

I. Introducción

I.1. Las proteasas y su clasificación

Las enzimas proteolíticas o proteasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas. Una de las características más importantes de las proteasas es su alta especificidad. El hecho de que un enlace peptídico sea hidrolizado o no por una proteasa depende de varios factores, entre ellos, la secuencia de aminoácidos alrededor del enlace, ya que la mayoría reconocen aminoácidos o secuencias específicas. Otro requisito para tenga lugar la hidrólisis es la accesibilidad estérica del enlace, de manera que si éste se encuentra en el interior hidrofóbico de las proteínas globulares o en zonas hidrofóbicas poco accesibles, no podrá ser atacado por la proteasa a menos que se produzca una desestructuración de la proteína que aumente la accesibilidad. Por último, se han de considerar las condiciones físico-químicas del medio, dado que las proteasas presentan un rendimiento óptimo a unas determinadas condiciones de pH, fuerza iónica, temperatura y presencia de factores orgánicos y/o metálicos.

De forma genérica, el mecanismo catalítico de una proteasa suele consistir en la polarización del enlace peptídico por el ataque nucleofílico sobre el enlace carbono-oxígeno y la donación paralela de un protón al átomo de nitrógeno (figura I.1). Cada tipo de proteasa cuenta con residuos específicos que cumplen las funciones de nucleófilos y de donadores de protones.

Las proteasas pueden clasificarse en base a diferentes criterios: especificidad de sustrato, mecanismo catalítico, localización intracelular, función en el organismo, etc. Una de las clasificaciones de las proteasas es la descrita por Barret y Rawlings (1993) y se basa en el mecanismo catalítico de las proteasas. De este modo, podemos encontrar serina proteasas, cisteína proteasas, aspártico proteasas, metaloproteasas y proteasas de mecanismo catalítico desconocido.

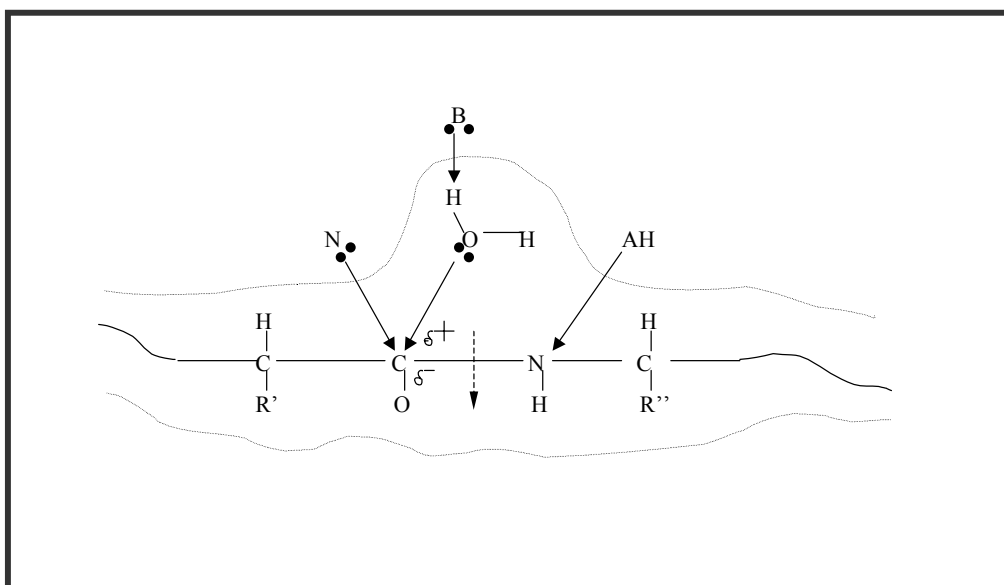


Figura I.1. Mecanismo general de hidrólisis enzimática del enlace peptídico. El ataque sobre el carbono del grupo carbonilo se produce directamente por un grupo nucleófilo (N) o bien por acción de una base (B) a través de una molécula de agua, y se combina con la donación de un protón, por parte de AH sobre el átomo de nitrógeno. Modificado de Vendrell, (1987).

En la familia de las **serina proteasas**, el protón que ha de ser donado es captado secuencialmente por residuos del centro activo: His 57, Asp 102 y Ser 195 (según numeración de la quimotripsina) (Stroud *et al.*, 1975). El diisopropilfluorofosfato (DFP) es un potente inhibidor de estas proteasas y reacciona irreversiblemente con la Ser del centro activo. Este mecanismo catalítico, al igual que la estructura tridimensional del centro activo, muestra gran similitud en todas las serina proteasas estudiadas. Las diferencias de función entre ellas suelen ser atribuidas a cambios de especificidad de sustrato. Así, por ejemplo, la tripsina, la quimotripsina y la elastasa son endoproteasas con estructuras muy parecidas que prácticamente sólo presentan diferencias en el centro de fijación de sustratos. El grupo de las serina proteasas es muy amplio y puede ser dividido en otras subfamilias, de cada una de las cuales se puede tomar un miembro representativo. El grupo de la quimotripsina contiene endoproteasas como tripsina, elastasa, acrosina, calicreína, renina, catepsinas (A,G y R), factores de coagulación (VII, IX, X XI), activador del plasminógeno, trombina, proteína C y factores del sistema del

complemento. Otra subfamilia es la representada por la subtilisina, donde se encuentran además varias endopeptidasas (B, K, R, T), la elastasa alcalina, convertasas (1 y 2), etc. Otros grupos interesantes son las prolil oligopeptidasas y las serina carboxipeptidasas.

Las **cisteína proteasas**, también llamadas sulfidril o tiol proteasas, son sensibles a la inhibición por reactivos bloqueadores de tiol como el yodoacetato. El mecanismo catalítico de este grupo ha sido bien caracterizado en la familia de la papaína, e involucra un residuo Cys y uno His. Otras enzimas pertenecientes a esta subfamilia son la calpaína, la dipeptidil peptidasa, las catepsinas L, S, H, B, etc.

Las **aspártico proteasas**, también denominadas proteasas ácidas o carboxil proteasas, se caracterizan por la presencia de un residuo Asp en el centro activo, por ser endopeptidasas y por su dependencia de un medio de reacción fuertemente ácido. Dentro de este grupo se encuentran las enzimas pepsina, renina, retropepsina (endopeptidasa del virus del SIDA), etc.

Las **metaloproteasas** presentan una gran variedad de estructuras y familias, pero la gran mayoría de ellas depende del zinc para su actividad. En las estructuras conocidas de enzimas de este grupo se ha observado que el átomo metálico presenta tres ligandos con la cadena polipeptídica y el cuarto ligando es una molécula de agua que se activa cuando se inicia el ataque nucleofílico sobre el enlace a hidrolizar. Se conocen hasta 25 familias de metaloproteasas que incluyen subfamilias de endopeptidasas como la de la termolisina, la collagenasa y la astacina, y de exopeptidasas como las carboxipeptidasas y las aminopeptidasas.

Existe un quinto grupo de proteasas en el que se engloban todas aquellas cuyo mecanismo catalítico es desconocido o no se encuadra dentro de las anteriormente descritas. Entre ellas, se encuentra el proteosoma, un complejo macromolecular en forma de barril responsable de la mayor parte de la degradación no lisosomal de proteínas (Coux, 1996; Stuart y Jones, 1997). Se ha encontrado tanto en procariotas como en eucariotas. El proteosoma eucariota, también llamado proteosoma 26 S, está formado por un complejo de 100 kDa y es activo independientemente de ATP. El proteosoma procariota o proteosoma 20 S se asocia en sus extremos con dos estructuras de 19 S llamadas *caps* para dar lugar a un complejo de 2 MDa que hidroliza ATP al proteolizar sus sustratos. El proteosoma se clasifica dentro de una familia de enzimas descubiertos recientemente llamadas **hidrolasas con el nucleófilo N-terminal** (Lupas *et al.*, 1997). El mecanismo catalítico de estas proteasas es diferente del de la mayoría de

proteasas conocidas. Este mecanismo se expresa en función del entorno proteico en cinco actividades proteásicas diferentes, las más importantes de las cuales son: de tipo tríptico (corte en el extremo carboxiterminal de residuos básicos), de tipo quimotríptico (corte en el extremo carboxiterminal de residuos hidrofóbicos) y una actividad hidrolítica de péptidos peptidilglutamil (PGPH, corte en el extremo carboxiterminal de residuos ácidos). De esta forma, el proteosoma puede hidrolizar prácticamente cualquier enlace peptídico de las proteínas sustrato. La disposición de los diferentes centros activos le permiten cortar las proteínas cada 6 a 9 residuos.

I.2. Las metalocarboxipeptidasas

Las metalocarboxipeptidasas son carboxipeptidasas que cuentan con un átomo de Zn^{2+} directamente involucrado en la catálisis. Según la clasificación de las metaloproteasas de Rawlings y Barrett (1995), éstas constituyen la familia M14, con la carboxipeptidasa A1 como enzima representativo. Las proteínas de esta familia se pueden clasificar según su especificidad para el sustrato. Así, encontramos el grupo de enzimas "carboxipeptidasa A-like", que tienen preferencia por residuos C-terminales hidrofóbicos y el grupo de enzimas "carboxipeptidasa B-like", que escinden sólo los residuos básicos Lys o Arg. Las formas A se pueden dividir en las isoformas A1 y A2, mostrando las segundas preferencia por residuos aromáticos C-terminales (Gardell *et al.*, 1988; Pascual *et al.*, 1989).

Basándonos en la estructura y en la homología de secuencia, la familia M14 también se puede subdividir en dos subfamilias: el grupo de la carboxipeptidasa A y el de la carboxipeptidasa E. El grado de identidad aminoacídica es mayor del 40% dentro de cada subfamilia y entre el 15 y el 20% entre subfamilias. El dominio enzimático de los miembros del grupo de la carboxipeptidasa A es de 310 residuos, mientras que el de la carboxipeptidasa E excede en tamaño en más de 100 residuos. Sólo el grupo de la carboxipeptidasa E tiene miembros con varios dominios estructurales, los cuales suelen sufrir glicosilación.

	6	7	8	19	20	27	28
	01234567890123456789012	901234567890123456	234567890123456789012				
		*	*		*		+
Carboxypeptidase A subfamily							
1	PAIWIDLGIHSREWITQATGVWF	EKAFLSIHSYSQLLLYPY	GIKYSFTFELRD-TGRYGFLLE				
2	PAIWIDTGIHSREWITQASGVWF	IKAFISIHSYSQLLMYPY	GIKYSFTFELRD-TGRYGFLLE				
3	PAIWLDAIHAREWVTOATALWT	VKAFITLHSYSQLLMFPY	GIKYSFTFELRD-TAFYGFLLE				
4	KAIFMDCGIHAREWVSPAFQWF	IKVYITFHSYSQLLMFPY	GIKHTFAFELRD-RGKFGFLLE				
5	PAIFIDCGIHAREWISPAFCQWF	IKAVITLHSYSQMLLYPY	GIKYSFTFELRD-TGFFGFLLE				
6	PIIFIDGGIHAREWIAPSTVTYI	IKVYITFHSYSQLLMYPY	GVKYAYTIELRD-TGNYGFLLE				
7	NAIWIDCGIHAREWISPAFCLWF	IKAYISMHSYSQHIVFPY	GIKYSFTFELRD-TGTYGFLLE				
8	FVVMVESNIHAREWITAATTTYL	IKVYLAHHSYSQLLLYPY	DPIAYTVELRPRDGNNGEQL				
9	BEVLFTCNMHAREHITVEMCLRI	IKTHIDWHTYSELILWPY	KI-WSYTFEMYPKSSSPGFYPR				
10	BEVLYTALHAREHITVEMALYT	IKTLITFTYSELILYPY	KI-FAFTFEMYPSTYNPGFYPR				
Carboxypeptidase H subfamily							
11	PEFKYIGNMHGNEAVGRELLIFL	FVLSANLHGGDLVANYPY	SNCFEITVEL-----SCEKFPF				
12	PEFKYIANMHGNEAVGRELLIYL	FVLSANLHGGDVVANYPY	SNCFEITVEL-----SCDKFPN				
13	PEVKYVGNMHGNEALGREMLQL	FVLSANLHGGAVVANYPY	TNCFEITVEL-----SCDKFPF				
14	PEFKYVANMHGDETVGRELLLHL	FVLSANLHGGALVASYPF	AQCFEITVELSCCKYPREEKLE				
15	PEFKYVANMHGNEVVGKELLIL	FVLSANLHGGSLVANYPF					

Figura I.2. Conservación de secuencia alrededor de los ligandos de zinc y los residuos catalíticos de la familia de la carboxipeptidasa A (M14). Los residuos están numerados de acuerdo con la carboxipeptidasa A bovina. Los asteriscos indican los ligandos de zinc, y el símbolo + indica el residuo catalítico Glu. Los residuos idénticos a la secuencia de carboxipeptidasa A se muestran en blanco sobre negro. Los números corresponden a las siguientes secuencias: 1, carboxipeptidasa A bovina; 2, carboxipeptidasa A1 humana; 3, carboxipeptidasa A2 de rata; 4, carboxipeptidasa A humana; 5, carboxipeptidasa B de rata; 6, carboxipeptidasa de pez astaco; 7, carboxipeptidasa B de plasma; 8, carboxipeptidasa de *Simulium vittatum*; 9, carboxipeptidasa de *Streptomyces capreolus*; 10, carboxipeptidasa de *Thermoactinomyces vulgaris*; 11, carboxipeptidasa E humana; 12, carboxipeptidasa de pez pulmonado; 13, lisina carboxipeptidasa humana; 14, carboxipeptidasa M humana; 15, carboxipeptidasa de *Drosophila melanogaster*. (Rawlings y Barrett, 1995) Nota: en la tabla se utiliza la notación H para referirse a la carboxipeptidasa E.

Una subdivisión alternativa a las dos anteriores es la basada en las funciones fisiológicas en que las enzimas están involucradas. Las **carboxipeptidasas pancreáticas** A1, A2 y B suelen actuar sólo como enzimas digestivas, mientras que el resto de las carboxipeptidasas actúan en otro tipo de procesos fisiológicos más específicos y pueden tomar el nombre genérico de **carboxipeptidasas reguladoras** (Skidgel, 1996), que hace referencia a su actividad proteolítica sobre sustratos como

hormonas o neuropéptidos, o de **carboxipeptidasas básicas**, en referencia a su especificidad para residuos C-terminales Lys o Arg.

I.3. Estructura y mecanismo catalítico de las carboxipeptidasas

Hasta ahora, se han resuelto las estructuras cristalográficas de las procarboxipeptidasas pancreáticas A1, A2 y B (Rees *et al.*, 1983; Schmid *et al.*, 1976; Famming *et al.*, 1991; Coll *et al.*, 1991; Guasch *et al.*, 1992; García-Sáez *et al.*, 1997) y de otras metalocarboxipeptidasas como la carboxipeptidasa T (Teplyakov *et al.*, 1992), G2 (Rowell *et al.*, 1997), etc. La primera y hasta ahora única estructura cristalográfica resuelta de una carboxipeptidasa reguladora se presenta en este trabajo, y corresponde a uno de los dominios de la carboxipeptidasa D.

Tanto en las carboxipeptidasas pancreáticas como en las reguladoras existe una región de unión a sustrato del tipo HXXE...H, donde los tres ligandos de zinc son una histidina, un glutamato situado dos residuos más allá de la histidina y otra histidina localizada a 108 – 135 residuos hacia el C-terminal de la primera histidina. En prácticamente todas las secuencias se encuentran conservados los residuos esenciales para la actividad.

En la carboxipeptidasa A1, la metaloproteasa mejor estudiada, los residuos de unión de zinc son His 69, Glu 72 e His 196. De los estudios cristalográficos, se han definido una serie de aminoácidos como los importantes en la catálisis y la unión a sustrato y pueden ser clasificados en varios subsitios (la lista no es exhaustiva):

- S1': Asn 144, Arg 145 y Tyr 248.
- S1: Arg 127 y Glu 270.
- S2: Arg 71, Ser 197, Tyr 198 y Ser 199.
- S3: Phe 279.
- S4: Glu 122, Arg 124.

El grupo carboxilato terminal del sustrato peptídico es fijado por Asn 144, Arg 145 y Tyr 248, mientras que el grupo carbonilo del enlace peptídico a hidrolizar está cerca de Glu 270, Arg 127 y el zinc. Todos estos residuos están conservados en las carboxipeptidasas digestivas y muchos de ellos también en las reguladoras, encontrándose sólo algunas diferencias importantes en los aminoácidos que definen la especificidad de sustrato o se encuentran en regiones superficiales.

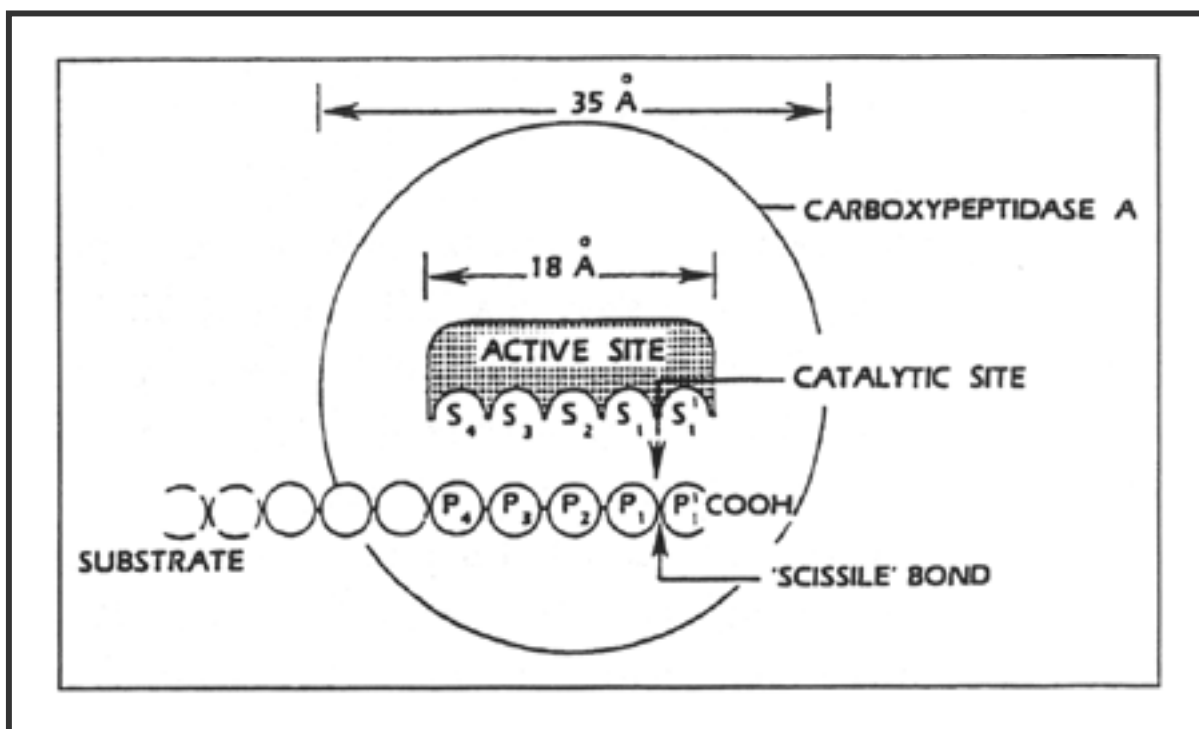


Figura I.3. Esquema del centro activo de la carboxipeptidasa A. Se muestran los cinco subsitios (S_i) deducidos a partir de los estudios cinéticos utilizando sustratos de diferente longitud (P_i) y estructura. Reproducido de McDonald (1985).

I.4. Funciones de las carboxipeptidasas

La escisión del aminoácido C-terminal de una proteína o péptido que llevan a cabo las carboxipeptidasas puede ser un paso de sus procesos de degradación o de procesamiento. Según el tipo y localización de la función fisiológica que desempeñan,

las enzimas de la familia M14 pueden dividirse en 2 grupos: las **carboxipeptidasas digestivas o pancreáticas**, cuya función primaria es actuar en la degradación de las proteínas procedentes de la ingesta y las **carboxipeptidasas reguladoras**, cuyos sustratos son normalmente péptidos activos biológicamente en tejidos y fluidos no digestivos. A pesar de que este criterio de clasificación es el más sencillo y, posiblemente, el menos controvertido, existen otros criterios por los que se ha querido clasificar a este tipo de enzimas. La búsqueda de relaciones evolutivas a partir de comparaciones secuenciales y de las estructuras tridimensionales conocidas nos llevaría, por ejemplo, a la definición de dos familias de enzimas: la formada por las carboxipeptidasas de tipo pancreático (pancreatic-like) y la formada por las enzimas similares a la carboxipeptidasa E. En la primera familia encontraríamos, por ejemplo, a la carboxipeptidasa U, antes definida como reguladora y, desde este punto de vista, con funciones fisiológicas más adecuadas a su clasificación en el segundo grupo. Un criterio de clasificación adicional nos permitiría clasificar a las carboxipeptidasas según su especificidad de sustrato. En este caso, la familia de las “carboxipeptidasas básicas”, con preferencia para la escisión de Lys o Arg C-terminales, contendría algunas formas pancreáticas, la carboxipeptidasa U y todos los miembros de la familia de la carboxipeptidasa E. Para simplificar esta multiplicidad de criterios, en esta Tesis utilizaremos la clasificación más simple comentada al inicio de este párrafo.

Además de las carboxipeptidasas pancreáticas A1, A2 y B y de las reguladoras E y D, a las cuales prestaremos atención más adelante, existen otras carboxipeptidasas reguladoras con funciones diversas, que se describen brevemente a continuación.

La **carboxipeptidasa A de mastocitos** y la **carboxipeptidasa U** (o carboxipeptidasa B de plasma, también denominada TAFI) son las carboxipeptidasas reguladoras con mayor homología estructural con las pancreáticas, siendo el grado de identidad secuencial mayor del 40%. Son las únicas proteínas dentro de este grupo que se sintetizan con un propéptido de la misma longitud que el de las pancreáticas. La primera se encuentra en los gránulos secretores de los mastocitos, donde forma complejos macromoleculares con proteoglicanos. Es una proteína activa que hidroliza sustratos peptídicos en tándem con otras proteasas (Reynolds *et al.*, 1989). La función precisa de esta proteína aún no se conoce del todo, aunque está probablemente relacionada con las condiciones patológicas o de respuesta fisiológica en las que los mastocitos están implicados. La carboxipeptidasa U se encuentra en la sangre como

zimógeno y ha sido identificada como un inhibidor de fibrinolisis activable por trombina (Bajzar *et al.*, 1995), de ahí la denominación de TAFI. El complejo trombina-trombomodulina modula la activación de esta proteína mediante su dominio 3, que es un "epidermal growth factor-like" (Kokame *et al.*, 1998). La carboxipeptidasa U puede estar involucrada en modular la activación del plasminógeno y la tasa de fibrinolisis.

La **carboxipeptidasa T** es aquella hallada en bacterias como *Thermoactinomyces* (Teplyakov *et al.*, 1992).

La **carboxipeptidasa M** fue purificada y caracterizada por primera vez de microvellosidades placentarias (Skidgel, 1989). Está ampliamente distribuida en una gran variedad de tejidos y células y es especialmente abundante en placenta y pulmones. Se encuentra unida a membrana gracias a un ancla de glicosilfosfatidilinositol en la región C-terminal, como demuestra su liberación de la membrana después de un tratamiento con una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (Skidgel, 1996). La localización de la carboxipeptidasa M en membrana sugiere que ésta podría participar en el control de la actividad de hormonas peptídicas en la superficie celular, en la modulación de receptores y en el procesamiento o degradación de proteína extracelular. Entre otros procesos, la carboxipeptidasa M puede estar implicada en el metabolismo de factores de crecimiento debido a su capacidad de generar Arg53-EGF y a la coincidencia de la distribución de la enzima y el factor de crecimiento epidérmico (McGuire y Skidgel, 1995). Puede estar también implicada en funciones de protección de la superficie alveolar en procesos inflamatorios y además puede generar Arg-9-bradiquinina, un péptido capaz de estimular toda una serie de respuestas celulares mediante un cambio en la especificidad del receptor (Nagae *et al.*, 1992).

La **carboxipeptidasa N** es la carboxipeptidasa reguladora más grande que se ha descrito. Se la conoce también por los nombres de quinasa I, arginina carboxipeptidasa, inactivador de anafilotoxina, carboxipeptidasa B de suero, protaminasa, factor convertor de la creatina quinasa y carboxipeptidasa K. Para ser activa, la carboxipeptidasa N necesita la presencia de la subunidad catalítica (50-55 kDa) y de una subunidad glicosilada acompañante de 83 kDa (Erdös, 1979). Se sintetiza en el hígado y se libera a la sangre, donde pueden detectarse altas concentraciones (30 µg/ml). Se cree que esta proteasa protege al organismo de péptidos de potente acción que van a parar al torrente sanguíneo como las quininas y las anafilotoxinas.

La **carboxipeptidasa Z** es una de las metalocarboxipeptidasas más recientemente clonadas y caracterizadas (Song y Fricker, 1997). Tanto la forma humana como la de rata contienen un dominio N-terminal de 100 aminoácidos que muestra un 20-30% de identidad aminoacídica con el dominio “frizzled” que se encuentra en proteínas que interaccionan con Wnt, una proteína involucrada en la polaridad de tejidos en la embriogénesis temprana. Este dominio está altamente conservado en rata y humano. La carboxipeptidasa Z es abundante en placenta y se encuentra en menores cantidades en cerebro, pulmones, timo y riñón. En la tabla I.1 y la figura I.4 se presentan algunos datos estructurales y de homología de la CPZ.

Tabla I.1. Identidad aminoacídica (%) entre CPZ de rata y otras metalocarboxipeptidasas (NA: no analizado).

	Dominio carboxipeptidasa	Proteína
completa		
CPZ humana	91	81
CPE humana	48	41
CPN humana	47	45
CPM humana	37	33
CPD de rata		
Proteína completa	NA	28
Dominio 1	37	NA
Dominio 2	38	NA
Dominio 3	22	NA
CPB de rata	13	12

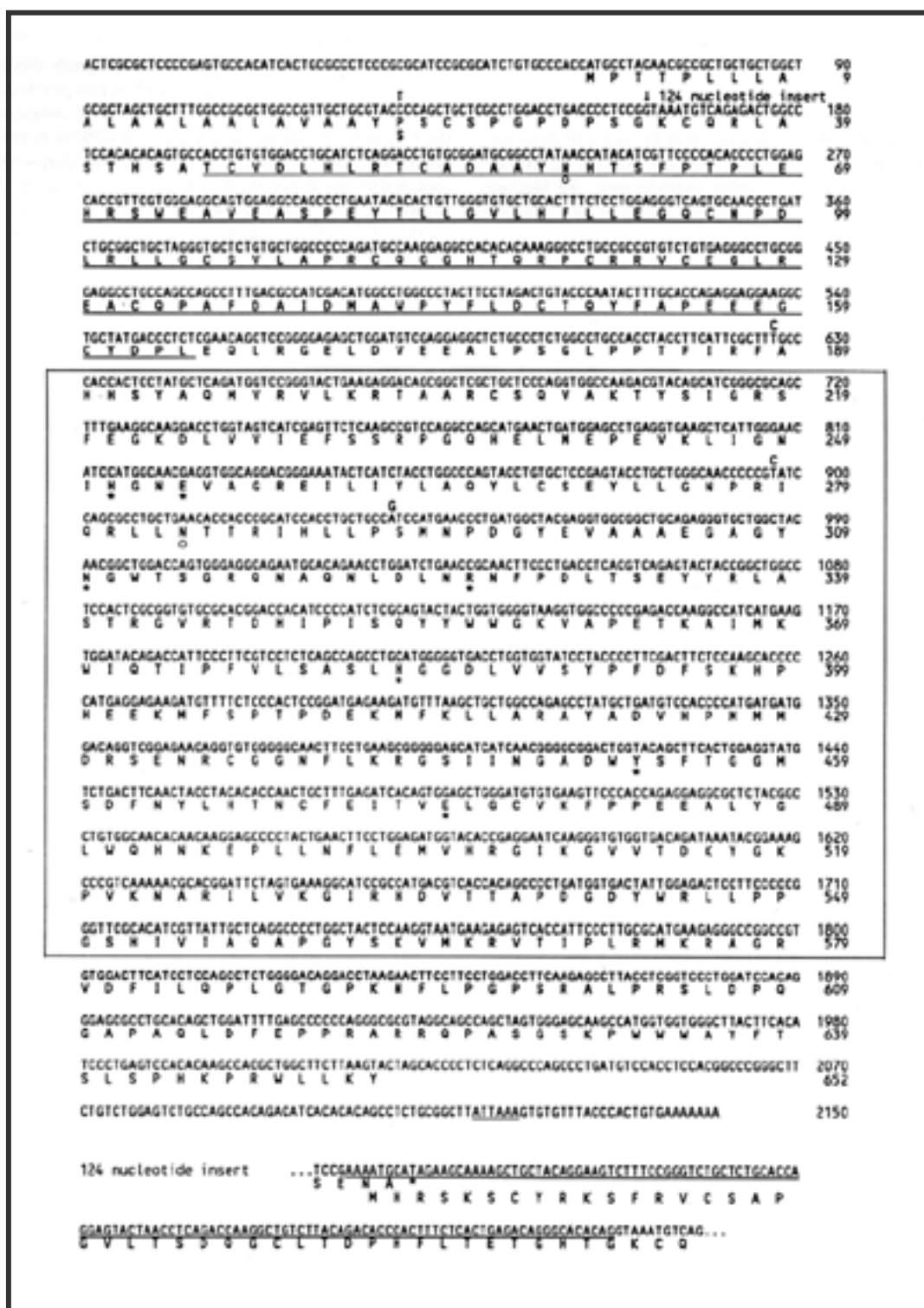


Figura I.4. Arriba: secuencia de CPZ de rata. El dominio "frizzled" se encuentra subrayado y el dominio carboxipeptidasa recuadrado. Los asteriscos indican residuos en posiciones comparables a residuos catalíticos de las carboxipeptidasas A y B. Los lugares de posible N-glicosilación están indicados con un círculo. La secuencia putativa de poliadenilación está subrayada. Abajo: secuencia de una forma alternativa de CPZ con un inserto de 124 nucleótidos (subrayado). Extraído de Xin *et al.* (1998).

Las **carboxipeptidasas X1 y X2** se han identificado recientemente en ratón (Lei *et al.*, 1999; Xin *et al.*, 1998). Las dos proteínas contienen una región N-terminal de 160 aminoácidos secuencialmente similar al dominio de discoidina de otras proteínas. Algunos residuos importantes para la actividad catalítica de otras carboxipeptidasas no se encuentran conservados en éstas. Debido a esto, la carboxipeptidasa X1 no tiene actividad frente a los sustratos estándar para carboxipeptidasas, mientras que para la carboxipeptidasa X2 no se ha detectado actividad en absoluto. La carboxipeptidasa X1 se ha encontrado en numerosos tejidos embrionarios, lo cual sugiere que su función debe estar ligada al desarrollo, posiblemente mediante interacciones celulares vía su dominio de discoidina. La carboxipeptidasa X2 tiene una amplia distribución en el cerebro, donde probablemente actúa más bien como proteína de unión que como enzima activa.

Las carboxipeptidasas pueden tener algunas aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. Por ejemplo, se han usado para producir enzimas con especificidad inversa (Edge *et al.*, 1998) o para generar complejos enzima-anticuerpo con el objeto de utilizarlos para una terapia con enzimas dirigidos por anticuerpos capaces de activar una prodroga en el lugar adecuado (Smith *et al.*, 1997; Wolfe *et al.*, 1999).

I.5.Evolución de las metalocarboxipeptidasas

El nivel de identidad secuencial entre las carboxipeptidasas pancreáticas y el resto es bajo (exceptuando la carboxipeptidasa A de mastocito y la carboxipeptidasa U). Aún así, se observa una conservación de los residuos catalíticamente importantes como: His 69, His 169 y Glu 72, que coordinan el zinc; Arg 145, necesaria para el anclaje del sustrato y Glu 270, Arg 127, Arg 71 y Tyr 248 en los subsitios del centro activo (numeración de la carboxipeptidasa A bovina). Las diferencias de tamaño entre las carboxipeptidasas son debidas a los dominios de unión a membrana o a otros dominios adicionales o repetidos. Se ha propuesto como árbol evolutivo de las metalocarboxipeptidasas el que se muestra en la figura I.6. Los segmentos de activación de las proenzimas pancreáticas, de la carboxipeptidasa A de mastocitos y de la

carboxipeptidasa U tienen 92-95 residuos, el de la carboxipeptidasa E, 5-16 residuos y las carboxipeptidasas N y M no contienen propéptidos. Esto apoyaría la hipótesis de que los segmentos de activación aparecieron al final del proceso de diferenciación evolutiva de las proteasas.

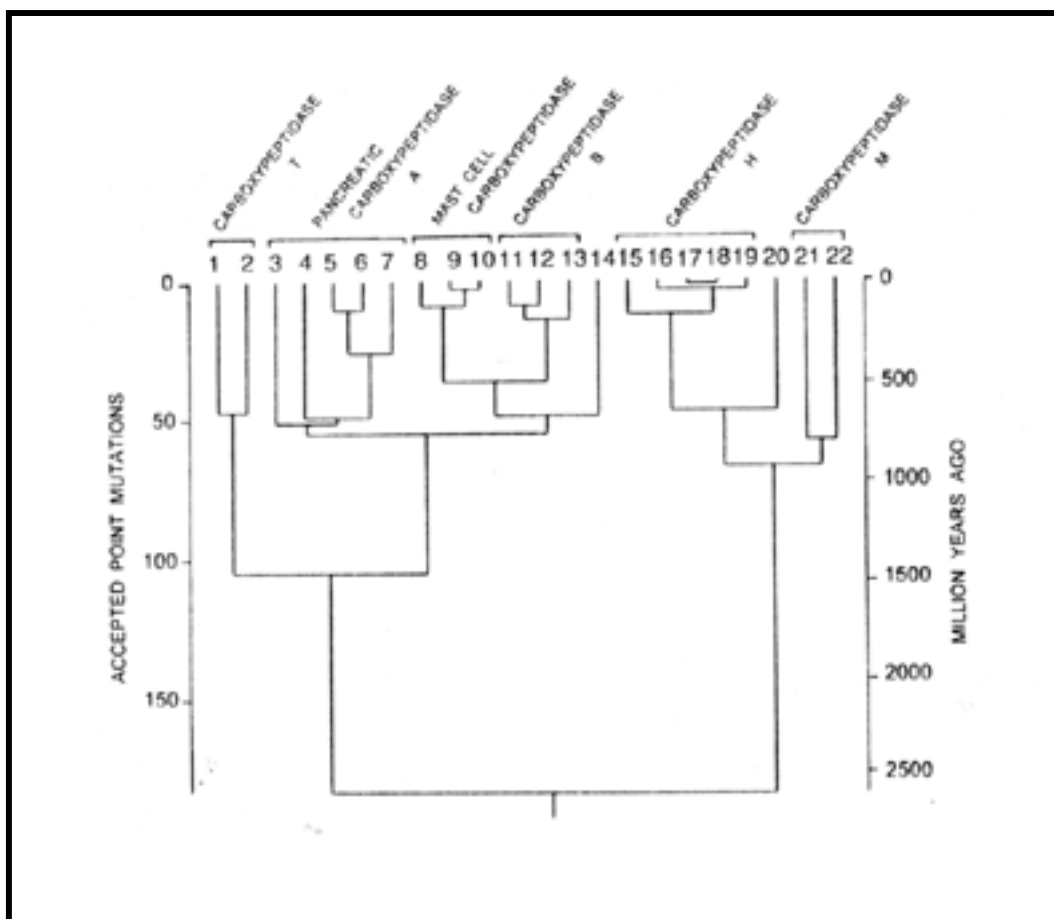


Figura I.5. Árbol filogenético de la familia de la carboxipeptidasa A (M14). 1, carboxipeptidasa T de *Thermoactinomyces*; 2, carboxipeptidasa T de *Streptomyces*; 3 carboxipeptidasa B de pez astaco; 4, carboxipeptidasa A de *Simulium*; 5, carboxipeptidasa A humana; 6, carboxipeptidasa A bovina; 7, carboxipeptidasa A de rata; 8, carboxipeptidasa A de mastocito humana; 9, carboxipeptidasa A de mastocito de rata; 10, carboxipeptidasa A de mastocito de ratón; 11, carboxipeptidasa B bovina; 12, carboxipeptidasa B humana; 13, carboxipeptidasa B de rata; 14, arginina carboxipeptidasa humana; 15, carboxipeptidasa E de pez pulmonado; 16, carboxipeptidasa E humana; 17, carboxipeptidasa E de rata; 18, carboxipeptidasa E de ratón; 19, carboxipeptidasa E bovina; 20, lisina carboxipeptidasa humana; 21, carboxipeptidasa de *Drosophila*; 22, carboxipeptidasa M humana. Extraído de Rawlings y Barret (1995).