9957 \pm 0.007981$ ,  $n=3$ ).  $P = 0.4898$ .

El anticuerpo utilizado para el análisis de Furina nos permitió diferenciar entre las diferentes formas de esta proteína que corresponden al precursor de 110 kDa, la forma madura activa de 98 kDa y la forma soluble de 80-82 kDa. El análisis de la expresión de Furina se realizó para cada una ellas y las comparaciones se efectuaron entre células de la misma línea cultivadas a diferentes porcentajes de suero.



### Figura 15. Expresión de Furina (Precursor y forma citosólica o soluble).

**A.** Comparación de la expresión de Furina citosólica en células CHO-DL1 al 10% ( $x=1.287 \pm 0.003448$ ,  $n=3$ ) contra células al 2% de SFB ( $x=0.7876 \pm 0.002551$ ,  $n=3$ ).  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*). **B.** Comparación de la expresión de Furina citosólica en células CHO-WT al 10% ( $x=0.9843 \pm 0.008178$ ,  $n=3$ ) contra la cepa CHO-WT al 2% de SFB ( $x=1.013 \pm 0.006783$ ,  $n=3$ ).  $P=0.0542$ . **C.** Comparación de la expresión del precursor de Furina de 110 kDa en células CHO-DL1 al 10% ( $x=1.287 \pm 0.004259$ ,  $n=3$ ) contra células al 2% de SFB ( $x=0.7878 \pm 0.003151$ ,  $n=3$ ).  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*). **D.** Comparación de la expresión del precursor de Furina de 110 kDa en células CHO-WT al 10% ( $x=0.8547 \pm 0.008244$ ,  $n=3$ ) contra la cepa CHO-WT al 2% de SFB ( $x=1.121 \pm 0.006838$ ,  $n=3$ ).  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*).

El análisis de la forma transmembranal de esta proteína madura activa está representado en la Figura 14, en donde la imagen 14A corresponde a las bandas representativas de Furina en células CHO-WT al 10% y 2% de SFB mientras que la imagen 14B muestra las mismas bandas pero para la línea CHO-DL1. Esta forma transmembranal de Furina tiene un peso de 98 kDa y es biológicamente activa.

En las células de la línea WT no se encontró una diferencia significativa de los valores normalizados de Furina de 98 kDa.

Algo muy diferente sucede en las células CHO-DL1 en donde la concentración de esta molécula se observa claramente disminuida en las células cultivadas al 2% de SFB.

Además la diferencia en los niveles de Furina de 98 kDa de las células al 2% con respecto a las del 10% es de un 36%.

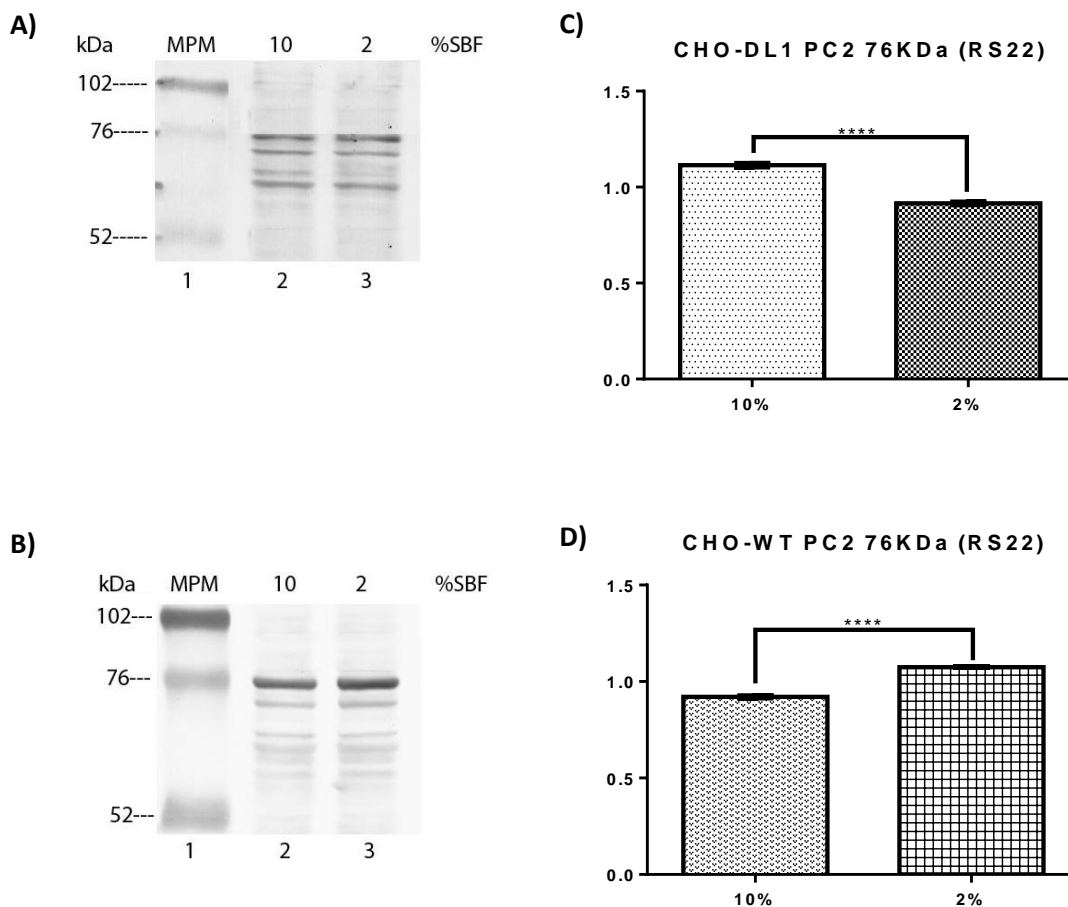
También hubo cambios significativos en la expresión del precursor de Furina y de la forma citosólica de esta proteína.

Como se muestra en la Figura 15A en las células CHO-DL1 hay una disminución del 39% en la expresión de la forma citosólica en las células al 2% con respecto a las células al 10% de SFB. Sin embargo esta tendencia solo se manifiesta en la cepa DL1, ya que en las células de la cepa silvestre no se encuentra un cambio significativo de la misma (Figura 15B).

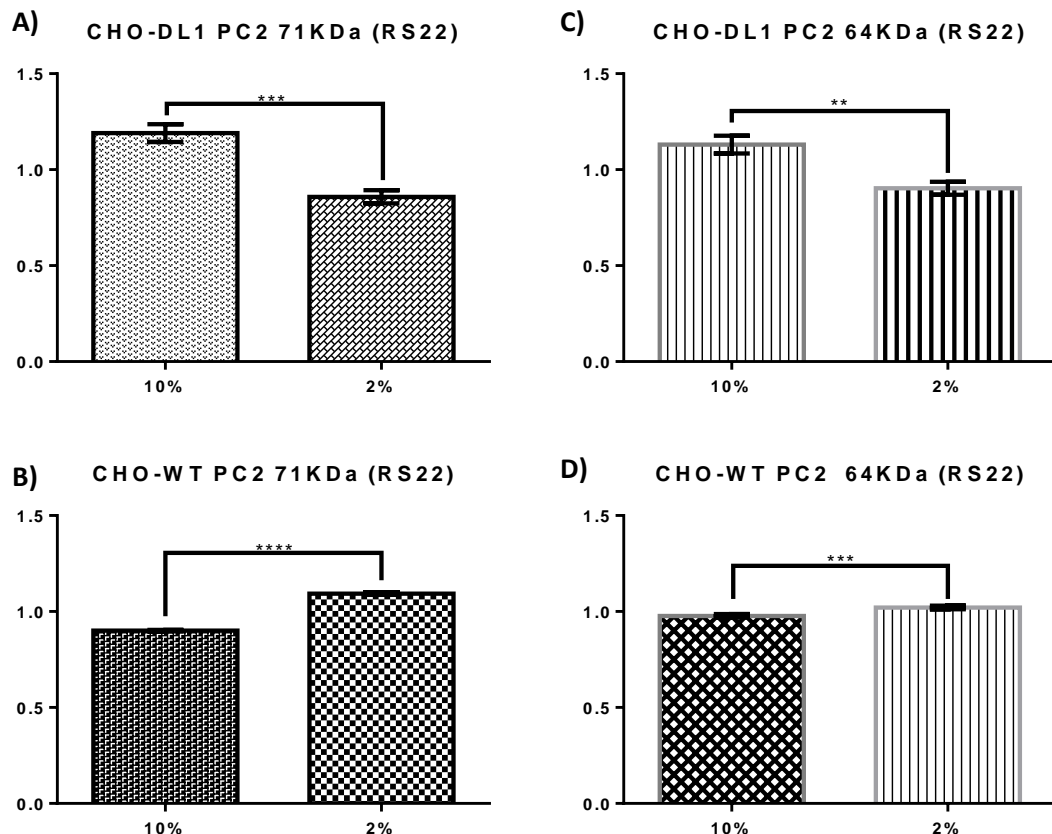
Para el precursor de Furina de 110 kDa los datos también fueron bastante heterogéneos. Como muestra la Figura 15C, en la cepa CHO-DL1 la concentración del precursor de 110 kDa disminuyó en un 38% para las células al cultivadas con 2% en comparación con las células crecidas a mayor concentración de SFB. En contraste a esto se observa en la Figura 15D que la expresión del precursor de Furina en las células silvestres muestra un aumento del 23% en la células cultivadas al 2% de SFB en contraste con las cultivadas al 10%.

## 8.4. Expresión de PC2

El anticuerpo utilizado para la identificación de PC2 nos permitió discriminar tres formas de esta enzima. La primera corresponde al precursor de PC2 con un peso molecular aparente de 74 kDa, en segundo lugar se encuentra una forma truncada en el péptido señal la cual tiene un peso de 71 kDa y finalmente la tercera forma que se presenta con un doblete de 64-66kDa.



**Figura 16. Expresión de PC2 (76kDa).** A. Western blot de PC2 revelado con el anticuerpo RS22 en células CHO-DL1. B. Western blot de PC2 revelado con el anticuerpo RS22 en células CHO-WT. C. Comparación de la expresión de PC2 de 76 kDa en células CHO-DL1 al 10% ( $x=1.114 \pm 0.006663$ ,  $n=3$ ) contra células al 2% de SFB ( $x=0.9155 \pm 0.004929$ ,  $n=3$ ).  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*). D. Comparación de la expresión de PC2 de 76 kDa en células CHO-WT al 10% ( $x=0.9205 \pm 0.002119$ ,  $n=3$ ) contra la cepa CHO-WT al 2% de SFB ( $x=1.075 \pm 0.001992$ ,  $N=3$ ).  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*).



**Figura 17. Expresión de PC2 (71 y 64 kDa).** A. Comparación de la expresión de PC2 de 71 kDa en células CHO-DL1 al 10% ( $x=1.191 \pm 0.02679$ ,  $n=3$ ) contra células al 2% de SFB ( $x=0.8587 \pm 0.01982$ ,  $n=3$ ).  $P=0.0006$  (\*\*\*). B. Comparación de la expresión de PC2 de 71 kDa en células CHO-WT al 10% ( $x=0.9009 \pm 0.002219$ ,  $n=3$ ) contra la cepa CHO-WT al 2% de SFB ( $x=1.093 \pm 0.002087$ ,  $n=3$ ).  $P= < 0.0001$  (\*\*\*\*). C. Comparación de la expresión de PC2 de 64 kDa en células CHO-DL1 al 10% ( $x=1.131 \pm 0.02662$ ,  $n=3$ ) contra células al 2% de SFB ( $x=0.9032 \pm 0.01970$ ,  $n=3$ ).  $P= (**)$ . D. Comparación de la expresión de PC2 de 64 kDa en células CHO-WT al 10% ( $x=0.9774 \pm 0.003437$ ,  $n=3$ ) contra la cepa CHO-WT al 2% de SFB ( $x=1.021 \pm 0.003233$ ,  $n=3$ ).  $P= 0.0007$  (\*\*\*).

En la Figura 16A se presenta la imagen del western blot cuando se utilizó el anticuerpo RS22 dirigido contra PC2 en los extractos celulares de CHO-DL1; mientras que en la Figura 16B se observan las bandas reactivas al anticuerpo RS22 correspondientes a la cepa silvestre.

En la Figura 16C se observa que la concentración del precursor de PC2 disminuyó en un 17% en las células cultivadas al 2% de SFB con respecto a su contraparte a mayor cantidad de SFB. Los datos de la cepa DL1 contrastan con lo observado en la cepa silvestre, pues se encontró un aumento del 16% en la concentración del precursor de

PC2 en las células cultivadas al 2% de SFB. en comparación con las cultivadas con 10% de SFB (Figura 16D).

Los resultados de la expresión de la molécula de 71 kDa de PC2 fueron congruentes con lo observado en la expresión del precursor, en la Figura 17A se observa cómo se mantiene la disminución en la expresión de las moléculas derivadas de PC2 en células que fueron cultivadas al 2% de SFB, para este caso la disminución es de un 27%. Además, como ocurrió con el precursor, en las células de la cepa silvestre cultivadas en bajo suero muestran un incremento del 21% en la expresión de esta forma truncada de PC2 (Figura 17B).

Por otra parte, en la Figura 17C se encontró una disminución en los niveles de expresión de la forma de 64 kDa de PC2 en las células cultivadas al 2% de SFB con respecto a los cultivos al 10%, en este caso hay una diferencia del 20% entre ambos grupos. Referente a las concentraciones de la misma molécula en la cepa silvestre, se observó un aumento ligero de la molécula de 64 kDa en células cultivadas al 2% de SFB, siendo éste de un 4% con respecto al grupo en condiciones normales de suero (Figura 17D).

## **8.5. Secreción de PENK de 32-34 kDa y 8.5 kDa posterior a la transfección de las diferentes convertasas**

El análisis de las formas de PENK se hizo en el medio condicionado después de que las células habían terminado el tercer ciclo de rotación de medios para favorecer la máxima expresión de PENK. La transfección transitoria de las protein-convertasas de interés se realizó al inicio del tercer ciclo de rotación de medios para que la máxima expresión de las proteínas transfectadas coincidiera con la máxima expresión de PENK en las células CHO-DL1.

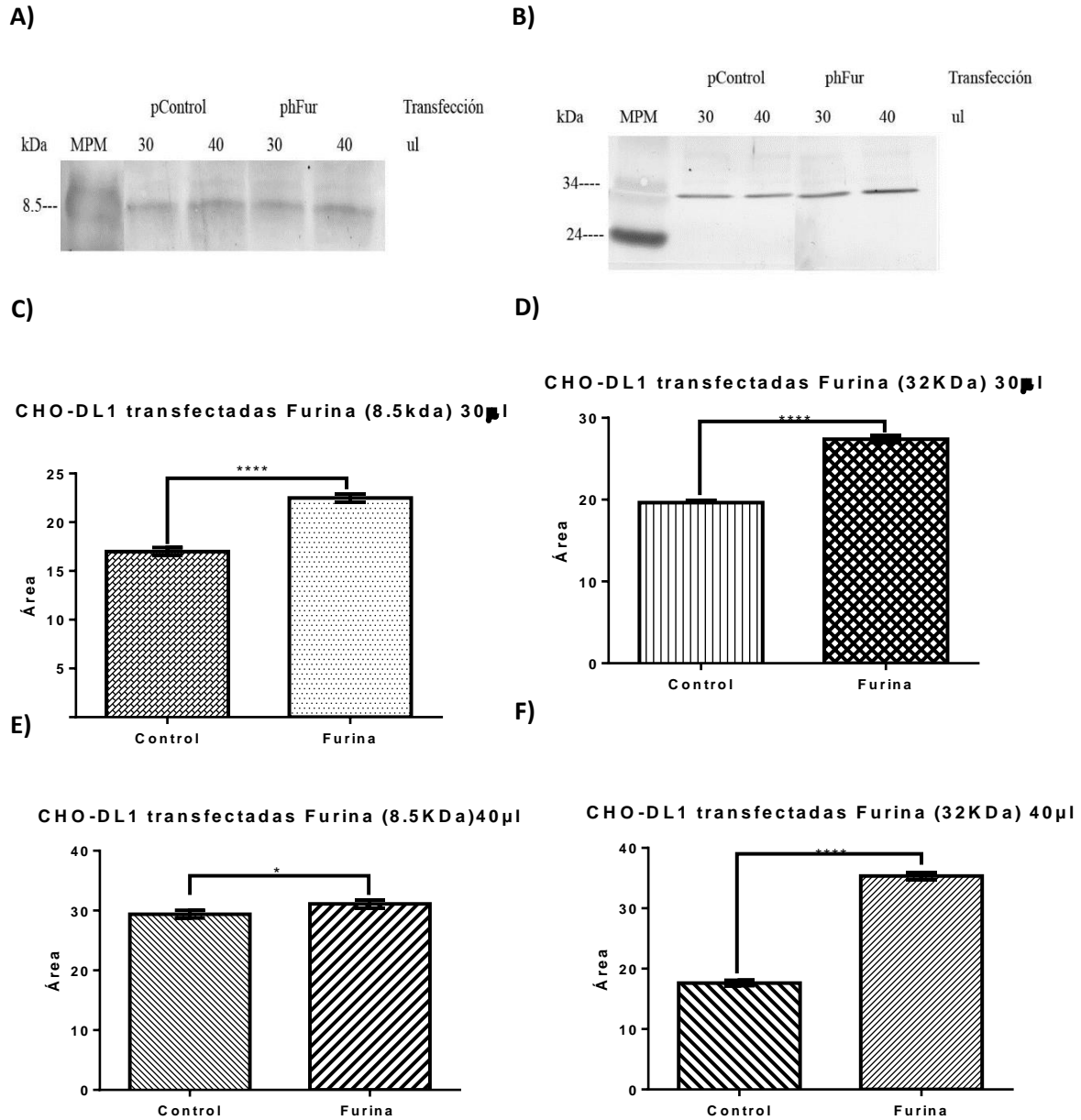
Para estos experimentos fueron utilizados dos anticuerpos distintos. El anticuerpo DAM5 dirigido a la porción terminal de la synencefalina, el cual nos permitía detectar la banda correspondiente a la molécula de 8.5 kDa. El otro anticuerpo, HEPTA-SWARTZ está dirigido al heptapéptido gracias a esto es posible observar la forma completa de PENK, una molécula de entre 32-34KDa.

### **8.5.1. Transfección con pFurina**

Las Figuras 18A y 18B muestran las bandas de las moléculas de PENK con pesos de 8.5 kDa y 32-34 kDa, respectivamente. El análisis densitométrico de estas moléculas indica que existe un aumento en el procesamiento proteico de ambas moléculas para las células que fueron transfectadas con furina. Cuando se utilizó un volumen de 30 $\mu$ l, la secreción de la molécula de 8.5 kDa se incrementó en un 32%, como se muestra en la Figura 18C. Algo similar ocurrió con la molécula de 32-34 kDa, en donde el aumento de las células transfectadas fue del 42% con respecto al control (Figura 18D).

Los resultados de los experimentos realizados con un volumen de 40 $\mu$ l muestra fueron congruentes con lo ocurrido en las muestras de 30 $\mu$ l. En la figura 18E la gráfica muestra que las células transfectadas con furina tuvieron una expresión un 6% mayor de la molécula de 8.5 KDa. Además la presencia de la forma de 32-34KDa de PENK resultó un 100% mayor con respecto a las células utilizadas como control (Figura 18F).

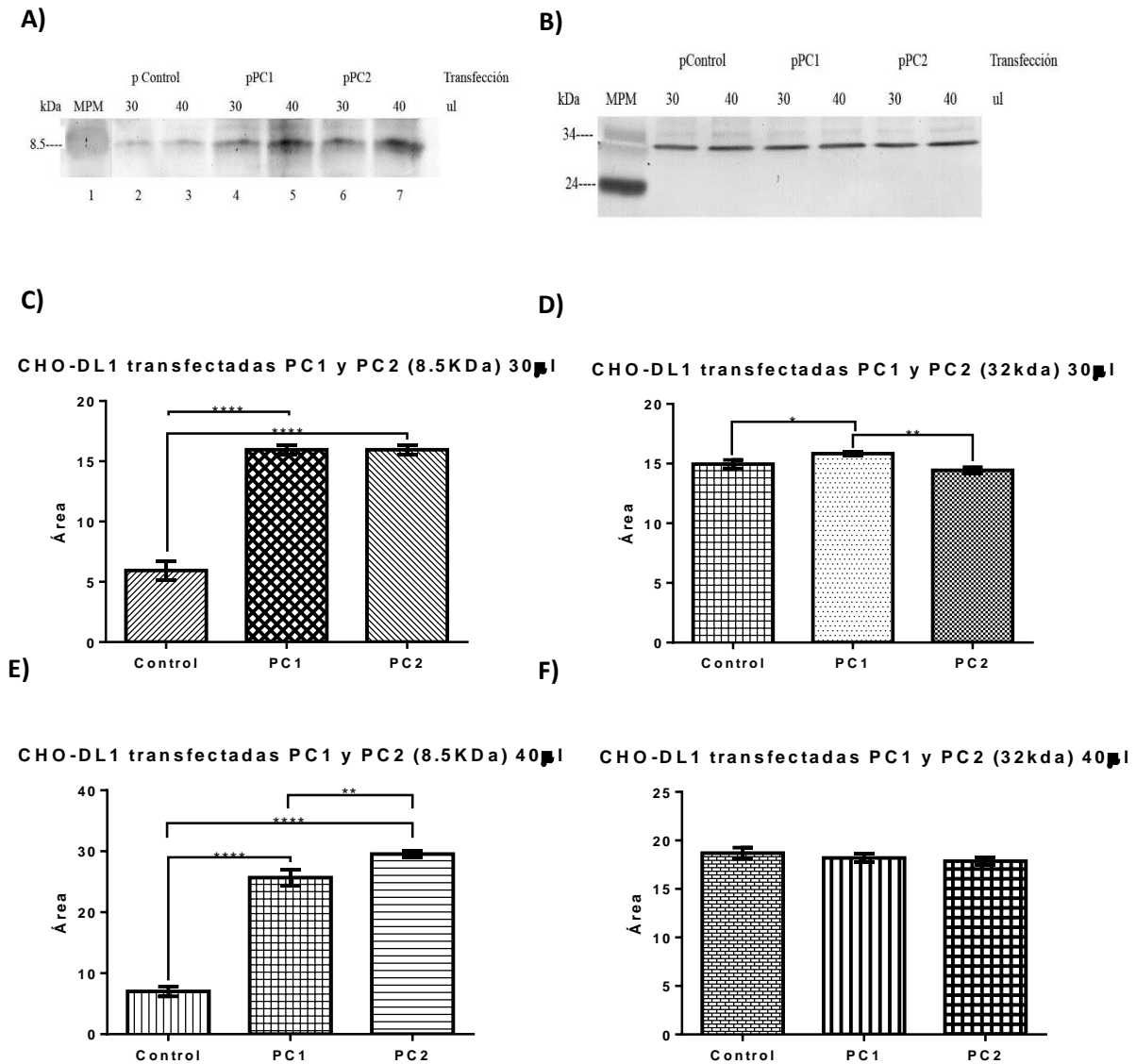




**Figura 18. Secreción de PENK de 32-34 kDa y 8.5 kDa en sobrenadantes de células CHO- DL1 transfectadas con pFurina.**

**A.** Imagen representativa de bandas reactivas al anticuerpo DAM5 en sobrenadantes CHO-DL1 2% SFB transfectadas con Furina. **B.** Imagen representativas de las bandas inmunoreactivas a HEPTA-SWARTZ en sobrenadantes CHO-DL1 2% SFB transfectadas con Furina. **C.** Comparación de la secreción de PENK de 8.5KDa en sobrenadantes CHO-DL1 2% SFB control ( $x= 17.00 \pm 0.2355$ ,  $n=3$ ) y transfectadas con Furina ( $x= 22.49 \pm 0.2343$ ,  $n=3$ ), en volumen de 30  $\mu$ l.  $P= < 0.0001$  (\*\*\*\*). **D.** Comparación de la secreción de PENK de 32KDa en sobrenadantes CHO-DL1 2% SFB control ( $x= 19.64 \pm 0.1592$ ,  $n=3$ ) y transfectadas con Furina ( $x= 27.39 \pm 0.2355$ ,  $n=3$ ), en volumen de 30  $\mu$ l.  $P=< 0.0001$  (\*\*\*\*). **E.** Comparación de la secreción de PENK de 8.5KDa en sobrenadantes CHO-DL1 2% SFB control ( $x=29.40 \pm 0.3843$ ,  $n=3$ ) y transfectadas con Furina ( $x=31.12 \pm 0.3748$ ,  $n=3$ ), en volumen de 40  $\mu$ l.  $P= 0.0330$  (\*). **F.** Comparación de la secreción de PENK de 32KDa en sobrenadantes CHO-DL1 2% SFB control ( $x=17.63 \pm 0.2633$ ,  $n=3$ ) y transfectadas con Furina ( $x=35.34 \pm 0.3617$ ,  $n=3$ ), en volumen de 40  $\mu$ l.  $P=< 0.0001$  (\*\*\*\*).

## 8.5.2. Transfecciones con pPC1/3 y pPC2



**Figura 19. Secreción de PENK de 32-34 kDa y 8.5 kDa en sobrenadantes de células CHO-DL1 transfectedas con pPC1/3 y pPC2.**

**A.** Imagen representativa de bandas reactivas al anticuerpo DAM5 en sobrenadantes CHO-DL1 2% SFB transfectedas con pPC1/3 y pPC2. **B.** Imagen representativa de las bandas inmunoreactivas a HEPTA-SWARTZ en sobrenadantes CHO-DL1 2% SFB transfectedas con pPC1/3 y pPC2. **C.** ANOVA de la secreción de PENK de 8.5 kDa en sobrenadantes CHO-DL1 2% SFB control ( $x=5.942 \pm 0.4639$ ,  $n=3$ ), transfectedas con pPC1/3 ( $x=15.95 \pm 0.2329$ ,  $n=3$ ) y transfectedas con pPC2 ( $x=15.95 \pm 0.2329$ ,  $n=3$ ), en volumen de 30 µl. **D.** ANOVA de la secreción de PENK de 32 kDa en sobrenadantes CHO-DL1 2% SFB control ( $x=14.95 \pm 0.2096$ ,  $n=3$ ), transfectedas con pPC1/3 ( $x=15.84 \pm 0.1025$ ,  $n=3$ ) y transfectedas con pPC2 ( $x=14.44 \pm 0.1587$ ,  $n=3$ ), en volumen de 30 µl. **E.** ANOVA de la secreción de PENK de 8.5 kDa en sobrenadantes CHO-DL1 2% SFB control ( $x=7.018 \pm 0.4671$ ,  $n=3$ ), transfectedas con pPC1/3 ( $x=25.67 \pm 0.8038$ ,  $n=3$ ) y transfectedas con pPC2 ( $x=29.54 \pm 0.3462$ ,  $n=3$ ), en volumen de 40 µl. **F.** ANOVA de la secreción de PENK de 32 kDa en sobrenadantes CHO-DL1 2% SFB control ( $x=18.69 \pm 0.3258$ ,  $n=3$ ), transfectedas con pPC1/3 ( $x=18.21 \pm 0.2317$ ,  $n=3$ ) y transfectedas con pPC2 ( $x=17.87 \pm 0.2026$ ,  $n=3$ ), en volumen de 40 µl.

Para las células transfectadas con los plásmidos pPC1/3 y pPC2 también se realizó el análisis de las bandas de PENK de 8.5 kDa y 32-34 kDa, las cuales se representan en las Figuras 19A y 19B.

Los resultados utilizando 30 $\mu$ l de muestra indicaron que el procesamiento de la molécula de 8.5 kDa incrementa para las dos diferentes transfecciones realizadas, los valores fueron de un 168% entre el plásmido control y el pPC1/3, y para el caso de pPC2 el aumento también fue de un 168%. Sin embargo, utilizando este volumen no se encontró un valor significativo entre la secreción de PENK de 8.5 kDa de las células transfectadas con pPC1/3 comparadas con las comparadas con pPC2 (Figura19C). Como se muestra en la Figura 19D, la secreción de la molécula de 32-34KDa solo se vio afectada en las células transfectadas con pPC1/3, en donde hubo un aumento del 6% con respecto al control y de un 10% con respecto a pPC2; no hubo una diferencia significativa entre pPC2 y el pcontrol.

Al utilizar un volumen de muestra de 40 $\mu$ l se encontró que la expresión de la molécula de 8.5 kDa se mantenía aumentada en comparación con el control, en un 266% en contraste a pPC1/3 y en un 321% al compararla con pPC2; además a esta concentración se observa una diferencia en el procesamiento de esta molécula para las distintas transfecciones en donde pPC2 presentaba una secreción un 15% mayor que la de pPC1/3 (Figura19E). Finalmente, en la Figura 19F se indica que no se encontró una diferencia significativa para la expresión de la molécula de PENK de 32-34KDa pero cabe resaltar que existe una tendencia a la disminución de esta molécula en las células transfectadas, en donde la secreción por las células transfectadas con pPC1 se reduce en un 2.5% con respecto al control y la liberación por las células transfectadas con pPC2 disminuye en un 4% al compararlas con el control.

## 9. Discusión

Desde que fueron aisladas, las células CHO han sido de gran relevancia en la industria y la investigación. Existen cepas de estas células que presentan deficiencia en la expresión de diversos genes, siendo de especial interés aquellas que exhiben deficiencia para expresar la enzima DHFR (dihidrofolato reductasa) las cuales han sido utilizadas para la generación de proteínas recombinantes. La generación de proteínas recombinantes utilizando a las células CHO-DHFR<sup>-</sup> presenta una gran ventaja respecto a otros modelos utilizados, ya que se pueden generar líneas celulares que mantienen una expresión estable de la proteína recombinante y ésta puede ser modulada por agentes externos (Condon et al., 2003; Jayapal et al., 2007; Urlaub & Chasin, 1980).

Una cepa deficiente en DHFR fue utilizada por la doctora Iris Lindberg y colaboradores para obtener una nueva línea celular que expresara PENK. El resultado de estos experimentos fue el desarrollo de la cepa CHO-DL1 que mantiene una transfección estable del gen de PENK de rata acoplada a la expresión de la enzima DHFR (Lindberg et al., 1991).

Las células CHO-DL1 se han utilizado en trabajos anteriores de nuestro laboratorio para el estudio de la molécula de PENK, donde se encontró que estas células son capaces de secretar la forma completa de esta molécula (32-34 kDa) así como un péptido de 8.5 kDa derivado de la misma y que corresponde a la región amino terminal de PENK (Mettters & Rossier, 1987; Acevo, 2014; Chang et al., 1998; Velazquez, 2003).

Al final de la secuencia de 73 aa de la molécula de sinencefalina existe un sitio dibásico Arg-Arg, la escisión del mismo sería el fenómeno responsable de la liberación de la molécula de sinencefalina. Por otra parte, en distintos trabajos se ha reportado que las células CHO no cuentan con la maquinaria enzimática necesaria para realizar este proceso, el cual debería ser mediado por una proteasa que actúe sobre los sitios dibásicos de sus sustratos. Entre las principales candidatas para efectuar dicha actividad están las protein-convertasas PC1/3 y PC2 cuya presencia no había sido reportada con anterioridad en la línea celular CHO, aunque también podría participar la protein-convetasa furina que tiene una expresión ubicua (Sathyamurthy et al., 2015; Chavez et al., 1996; B. Brar et al., 1997).

Las protein-convertasas PC1/3 y PC2 son dos serina proteasas que participan activamente en la derivación de moléculas péptidas de precursores proteicos de mayor tamaño a través de endoproteólisis dirigida hacia sitios dibásicos dentro de la secuencia de la molécula precursora (Thomas et al., 1991).

Ambas enzimas son sintetizadas como un precursor de un mayor peso molecular cuya activación requiere la remoción del péptido señal y del prosegmento. El proceso de escisión de estas secuencias es realizado de forma autocatalítica en ambas enzimas; que también contienen otros sitios susceptibles a proteólisis que son los responsables de la existencia de péptidos de menor tamaño de los cuales algunos conservan la actividad catalítica. Además de la derivación endoproteica a la que están expuestas PC1/3 y PC2, ambas enzimas contienen sitios para N- glicosilación, y para O-glicosilación solo en PC2, que en conjunto con otras modificaciones postraduccionales también son responsables por pequeñas variaciones en el peso molecular de las diferentes formas activas de ambas enzimas.(N G Seidah et al., 1991; Smeekens & Steiner, 1990).

Desde que fue descrita en 1991, PC1/3 ha sido considerada como una enzima cuya expresión está restringida a células de tejidos nervioso y neuroendócrino en las que existe una vía de secreción regulada(Lee et al., 1999). Esto debido a que tiene un papel muy importante en el procesamiento de precursores peptídicos hacia productos finales o intermedios (Pan et al., 2005).

PC1/3 originalmente es sintetizada como un precursor de 94 kDa que es rápidamente escindido hacia una forma de 87 kDa la cual presenta una actividad enzimática menor a las de las formas activas de menor peso molecular de PC1/3. Un segundo corte en la enzima da lugar a la forma de 74 kDa que también presenta actividad catalítica, y de la cual deriva un péptido de 66 kDa que ha perdido el extremo carboxilo terminal pero que presenta la mayor actividad catalítica. También se ha reportado la existencia de formas menores a 50 kDa presumiblemente inactivas por la pérdida de zonas importantes dentro del dominio catalítico (Benjannet et al., 1993; Y. Zhou & Lindberg, 1993).

En los experimentos de western blot realizados en nuestro laboratorio encontramos que las cepas CHO-WT y CHO-DL1 expresan la enzima PC1/3 en su forma precursora (94 kDa), y las formas de 87, 74 y 66 kDa. El hecho de que todas las formas de PC1/3

reportadas estén presentes en ambas líneas celulares indican de que esta convertasa presenta actividad catalítica ya que la formación de las moléculas derivadas ocurre por procesamiento autocatalítico (Vindrola, 1994).

La expresión PC1/3 tanto del precursor como de sus formas menores parece verse afectada por el porcentaje de suero en el que son cultivadas las células, esto ocurre en la cepa CHO-DL1 y en la cepa silvestre. Sin embargo la disminución es más notoria en la cepa CHO-DL1 probablemente debido a que la sobreexpresión de la molécula de PENK recombinante produce un efecto de atenuación en la expresión de otras proteínas (Scorsone, Panniers, Rowlands, & Henshaw, 1987).

PC2 también es considerada una protein-convertasa neuroendocrina debido a su expresión restringida a estos tejidos donde participa en la derivación de péptidos a partir de precursores proteicos. Además en muchas ocasiones su actividad resulta complementaria o redundante con la de PC1/3 (Nabil G. Seidah et al., 2013; Smeekens & Steiner, 1990).

Como ya se ha mencionado en los antecedentes, la forma completa de la molécula de proPC2 es una proteína cuyo peso molecular se sitúa en los 76 kDa. La forma de 76 kDa puede sufrir un corte en un sitio intermedio del prodominio lo que da origen a una forma truncada (71 kDa) de PC2, debido a que esta forma de PC2 aún contiene parte del prosegmento no presenta actividad catalítica. Cuando PC2 llega a los gránulos secretorios y se encuentra en condiciones óptimas para su actividad, tiene lugar otra proteólisis la cual da lugar a una forma de PC2 con un peso molecular de 62-64 kDa que es enzimáticamente activa. Como sucede con PC1/3, existen formas de PC2 que presentan pesos moleculares menores pero estas son inactivas debido que se forman por escisiones proteicas en el extremo amino terminal del dominio catalítico PC2 (Benjannet et al., 1993; N G Seidah et al., 1991).

Durante su transcurso por la vía secretoria PC2 se encuentra asociada con la proteína 7B2, la cual funciona como una chaperona y asiste en el correcto plegamiento de PC2, además de fungir como un inhibidor de la enzima que evita la activación prematura. La disociación del complejo PC2/7B2 ocurre cuando PC2 se encuentra en condiciones adecuadas para su actividad y es dependiente de un corte proteico que realiza PC2 en

7B2 para permitir la separación del complejo proteico (Lindberg et al., 1995; Pan et al., 2005; Van Horssen et al., 1995).

Los resultados que obtuvimos en el análisis de la expresión de PC2 en las cepas CHO-WT y CHO-DL1 fueron positivos. En estas células encontramos bandas con pesos moleculares que corresponden con las formas del precursor (76 kDa), la forma truncada (71kDa) y la forma activa (62-64 kDa). Como el procesamiento de estas formas de PC2 también se realiza de forma autocatalítica, la presencia de estos péptidos es un indicador indirecto de la actividad de la enzima.

El porcentaje de SFB al que son cultivadas las células también afecta la expresión de PC2. En la cepa CHO-DL1 existe una disminución de los niveles de expresión de PC2 en todas sus formas cuando las células son cultivadas a bajos niveles de suero. Algo diferente ocurre en las células de la cepa silvestre, en éstas la expresión de PC2 se ve incrementada ligeramente cuando las células son incubadas en condiciones de bajo suero esta situación se observa tanto para el precursor como para las formas de 71 y 62-64 kDa. Como se propone para la expresión de PC1/3, esta situación podría estar asociada a cambios en la síntesis proteica relacionada al crecimiento en un medio con bajo suero así como al efecto de atenuación que produce la sobreexpresión de PENK.(Scorsone et al., 1987)

A pesar de que en el presente trabajo no se analizó, la expresión de la chaperona 7B2, la presencia de la forma de PC2 de 62-64 kDa hace suponer que el proceso de maduración de PC2 se lleva a cabo de forma completa y corresponde con el hecho de que la expresión de esta forma de PC2 sigue las tendencias de disminución o incremento que se observan en la cepa CHO-DL1 y en la cepa silvestre, respectivamente (Braks & Martens, 1994; Rehfeld et al., 2002).

Como una conclusión general de esta primera parte, podemos afirmar que las células CHO-WT y CHO-DL1, que no tienen la vía de secreción regulada característica de los sistemas nervioso y neuroendócrino, expresan las formas precursoras y activas de las convertasas PC1/3 y PC2.

Furina también es una serina proteasa que pertenece a la familia de las protein-convertasas y la primera descrita en eucariotas superiores. A diferencia del resto de los

integrantes de la familia su expresión parece no estar restringida y se expresa de forma ubicua en las células (Roebroek et al., 1994; van Den Ouweland et al., 1990).

Como ocurre con otros miembros de esta familia de enzimas, furina es sintetizada en forma de un precursor con un peso molecular de 110 kDa. Posteriormente ocurre la primera escisión proteica que separa el prodominio de la enzima dando lugar a una forma de furina con un peso de 98 kDa la cual es la forma madura activa de furina. Una de las principales características de esta enzima es que contiene un dominio transmembranal, en las formas precursora y madura activa, lo que la convierte en una proteína integral de membrana que realiza sus funciones en el TGN. Por el contrario, la forma soluble de furina de 80-82 kDa se origina por la proteólisis del dominio transmembranal aún presenta actividad enzimática (van de Ven et al., 1990)

En nuestros experimentos encontramos que las cepas CHO-DL1 y CHO-WT expresan las tres formas de Furina. Además encontramos que existe una diferencia en los niveles de expresión de esta enzima entre las distintas cepas utilizadas que también se ve afectada por el porcentaje de SFB que contiene el medio en el que son cultivadas. En las células CHO-DL1 la expresión de esta enzima disminuye cuando son cultivadas en un bajo porcentaje de suero, esta tendencia se observa para las tres formas analizadas de furina y podría ser atribuida a la sobreexpresión de PENK en esta cepa. De forma contraria, al analizar la concentración de esta convertasa en la cepa silvestre cuando se cultiva a diferentes porcentajes de suero no se encuentra un cambio significativo para la expresión de la forma activa de 98 kDa en las células a baja concentración con respecto a las cultivadas en condiciones normales. Y en el caso del precursor y de la forma citosólica o soluble de Furina existe un aumento de los niveles de expresión de ambas moléculas en células silvestres que han sido cultivadas en un 2% de SFB en comparación con las que han sido cultivadas con un 10% de suero (Scorsone et al., 1987).

La expresión positiva de las tres enzimas en la cepa CHO-DL1 hace suponer que estas convertasas son las que están involucradas en la generación de la molécula de 8.5 kDa en esta línea celular.

Para observar de forma indirecta la actividad de estas enzimas, grupos de células CHO-DL1 fueron transfectadas de forma transitoria por separado con cada uno de los



plásmidos que contienen el cDNA de PC1/3 humana, Furina humana y PC2 de ratón. Después de las transfecciones se analizó la presencia en el medio condicionado de la molécula completa de PENK (32-34 kDa) y del péptido de 8.5 kDa de PENK (Hook et al., 1996).

En las células que fueron transfectadas con furina hubo un incremento considerable de la presencia de las dos moléculas secretadas respecto a las células transfectadas con el plásmido control (plásmido vacío); pero el mayor aumento fue para la forma de PENK 32-34 kDa. Estos resultados indican que Furina puede actuar sobre PENK para generar el péptido de 8.5 kDa pero sería un proceso que ocurriría lentamente o con baja afinidad (Hosaka et al., 1991). Cuando las células CHO-DL1 fueron transfectadas con el plásmido que contiene el cDNA de PC1/3 también hubo un aumento de la presencia de la molécula 8.5 kDa en el medio sobrenadante con respecto a la secreción de las células transfectadas con el plásmido control. Y de forma contraria, se observó una tendencia a la disminución de la molécula de 32-34 kDa de PENK. Estos resultados apuntan a que esta disminución de la concentración de la molécula de 32-34 kDa podría deberse a un aumento del procesamiento hacia el péptido de 8.5 kDa como resultado de la actividad de PC1/3. Además, el incremento del péptido de 8.5 kDa sería un indicador indirecto de que en las células CHO-DL1 la enzima PC1/3 cuenta con las condiciones adecuadas para su maduración y para realizar su actividad catalítica (Breslin et al., 1993; Vindrola et al., 1994). En el caso de las células transfectadas con el plásmido que contiene el cDNA de PC2, se encontraron resultados similares a los observados con pPC1/3, pero la presencia del péptido de 8.5 kDa en el medio sobrenadante de estas células fue mayor a la de las células transfectadas con PC1/3. Además encontramos una mayor disminución de la presencia de la molécula de 32-34 kDa en el medio de secreción que con células que fueron transfectadas con el plásmido de PC2; lo que indicaría que en las células CHO-DL1 la protein-convertasa PC2 tiene un papel más importante en la generación del péptido de 8.5 kDa derivado de PENK de 32-34 kDa (B. K. Brar & Lowry, 1999; Johanning et al., 1998; Pan et al., 2006; Peinado et al., 2003).

## 10. Conclusiones

- ◆ Las células CHO-WT y CHO-DL1 (que sobreexpresa PENK recombinante) expresan las formas de la convertasa Furina: precursor de 110 kDa, madura activa de 98 kDa y soluble de 80-82 kDa.
- ◆ En las células CHO-DL1 y en la cepa silvestre se encuentran las formas de PC1/3 de 97, 87 y 66 kDa reportadas en otros trabajos. La presencia de las formas de 87 y 66 kDa es indicador indirecto de la actividad de PC1/3 debido a que estas formas se derivan por un proceso autocatalítico.
- ◆ La presencia de las formas de PC2 con pesos moleculares de 76, 71 y 64 kDa en las células CHO-DL1 y la cepa silvestre, hacen suponer que esta enzima puede presentar actividad catalítica necesaria para la escisión de su propio prodominio. Además de ser un indicador de la existencia de condiciones apropiadas para la activación de esta enzima en las células CHO.
- ◆ Los niveles de expresión de estas enzimas se ven afectados por el porcentaje de suero en el que son cultivadas las células. En células de la cepa silvestre cultivadas en bajas condiciones de suero hay un incremento de la expresión de Furina y muy ligeramente de PC2.
- ◆ En las células CHO-DL1 las protein-convertasas Furina, PC2 y PC1/3 están involucradas en la generación del péptido de 8.5 kDa derivado de PENK de 32-34 kDa en el medio sobrenadante. Los experimentos realizados por transfección transitoria de estas enzimas indican que PC2 tiene una mayor actividad para la generación de dicho péptido.

## 11. Bibliografía

- Acevo, P. S. (2014). *Inhibición de la liberación de las moléculas de Proencefalina de 32-34 kDa y 8.6 kDa mediante un posible mecanismo de exofagia/autofagia en células CHO-DL1*. Benemerita Universidad Autónoma de Puebla.
- Artenstein, A. W., & Opal, S. M. (2011). Proprotein convertases in health and disease. *The New England Journal of Medicine*, 365(26), 2507–18. <http://doi.org/10.1056/NEJMra1106700>
- Benjannet, S., Rondeau, N., Paquet, L., Boudreault, a, Lazure, C., Chrétien, M., & Seidah, N. G. (1993). Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone convertases PC1 and PC2: glycosylation, sulphation and identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and P. *The Biochemical Journal*, 294 ( Pt 3(1 993), 735–743.
- Böttger, A., & Spruce, B. a. (1995). Proenkephalin is a nuclear protein responsive to growth arrest and differentiation signals. *Journal of Cell Biology*, 130(6), 1251–1262. <http://doi.org/10.1083/jcb.130.6.1251>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Braks, J. a M., & Martens, G. J. M. (1994). 7B2 is a neuroendocrine chaperone that transiently interacts with prohormone convertase PC2 in the secretory pathway. *Cell*, 78(2), 263–273. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90296-8](http://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90296-8)
- Brar, B. K., & Lowry, P. J. (1999). The differential processing of proenkephalin A in mouse and human breast tumour cell lines. *The Journal of Endocrinology*, 161(3), 475–484.
- Brar, B., Sanderson, T., Wang, N., & Lowry, P. J. (1997). Post-translational processing of human procorticotrophin-releasing factor in transfected mouse neuroblastoma and Chinese hamster ovary cell lines. *The Journal of Endocrinology*, 154(3), 431–440.

- Breslin, M. B., Lindberg, I., Benjannet, S., Mathis, J. P., Lazure, C., & Seidah, N. G. (1993). Differential processing of proenkephalin by prohormone convertases 1(3) and 2 and furin. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(36), 27084–27093.
- Chang, S., Girod, R., Morimoto, T., O'Donoghue, M., & Popov, S. (1998). Constitutive secretion of exogenous neurotransmitter by nonneuronal cells: implications for neuronal secretion. *Biophysical Journal*, *75*(3), 1354–1364. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)74053-6](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)74053-6)
- Chavez, R. a., Miller, S. G., & Moore, H. P. H. (1996). A biosynthetic regulated secretory pathway in constitutive secretory cells. *Journal of Cell Biology*, *133*(6), 1177–1191. <http://doi.org/10.1083/jcb.133.6.1177>
- Condon, R. G. G., Schaefer, E. J., Santoro, M., Longley, R., Tsao, Y.-S., Zurawski, S. M., & Liu, Z. (2003). Development of a Chinese hamster ovary cell line for recombinant adenovirus-mediated gene expression. *Biotechnology Progress*, *19*(1), 137–143.
- Costa, E., Mocchetti, I., Supattapone, S., & Snyder, S. H. (1987). Opioid peptide biosynthesis: enzymatic selectivity and regulatory mechanisms. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *1*(1), 16–21.
- Di Cera, E. (2009). Serine proteases. *IUBMB Life*, *61*(5), 510–5. <http://doi.org/10.1002/iub.186>
- Eipper, B. A. (2014). *Posttranslational Modification of Proteins: Expanding Nature's Inventory*. *Posttranslational Modification of Proteins: Expanding Nature's Inventory by Christopher T. Walsh Review by: By Betty A. Eipper The Quarterly Review of Biology*, Vol. 83, University Of Chicago.
- Hattori, M. (2005). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme*, *50*(2), 162–168. <http://doi.org/10.1038/nature03001>
- Henrich, S., Lindberg, I., Bode, W., & Than, M. E. (2005). Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: Explanation of their specificity.

*Journal of Molecular Biology*, 345(2), 211–227.  
<http://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.050>

Hook, V. Y., Schiller, M. R., & Azaryan, A. V. (1996). The processing proteases prohormone thiol protease, PC1/3 and PC2, and 70-kDa aspartic proteinase show preferences among proenkephalin, proneuropeptide Y, and proopiomelanocortin substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 328(1), 107–114.  
<http://doi.org/10.1006/abbi.1996.0149>

Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W. S., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., ... Nakayama, K. (1991). Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 266(19), 12127–12130.

Hoshino, A., & Lindberg, I. (2012). *Peptide Biosynthesis: Prohormone Convertases 1/3 and 2. Colloquium Series on Neuropeptides* (Vol. 1). Morgan & Claypool Life Sciences. <http://doi.org/10.4199/C00050ED1V01Y201112NPE001>

Hsi, K. L., Seidah, N. G., De Serres, G., & Chrétien, M. (1982). Isolation and NH<sub>2</sub>-terminal sequence of a novel porcine anterior pituitary polypeptide. Homology to proinsulin, secretin and Rous sarcoma virus transforming protein TVFV60. *FEBS Letters*, 147(2), 261–266. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)81055-7](http://doi.org/10.1016/0014-5793(82)81055-7)

Jayapal, K. P., Wlaschin, K. F., Hu, W.-S. H., & Yap, M. G. S. (2007). Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells — 20 Years and Counting. *CEP Magazine*, 40–47. Retrieved from [http://pef.aibn.uq.edu.au/wordpress/wp-content/blogs.dir/1/files/Support/Mammalian/Literature/Recombinant\\_Protein\\_Therapeutics\\_from\\_CHO\\_Cells-20\\_years\\_and\\_counting\\_Jayapal.pdf](http://pef.aibn.uq.edu.au/wordpress/wp-content/blogs.dir/1/files/Support/Mammalian/Literature/Recombinant_Protein_Therapeutics_from_CHO_Cells-20_years_and_counting_Jayapal.pdf)

Johanning, K., Juliano, M. A., Juliano, L., Lazure, C., Lamango, N. S., Steiner, D. F., & Lindberg, I. (1998). Specificity of prohormone convertase 2 on proenkephalin and proenkephalin-related substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 273(35), 22672–22680. <http://doi.org/10.1074/jbc.273.35.22672>

Lander, E. S. (2011). Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*, 470(7333), 187–197. <http://doi.org/10.1038/nature09792>

- Lee, Y. C., Damholt, a. B., Billestrup, N., Kisbye, T., Galante, P., Michelsen, B., ... Nielsen, J. H. (1999). Developmental expression of proprotein convertase 1/3 in the rat. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 155(1-2), 27–35. [http://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00119-7](http://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00119-7)
- Lindberg, I., Shaw, E., Finley, J., Leone, D., & Deininger, P. (1991). Posttranslational modifications of rat proenkephalin overexpressed in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology*, 128(4), 1849–1856. <http://doi.org/10.1210/endo-128-4-1849>
- Lindberg, I., van den Hurk, W. H., Bui, C., & Batie, C. J. (1995). Enzymatic characterization of immunopurified prohormone convertase 2: potent inhibition by a 7B2 peptide fragment. *Biochemistry*, 34(16), 5486–5493. <http://doi.org/10.1021/bi00016a020>
- Liston, D. R., Vanderhaeghen, J. J., & Rossier, J. (1983). Presence in brain of synenkephalin, a proenkephalin-immunoreactive protein which does not contain enkephalin. *Nature*, 302(5903), 62–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6687489>
- Lu, W. D., Liu, T., Li, S., Woods, V. L., & Hook, V. (2012). The prohormone proenkephalin possesses differential conformational features of subdomains revealed by rapid H-D exchange mass spectrometry. *Protein Science*, 21(2), 178–187. <http://doi.org/10.1002/pro.2000>
- Marcinkiewicz, M., Ramla, D., Seidah, N. G., & Chrétien, M. (1994). Developmental expression of the prohormone convertases PC1 and PC2 in mouse pancreatic islets. *Endocrinology*, 135(4), 1651–60. <http://doi.org/10.1210/endo.135.4.7925129>
- Metters, K. M., & Rossier, J. (1987). Affinity purification of synenkephalin-containing peptides, including a novel 23.3-kilodalton species. *Journal of Neurochemistry*, 49(3), 721–728.
- Mizuno, K., Nakamura, T., Ohshima, T., Tanaka, S., & Matsuo, H. (1989). Characterization of KEX2-encoded endopeptidase from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 159(1), 305–311. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)92438-8](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(89)92438-8)

- Modrek, B., & Lee, C. (2002). A genomic view of alternative splicing. *Nature Genetics*, 30(1), 13–19. <http://doi.org/10.1038/ng0102-13>
- Nakagawa, T., Murakami, K., & Nakayama, K. (1993). Identification of an isoform with an extremely large Cys-rich region of PC6, a Kex2-like processing endoprotease. *FEBS Letters*, 327(2), 165–171. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80163-O](http://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80163-O)
- Nakayama Kim, W.-S., Torii, S., Hosaka, M., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Baba, T., K., & Murakami, K. (1992). Identification of the fourth member of the mammalian endoprotease family homologous to the yeast Kex2 protease. *J. Biol. Chem.*, 267, 5897–5900.
- Pan, H., Che, F. Y., Peng, B., Steiner, D. F., Pintar, J. E., & Fricker, L. D. (2006). The role of prohormone convertase-2 in hypothalamic neuropeptide processing: A quantitative neuropeptidomic study. *Journal of Neurochemistry*, 98(6), 1763–1777. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04067.x>
- Pan, H., Nanno, D., Che, F. Y., Zhu, X., Salton, S. R., Steiner, D. F., ... Devi, L. a. (2005). Neuropeptide processing profile in mice lacking prohormone convertase-1. *Biochemistry*, 44(12), 4939–4948. <http://doi.org/10.1021/bi047852m>
- Peinado, J. R., Li, H., Johanning, K., & Lindberg, I. (2003). Cleavage of recombinant proenkephalin and blockade mutants by prohormone convertases 1 and 2: An in vitro specificity study. *Journal of Neurochemistry*, 87(4), 868–878. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02043.x>
- Polgár, L. (2005). The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(19-20), 2161–2172. <http://doi.org/10.1007/s00018-005-5160-x>
- Rehfeld, J. F., Lindberg, I., & Friis-Hansen, L. (2002). Progastrin processing differs in 7B2 and PC2 knockout animals: A role for 7B2 independent of action on PC2. *FEBS Letters*, 510(1-2), 89–93. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03234-3](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03234-3)
- Richards, F. M. (1958). on the Enzymic Activity of Subtilisin-Modified Ribonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(2), 162–166. <http://doi.org/10.1073/pnas.44.2.162>
- Rodriguez Vida, M. I., Kleid, M. C., Ase, A., Finkielman, S., Nahmod, V. E., & Vindrola,

- O. (1994). Synenkephalin processing in embryonic rat brain. *Developmental Brain Research*, 77(2), 151–156. [http://doi.org/10.1016/0165-3806\(94\)90191-0](http://doi.org/10.1016/0165-3806(94)90191-0)
- Roebroek, a J., Creemers, J. W., Ayoubi, T. a, & Van de Ven, W. J. (1994). Furin-mediated proprotein processing activity: involvement of negatively charged amino acid residues in the substrate binding region. *Biochimie*, 76(3-4), 210–216. [http://doi.org/10.1016/0300-9084\(94\)90148-1](http://doi.org/10.1016/0300-9084(94)90148-1)
- Rossier, J., Audigier, Y., Ling, N., Cros, J., & Udenfriend, S. (1980). Met-enkephalin-Arg6-Phe7, present in high amounts in brain of rat, cattle and man, is an opioid agonist. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/288088a0>
- Rouillé, Y., Duguay, S. J., Lund, K., Furuta, M., Gong, Q., Lipkind, G., ... Steiner, D. F. (1995). Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Frontiers in Neuroendocrinology*. <http://doi.org/10.1006/frne.1995.1012>
- Saravia, F., Ase, A., Aloyz, R., Kleid, M. C., Ines, M., Vida, R., ... Vindrola, O. (1993). Differential posttranslational processing of proenkephalin in rat bone marrow and spleen mononuclear cells: evidence for synenkephalin cleavage. *Endocrinology*, 132(4), 1431–7. <http://doi.org/10.1210/endo.132.4.8462445>
- Sathyamurthy, M., Kim, C. L., Bang, Y. L., Kim, Y. S., Jang, J. W., & Lee, G. M. (2015). Characterization and expression of proprotein convertases in CHO cells: Efficient proteolytic maturation of human bone morphogenetic protein-7. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(3), 560–568. <http://doi.org/10.1002/bit.25458>
- Sayah, M., Fortenberry, Y., Cameron, a., & Lindberg, I. (2001). Tissue distribution and processing of proSAAS by proprotein convertases. *Journal of Neurochemistry*, 76(6), 1833–1841. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00165.x>
- Scorsone, K. A., Panniers, R., Rowlands, A. G., & Henshaw, E. C. (1987). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 during physiological stresses which affect protein synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(30), 14538–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3667588>
- Seidah, N. G. (2011). What lies ahead for the proprotein convertases? *Annals of the*



*New York Academy of Sciences*, 1220(1), 149–161. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05883.x>

Seidah, N. G., Gaspar, L., Mion, P., Marcinkiewicz, M., Mbikay, M., & Chrétien, M. (1990). cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA and Cell Biology*, 9(10), 789. <http://doi.org/10.1089/dna.1990.9.415>

Seidah, N. G., Marcinkiewicz, M., Benjannet, S., Gaspar, L., Beaubien, G., Mattei, M. G., ... Chrétien, M. (1991). Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 5(1), 111–122. <http://doi.org/10.1210/mend-5-1-111>

Seidah, N. G., Mayer, G., Zaid, A., Rousselet, E., Nassoury, N., Poirier, S., ... Prat, A. (2008). The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(6-7), 1111–1125. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.01.030>

Seidah, N. G., & Prat, A. (2002). Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu. *Essays in Biochemistry*, 38, 79–94.

Seidah, N. G., & Prat, A. (2012). The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(5), 367–383. <http://doi.org/10.1038/nrd3699>

Seidah, N. G., Sadr, M. S., Chrétien, M., & Mbikay, M. (2013). The multifaceted proprotein convertases: Their unique, redundant, complementary, and opposite functions. *Journal of Biological Chemistry*, 288(30), 21473–21481. <http://doi.org/10.1074/jbc.R113.481549>

Siezen, R. J., Creemers, J. W. M., & Van De Ven, W. J. M. (1994). Homology modelling of the catalytic domain of human furin. A model for the eukaryotic subtilisin-like proprotein convertases. *European Journal of Biochemistry*, 222(2), 255–266. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18864.x>

- Smeeckens, S. P., Avruch, S., LaMendola, J., Chan, S. J., & Steiner, D. F. (1991). Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(2), 340–344. <http://doi.org/10.1073/pnas.88.2.340>
- Smeeckens, S. P., & Steiner, D. F. (1990). Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *The Journal of Biological Chemistry*, *265*(6), 2997–3000. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2154467>
- Steiner, D. F., Cunningham, D., Spigelman, L., & Aten, B. (1967). Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science (New York, N.Y.)*, *157*(789), 697–700. <http://doi.org/10.1126/science.157.3789.697>
- Stell, W. K., Chaminade, M., Metters, K. M., Rougeot, C., Dray, F., & Rossier, J. (1990). Detection of synenkephalin, the amino-terminal portion of proenkephalin, by antisera directed against its carboxyl terminus. *Journal of Neurochemistry*, *54*(2), 434–443.
- Thomas, L., Leduc, R., Thorne, B. a, Smeeckens, S. P., Steiner, D. F., & Thomas, G. (1991). Kex2-like endoproteases PC2 and PC3 accurately cleave a model prohormone in mammalian cells: evidence for a common core of neuroendocrine processing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(12), 5297–5301. <http://doi.org/10.1073/pnas.88.12.5297>
- Trejo, M., Asai, M., Matamoros-trejo, G., Linares, G., & Agustín, P. (2000). Procesamiento postraduccion de la porción no opioide de la proencefalina ( Synencefalina ) en el cerebro de la rata. *Salud Mental*, *23*, 13–19.
- Turpeinen, H., Ortutay, Z., & Pesu, M. (2013). Genetics of the first seven proprotein convertase enzymes in health and disease. *Curr.Genomics*, *14*(1389-2029 (Print)), 453–467. <http://doi.org/10.2174/1389202911314050010>
- Urlaub, G., & Chasin, L. a. (1980). Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proceedings of the National Academy of*

*Sciences of the United States of America*, 77(7), 4216–4220. <http://doi.org/VL-77>

- van de Ven, W. J., Voorberg, J., Fontijn, R., Pannekoek, H., van den Ouweland, A. M., van Duijnhoven, H. L., ... Siezen, R. J. (1990). Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Molecular Biology Reports*, 14(4), 265–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2094803>
- van Den Ouweland, A. M. W., van Duijnhoven, H. L. P., Keizer, G. D., Dorssers, L. C., & van de Ven, W. J. M. (1990). Structural homology between the human fur gene product and the subtilisin-like protease encoded by yeast KEX2. *Nucleic Acids Research*, 18(3), 664. <http://doi.org/10.1093/nar/18.3.664>
- Van Horssen, a. M., Van Den Hurk, W. H., Bailyes, E. M., Hutton, J. C., Martens, G. J. M., & Lindberg, I. (1995). Identification of the region within the neuroendocrine polypeptide 7B2 responsible for the inhibition of prohormone convertase PC2. *Journal of Biological Chemistry*. <http://doi.org/10.1074/jbc.270.24.14292>
- Velazquez, I. Q. (2003). *Producción, purificación y secuenciación de proencefalina recombinante utilizando el metodo de transfeccion estable de cDNA en células CHO*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Vindrola, O. (1994). Rapid cleavage of the endogenous PC3 prosegment and slow conversion to 74 kDa and 66 kDa proteins in AtT-20 cells. *Neuropeptides*, 27(2), 109–120. [http://doi.org/10.1016/0143-4179\(94\)90051-5](http://doi.org/10.1016/0143-4179(94)90051-5)
- Vindrola, O., Chervin, a, Vitale, M., Mella, a N., Aloyz, R., & Basso, a. (1998). Elevated proenkephalin-derived peptide levels in ACTH-producing adenomas: nucleus and cytoplasm localization. *Endocrine*, 8(3), 231–240. <http://doi.org/10.1385/ENDO:8:3:231>
- Vindrola, O., Mayer, A. M., Citera, G., Spitzer, J. A., & Espinoza, L. R. (1994). Prohormone convertases PC2 and PC3 in rat neutrophils and macrophages. Parallel changes with proenkephalin-derived peptides induced by LPS in vivo. *Neuropeptides*, 27(4), 235–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7808596>

- Vindrola, O., Padros, M. R., Sterin-Prync, a., Ase, a., Finkielman, S., & Nahmod, V. (1990). Proenkephalin system in human polymorphonuclear cells. Production and release of a novel 1.0-kD peptide derived from synenkephalin. *Journal of Clinical Investigation*, 86(2), 531–537. <http://doi.org/10.1172/JCI114740>
- Vishnuvardhan, D., Connolly, K., Cain, B., & Beinfeld, M. C. (2000). PC2 and 7B2 null mice demonstrate that PC2 is essential for normal pro-CCK processing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273(1), 188–191. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2915>
- von Eggelkraut-Gottanka, R., & Beck-Sickinger, A. G. (2004). Biosynthesis of peptide hormones derived from precursor sequences. *Current Medicinal Chemistry*, 11(20), 2651–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15544467>
- Westphal, C. H., Muller, L., Zhou, a, Zhu, X., Bonner-Weir, S., Schambelan, M., ... Leder, P. (1999). The neuroendocrine protein 7B2 is required for peptide hormone processing in vivo and provides a novel mechanism for pituitary Cushing's disease. *Cell*, 96(5), 689–700. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80579-6](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80579-6)
- Zhou, a, Webb, G., Zhu, X., & Steiner, D. F. (1999). Proteolytic processing in the secretory pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(30), 20745–20748. <http://doi.org/10.1074/jbc.274.30.20745>
- Zhou, Y., & Lindberg, I. (1993). Purification and characterization of the prohormone convertase PC1(PC3). *Journal of Biological Chemistry*, 268(8), 5615–5623.