

**BIBLIOTECA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
Universidade de São Paulo  
15959

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**INTERAÇÕES MACROMOLECULARES NA MATRIZ EXTRACELULAR. UMA**  
**ABORDAGEM BIOQUÍMICA E FILOGENÉTICA**

**SANDRO JOSÉ DE SOUZA**

**ORIENTADOR**  
**RICARDO RENZO BRENTANI**

**SÃO PAULO**

**1993**

**"INTERAÇÕES MACROMOLECULARES NA MATRIZ EXTRACELULAR. UMA  
ABORDAGEM BIOQUÍMICA E FILOGENÉTICA"**

**SANDRO JOSÉ DE SOUZA**

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área:  
Bioquímica.

Aprovada por:

---

Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani  
IQ-USP  
(Orientador e Presidente)

---

Prof. Dr. Pedro Soares de Araújo  
IQ-USP

---

Prof. Dr. Antonio Gildo de Bianchi  
IQ-USP

---

Prof. Dr. Luiz Juliano Neto  
EPM

---

Prof. Dr. Laerte de Oliveira  
EPM

SÃO PAULO, SP  
07 DE DEZEMBRO DE 1993

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha família (Alvaro, Cleide e Gustavo), pelo constante apoio e dedicação.

Agradeço também à Bettina, cuja companhia vem sendo enriquecedora.

Aos irmãos de laboratório Arnaldo "Bibelô" e Agnaldo "Gigio", pelos eternos brindes.

Agradeço à amiga Renata Pasqualini que me introduziu no mundo hidropático.

Ao amigo Dudi, com saudades de compartilhar as segundas felizes tricolores.

Aos amigos do Instituto; Luísa, Sérgio Line, Fernando F....., João "Barrão", Nathalie, Paula, etc...

Agradeço à Kátia e Luísa pelo cultivo dos queratinócitos.

Agradeço à família Malnic pelo doce acolhimento.

Um beijo carinhoso para a Zila (extendo o agradecimento ao pessoal de suporte do Ludwig).

Ao Prof. Waldemiro Gremski cuja amizade e apoio foram fundamentais na minha iniciação científica.

Agradeço à FAPESP pelo auxílio concedido.

Dedico o produto destes quatro anos de trabalho à duas pessoas que acreditaram e investiram na minha formação, os amigos Ricardo Brentani e Jorge Sabbaga.

## ÍNDICE

BIBLIOTECA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
Universidade de São Paulo

Abreviações

Resumo

Summary

<b>Introdução.....</b>	<b>01</b>
Componentes de membrana basal.....	02
Componentes do estroma conjuntivo.....	04
Colágeno.....	04
Fibronectina.....	07
Metaloproteinases de matriz (MMP).....	10
A especificidade das collagenases intersticiais.....	17
Hidropaticidade complementar.....	18
Objetivos.....	25
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>26</b>
Peptídeos.....	26
Anti-peptídeos.....	26
Ligação colágeno/peptídeo.....	26
Ensaio de ligação direta antígeno/anticorpo.....	26
Inibição da ligação indireta antígeno/anticorpo.....	27
SDS-PAGE e Western blot.....	27
Imunofluorescência.....	28
Isolamento do colágeno do tipo I.....	28
Marcação de colágeno.....	29
Imunoprecipitação.....	29

Zimograma.....	29
Cultura de queratinócitos e processamento do sobrenadante...	30
Ativação do sobrenadante de queratinócito.....	30
Ensaio colagenolítico I.....	30
Ensaio colagenolítico II.....	31
Isolamento de IgG.....	32
Acoplamento do peptídeo TKKTLRT à Sepharose CNBr 4B.....	32
Purificação de fibronectina a partir de plasma humano.....	32
Ligação colágeno/fibronectina.....	33
Ligação fibronectina/zinco.....	33
Construção dos dendogramas.....	33
Comparação de sequências por análise matricial.....	33
<b>Resultados.....</b>	<b>35</b>
I. Interação colágeno/colagenase.....	35
I.1 Dedução dos peptídeos complementares.....	35
I.2 Interação peptídeo/colágeno.....	35
I.3 Reconhecimento da colagenase intersticial pelo soro anti-TKKTLRT.....	38
I.4 Inibição da atividade colagenolítica.....	45
II. Interação colágeno/fibronectina.....	47
II.1 Similaridade hidropática entre os domínios ligantes de colágeno em colagenase e fibronectina.....	47
II.2 Reconhecimento da fibronectina por anticorpos anti-TKKTLRT.....	50
II.3 "Binding"colágeno/fibronectina.....	54

II.4 O potencial inibitório dos peptídeos SQNPVQP e TNEGVMY sobre a interação colágeno/fibronectina.....	54
II.5 O peptídeo da fibronectina responsável pela ligação ao colágeno apresenta uma homologia com o "zinc-binding site" de diversas proteases.....	54
II.6 Evidências da interação fibronectina/zinco.....	55
II.7 Influência de zinco e outros íons na interação colágeno/fibronectina.....	55
III. Análise filogenética das MMP.....	63
III.1 Construção de dendogramas das MMP e das metaloproteinases.....	63
III.2 Alinhamento múltiplo de algumas MMP com protease B de <u>E. chrysanthemi</u> .....	63
III.3 Construção das sub-sequências das metaloproteinases...	64
III.4 Análise das subsequências.....	69
<b>Discussão</b> .....	73
I. Interação colágeno/colagenase.....	73
II. Interação colágeno/fibronectina.....	80
III. Evolução das MMP.....	83
Origem da especificidade nas colagenases intersticiais.....	89
Considerações finais sobre a hipótese da hidropaticidade complementar.....	97
Conclusões.....	98
<b>Bibliografia</b> .....	99

### **Abreviações:**

BSA	- Albumina sérica bovina
cDNA	- DNA complementar
cpm	- cintilações por minuto
Ci	- Curie
DNA	- ácido desoxiribonucléico
EDTA	- etileno diamino tetraacético
EHS	- Engelbreth Holm Swarm
ELISA	- Enzima imunensaio
FITC	- isotiocianato de fluoresceína
IgG	- gamaimunoglobulina
kDA	- milhares de daltons
KLH	- keyhole limpet hemocianin
mRNA	- RNA mensageiro
MMP	- metaloproteinases de matriz
PAGE	- gel de poliacrilamida
PBS	- tampão fosfato salino
RNA	- ácido ribonucléico
rpm	- rotações por minuto
SDS	- lauril sulfato de sódio
TBS	- tampão tris salino
TIMP	- tissue inhibitor of metalloproteinases
Tris	- tris hidroximetil aminometano
UV	- radiação ultravioleta
Zn	- zinco

## Nomenclatura das sequências

FIBCOLLAG	colagênase de fibroblasto humano (COG1_HUMAN)
RABCOLLAGE	colagenase de coelho (COG1_RABIT)
NEUTCOLLAG	colagenase de neutrófilo humano (COG8_HUMAN)
GELATINASE	gelatinase de 72 kDa humana (COG2_HUMAN)
STROMELYS	estromelisina humana (COG3_HUMAN)
STROMELYS3	estromelisina 3 humana (COGY_HUMAN)
PROTEASEB	protease B de <u>Erwinia chrysanthemi</u> (PRTB_ERWCH)
SERRATIA	protease de <u>Serratia</u> (PRZN_SERSP)
NPR	protease neutra de <u>S.cacoai</u>
PRT	<u>protease de S. lívidans</u>
THERMOLYS	thermolisina (THER_BACST)
ASTACIN	astacina (ASTA_ASTFL)
MEP	mefrina A {M74897}
PPH	PABA hidrolase {M82962}
CROTALUS	atrolisina e de veneno de <u>C. atrox</u>
HTD	metaloproteinase de veneno de <u>C.atrox</u>
HATCHING	metaloproteinase de ouriço-do-mar

As sequências foram obtidas através de banco de dados ou trabalhos publicados. ( ) acesso ao banco de dados SWISS-PROT; { } acesso ao banco de dados da EMBL.

## RESUMO

O estudo de macrointerações na matriz extracelular (ECM) foi abordado em três modelos; a interação colágeno/colagenase, a interação colágeno/fibronectina e finalmente, a evolução da família enzimática das metaloproteinases de matriz (MMP).

As MMP se caracterizam por sua notável especificidade contra componentes da ECM. As colagenases intersticiais, os membros mais estudados, clivam os colágenos intersticiais em um único ponto da molécula produzindo dois fragmentos característicos. Usando a hipótese da hidropaticidade complementar, a qual estipula que peptídeos codificados por sequências nucleotídicas complementares podem interagir entre si, foi possível caracterizar a sequência SQNPVQP em colagenase de fibroblasto ou SSNPIQP em colagenase de neutrófilo como importantes na interação das respectivas enzimas com o colágeno nativo.

O fato da fibronectina, outro componente da ECM, ligar-se no mesmo domínio do colágeno clivado pelas colagenases possibilitou a utilização da mesma abordagem acima (hidropaticidade complementar) no estudo da interação colágeno/fibronectina. Sendo assim, foi possível caracterizar a sequência TNEGVMY da fibronectina como importante na interação com o colágeno. Adjacente a este sítio na fibronectina, existe uma sequência (AAHEEIC) que é homóloga ao sítio de ligação ao zinco presente nas MMP. Isto originou a possibilidade de que zinco pudesse modular a interação colágeno/fibronectina. De fato, zinco aumentou especificamente a ligação entre colágeno e fibronectina.

Finalmente, abordou-se alguns aspectos filogenéticos da família das MMP. Foi caracterizada uma relação filogenética entre o núcleo enzimático das MMP e o domínio correspondente tanto na protease de Serratia como na protease B de Erwinia chrysanthemi, membros da mesma família de metaloproteinases bacterianas. Sendo assim, a atividade catalítica das MMP pode ter sido herdada das metaloproteinases bacterianas, enquanto a especificidade ao substrato talvez se constitua em uma aquisição das MMP eucarióticas.

## Summary

The study of extracellular matrix (ECM) macrointeractions was approached in three models: the collagen/collagenase interaction, the collagen/fibronectin interaction and the molecular evolution of the matrix metalloproteinase (MMP) family of enzymes.

MMP is characterized by its remarkable specificity against ECM components. Interstitial collagenases, the best studied members, attack interstitial collagens at a unique site producing two fragments. Using the complementary hydrophathy hypothesis that states that peptides encoded by complementary nucleotide sequence can interact one to another, it was possible to characterize the sequence SQNPVQP (in fibroblast collagenase) or SSNPIQP (in neutrophil collagenase) as important in the interaction of the respective enzymes with collagen.

The fact that fibronectin, another ECM component, binds at the same domain on collagen that is cleaved by collagenases arose the possibility of using the same approach (complementary hydrophathy) in the study of collagen/fibronectin interaction. It was possible to characterize the fibronectin sequence TNEGVMY as important in the interaction with collagen. Adjacent to this site, there is a sequence (AAHEEIC) that shows an homology to the zinc-binding site present in several MMP. Therefore, zinc could be a modulator the collagen/fibronectin interaction.

Finally, some phylogenetic aspects of the MMP family were studied. It was characterized a phylogenetic relationship between the catalytic core of MMP and the corresponding domain in Serratia protease and protease B from E. chrysanthemi, members of the same

family of bacterial metalloproteinases. The catalytic activity of MMP can have evolved from the bacterial metalloproteinases whereas the substrate specificity is an acquisition of eukaryotic MMP

## INTRODUÇÃO

O estudo da evolução dos organismos vivos representa uma das áreas mais excitantes da biologia moderna. Durante os bilhões de anos decorridos entre o surgimento do protenoto e dos vertebrados superiores algumas etapas representaram saltos qualitativos dentro de um contexto de complexidade orgânica. Como exemplo podemos citar o desenvolvimento da multicelularidade. A maioria dos autores acredita em uma evolução monofilética dos metazoários e que organismos do gênero Volvox são intermediários neste processo. Como consequência da multicelularidade, houve o desenvolvimento de um espaço intercelular que com o aumento da complexidade precisou ser preenchido. Paralelamente, então, uma matriz protéica desenvolveu-se ocupando tais espaços (Har-el & Tanzer, 1993). Analisando a escala filogenética, tal matriz extracelular (ECM) apresenta-se pela primeira vez nos primeiros organismos multicelulares, ou seja, os membros do filo Porífera (Garrone, 1984).

A ECM pode ser dividida em duas principais estruturas macromoleculares; as membranas basais e o estroma conjuntivo adjacente (Hay, 1984). Esta distinção foi primeiramente verificada por intermédio da microscopia eletrônica e posteriormente confirmada por análises bioquímicas, as quais mostraram que ambas as estruturas apresentam componentes diferenciados (Paulsson, 1992). As membranas basais delimitam os domínios do tecido conjuntivo. Células epiteliais bem como endoteliais estão assentadas sobre membranas basais enquanto células musculares e nervosas são envolvidas por

elas (Paulsson, 1992). Por sua vez, o estroma conjuntivo representa toda a matriz restante.

Algumas décadas atrás predominava o conceito errôneo de que a ECM teria um papel primariamente estrutural ou de sustentação (Hay, 1984). Atualmente, sabe-se que a ECM como um todo e alguns de seus componentes isolados são funcionalmente ativos, sendo capazes de ativar expressão gênica entre outros exemplos (Lin & Bissel, 1993). De fato, a presença de uma ECM organizada parece ser determinante em muitos processos morfogênicos (Trelstad, 1984). Vale citar os experimentos clássicos de Hay (Greenburg & Hay, 1982), onde células de origem epitelial quando mergulhadas em um gel de colágeno passam a expressar um fenótipo mesenquimal, inclusive com os marcadores característicos deste tipo celular.

### **Componentes de membrana basal**

Do ponto de vista bioquímico, as membranas basais são constituídas de proteoglicanas, colágeno e glicoproteínas não-colágenas (Weber, 1992). Na década de 80, uma das principais discussões a respeito das membranas basais era a natureza intrínseca ou não de seus componentes (Leblond & Inoue, 1989). Acredita-se que o colágeno do tipo IV e a laminina sejam os únicos componentes encontrados exclusivamente nas membranas basais. A organização estrutural das membranas basais é conseguida através de um processo muito bem coordenado de deposição de seus componentes envolvendo tanto homo como heterointerações. Dentre todas as glicoproteínas não-colágenas, a mais bem estudada é a laminina (Beck et al., 1990). Esta glicoproteína é composta de três cadeias polipeptídicas

diferentes denominadas A, B1 e B2. Através da microscopia eletrônica, foi demonstrado que a laminina tem a forma de uma cruz assimétrica com três braços curtos e um longo (Beck et.al., 1990 e referências citadas). A capacidade adesiva da laminina tem sido demonstrada em muitos modelos. A digestão proteolítica da laminina por diversas proteases tem permitido o isolamento de diferentes fragmentos, os quais retêm atividade biológica (Paulsson, 1992). Graças a esta metodologia, descobriu-se que o centro da cruz, o fragmento P1, possui pelo menos um sítio de ligação à célula. O estudo da laminina, e mais genericamente da ECM, foi extremamente facilitado pela utilização do tumor EHS (Engelbreth-Holm-Swarm), um sarcoma que produz quantidades abundantes de componentes de membrana basal.

Outro componente exclusivo das membranas basais é a entactina ou nidogênio (Carlin et.al., 1981). Esta glicoproteína encontra-se formando um complexo não-covalente com laminina em tecidos normais e devido a isto tem também sido chamada de cadeia C de laminina (Paulsson, 1992). Um dos mais recentes componentes de membrana basal descrito é a proteína SPARC (secreted protein acidic and rich in cystein) (Dziadek et.al., 1986). SPARC foi primeiramente isolada de uma matriz óssea calcificada mas posteriormente foi demonstrado que sua expressão não se restringe a este sítio anatômico. A razão de SPARC ser considerada um componente de membrana basal é que ela é produzida em grandes quantidades por EHS (Dziadek et.al., 1986).

Várias proteoglicanas estão presentes na ECM. Estas moléculas se caracterizam por apresentar um núcleo protéico, ao qual estão ligadas várias cadeias de glicosaminoglicanas ( polímeros de

dissacarídeos) (Weber, 1992). Um dos pontos mais interessantes a respeito das proteoglicanas é sua expressão diferenciada durante o desenvolvimento (Trelstad, 1984). Na morfogênese da glândula salivar, por exemplo, a proteoglicana condroitin sulfato é encontrada nas membranas basais durante os estágios iniciais do desenvolvimento. Nos estágios finais tal proteoglicana é substituída pela heparan sulfato que permanecerá nas membranas basais no adulto (Bernfield et.al., 1984). O grupo de Bernfield tem também descrito uma proteoglicana de superfície celular, chamada sindecan que parece estar envolvida em diferentes processos celulares (Saunders et.al., 1989)

### **Componentes do estroma conjuntivo**

O estroma conjuntivo, assim como as membranas basais, são constituídos basicamente de glicoproteínas colágenas, não-colágenas e proteoglicanas. Muitos tipos celulares têm no estroma conjuntivo seu habitat como por exemplo os fibroblastos. Outras células de caráter migratório também têm um íntimo contato com o estroma. Discutirei a seguir alguns dos principais componentes do estroma conjuntivo.

### **Colágeno**

O colágeno é uma das proteínas mais bem estudadas nos seres vivos. Conhecido desde o século passado restam poucas dúvidas de que a evolução da ECM ocorreu coincidentemente com a evolução desta glicoproteína extracelular. Como já citado acima, é possível

encontrar uma ECM bem definida nas esponjas. Nestes mesmos animais, já se encontram também no mínimo dois tipos de colágeno (Exposito & Garrone, 1990). Atualmente com o número crescente de proteínas colágenas sendo descritas ( já foram descritos 18 colágenos) é possível englobar todas em uma única família gênica. De todos estes, entretanto, os mais bem estudados são os colágenos intersticiais, denominados do tipo I, II e III que apresentam uma estrutura quaternária característica, a tripla hélice de colágeno (revisto por van der Rest & Garrone, 1991). Tal estrutura é formada pela homo ou heteropolimerização de duas cadeias polipeptídicas denominadas  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ . Este tipo de estrutura é hoje muito bem caracterizado inclusive com coordenadas de difração de raio X . Cada cadeia polipeptídica forma uma hélice com torção à esquerda e todo terceiro resíduo tem sua cadeia lateral voltada para o centro da hélice. Por questões estéricas, somente um resíduo com uma cadeia lateral pequena é permitido nesta posição. Esta pode ser a razão da existência da repetição Gly-X-Y em todos os segmentos em hélice dos colágenos. A tripla hélice é estabilizada pela presença de iminoácidos nas posições X e Y. Cerca de 1/3 destas posições são ocupadas por prolina ou hidroxiprolina, uma forma pós-traducionalmente derivada de prolina.

Todos os colágenos intersticiais apresentam basicamente a mesma organização estrutural. Eles apresentam um domínio em tripla-hélice com cerca de 1000 resíduos de aminoácidos. Na extremidade carboxi-terminal ocorre um domínio globular (o propeptídeo C) ligado por várias pontes dissulfeto. Este domínio está envolvido no "assembly" do heterotrímero. O domínio em tripla-hélice é separado do domínio carboxi-terminal globular por

uma região de aproximadamente 30 resíduos que contém um sítio suscetível à digestão por proteinase C. Outro pequeno domínio em tripla-hélice é encontrado na extremidade amino-terminal, o qual é separado da tripla-hélice central por um sítio suscetível a proteinase N. A síntese e deposição dos colágenos intersticiais é um processo extremamente complexo com várias etapas pós-traducionais. Todo o processo está muito bem descrito em livros texto bem como em excelentes revisões (van der Rest & Garrone, 1991; Burgeson, 1988).

A estrutura em tripla hélice, bem como sua composição (rica em iminoácidos) confere aos colágenos uma resistência notável à digestão proteolítica. Poucas proteases são capazes de clivar moléculas de colágeno nativo, entre elas algumas proteases bacterianas e as collagenases intersticiais que serão extensivamente discutidas posteriormente. A evolução da família dos colágenos é um assunto também fascinante. Muitos autores têm sugerido que duplicações de um gene ancestral composto de 54 pb ocasionaram tal estrutura repetitiva (Chu et.al., 1984). De fato, a maioria dos exons do gene dos colágenos intersticiais apresenta 54 ou 108 pb de comprimento.

Outro colágeno muito estudado é o tipo IV, exclusivo das membranas basais (Yurchenko & Schiffny, 1990). Sua principal característica é a ausência de uma estrutura fibrilar em tripla hélice. As moléculas de colágeno do tipo IV se depositam na forma de uma rede onde interações amino-amino e carboxi-carboxi predominam. Acredita-se que tal forma de deposição se constitua no principal centro de sustentação das membranas basais.

## FIBRONECTINA

A fibronectina é também abundante na ECM. Esta glicoproteína plasmática e extracelular se caracteriza por sua notável capacidade adesiva. Vários eventos celulares estão intimamente relacionados à interação célula/fibronectina (Ruoslahti, 1988). A fibronectina existe no plasma sanguíneo e nos tecidos como um dímero de peso molecular aparente de 450-500 kDa e parece ser extremamente conservada em todos os animais multicelulares (Har-El & Tanzer, 1993). A capacidade adesiva da fibronectina deve-se à presença de múltiplos sítios de ligação à célula e a outros componentes da ECM, tais como fibrina, heparina e colágeno. Estudos usando fragmentos de fibronectina permitiram determinar as regiões da molécula importantes para a ligação com as células (Piershbacher et.al., 1981). Especificamente neste caso, um fragmento de 120 kDa produzido por digestão quimiotriptica reteve a capacidade de ligar-se à superfície celular. Com a utilização de outras digestões proteolíticas e de peptídeos sintéticos, o grupo de Ruoslahti caracterizou o peptídeo RGDS como um sítio de ligação a célula na molécula de fibronectina (Piershbacher & Ruoslahti, 1984). Sem qualquer sombra de dúvida, tal descoberta representou um dos grandes passos no estudo da ECM. A partir de então, vários grupos caracterizaram a sequência RGDS como um dos principais fatores de adesão celular em diversos modelos. Graças a estes estudos, houve a caracterização das integrinas, uma família heterodimérica de receptores celulares particularmente envolvidos em interações célula-célula e célula-ECM (Hynes, 1992).

Uma das associações macromoleculares mais bem estudadas da ECM refere-se à interação colágeno/fibronectina (revisto por Ruoslahti, 1988). Alguns sítios de interação foram descritos em ambas as proteínas (Owens & Barale, 1986; Guidry et.al., 1990; Kleinman et.al., 1981). Entretanto, o fato de fibronectina sabidamente interagir com o domínio clivado pela colagenase na molécula do colágeno (Kleinman et.al., 1976) tem atraído a atenção de alguns pesquisadores. Sabe-se que a interação colágeno/fibronectina é inibida por uma prévia digestão do colágeno por colagenase (Kleinman et.al., 1981). O fato de duas proteínas, no caso fibronectina e colagenase, interagirem com mesmo domínio no colágeno pode trazer implicações estruturais para ambas as proteínas, tal como uma semelhança de conformação no sítio de ligação. Recentemente uma sequência de 15 aminoácidos (AAHEEICTTNEGVMY) presente na fibronectina foi caracterizada como o sítio de ligação ao colágeno (Owens & Barale, 1986). Um fato bastante interessante é a maior afinidade da fibronectina pela gelatina do que pelo colágeno nativo (Kleinman et.al., 1981). De fato, esta interação é a base do protocolo de purificação da fibronectina, no qual gelatina é acoplada à uma coluna de Sepharose. Isto parece sugerir que a estrutura quaternária do colágeno é uma restrição à interação com a fibronectina. A interação colágeno/fibronectina será um dos temas abordados experimentalmente nesta tese.

Face a tudo que foi discutido acima, fica evidente que a ECM como um todo se constitui em um obstáculo a eventos de migração celular, sejam eles normais ou patológicos. De fato a ECM sofre um processo constante de "turnover". Células epiteliais e/ou

mesenquimais secretam constitutivamente enzimas capazes de degradar componentes da ECM. Um equilíbrio entre síntese e degradação é responsável pelo estado normal da ECM (Woessner, 1991). Em situações de regeneração, por exemplo, este equilíbrio tem de ser desfeito prevalecendo o processo de síntese. Muitas patologias se caracterizam por uma alteração neste equilíbrio desencadeando, então um processo de degradação incontrolado da ECM. Como exemplo de tais processos patológicos temos a invasão tumoral e a artrite.

Algumas enzimas parecem estar intimamente envolvidas neste processo de "turnover" da ECM tais como as serina proteases, as cisteínas proteases e as metaloproteinases de matriz (MMP) (Liotta et.al., 1991; Souza et.al., 1994). Como já citado acima, um descontrole na regulação destas enzimas pode levar a um fenótipo invasivo e nesses casos é muito provável o envolvimento de todas estas proteases em um mecanismo tipo cascata. De todas as serina proteases a mais bem caracterizada como importante no processo invasivo tumoral é o ativador de plasminogênio, mais especificamente a urokinase (u-PA) (Sappino et.al., 1987). Anticorpos contra u-PA são capazes de inibir invasão tumoral "in vitro" bem como a colonização pulmonar por células de melanoma murino (Ossowski & Reich, 1983; revisto por Liotta et.al., 1991). Além disso, inibidores de serina proteases inibem invasão tumoral "in vitro" (Mignatti et.al., 1986). Muitos autores têm sugerido não um papel primário, mas sim secundário das serina proteases nos processos invasivos, servindo basicamente para a ativação extracelular das metaloproteinases de matriz.

## METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMP)

A hidrólise de ligações peptídicas é uma das mais frequentes e importantes modificações enzimáticas em proteínas. Com o acúmulo de dados de sequência e estrutura tornou-se claro que as proteases poderiam ser classificadas em famílias sendo que membros de uma mesma família compartilham semelhanças estruturais e/ou funcionais. Atualmente, o critério mais racional de classificação é baseado na comparação de sítios ativos e no mecanismo de ação. A International Union of Biochemistry reconhece quatro classes ou superfamílias enzimáticas; as serina proteases, as cisteína proteases, as aspártico proteases e as metaloproteases ( ou metaloproteinases) (Beynon & Bond, 1989). Como o modelo de estudo nesta tese refere-se a uma família das metaloproteinases, irei me deter especificamente nesta classe de enzimas.

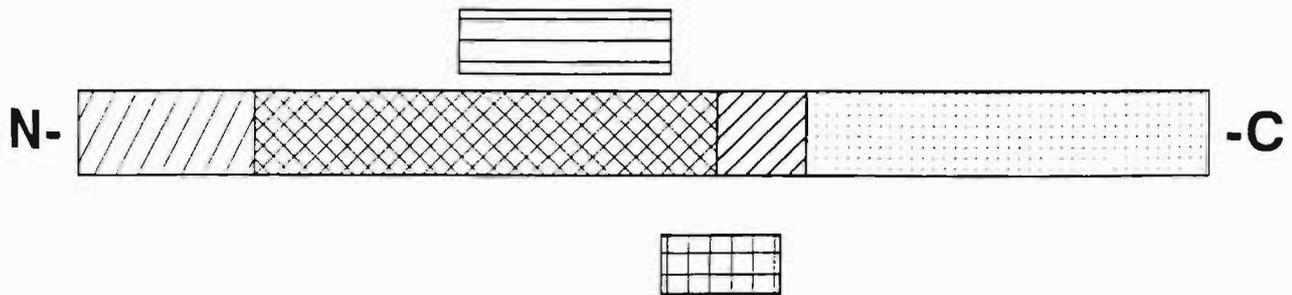
A maioria das metaloproteinases contém zinco como um íon essencial para a atividade catalítica (Rawlings & Barret, 1993). A comparação das sequências de diversas metaloproteinases permitiu classificar diferentes famílias dentro desta classe (Jiang & Bond, 1992). As mais importantes são: termolisina, astacina, metaloproteinases de veneno de cobra, metaloproteinase de Serratia e MMP. Todas as enzimas compartilham uma sequência extremamente conservada (HEXXH) que é responsável pela coordenação do átomo de zinco (Valle & Auld, 1990). A análise cristalográfica de algumas metaloproteinases, incluindo a astacina, tem indicado que as duas histidinas presentes na sequência acima estão diretamente coordenadas ao zinco (Bode et.al., 1992). De fato, mutações nas duas histidinas presentes em estromelisina de rato confirmaram a sugestão

acima (Sanches-Lopes et.al., 1988).

Alguns critérios têm sido usados na tentativa de se classificar os membros da família MMP, entre eles: homologia com colagenase de fibroblasto; atividade catalítica dirigida contra componentes da ECM; suscetibilidade à inibição por TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) e secreção na forma de um zimogênio. A tabela 01 mostra todos os membros das MMP e suas principais características. As MMP têm despertado a atenção de muitos grupos nos últimos anos devido ao fato de que muitos dos seus membros parecem estar envolvidos no processo invasivo de células cancerosas (revisto por Liotta et.al., 1991). A colagenase intersticial bem como a colagenase do tipo IV são encontradas em grande quantidade em diferentes tipos tumorais (Monteagudo et.al., 1991; revisto por Liotta et.al., 1991). Células transfectadas com diversos oncogênes apresentam uma expressão aumentada de MMP (Bonfil et.al., 1989; Kerr et.al., 1988). O uso de TIMP eliminou o fenótipo metastático em células tumorais enquanto transfecção com oligonucleotídeos antisense de TIMP, o que bloqueia a expressão do mesmo, aumentou a capacidade invasiva de células transformadas (Khokha et.al., 1989; Khokha & Denhardt, 1989). Recentemente, Basset et al (1990) clonaram um novo membro da família MMP, chamado de estromelina 3, que apresenta uma expressão bastante aumentada nos fibroblastos normais que envolvem as células cancerosas em um tumor de mama. Tal descoberta indica que as células tumorais são capazes de induzir a expressão de MMP em células normais. Como discutido acima, a capacidade invasiva das células tumorais é decorrente de uma alteração no equilíbrio síntese/degradação de componentes da matriz extracelular. Fica claro, então, que um controle fino na atividade

das MMP é fundamental em um ambiente extracelular normal. Evolutivamente, este controle foi conseguido através do desenvolvimento de diferentes mecanismos regulatórios tais como a regulação da expressão gênica e o controle do processo de ativação enzimática (Matrisian, 1992). Além disso, o próprio controle da expressão de TIMP representa um passo regulatório na atividade das MMP (Khokha & Denhardt, 1989). Vale enfatizar que as MMP também têm um papel fundamental em muitos processos normais no organismo como remodelamento tecidual durante o desenvolvimento, angiogênese, cicatrização e migração celular (Woessner, 1991). Do ponto de vista terapêutico, inclusive, tem havido muita discussão a respeito de possíveis inibidores de MMP, os quais poderiam ser utilizados em algumas situações patológicas.

Outro ponto bastante interessante a respeito das MMP é sua estrutura modular. A figura 01 mostra um esquema desta estrutura. Todas as MMP, com exceção de PUMP e das gelatinases, apresentam uma organização de domínios muito parecida com aquela mostrada na figura 01 (Matrisian, 1992). É possível identificar, por exemplo, um domínio de ativação que contém a sequência PRCGVXNPD e que é perdido durante o processo de ativação. Van Hart e Birkedal-Hansen (1990) têm proposto um mecanismo de ativação para as MMP baseado em uma possível interação entre o resíduo de cisteína na posição 73 e o átomo de zinco no sítio ativo. Esta interação bloquearia o sítio ativo, provavelmente excluindo a água da esfera de coordenação do zinco. Sabe-se que todas as hidrolases contendo zinco no sítio ativo possuem água como o quarto ligante, o que é essencial para a catálise (Valle and Auld, 1990). Outro domínio bastante evidente na estrutura das MMP é o núcleo enzimático, o qual contém o sítio de



-  domínio de ativação
-  núcleo enzimático
-  domínio rico em prolina
-  domínio COOH-terminal
-  Domínio ligante de gelatina (somente nas gelatinases)
-  Domínio homólogo ao colágeno (somente na gelatinase B)

FIGURA 01: Estrutura modular das MMP.

ligação ao zinco. Segue-se um domínio rico em prolínas que nas colagenases está organizado em repetições da sequência Y-X-Pro onde X e Y são quaisquer aminoácidos (Goldberg et.al., 1986). Na extremidade carboxi-terminal, encontra-se um domínio com certo grau de homologia com hemopexina, uma proteína sérica capaz de ligar grupos heme.

Todos os membros da família MMP compartilham um razoável grau de homologia entre si. Apesar disto, existe uma especificidade a nível de substratos. Por exemplo, apesar dos 50% de homologia entre colagenase de fibroblasto e estromelina, ambas as enzimas apresentam substratos diferentes. Enquanto a estromelina é capaz de degradar vários substratos incluindo proteoglicanas e gelatina, a colagenase tem sua atividade dirigida primariamente contra moléculas de colágeno nativo (Harris et.al., 1984; Gross & Nagai, 1965). A tabela 01 mostra a especificidade de todos os membros da família MMP. Exemplos interessantes são as gelatinases de 72 e 92 kD onde a especificidade para a gelatina é dada por um domínio adquirido da fibronectina (Collier et.al., 1988). Diferentes grupos têm mostrado que o núcleo enzimático das MMP apresentam uma atividade catalítica intrínseca (Lowry et.al., 1992; revisto por Birkedal-Hansen et.al., 1993 e Woessner, 1991) sem especificidade ao nível de substratos. Tal especificidade reside em sequências presentes em outros domínios como no caso de fibronectina mostrado acima. Lowry et.al. (1992) tem mostrado que um fragmento recombinante de colagenase que corresponde ao núcleo enzimático apresenta atividade proteolítica degenerada perdendo a especificidade contra moléculas de colágeno. A especificidade deste fragmento corresponde à especificidade de PUMP que possui apenas o domínio de ativação e o núcleo enzimático

(Quantin et.al., 1989). PUMP, no entanto, apresenta uma forte atividade de proteoglicanase (Quantin et.al., 1989; Matrisian, 1992).

O estudo da relação estrutura-função nas MMP traz a necessidade de se discutir importantes questões à respeito da origem e evolução da família. A presença de metaloproteinases em bactérias, por exemplo, origina a possibilidade de uma relação filogenética entre estas e as MMP. Alguns autores falharam na tentativa de achar tal relação (Murphy et.al., 1991; Jongeneel et.al., 1989). Da mesma forma, a estrutura modular das MMP origina um outro ponto de discussão. Todos os domínio evoluíram em conjunto ou eles foram adquiridos em épocas diferentes durante a história evolutiva da família? Como discutido por Matrisian (1992), a organização exon/intron nos genes das MMP sugere que a família evoluiu por duplicação gênica de uma metaloproteinase ancestral contendo o domínio de ativação e o núcleo enzimático, e por eventos de "exon shuffling" que levaram à aquisição dos outros domínios. De fato, tanto o domínio ligante de gelatina nas gelatinases como o domínio "collagen-like" na gelatinase B parecem ter sido adquiridos por "exon shuffling" (Collier et.al., 1988; Wilhelm et.al., 1989).

A estrutura truncada de PUMP de certa forma corrobora a sugestão de Matrisian (1992). Especulou-se que PUMP seja a MMP atual mais homóloga ao gene primordial. A natureza deste gene primordial, no entanto, permanece desconhecida. De fato, McFerro (1986) observou que o núcleo enzimático da colagenase de fibroblasto apresenta uma homologia significativa com a protease de Serratia sp e especulou que talvez esta homologia reflita uma ancestralidade

comum. Mais recentemente, no entanto, Murphy et.al.(1991) discutiu a relação filogenética entre as MMP e as metaloproteinasas bacterianas. Eles concluíram que somente estromelisina 3 apresenta um certo grau de parentesco com as metaloproteinasas bacterianas.

Com o objetivo de se estudar a origem da família das MMP e mais especificamente a evolução da especificidade ao substrato em seus membros, uma parte deste trabalho é destinada a análise das sequências de diversas metaloproteinasas bacterianas e das MMP.

#### **A especificidade das collagenases intersticiais**

A especificidade das collagenases pelo colágeno nativo é surpreendente. Elas clivam ambas as cadeias da tripla hélice em um único ponto da molécula entre um resíduo de glicina e um de leucina ou isoleucina dependendo da cadeia alpha em questão (Harris et.al., 1984). Estudos de mutagênese sítio-dirigida desenvolvidos pelo grupo de Stephen Krane mostraram que os dois resíduos hidrofóbicos imediatamente após a glicina bem como um hidrofílico anterior à ela são importantes no evento de ligação e clivagem da molécula pela enzima (Wu et.al., 1990). Muito tem se discutido a respeito da influência da conformação da tripla hélice na especificidade da interação (Fields et.al., 1990; Arnett et.al., 1991). A preponderância de resíduos hidrofóbicos bem como a ausência de iminoácidos na região de clivagem tornam a tripla hélice mais instável o que explicaria a suscetibilidade desta região à collagenase (Woessner, 1991). Da mesma forma sequências Gli-Leu/Ile existem em grande número na molécula de colágeno, as quais no entanto, não são clivadas. Isto confirma as análises de mutação

sítio-dirigida indicando que sequências flanqueadoras são importantes na especificidade enzima-substrato.

Com relação ao sítio de ligação ao substrato na molécula da enzima colagenase intersticial, pouco se sabia no início do projeto em questão. Nosso principal objetivo era determinar este sítio dentro da estrutura enzimática e para tanto decidiu-se usar o princípio da hidropaticidade complementar de amino ácidos codificados por sequências complementares de DNA.

### **Hidropaticidade complementar**

O termo hidropaticidade foi definido por Kyte e Doolittle (1982) como uma afinidade por água. Sendo assim, hidropaticidade pode ser confundida com hidrofiliçidade, pelo menos conceitualmente. Os coeficientes de hidropaticidade e hidrofiliçidade, entretanto, foram determinados por métodos diferentes. Em relação à tabela de hidropaticidade ( tabela 03), os amino ácidos hidrofóbicos apresentam coeficientes positivos, enquanto os hidrofílicos negativos. Os amino ácidos com grupos R não-carregados porém parcialmente hidrofílicos apresentam coeficientes próximo ao zero. Uma das características mais interessantes do código genético é a complementaridade hidropática dos amino ácidos codificados por codons complementares (Blalock & Smith, 1984). Isto significa que se um códon codifica um amino ácido hidrofóbico, na maioria das vezes seu códon complementar codificará um amino ácido hidrofílico. Da mesma forma codons para amino ácidos hidrofílicos não carregados são complementados por codons codificando amino ácidos da mesma classe.

<b>Aminoácido</b>	<b>Hidropaticidade</b>
Alanina	+1,8
Arginina	-4,5
Asparagina	-3,5
Ac. Aspartico	-3,5
Cisteina	+2,5
Glutamina	-3,5
Ac. Glutamico	-3,5
Glicina	-0,4
Histidina	-3,2
Isoleucina	+4,5
Leucina	+3,7
Lisina	-3,9
Metionina	+1,9
Fenilalanina	+2,7
Prolina	-1,6
Serina	-0,9
Treonina	-0,7
Triptofano	-0,9
Tirosina	-1,3
Valina	+4,2

TABELA 02: Coeficiente de hidropaticidade dos 20 aminoácidos. A escala foi construída por Kyte & Doolittle (1982) baseado em um programa de computador que considerou as propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas da cadeia lateral dos 20 tipos de aminoácidos.

O grupo de Blalock (Blalock & Smith, 1984) especulou que peptídeos codificados por sequências nucleotídicas complementares poderiam interagir formando uma estrutura anfifílica. Esta proposta tem sido aplicada em diferentes modelos com razoável sucesso (Bost & Blalock, 1986; Bost et.al., 1985; Brentani et.al., 1988; Pasqualini et.al., 1989; Fassina et.al., 1989; Knutson, 1988; Miyagima et.al., 1989; Ghiso et.al., 1990). A princípio, tais modelos ficaram restritos a certos hormônios como angiotensina II (Elton et.al., 1988), ACTH (Bost et.al., 1985), endorfina (Carr et.al., 1986) e vasopressina (Lu et.al., 1991), entre outros. Mais recentemente, o princípio tem sido também aplicado a interações entre macroproteínas (Brentani et.al., 1988; Pasqualini et.al., 1989; Souza & Brentani, 1992). Segundo o princípio, um peptídeo codificado pela sequência complementar àquela que codifica o sítio de ligação de um ligante, por exemplo, deveria representar, ao menos conformacionalmente, o sítio de ligação do receptor. Isto faz com que os peptídeos complementares e anticorpos dirigidos contra eles sejam importantes ferramentas na pesquisa biológica como possíveis agentes inibidores. Por exemplo o peptídeo complementar aos resíduos 22-27 de insulina humana foi capaz de inibir especificamente a ligação desta à adipócitos (Knutson, 1988). Da mesma forma, anticorpos dirigidos contra peptídeos complementares deveriam reconhecer a outra proteína interagente. Isto tem sido confirmado experimentalmente para uma série de proteínas onde anti-peptídeos complementares reconhecem a outra proteína interagente (Gorcs et.al., 1986; Carr et.al., 1986; Brentani et.al., 1988; Souza & Brentani, 1992). Além disso, tais anticorpos podem apresentar atividade biológica como mostrado para anticorpos dirigidos contra o hormônio ACTH que estimularam a secreção de corticosterona por células adrenais (Bost et.al.,

1985). Uma das principais críticas ao princípio refere-se, segundo alguns, à improvável interação entre resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos (discutido por Brentani, 1988,1990). A literatura, no entanto, está repleta de exemplos onde tal interação pode ocorrer. Citemos alguns deles:

-Alguns amino ácidos hidrofílicos apresentam uma cadeia lateral hidrocarbonada com um radical carregado na extremidade. Tal cadeia hidrocarbonada permite que tais amino ácidos interajam com outros resíduos hidrofóbicos de uma maneira espontânea e energeticamente favorável, como reportado por Nemethy e Sheraga (1962). Este tipo de interação, bem como outras, pode ser ainda mais efetiva visto que o microambiente proporcionado pela interação entre os sítios ligantes das proteínas pode estar desprovido de água (Wolfendem et.al., 1978).

-Interações amino-aromáticas vem sendo caracterizadas como exemplo clássico de ligação hidrofóbico-hidrofílico (Burley & Petsko, 1988). Os grupos aromáticos são caracterizados por um anel benzênico. A presença de três duplas ligações caracteriza o anel como uma estrutura planar e altamente simétrica com os seis átomos de carbono nos vértices de um hexágono regular. Uma sobreposição dos orbitais dos átomos constituintes leva à formação de duas nuvens eletrônicas contínuas, uma acima e outra abaixo do plano dos átomos. A presença destas nuvens carregadas negativamente possibilita uma interação eletrostática com grupos positivos de amino ácidos polares. De fato, a análise de dados de cristalografia de complexos proteína/proteína ou proteína/peptídeo permite identificar interações hidrofóbico/hidrofílico.

O que chama a atenção nas interações hidropaticamente complementares é a aparente degenerescência que pode ocorrer na sequência do peptídeo complementar sem afetar significativamente a afinidade de ligação. Isto foi primeiramente indicado pela descoberta que peptídeos complementares deduzidos a partir da tradução no sentido 5' 3' ou 3' 5' eram capazes de se ligar ao peptídeo original com o mesmo grau de afinidade (Bost et.al., 1985; Shai et.al., 1987). O fato que ambos os peptídeos apresentam perfis de hidropaticidade muito parecidos levou à conclusão que em interações entre peptídeos complementares, não a sequência primária, mas sim o perfil de hidropaticidade é o que determina a especificidade da ligação (Shai et.al., 1987, 1989).

Outro ponto bastante interessante é a capacidade codificadora da fita "anti-sense". Alff-Steinberg (1984,1987) baseou-se em cálculos teóricos para postular que as regiões não-codificadoras do genoma também apresentam um potencial codificador. Esta conclusão também foi colocada por Ohno baseado na obediência das sequências codificadoras e não-codificadoras à "regra universal do código genético" (Ohno, 1988; Yomo & Ohno, 1989). Segundo tal regra, todas as sequências com potencial codificador apresentam uma deficiência em TA/CG que é compensada por um excesso de TG/CT (Ohno, 1988). De fato, fases abertas de leitura tem sido encontrado na fita anti-sense em muitos exemplos (Goldstein & Brutlag, 1989; Goldgaber, 1991; Nepveu & Mark, 1986 e discutido por Brentani, 1988, 1990). Adelman et al. (1987) encontrou dois genes transcritos no mesmo locus. Um destes genes é o hormônio liberador de corticotropina enquanto o gene transcrito pela fita complementar produz um RNA de função desconhecida. Outro exemplo bastante

interessante é o gene para a proteína prion que está envolvida na patogênese de uma doença neuro-degenerativa denominada "scrapie". Complementar ao gene do prion, Goldgaber (1991) encontrou uma fase aberta de leitura que posteriormente mostrou ser transcrita (Hewinson et.al., 1991). Talvez o exemplo mais interessante seja o gene myc. Complementar a ele, existe um gene denominado cym, o qual parece modular a atividade da proteína myc (Armstrong & Krystal, 1992). A importância de fases abertas de leitura na fita anti-sense foi levada ao extremo por Yomo et al. (1992) sugerindo que estas são as principais fontes para a criação de novas enzimas. Brentani (1988, 1990) tem discutido o aspecto evolutivo da hipótese sob um outro prisma. Sabe-se que muitas proteínas compartilham domínios ou módulos, sendo que o domínio tipo III de fibronectina é o exemplo mais conhecido. Walter Gilbert em 1978 propôs a "exon theory of genes" ou "exon shuffling theory", sugerindo que os genes atuais são mosaicos formados pela recombinação de um número limitado de exons primordiais. Desde a sua formulação, a hipótese tem sido plenamente corroborada em diversos modelos (revisto por Gilbert, 1985, 1987). A sugestão de Brentani se baseia na possibilidade de utilização da sequência antisense em eventos de "exon shuffling" (Brentani, 1988, 1990). Imaginemos o seguinte exemplo. Dois genes A e B codificam as proteínas a e b, respectivamente. Um exon do gene A é duplicado e inserido no gene B. No entanto, o que era antisense no gene A passa a ser sense no gene B. Pelo fato de codons complementares codificarem peptídeos hidropaticamente complementares, as duas proteínas podem a partir deste evento genético passar a interagir, visto que ambas possuem agora sequências hidropaticamente complementares. Obviamente, a probabilidade de tais eventos é mínima. Curiosamente, Kunisawa e Otsuka (1987) fizeram observações

bastante interessantes a respeito deste ponto. Através de um "search" por computador, eles foram capazes de encontrar uma similaridade "sense/antisense" na sequência de diversos pares receptor/ligante. Eles sugeriram que a utilização de sequências antisense poderia estar envolvida no aumento do repertório protéico.

Nosso grupo tem usado o princípio da hidropaticidade complementar no estudo da interação entre fibronectina e dois de seus receptores celulares, as integrinas VLA5 e GPIIb/IIIa (Brentani et.al., 1988; Pasqualini et.al., 1989). Foi mostrado que da fita complementar àquela que codifica a sequência RGD é possível deduzir um peptídeo (WTVPTA na sequência de rato) capaz de inibir a interação entre fibronectina e uma linhagem de células tumorais. Anticorpos contra tal peptídeo são capazes de reconhecer as duas integrinas citadas acima. Mais recentemente, nós mostramos que pacientes com Purpura Trombocitopênica Idiopática, os quais apresentam altos níveis de anticorpos anti-GPIIb/IIIa, desenvolvem anticorpos reativos contra este peptídeo (Souza et.al., 1992). Vale ressaltar que a mesma população de autoanticorpos reconhece tanto o peptídeo como a integrina.

Muito tem se discutido a respeito da universalidade da hipótese (Beattie, 1990). Particularmente, acho uma postura muito simplista achar que determinado fenômeno possa ser universal, excetuando-se, obviamente, aqueles fenômenos básicos e fundamentais como síntese protéica. Da mesma forma, acredito ser ingênuo condicionar a aplicabilidade de uma idéia a uma suposta universalidade. Uma análise da literatura, mesmo superficial, permitirá concluir que a hipótese é aplicável. Muitos grupos vêm

contribuindo significativamente nas suas áreas de atuação usando a hipótese da hidropaticidade complementar no estudo de interações protéicas. Não há dúvida, entretanto, que uma análise mais profunda das forças responsáveis pela interação entre peptídeos sense e antisense é necessária. Apesar do excelente trabalho desenvolvido pelo grupo de Irvin Chaiken neste campo, estou certo de que a elucidação destas forças passa pela utilização de NMR (nuclear magnetic resonance) e difração de raios X.

#### **Objetivos:**

A razão deste trabalho reside na determinação do sítio de ligação ao substrato da enzima colagenase intersticial. Abordou-se este ponto através da hipótese da hidropaticidade complementar. Da mesma forma estudou-se a interação fibronectina/colágeno. Isto devido ao fato da fibronectina interagir com o domínio do colágeno suscetível à clivagem pela colagenase. Finalmente, abordou-se a evolução da família das MMP discutindo-se, principalmente a evolução da atividade catalítica e da especificidade ao substrato.

## **Material e Métodos**

**Peptídeos:** Todos os peptídeos usados neste trabalho foram adquiridos comercialmente da Neosystem (Strasbourg, França). Os peptídeos usados em imunizações foram adquiridos já conjugados com KLH (keyhole limpet hemocyanin).

**Anti-peptídeos:** O peptídeo TKKTLRT conjugado a KLH (200 ug) foi injetado intraperitonealmente em camundongos Balb-c em intervalos de 2 semanas. Após a quarta injeção, os animais foram sangrados e o título contra o peptídeo não conjugado determinado através do ensaio ELISA.

**Ligação colágeno/peptídeo:** O peptídeo TKKTLRT foi adsorvido em placas de 96 poços (Costar). As placas foram bloqueadas com 3% BSA (Inlab, São Paulo) por 2 horas à temperatura ambiente. As placas foram então incubadas com concentrações crescentes de colágeno marcado por 8 horas à temperatura ambiente. Após lavagem extensiva com TBS contendo 0,05% Tween 20, o material radioativo ligado às placas foi determinado através de um contador gamma 127S Minigamma counter (LKB). Para os ensaios de inibição, o colágeno foi pré-incubado com concentrações crescentes dos peptídeos TKKTLRT, SQNPVQP e LTTTKKR por 2 horas à temperatura ambiente.

**Ensaio de ligação indireta antígeno/anticorpo:** O método de ELISA foi utilizado. Placas de poliestireno da Costar ou placas Immunolon II da Dynatech foram sensibilizadas com diferentes antígenos a diferentes concentrações (peptídeos a 50 ug/ml e

proteínas a 5 ug/ml) por 16 h a 4°C. Todos os antígenos foram diluídos em PBS. Em seguida, a placa foi bloqueada com uma solução de PBS contendo 3% de BSA por 1 h a temperatura ambiente. A incubação com os anticorpos em diferentes concentrações se deu por 2 horas à temperatura ambiente. Seguiu-se uma lavagem extensiva com PBS contendo 1% Tween 20 (Riedel-de-Haen AG, Srelze, Hannover). Em seguida, as placas foram incubadas com anticorpos dirigidos contra a porção constante das IgG de camundongo (Sigma) por 1 h à temperatura ambiente. Tais anticorpos secundários estavam conjugados com peroxidase. Após extensiva lavagem como citado acima, um tampão contendo OPD (Sigma) a 30 mg/ml foi usado para a revelação que foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8N. As densidades óticas foram determinadas em leitora automática a 492 nm. Vale ressaltar que em todos os ensaios foram feitos controles usando BSA e peptídeos ou proteínas não relacionadas.

**Inibição da ligação direta antígeno/anticorpo:** Em todos os ensaios de inibição, os competidores foram incubados previamente com os anticorpos primários por 2h à temperatura ambiente a concentrações variadas. A mistura anticorpo/competidor foi então adicionada as placas de ELISA contendo o antígeno. Com excessão deste ponto específico, todo o protocolo é idêntico ao descrito no tópico acima.

**SDS-PAGE e Western blot:** Gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) a 7,5% foi preparado conforme já descrito (Souza & Brentani, 1992). A solução protéica a ser aplicada foi misturada ao tampão de amostra redutor (Tris-HCl 62 mM, SDS 2%, glicerol 40 %, azul de bromofenol 0,2% e 200mM 2-mercaptoetanol) sendo submetido à

fervura por 5 minutos (Laemmli, 1970). Para os ensaios de Western blot, as bandas protéicas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm). A membrana foi bloqueada com PBS contendo 5% de leite liofilizado (Molico) por 1 hora e incubada com os respectivos anticorpos primários por 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem extensiva com PBS contendo 0,5% Tween 20 e 0,5% de Molico o anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina foi adicionado por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem extensiva com a mesma solução acima, foi adicionado o tampão de revelação contendo 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato e "nitro blue tetrazolium chloride" (BRL).

**Imunofluorescência:** Cortes histológicos de cérvix uterino de ratas grávidas foram desparafinizados e hidratados. O bloqueio de sítios inespecíficos foi feito incubando-se as lâminas em soro normal de cavalo (diluído a 1:40 em PBS pH 7,4). Após lavagem com PBS, o soro contra o peptídeo TKKTLRT foi adicionado sobre os cortes por 2 horas à 37°C. Seguiu-se uma lavagem extensiva com PBS e a incubação com o anti-IgG de camundongo conjugado à FITC por 1 hora à 37°C. Após lavagem e montagem, as lâminas foram observadas em um microscópio EX-EF (Nikon).

**Isolamento do colágeno tipo I:** Colágeno tipo I usado em todos os experimentos foi purificado de tendão da cauda de rato como descrito (Souza & Brentani, 1992). 05 ratos foram sacrificados e suas caudas dissecadas para a extração das fibras colágenas. As fibras foram picadas na presença de 0,5 N de ácido acético e deixadas por 7 h a 4°C em 300 ml do ácido. Em seguida, a mesma solução foi deixada sob agitação à 4 °C por 16 h. Seguiu-se uma

centrifugação a 6.500 rpm por 1 h. A fração sobrenadante foi dializada contra tampão fosfato pH 8.0 contendo 5mM EDTA por 48 h com várias trocas do tampão. Seguiu-se uma centrifugação por 30 minutos a 7.000 rpm. O precipitado foi ressuspendido em ácido acético 0,5 N.

**Marcação de colágeno:** Colágeno intersticial foi marcado com iodo 125 pelo método da cloramina T conforme descrito (Souza e Brentani, 1992), com uma atividade específica média de 0,9 uCi/ug. A separação do colágeno marcado do iodo livre deu-se através de uma coluna de gel filtração (G-25) e diálise.

**Imunoprecipitação:** Este protocolo de imunoprecipitação é o mesmo descrito por Pasqualini et.al.(1989) com poucas modificações. Todas as etapas foram realizadas a 4°C. Sobrenadante de queratinócito ativado com tripsina foi pré-incubado com soro normal de coelho por 3h, seguindo uma incubação com proteína A acoplada a Sepharose CNBr 4B (Sigma) por 1 h. A fração não-ligante desta resina (100 ul) foi incubada com 5 ul do soro anti-TKKTLRT por 3 h. Após esta etapa, seguiu-se uma incubação com 30 ul Proteína A/ Sepharose por 1h. A fração ligante desta coluna foi extensivamente lavada com Tris 50 mM, pH 7,4 contendo 0.05% Tween 20, 0.5M NaCl. Em seguida foi adicionado tampão de amostra redutor (para SDS-PAGE) ou tampão de amostra para zimograma.

**Zimograma:** O material imunoprecipitado por anti-TKKTLRT e pelo soro normal foram aplicados a SDS-PAGE 7,5% onde 01 ug de colágeno do tipo 1 marcado com  $^{125}\text{I}$  havia sido co-polimerizado. O método é uma modificação daquele reportado por Irvine et.al. (1990).

As amostras foram misturadas com um tampão de amostra modificado (sem 2-mercaptoetanol e contendo 5% SDS) e a eletroforese foi realizada a 4°C. Após a corrida o gel foi incubado por 30 minutos a 37°C em Triton X-100 seguido por uma incubação de 16 horas em 0,05 M Tris-HCl, pH 7,4 contendo 5mM CaCl<sub>2</sub>. Em seguida, o gel foi incubado no mesmo tampão contendo 100 ug/ml de tripsina por 4 horas e seco. Atividade colagenolítica foi visualizada por autoradiografia.

**Cultura de queratinócitos e processamento do sobrenadante:**

Queratinócitos obtidos de prepúcio de recém nascidos foram crescidos a baixa confluência a 37°C em KGM (Keratinocyte Growth Media) sem soro. O meio foi coletado após 48-96 h e precipitado com uma solução de sulfato de amônio saturada (20% do volume final). A fração sobrenadante desta precipitação foi coletada e dializada contra grande volume de PBS contendo CaCl<sub>2</sub>.

**Ativação do sobrenadante de queratinócito:** 100 ul do sobrenadante processado era ativado proteoliticamente adicionando-se 10 ul de uma solução de tripsina (Boehringer - Mannheim) a 1 mg/ml por 10 minutos a 37°C. Após esta incubação, a tripsina foi inativada adicionando-se 10 ul de inibidor de tripsina (Sigma) a uma concentração de 10 mg/ml. Vale ressaltar que tal concentração de inibidor é suficiente para inativar toda a tripsina adicionada previamente.

**Ensaio colagenolítico I:** O método de Yoshioka et.al.(1987) foi usado em alguns ensaios colagenolíticos descritos neste trabalho. Colágeno intersticial foi plaqueado a uma

concentração de 100 ug/ml em placas de poliestireno (Costar) por 7 dias a 4°C. Após lavagem com TBS para descartar as proteínas não adsorvidas, 100 ul de sobrenadante de queratinócito foi adicionado e incubado por 6 h a temperatura ambiente. Após lavagem extensiva com TBS contendo 0,05 Tween 20 e 50 mM de EDTA, um soro de coelho com atividade contra colágeno (cedido pelo Dr. Wilson Savino, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro) foi adicionado por 2 h a temperatura ambiente a uma diluição de 1:200 em TBS. Seguiu-se uma lavagem extensiva como citado acima. Foi adicionado, em seguida, uma solução contendo anticorpos contra IgG de coelho, os quais estavam conjugados a peroxidase, por 1h a temperatura ambiente. Após lavagem extensiva como acima, o tampão de revelação contendo 30 mg/10 ml de OPD (Sigma) foi adicionado e a reação interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8N. As densidades óticas foram medidas em leitor automático a 492 nm. Os ensaios de inibição usando anticorpos anti-TKKTLRT como competidores foram realizados pré-incubando o sobrenadante de queratinócito com anticorpos anti-TKKTLRT (fração IgG) ou IgG normal de camundongo por 2 horas à temperatura ambiente.

**Ensaio colagenolítico II:** Para os ensaios usando-se peptídeos como inibidores da atividade colagenolítica, 10 ug de colágeno marcado foi adsorvida em placa de poliestireno por 12 horas à temperatura ambiente. Seguiu-se uma incubação com os peptídeos competidores em diferentes concentrações por 4 horas à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado o sobrenadante de queratinócito por 6 horas à temperatura ambiente. O material radioativo liberado no sobrenadante após esta incubação foi medido em um 127S minigama counter (LKB).

**Isolamento de IgG:** Soro reativo contra o peptídeo TKKTLRT bem como soro normal de camundongo foram deixados reciclando em coluna de Proteína A/Sepharose, a qual havia sido equilibrada com 0.05M Tris, pH 8.5 contendo 0.15 M NaCl por 12 h a 4°C. Após lavagem extensiva com TBS, o material ligado foi eluído com 0.05 M de glicina, pH 3,0. As frações foram imediatamente neutralizadas com tris 0,05M pH 8.0. As frações mantiveram sua reatividade contra TKKTLRT.

**Acoplamento do peptídeo TKKTLRT à Sepharose CNBr 4B:** 10 mg do peptídeo TKKTLRT foi dialisado contra o tampão de ligação (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3) resultando em uma coluna de 2 ml de resina. Todo o protocolo de acoplamento foi feito segundo instruções do fabricante (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

**Purificação de fibronectina a partir de plasma humano (Engvall & Ruoslahti, 1977):** Plasma humano ( em torno de 400 ml) obtido do banco de sangue do Hospital A.C. Camargo foi submetido a dois ciclos de centrifugação a 6.000 rpm por 10 minutos. O plasma foi diluído v/v com tris 50 mM pH 7,4. Alíquotas de 200 ml desta solução foram aplicados em coluna de gelatina/Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Sweden) e deixado circular por 4 horas à 4°C. Após lavagem extensiva, prosseguiu-se a eluição com tris/uréia 4M. As frações correspondendo ao pico de eluição foram dializadas contra grande volume de PBS. Após dosagem da concentração protéica o material purificado foi analisado por SDS-PAGE. A fibronectina plasmática (100 ug) purificada foi digerida por cathepsina D (Sigma) por 1 hora a 37°C em tris-HCl ph 3.0 para a produção do fragmento de 70 kDa ligante de gelatina.

**Ligação colágeno/fibronectina:** 10 ug/ml de colágeno do tipo I foi plaqueado por 16 horas a 4°C em placas Immobilon II. O bloqueio se deu com uma solução de BSA 1% por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida a fibronectina foi adicionada por 3 horas a temperatura ambiente. Quando necessário, antes desta incubação a fibronectina foi incubada com os íons ou quelantes por 2 horas a temperatura ambiente. Após lavagem extensiva com PBS contendo 0,1% Tween 20, um ensaio de ELISA usando anticorpos contra fibronectina foi realizado como descrito acima e por Brentani et.al. (1988). Nos ensaios de inibição de "binding", o colágeno plaqueado foi incubado com diferentes concentrações dos peptídeos antes da adição da fibronectina.

**Ligação fibronectina/zinco:** 50 ul de Sepharose (zinc-chelate column da Sigma) previamente saturada com zinco foi incubada com concentrações crescentes de fibronectina marcada com <sup>125</sup>I em tampão contendo 0,4 M NaCl por 4 horas à temperatura ambiente. Após lavagem extensiva com PBS, a radioatividade em cada alíquota foi medida em um contador de radiação gamma (127S Minigamma counter-LKB).

**Construção dos dendogramas:** Os dendogramas foram construídos usando CLUSTAL com os seguintes parâmetros: gap penalty=5, window size=10, filtering level=2,5. Os mesmos parâmetros foram usados em alinhamentos múltiplos.

**Comparação de sequências por análise matricial:** O método utilizado foi aquele de Needleman & Wunsch (1970). Em todas as matrizes usadas o número de sequências randômicas construídas foi

100. Os parâmetros de cada matriz são dados em seguida: Dayhoff MDM 78, bias de 60 e "gap penalty" de 60; "unitary matrix", bias de 0 e "gap penalty" de 3; "genetic code", bias de 0 e "gap penalty" de 4; "structure-genetic", bias de 0 e "gap penalty" de 6.

## **RESULTADOS**

### **I- Interação colágeno/colagenase**

#### **I.1- Dedução dos peptídeos complementares**

A figura 02 mostra a sequência de amino ácidos da região clivada pela colagenase nas cadeias alpha2 (a) e alpha1 (h) do colágeno do tipo I. A partir dos clones de cDNA das respectivas cadeias foi possível deduzir as sequências complementares à região clivada (c e f) e, finalmente, os peptídeos codificados por estas sequências. A figura 03 mostra que os peptídeos deduzidos apresentam um perfil de hidropaticidade muito parecido. Segundo o princípio da hidropaticidade complementar, estes peptídeos deveriam representar, ao menos conformacionalmente, o sítio de ligação ao substrato nas colagenases intersticiais. No entanto, estas sequências não foram encontradas nas colagenases até então clonadas. Em colagenase de fibroblasto humano (Goldberg, 1986) foi encontrada uma sequência peptídica (SQNPVQP) cujo perfil de hidropaticidade é muito similar ao dos peptídeos deduzidos (figura 03). Em colagenase de neutrófilo humano (Hasty et.al., 1990) uma sequência de perfil hidropático muito similar existe na mesma posição da molécula. Tal sequência, SSNPIQP, mostra inclusive uma homologia a nível de sequência primária com um dos peptídeos deduzidos.

#### **I.2- Interação peptídeo/colágeno**

Se os peptídeos deduzidos representavam o sítio de ligação ao colágeno, talvez fosse possível visualizar tal interação. Para

	G <sub>772</sub>	P	Q	G	L	L	G <sub>778</sub>	a
5' -	GGT	CCT	CAG	GGT	CTT	CTT	GGT - 3'	b
5' -	ACC	AAG	AAG	ACC	CTG	AGG	ACC - 3'	c
	T	K	K	T	L	R	T	d
	S	S	N	T	L	R	S	e
5' -	TCC	AGC	AAT	ACC	CTG	AGG	TCC - 3'	f
5' -	GGA	CCT	CAG	GGT	ATT	GCT	GGA - 3'	g
	G <sub>772</sub>	P	Q	G	I	A	G <sub>778</sub>	h

FIGURA 02: Sequências dos domínios nos colágenos intersticiais que são clivados pelas colagenases e os peptídeos deduzidos complementares. a, sequência de aminoácidos da cadeia alpha 2 do colágeno do tipo I; b, sequência nucleotídica correspondente à sequência de aminoácidos mostrada em a; c, sequência nucleotídica complementar à sequência mostrada em b; d, sequência de aminoácidos codificado pela sequência de c, ou seja, o peptídeo complementar ao peptídeo mostrado em a; h, sequência de aminoácidos da cadeia alpha 1 do colágeno do tipo I; g, sequência nucleotídica que codifica a sequência mostrada em h; f, sequência nucleotídica complementar àquela mostrada em g; e, peptídeo codificado pela sequência complementar mostrada em f.

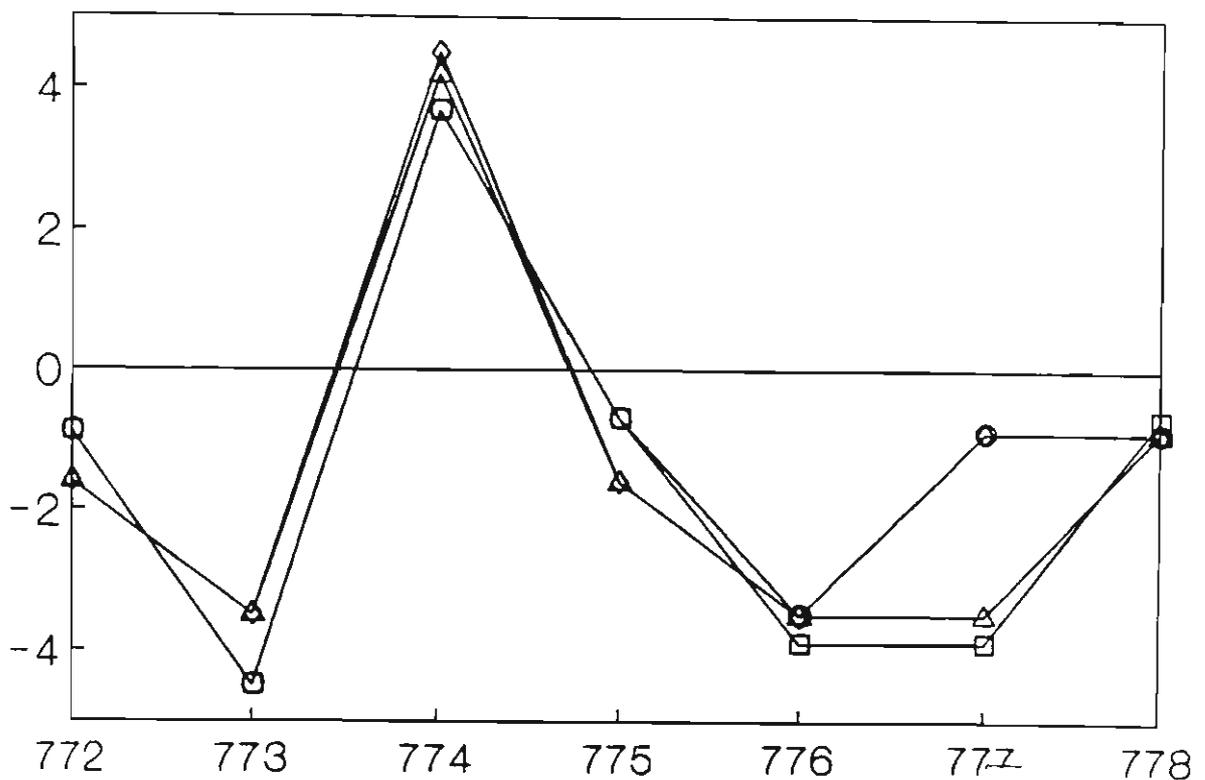


FIGURA 03: Perfil de hidropaticidade dos peptídeos deduzidos e daqueles presentes nas collagenases intersticiais. TKKTLRT (□), SSNTLRS (○), SQNPVQP encontrada na collagenase de fibroblasto (Δ), SSNPIQP encontrada na collagenase de neutrófilo (◇). O eixo Y corresponde ao coeficiente de hidropaticidade e os números do eixo X correspondem aos resíduos da região do colágeno clivada pela collagenase.

tanto, o peptídeo TKKTLRT foi adsorvido em placa de poliestireno e a captura de colágeno marcado com  $^{125}\text{I}$  foi medida em um contador de radiação gama. A figura 04a mostra o perfil gráfico desta interação característico de uma reação saturável. Esta ligação é inibida pelo próprio peptídeo em solução, bem como pelo peptídeo SQNPVQP presente na colagenase de fibroblasto humano mas não pelo peptídeo controle LTTTKKR (figura 04b). Observe que este peptídeo controle apresenta a mesma composição que o TKKTLRT porém com um perfil de hidropaticidade totalmente diferente (inserto da figura 04b). O ensaio de inibição consistiu na pré-incubação do colágeno marcado com os peptídeos (ver Material e Métodos). Esta interação também foi verificada através de uma coluna de Sepharose-TKKTLRT. A incubação de concentrações crescentes do colágeno marcado com a resina produziu uma ligação também com características saturáveis (figura 05). O material eluído da resina apresenta um padrão eletroforético compatível com o colágeno (inserto da figura 05). Talvez a conclusão mais importante destes resultados seja a de que o peptídeo SQNPVQP presente na colagenase de fibroblasto liga colágeno já que ele é capaz de inibir a interação deste com TKKTLRT. Isto também origina a possibilidade de que ambos os peptídeos apresentem a mesma conformação preferencial.

### **I.3- Reconhecimento da colagenase intersticial pelo soro anti-TKKTLRT**

Anticorpos contra o peptídeo TKKTLRT acoplados ao carreador KHL foram originados através de imunizações em camundongos Balb-c. A figura 06 mostra a reatividade deste anti-soro contra o peptídeo imunógeno não-acoplado. Novamente vale ressaltar que se o peptídeo

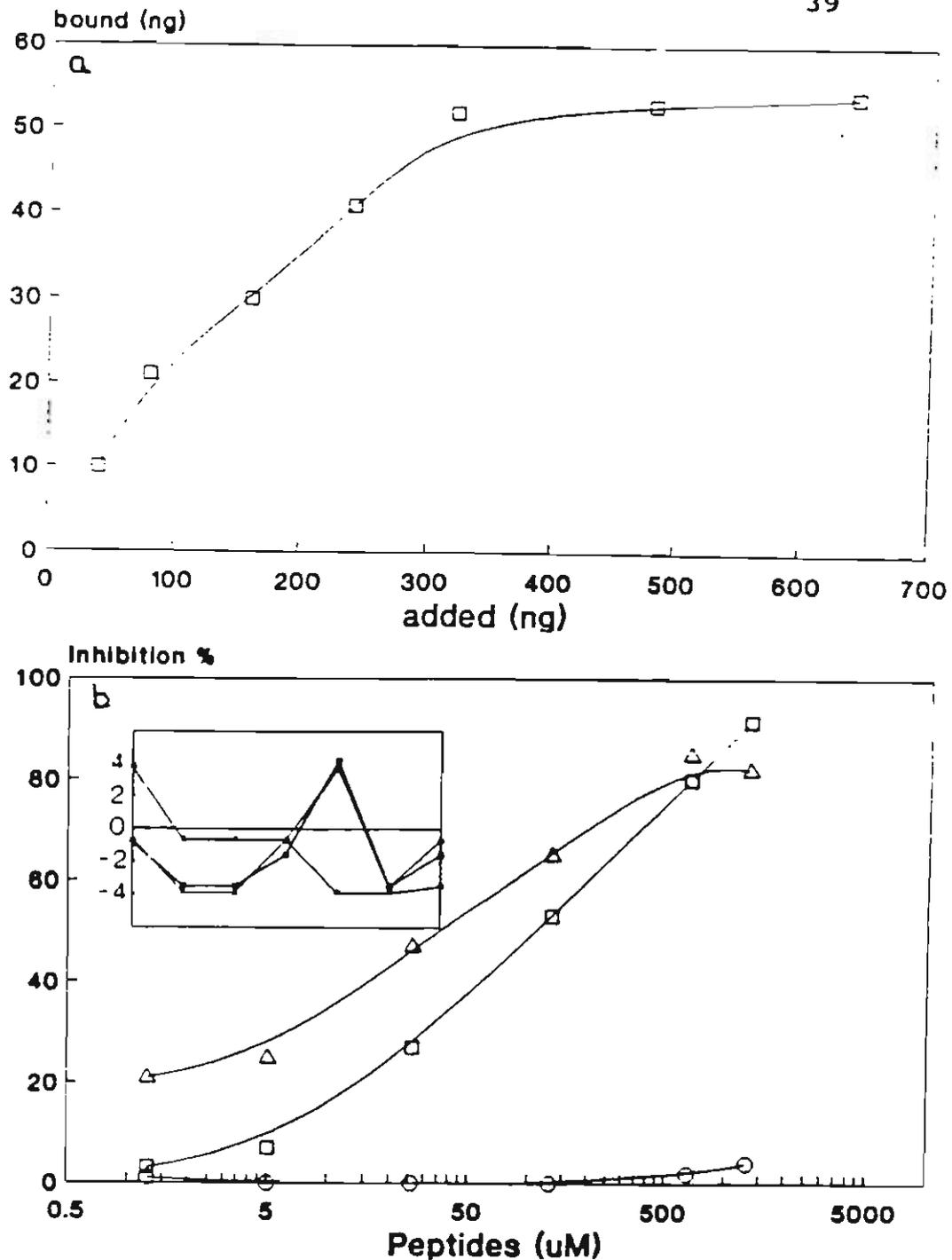


FIGURA 04: a, ligação entre colágeno e TKKTLRT (□).

Concentrações crescentes de colágeno marcado foram incubadas em poços previamente adsorvidos com o peptídeo deduzido TKKTLRT. A ligação específica foi definida como o total ligado menos a ligação em BSA. b, Antes da incubação com os poços adsorvidos com TKKTLRT, uma concentração definida de colágeno marcado foi incubado or 2h com concentrações crescentes de TKKTLRT (□), SQNPVQP(Δ) e LTTTKKR(○). Observe o perfil de hidropaticidade dos peptídeos envolvidos (inserção em b).

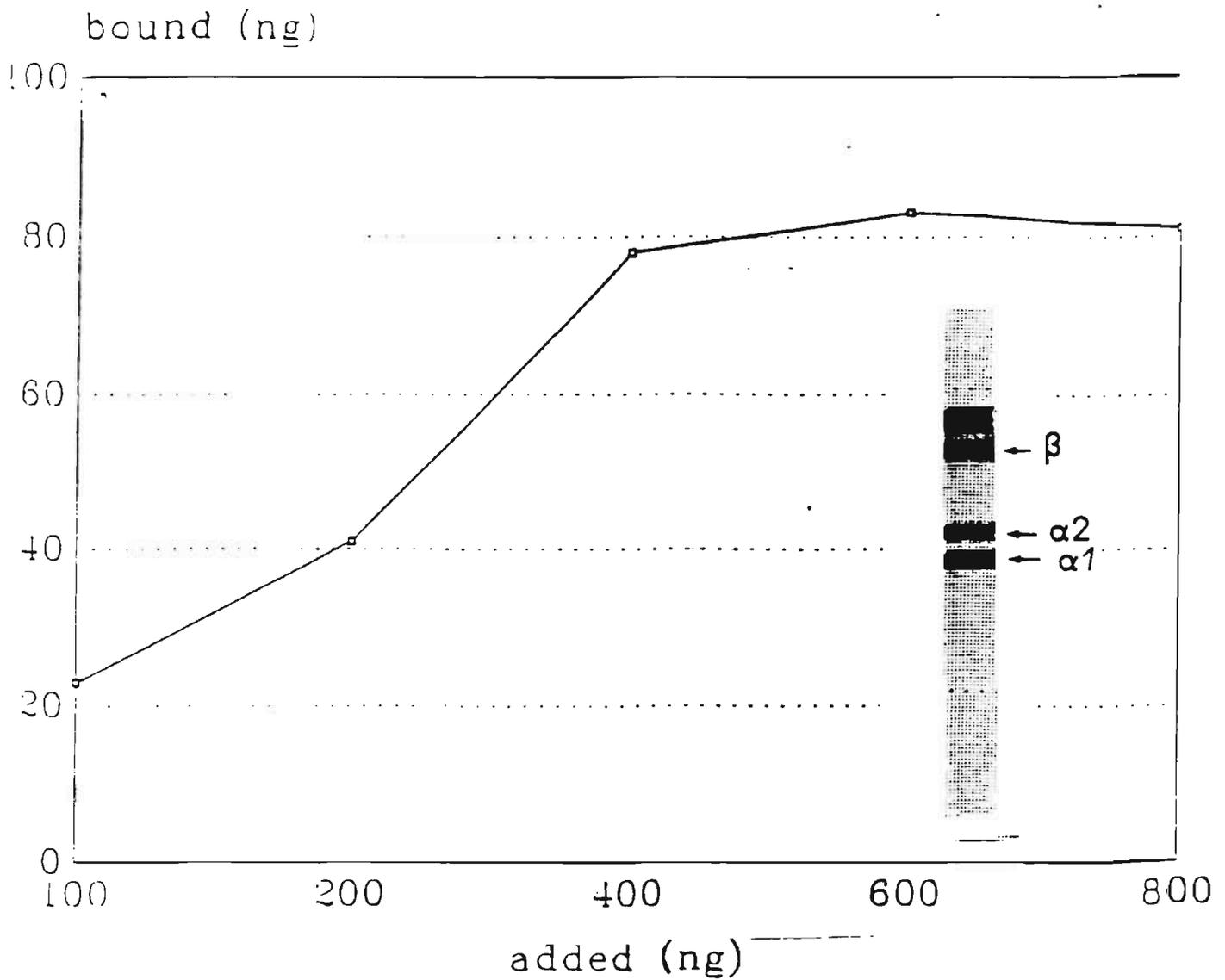


FIGURA 05: Ligação entre colágeno marcado e TKKTLRT acoplado à coluna de Sepharose. Os eixos X e Y correspondem à quantidade de colágeno adicionado e ligado respectivamente. O inserto mostra o padrão eletroforético do material eluído com a indicação das cadeias constituintes.

deduzido representa uma região da enzima, então, anticorpos dirigidos contra tal peptídeo deveriam também reconhecer a enzima. Isto é mostrado na figura 07a. O soro anti-TKKTLRT reagiu com colagenase de fibroblasto purificada (gentilmente cedida pelo Dr. A.Z. Eisen - Washington University, St. Louis, MO). Uma pré-incubação deste soro com os peptídeos TKKTLRT e SQNPVQP aboliu a ligação enquanto os peptídeos controles descritos acima não apresentaram efeito inibitório (figura 07b). Este resultado sugere que anticorpos dirigidos contra o peptídeo deduzido TKKTLRT reconhecem colagenase via a sequência SQNPVQP, favorecendo a idéia da similaridade da conformação de ambas as sequências. Foi decidido abordar esta provável interação entre os anticorpos e a colagenase através de outros ensaios. Por exemplo, o mesmo anti-soro reconhece uma proteína do sobrenadante de queratinócitos cuja migração eletroforética coincide com a de colagenase (figura 08, coluna 1). É importante mencionar que queratinócitos em cultura produzem colagenase intersticial (Peterson et.al., 1987). Por análise zimográfica, foi possível verificar que o material imunoprecipitado por estes anticorpos apresenta atividade colagenolítica na mesma altura (figura 08 coluna 3). Para sanar qualquer dúvida de que o material imunoprecipitado é colagenase, foi usado um anti-soro contra colagenase de fibroblasto cross-reativo com colagenase de outras origens, gentilmente cedido pelo Dr.A.Z. Eisen. A coluna 5 da figura 08 mostra que tal anti-soro reconheceu a mesma banda descrita acima. É possível identificar também que houve uma reação entre 67 kDa e 97 kDa. Esta reação talvez se deva a formação de um complexo entre a colagenase intersticial e seu inibidor natural, TIMP. A soma dos pesos moleculares de ambas as proteínas coincide com o peso da banda reativa.

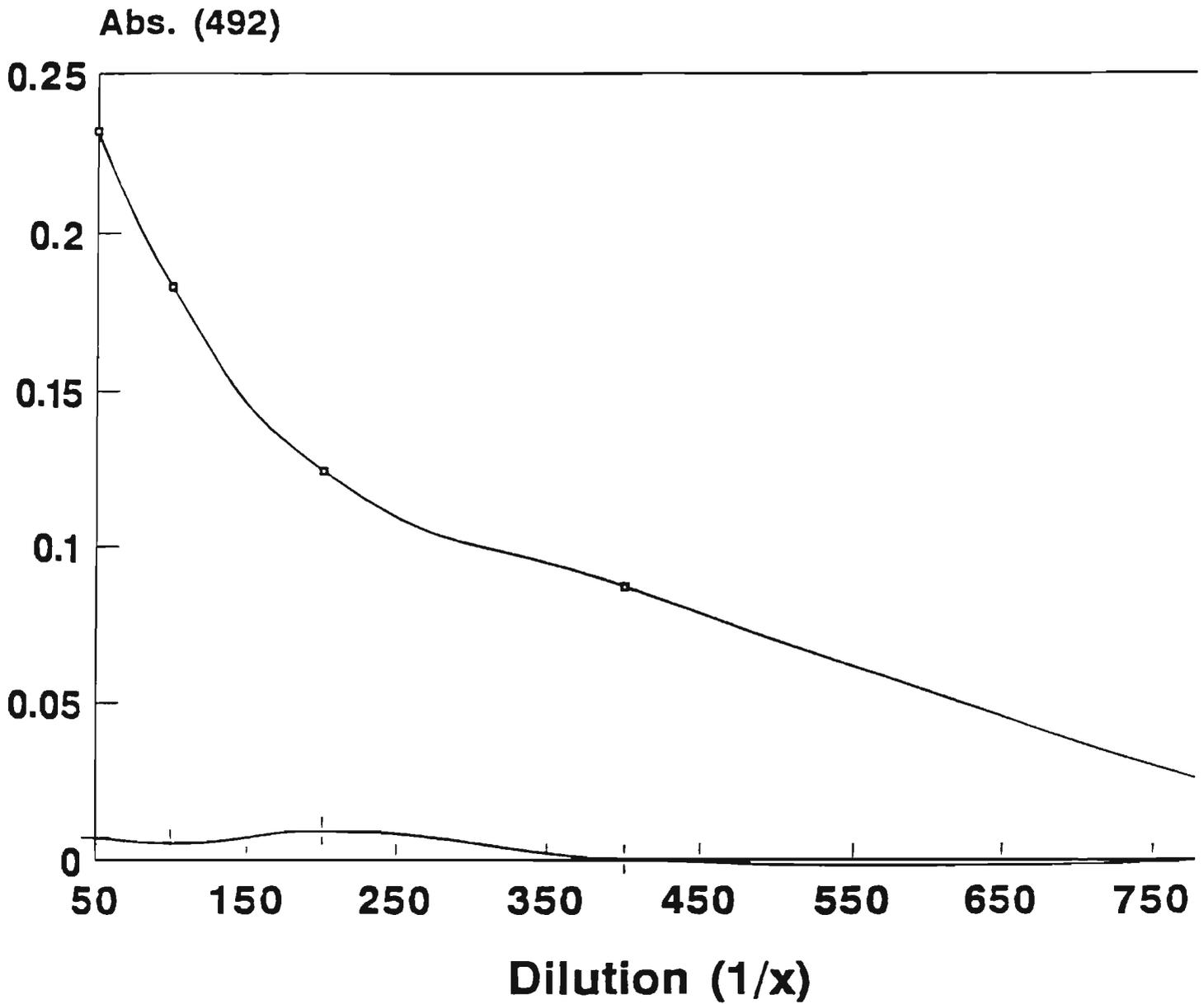


FIGURA 06: Ensaio de ELISA mostrando o reconhecimento do peptídeo TKKTLRT pelo soro anti-TKKTLRT. Reação com o soro normal é mostrada em (+).

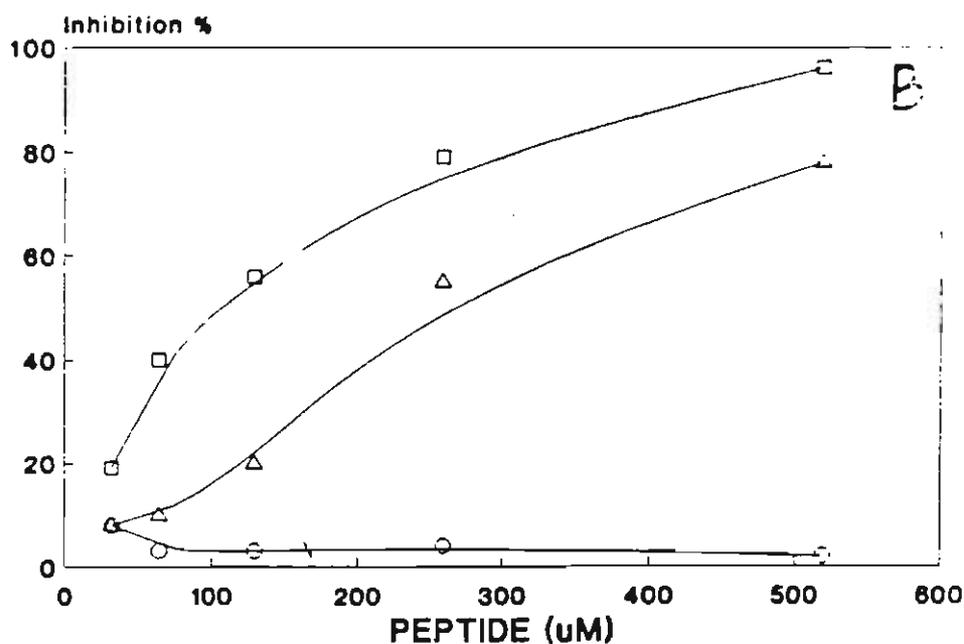
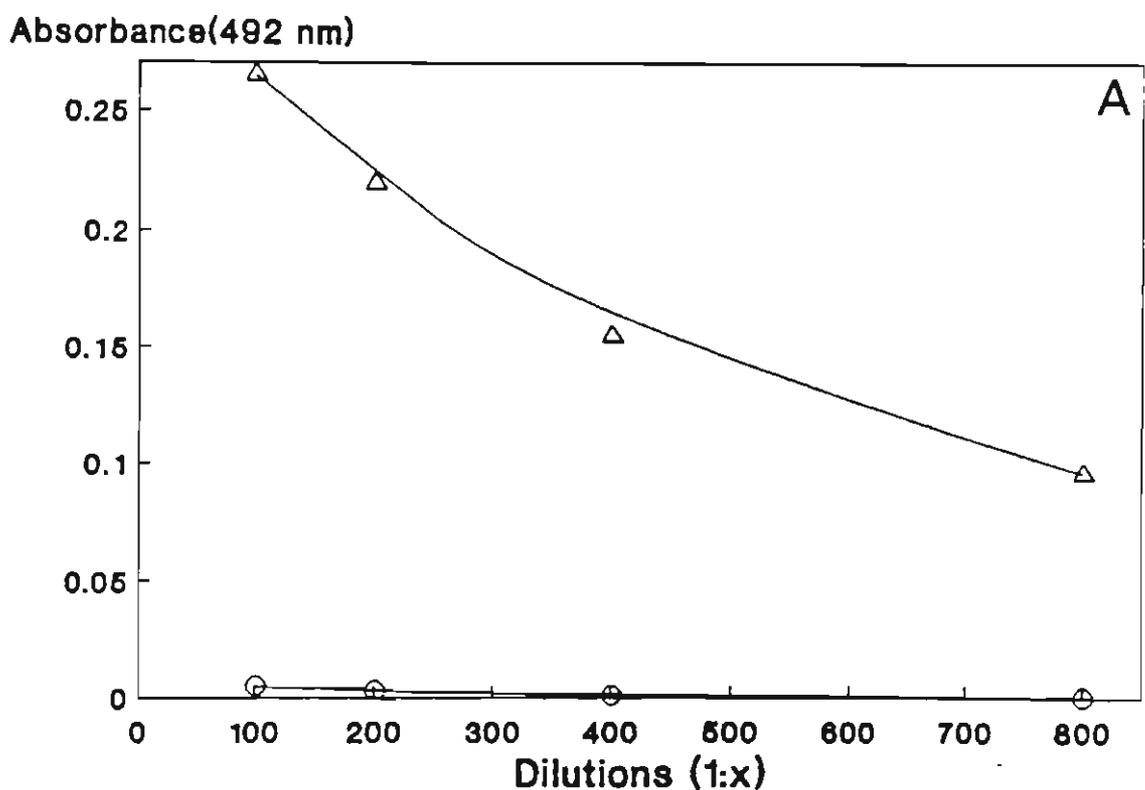


FIGURA 07: a, ELISA mostrando o reconhecimento por anticorpos contra TKKTLRT da colagenase de fibroblasto purificada ( $\Delta$ ). ( $\circ$ ) reação de um soro normal com a mesma enzima. b, para determinar o padrão de inibição da reação mostrada em a por alguns peptídeos, o soro anti-TKKTLRT foi pré-incubado com TKKTLRT ( $\square$ ), SQNPVQP ( $\Delta$ ) e LTTTKKR, o peptídeo controle ( $\circ$ ).

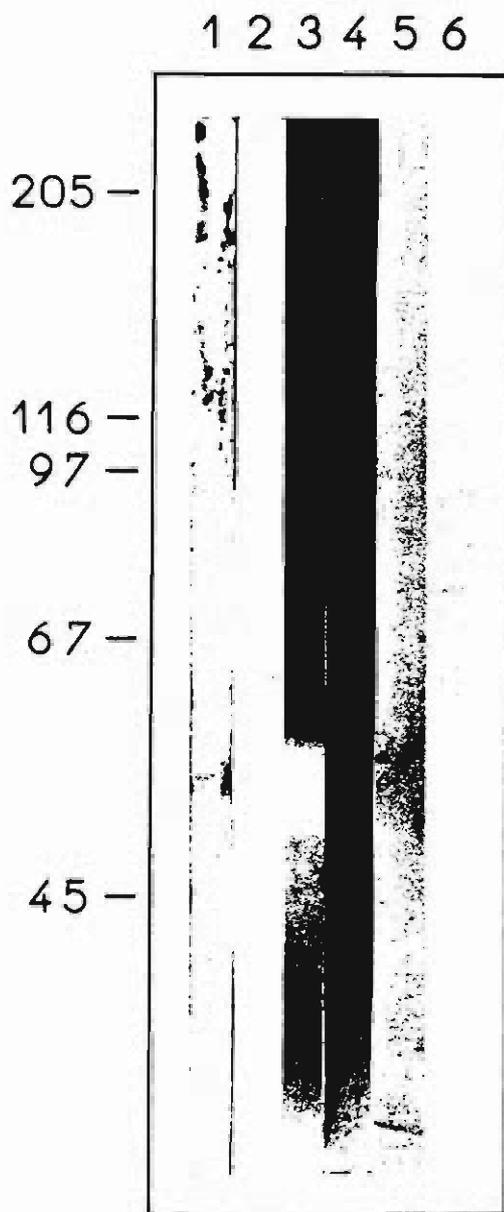


FIGURA 08: Análise da proteína reconhecida pelo soro anti-TKKTLRT em sobrenadante de queratinócito humano. Coluna 1, Western blot mostrando que o soro anti-TKKTLRT reconhece uma banda no extrato de sobrenadante de queratinócito de caráter migratório similar à colagenase intersticial. Coluna 2, reação com o soro normal. Coluna 3, Zimograma mostrando que o material imunoprecipitado por anticorpos contra TKKTLRT a partir do sobrenadante de queratinócito apresenta atividade colagenolítica na altura da banda reativa mostrada na coluna 1. Coluna 4, Zimograma do material imunoprecipitado por soro normal. Coluna 5, Western blot do material imunoprecipitado por anticorpos contra TKKTLRT usando um soro de coelho contra colagenase de fibroblasto cross-reativo com colagenases intersticiais de outras origens. Coluna 6 reação com soro normal de coelho.

Um dos modelos mais interessantes para se estudar colagenólise é a dilatação do cérvix uterino durante o parto. Tal dilatação é promovida por um infiltrado de células polimorfonucleares, as quais liberam grande quantidade de colagenase intersticial. Vale ressaltar que as células musculares lisas uterinas também produzem colagenase intersticial. A análise de cortes histológicos do cérvix uterino permite visualizar tal processo da mesma forma que permite uma análise imunocitoquímica dos componentes envolvidos. Os anticorpos anti-TKKTLRT reconhecem um material associado aos polimorfonucleares como mostrado na figura 09. Como o principal componente secretado por estas células neste sítio anatômico é a colagenase intersticial e pelo fato deste mesmo anticorpo reconhecer colagenase em outros modelos, é razoável supor que o material reconhecido na figura 09 é a colagenase.

#### **I.4- Inibição da atividade colagenolítica**

Se anticorpos anti-TKKTLRT reconhecem colagenase e se este reconhecimento ocorre via a sequência SQNPVQP, resta saber o efeito destes anticorpos na atividade catalítica da enzima. Isto foi visualizado através de um ensaio colagenolítico descrito por Yoshioka et al. (1987). O ensaio consiste na adsorção de colágeno intersticial em placas de poliestireno. Após a adição de uma solução contendo a enzima a ser estudada, efetua-se um ensaio de ELISA usando-se anticorpos anti-colágeno. A atividade da enzima é dada pela diferença na densidade ótica entre o colágeno sem degradação (a solução enzimática é substituída por tampão) e o colágeno degradado. A amostra enzimática utilizada nestes ensaios

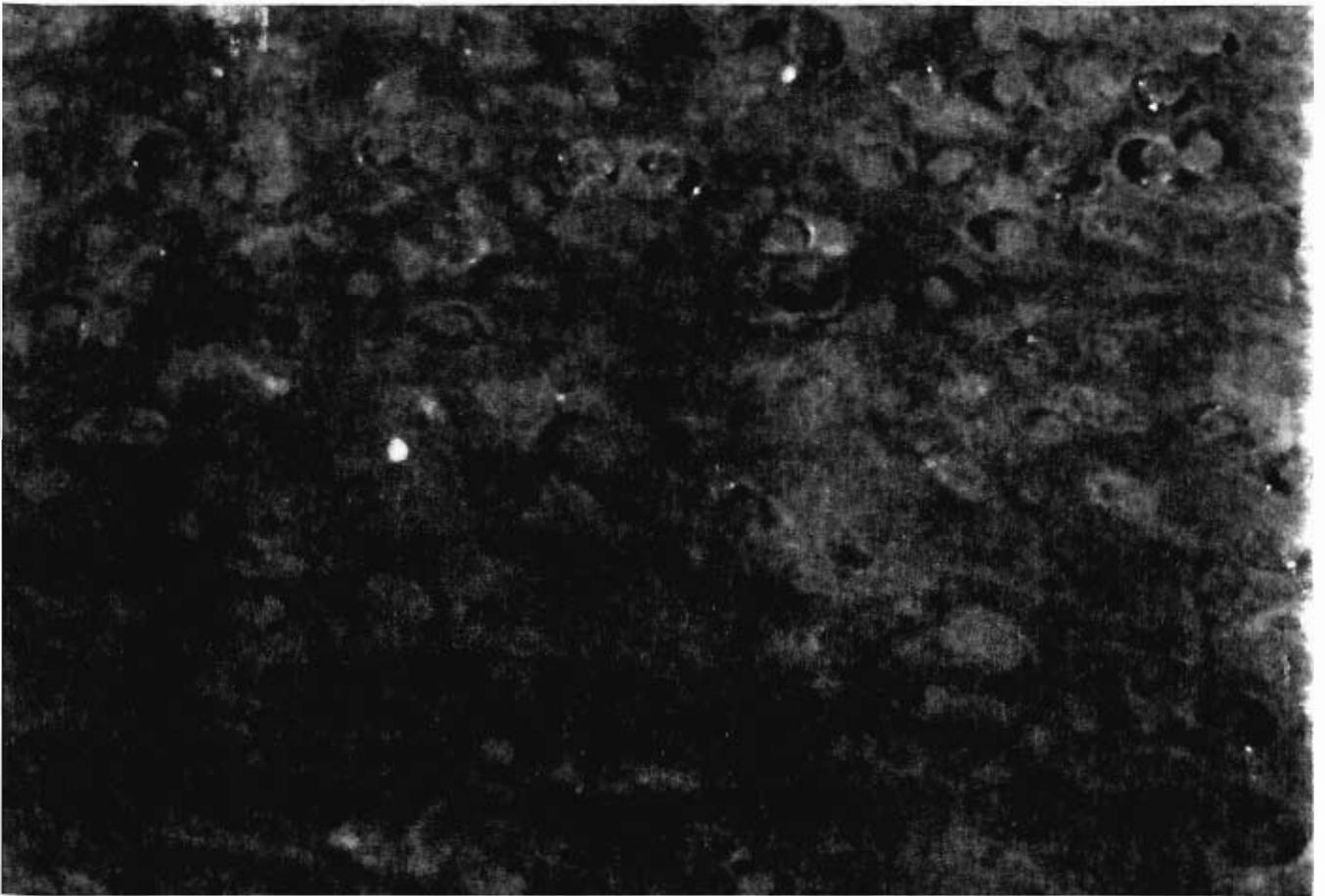


FIGURA 09: Imunofluorescência mostrando a reatividade do anti-TKKTLRT associada aos eosinófilos em um corte de cérvix uterino gravídico.

foi o sobrenadante de queratinócito humano que produz colagenase intersticial. Como já detalhado em Material e Métodos, o sobrenadante foi concentrado por precipitação com sulfato de amonio. Como mostrado na figura 10, a fração IgG do soro anti-TKKTLRT foi capaz de inibir a atividade colagenolítica de um sobrenadante de queratinócito em cultura enquanto a mesma fração, porém de um soro normal, não apresentou qualquer efeito inibitório. A utilização de uma fração purificada de IgG foi devida a existência de diferentes inibidores de protease séricos. Da curva mostrada na figura 10, é possível deduzir uma constante de inibição operacional ( $K_{iop}$ ) na ordem de 0.3  $\mu$ M. Da mesma forma os peptídeos TKKTLRT e SQNPVQP também inibiram a atividade colagenolítica do sobrenadante de queratinócito como mostrado na figura 11, enquanto um peptídeo controle apresentou um baixo nível de inibição.

## **II- Interação fibronectina/colágeno**

### **II.1 Similaridade hidropática entre os domínios ligantes de colágeno em colagenase e fibronectina**

Como já discutido na Introdução desta tese, a molécula de fibronectina interage com o colágeno através do sítio suscetível à colagenase. Também foi mostrado que um domínio da fibronectina parece ser responsável por esta interação (AAHEEICTTNEGVMY). A análise do perfil de hidropaticidade deste peptídeo mostra que os últimos sete resíduos apresentam uma similaridade com os

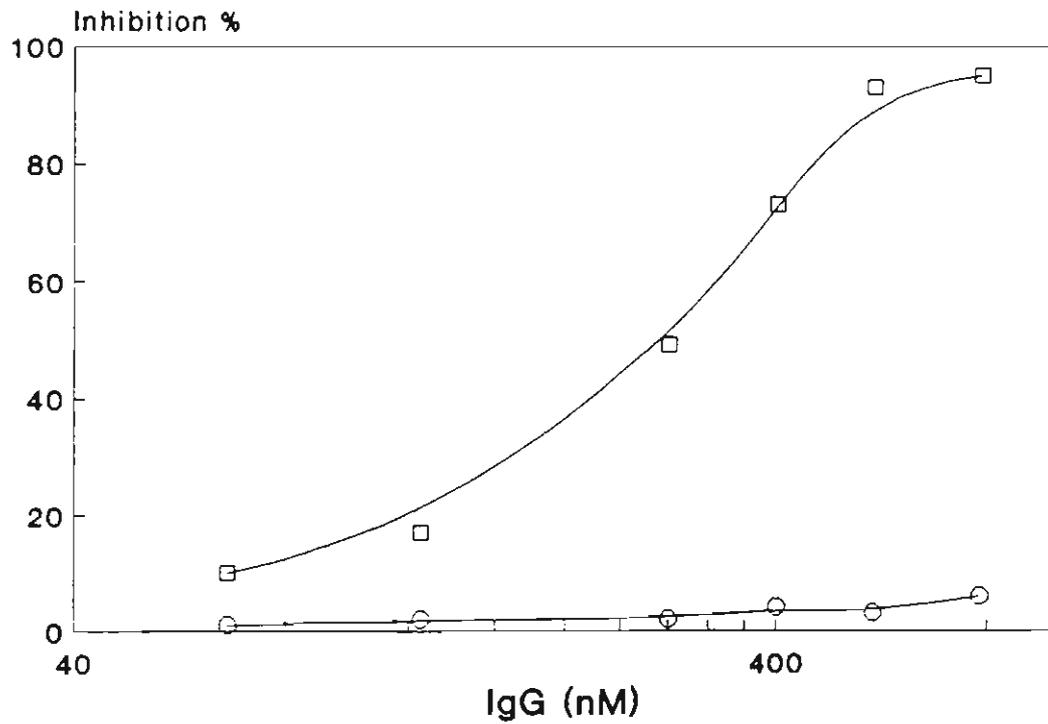


FIGURA 10: Efeito da fração IgG do soro anti-TKKTLRT ( $\square$ ) e do soro normal ( $\circ$ ) sobre a atividade colagenolítica do sobrenadante de queratinócito medido pelo método de Yoshioka et.al. (1987). Da curva mostrada em ( $\square$ ) foi possível deduzir um  $K_i$  operacional de 0,3  $\mu\text{M}$ .

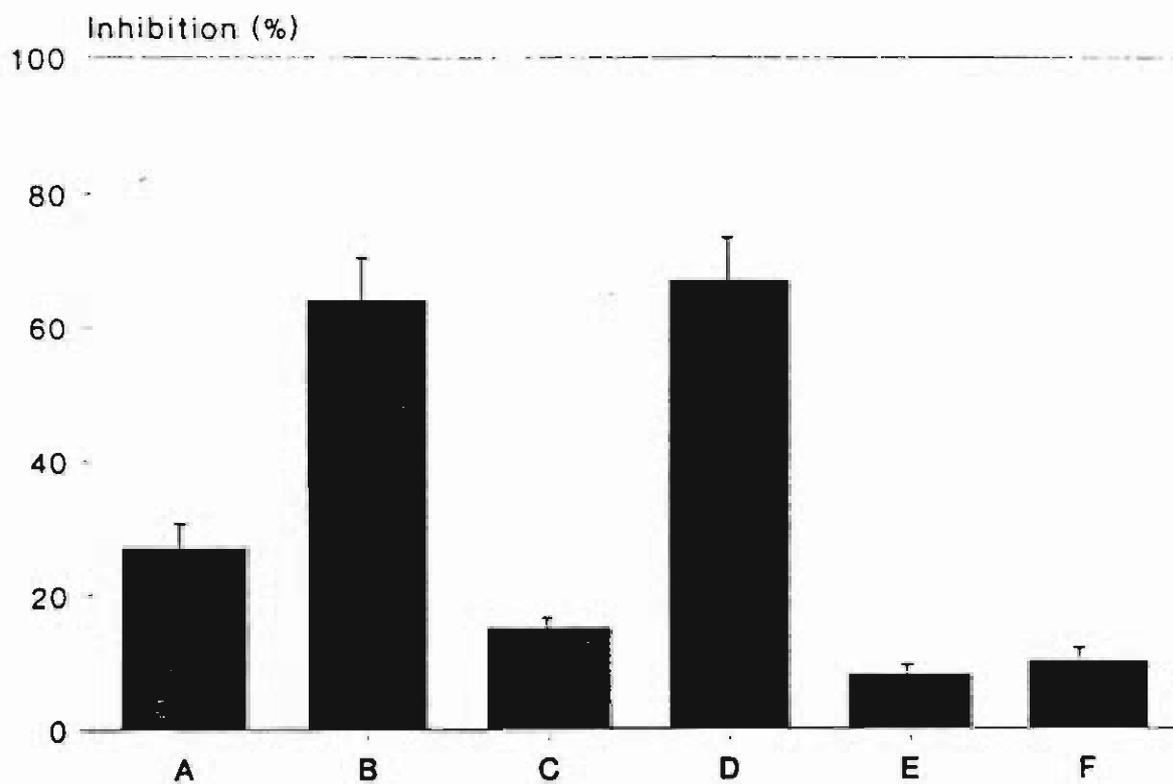


FIGURA 11: Efeito de TKKTLRT , SQNPVQP e LTTTKKR sobre a atividade colagenolítica do sobrenadante de queratinócito. A, TKKTLRT 2mM; B, TKKTLRT 5mM; C, SQNPVQP 2mM; D, SQNPVQP 5mM; E, LTTTKKR 2mM; F, LTTTKKR 5mM.

peptídeos TKKTLRT e SQNPVQP (figura 12).

## **II.2 Reconhecimento de fibronectina por anticorpos anti-TKKTLRT.**

É possível especular, baseado na semelhança ao nível de hidropaticidade, que os peptídeos SQNPVQP e TNEGVMY tenham uma conformação similar. Tal especulação se torna mais plausível pelo fato de ambos os peptídeos estarem envolvidos em interações com o mesmo sítio do colágeno. A figura 14 mostra que anticorpos anti-TKKTLRT, os quais reconhecem a sequência SQNPVQP em colagenase, reconhecem a molécula de fibronectina em ensaios de ELISA. Obviamente que este reconhecimento pode estar ocorrendo via qualquer sequência dentro da molécula de fibronectina. A fibronectina plasmática foi digerida por cathepsina D para a produção de um fragmento de 70 kDa que mantém a atividade de interação com o colágeno. Através de Western blot foi possível visualizar a produção deste fragmento usando-se anticorpos anti-fibronectina (coluna A da figura 14). A coluna B da mesma figura mostra que anticorpos anti-TKKTLRT reconhecem o fragmento de 70 kDa. A utilização de IgG normal de camundongo como controle negativo sugere que o reconhecimento mostrado na coluna B é específico. Este fragmento retém a capacidade de interagir com o colágeno como é mostrado na coluna D onde a fita de nitrocelulose foi incubada com colágeno do tipo I e depois submetida a um Western blot com anticorpos anti-colágeno. A omissão do passo de incubação com o colágeno eliminou o reconhecimento mostrado na coluna D (coluna E).

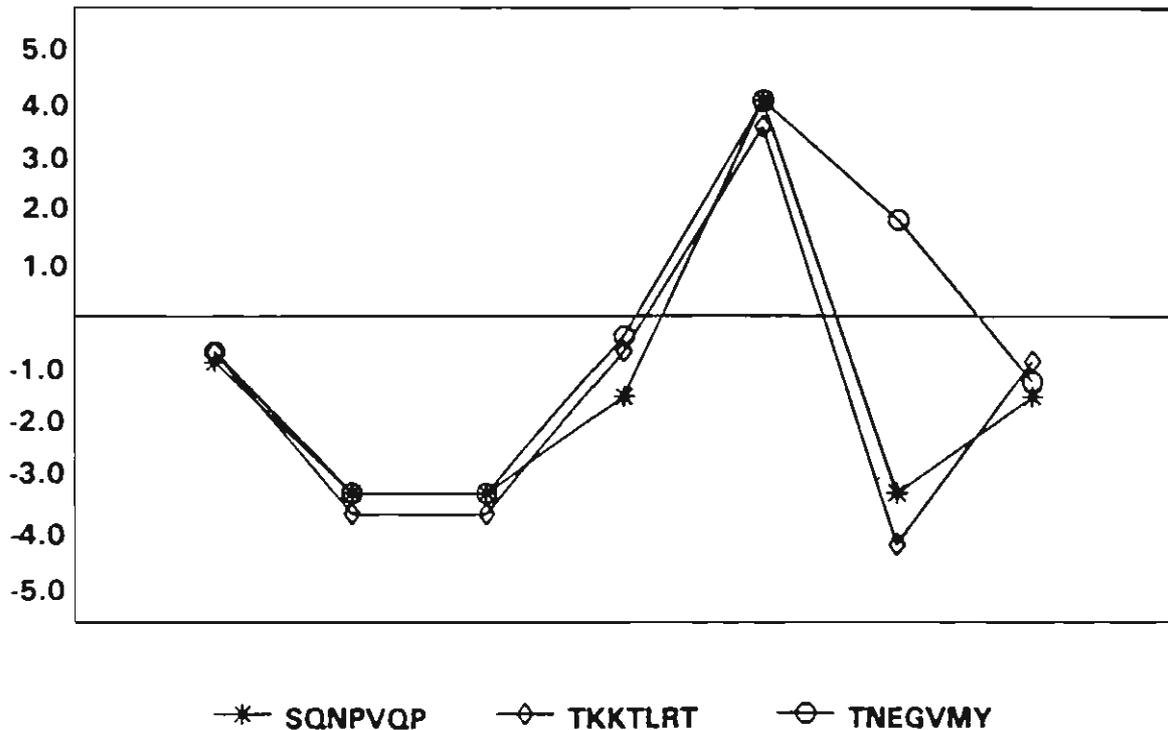


FIGURA 12: Perfil de hidropaticidade dos peptídeos TKKTLRT (◇), SQNPVQP (\*), e TNEGVMY (○). Observe a similaridade entre o peptídeo da fibronectina (TNEGVMY) e aquele presente na colagenase de fibroblasto (SQNPVQP). O eixo Y corresponde ao coeficiente de hidropaticidade enquanto o eixo X corresponde a sequência dos peptídeos no sentido amino-carboxi terminal.

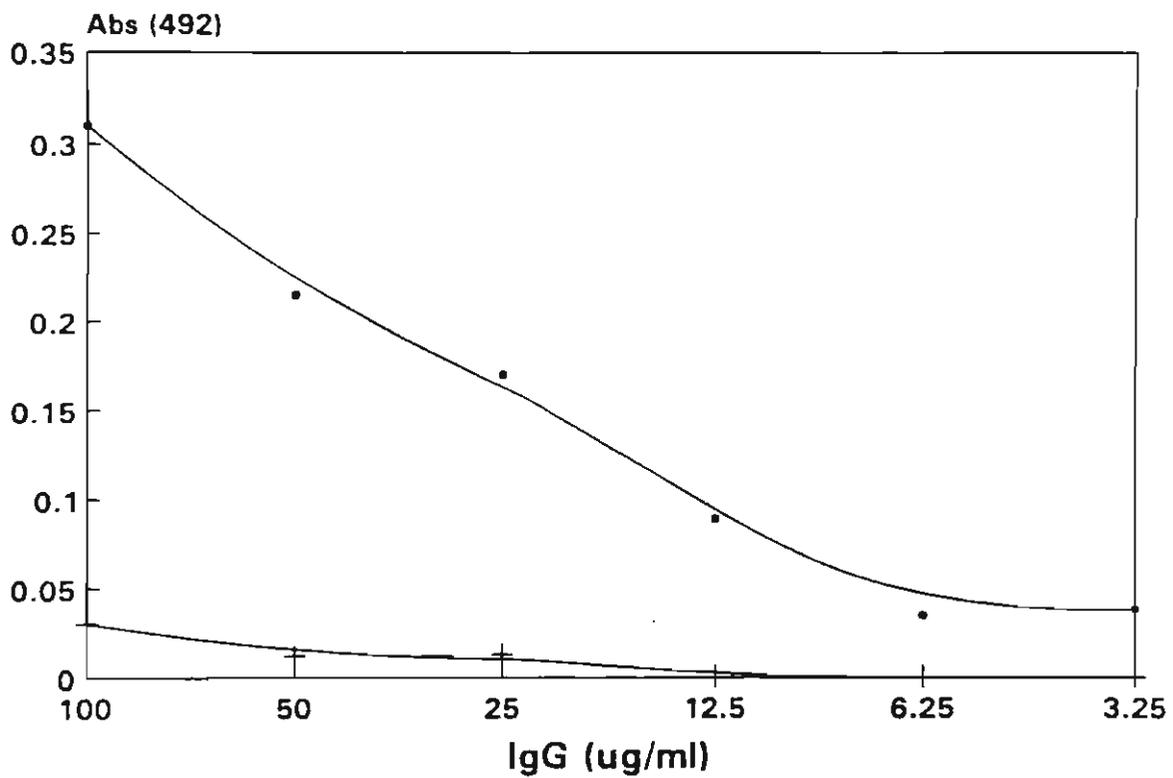


FIGURA 13: Ensaio de ELISA mostrando a reatividade de anticorpos anti-TKKTLRT contra fibronectina (■); (+) reatividade da fração IgG de um soro normal também contra fibronectina.

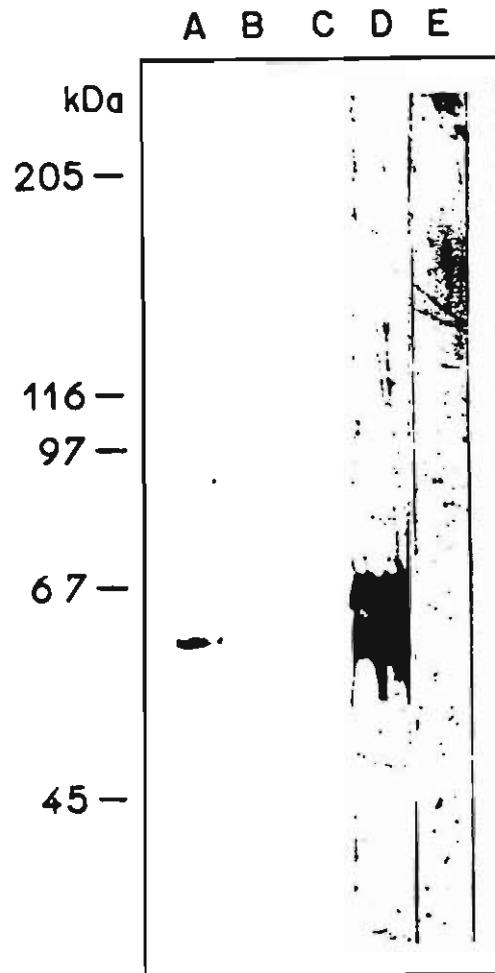


FIGURA 14: A fibronectina nativa foi digerida por cathepsina D. Os produtos desta digestão foram submetidos à SDS-PAGE e transferidos para fita de nitrocelulose. A coluna A mostra os produtos desta digestão como visualizado por uma reação com IgG anti-fibronectina. Anticorpos contra TKKTLRT reconhecem o fragmento de 70 kDa (coluna B) que ainda mantém a atividade ligante de colágeno (coluna D). As colunas C (IgG normal) e E (omissão do colágeno) são os respectivos controles de B e D.

### **II.3 "Binding" colágeno/fibronectina**

O protocolo usado para os ensaios de "binding" entre o colágeno e a fibronectina está detalhado no Material e Métodos. Vale ressaltar, no entanto, que a interação foi visualizada através de um ensaio de ELISA usando-se anticorpos anti-fibronectina. A figura 16 mostra que a adição de concentrações variadas de fibronectina produz uma curva com um padrão típico de saturação. Como os valores do eixo Y correspondem a densidade ótica produzida pela quantidade de fibronectina em cada ponto específico torna-se complexo uma análise cinética desta curva.

### **II.4 O potencial inibitório dos peptídeos SQNPVQP e TNEGVMY sobre a interação colágeno/fibronectina**

O ensaio discutido acima foi usado para os ensaios de inibição. Antes da adição de fibronectina, o colágeno foi incubado com uma concentração definida dos peptídeos. Os peptídeos SQNPVQP e TNEGVMY inibiram parcialmente a interação colágeno/fibronectina (figura 15). Os peptídeos LTTTKKR e LTKRRTK, usados como controle negativo, apresentaram um baixo índice de inibição.

### **II.5 O peptídeo da fibronectina responsável pela ligação ao colágeno apresenta uma homologia com o "zinc binding site" de diversas proteases**

Como mostrado acima, o peptídeo AAHEEICTTNEGVMY foi descrito

como importante na interação com o colágeno. Foi mostrado que os últimos sete resíduos apresentam uma similaridade hidropática com a região da colagenase responsável pela interação com o colágeno. Através do alinhamento mostrado na tabela 03, é possível notar que a primeira metade deste peptídeo apresenta um certo grau de homologia com o sítio de ligação ao zinco de várias metaloproteinases. A cisteína presente no peptídeo da fibronectina corresponde a segunda histidina das metaloproteinases e sabe-se que cisteínas também podem estar coordenadas ao zinco.

#### **II.6 Evidências da interação fibronectina/zinco**

A interação fibronectina/zinco foi visualizada utilizando uma "zinc chelate column" (Sigma). A coluna foi saturada com zinco e equilibrada com PBS. Concentrações crescentes de fibronectina foram incubadas com um volume definido da resina. A figura 18 mostra uma ligação entre a fibronectina e a resina com um padrão saturável. O controle negativo deste experimento consistiu na adição de uma grande concentração de zinco à solução de fibronectina incubada com a resina (figura 18).

#### **II.7 Influência de Zn e outros íons na interação colágeno/fibronectina**

Pelo fato deste provável sítio de ligação ao zinco estar localizado na estrutura da fibronectina ao lado da sequência TNEGVMY, especulou-se que a ligação de zinco à fibronectina pudesse alterar a capacidade desta de ligar-se ao colágeno. Como

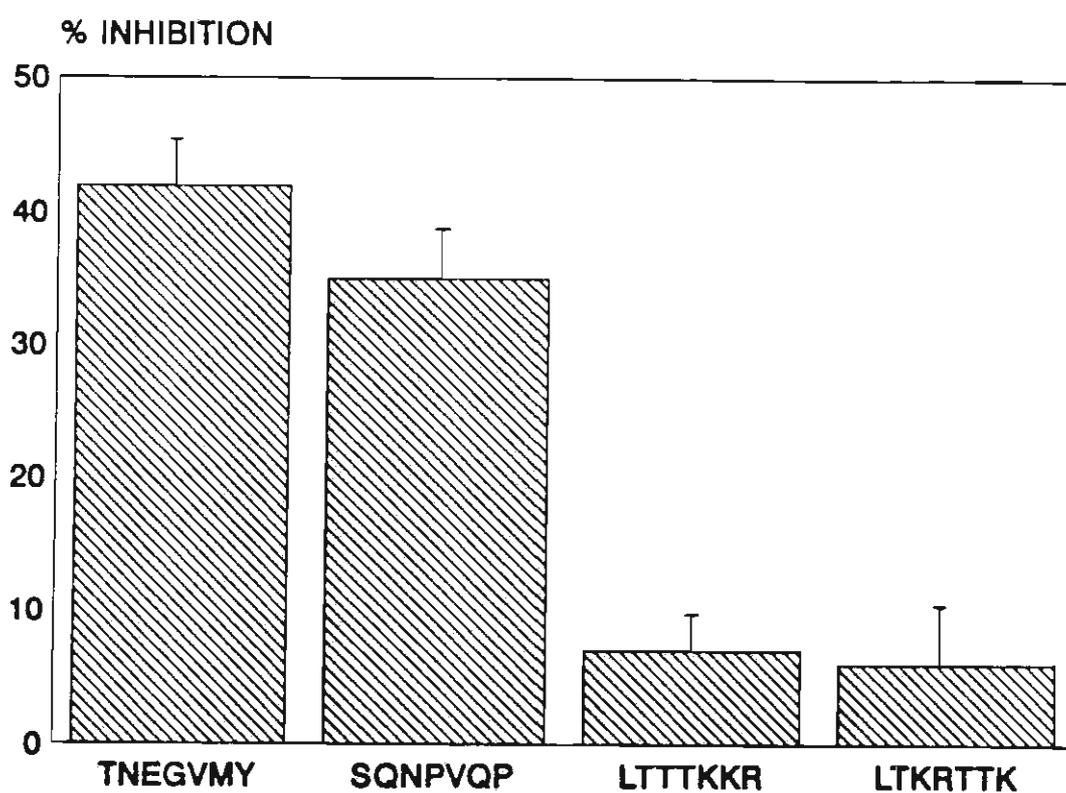


FIGURA 15: Este gráfico mostra a inibição parcial da interação colágeno/fibronectina pelos peptídeos TNEGVMY e SQNPVQP. Os peptídeos LTTTKKR e LTKRRTK que apresentam perfis de hidropaticidade diferentes não se mostraram efetivos na inibição.

<b>Fibronectin</b>	<b>A A H E E I C</b>
<b>Collagenase</b>	<b>A A H E L G H</b>
<b>Stromelysin</b>	<b>A A H E I G H</b>
<b>72 Gelatinase</b>	<b>A A H E F G H</b>

TABELA 03: Homologia a nível de sequência primária entre o possível sítio de ligação ao zinco na fibronectina e aqueles encontrados em diversas metaloproteinases.

pode ser notado na figura 19 a adição de concentrações crescentes de zinco aumentou o "binding" de uma concentração definida de fibronectina ao colágeno. Da mesma forma, uma concentração definida de zinco (10  $\mu\text{M}$ ) aumentou o "binding" de concentrações crescentes de fibronectina ao colágeno (figura 16). A especificidade deste efeito foi testada verificando-se a ação de outros cátions divalentes na interação colágeno/fibronectina (figure 17). Como pode ser analisado nesta figura cálcio, magnésio, ferro e cobre não apresentaram efeito significativo na interação fibronectina/colágeno.

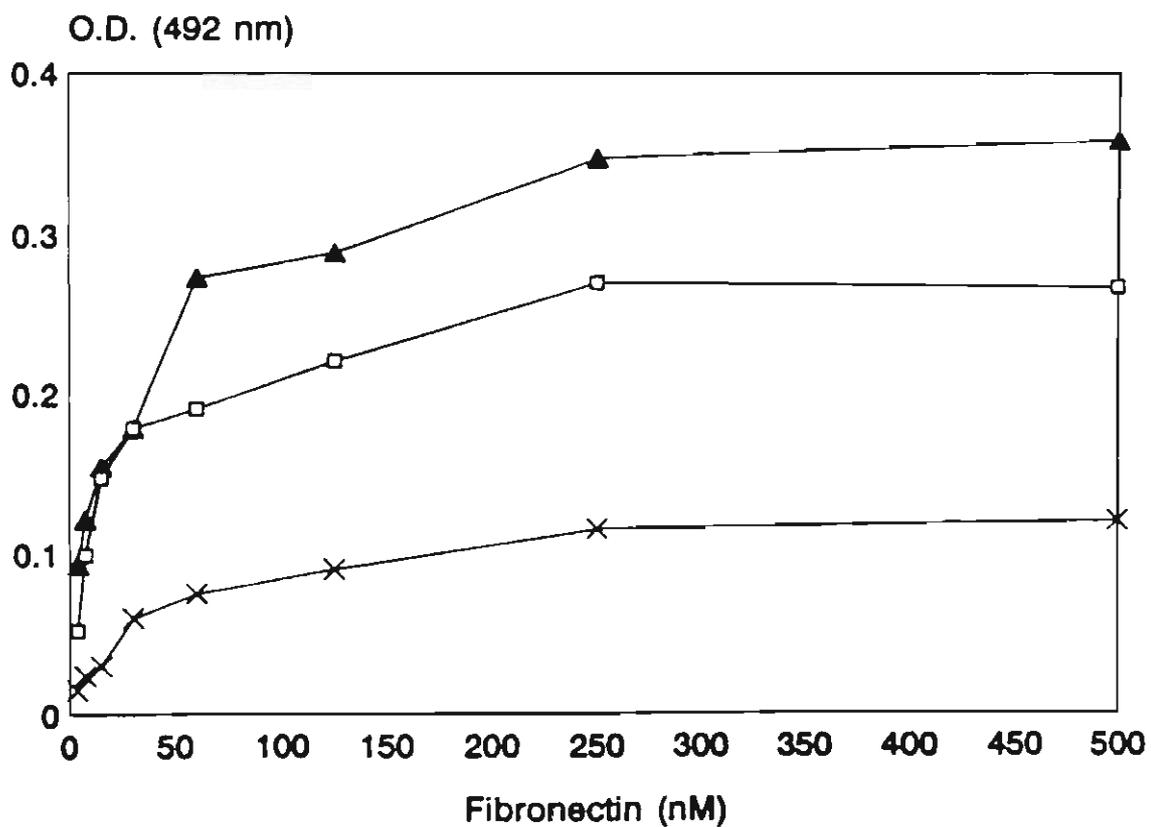


FIGURA 16: Efeito de zinco (▲) e 1,10-Phenantrolina (X) na interação colágeno/fibronectina (□). A ligação colágeno/fibronectina foi observada através de um ensaio tipo ELISA.

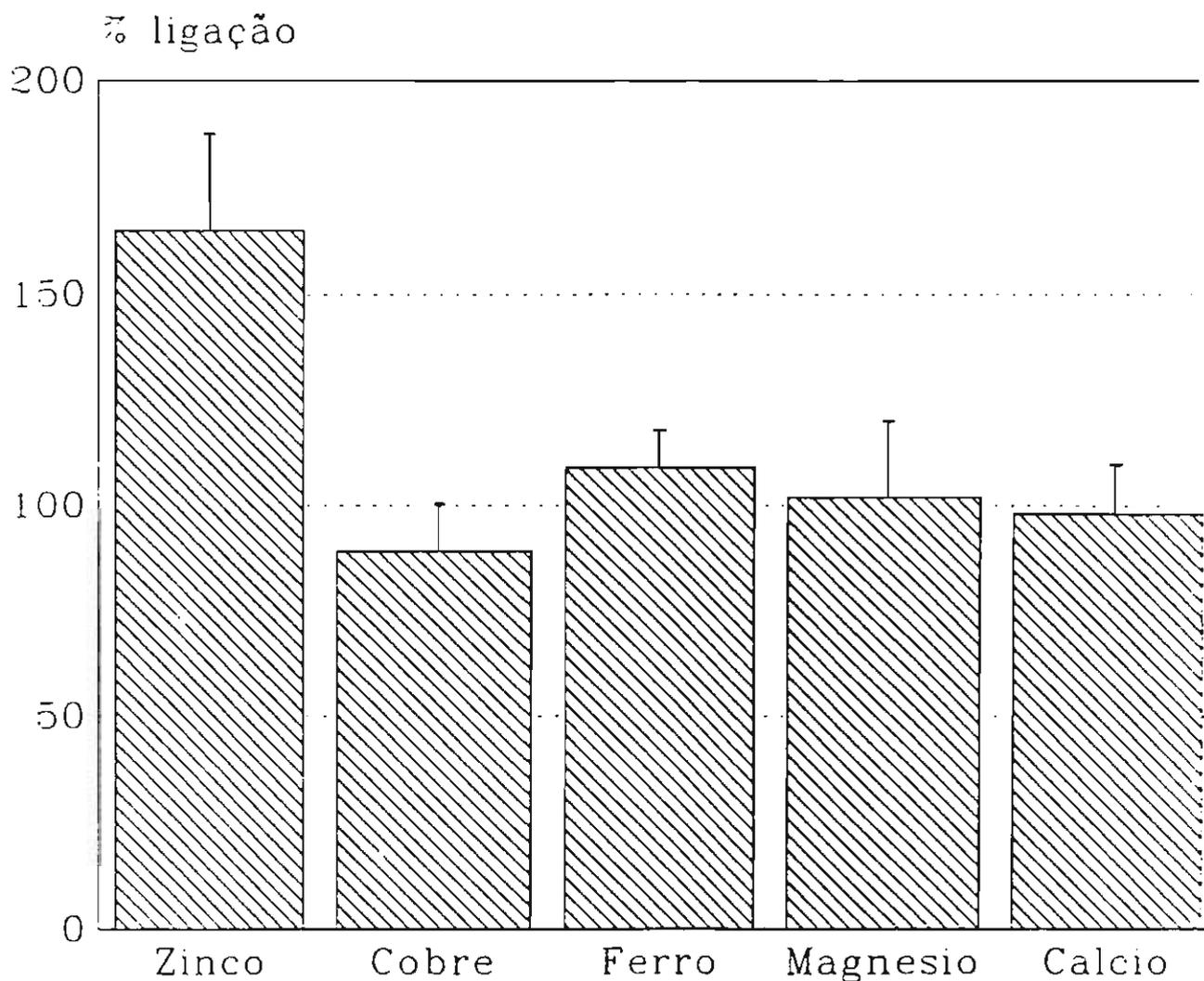


FIGURA 17: Para se testar a especificidade do efeito de zinco sobre a interação colágeno/fibronectina, a fibronectina foi pré-incubada com diferentes cátions divalentes. Observa-se que nenhum deles apresentou uma atividade estimulatória comparável ao zinco.

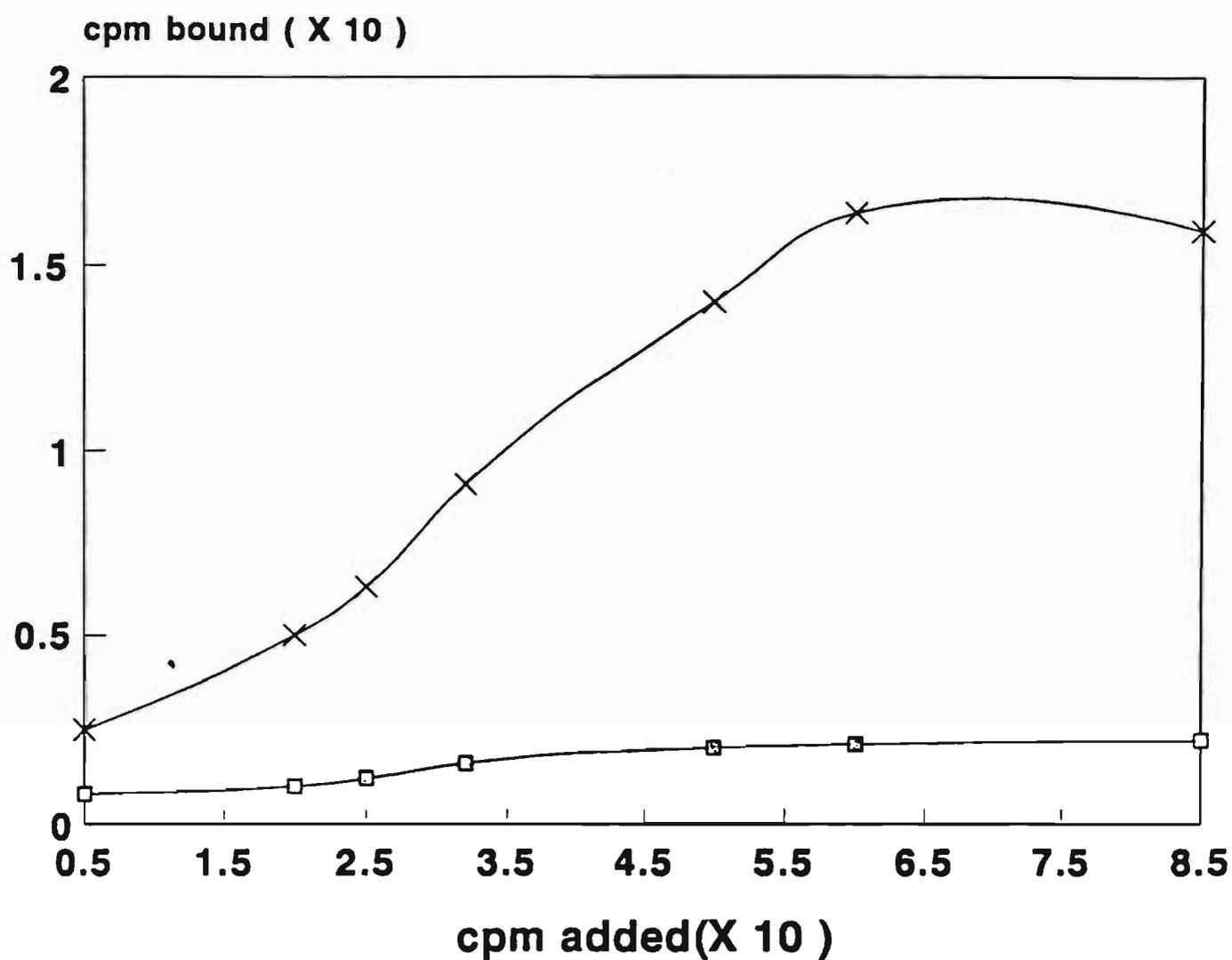


FIGURA 18: Concentrações crescentes de fibronectina marcada foram incubadas com a resina saturada com zinco. Os eixos X e Y correspondem a quantidade em cpm de fibronectina adicionada e ligada.

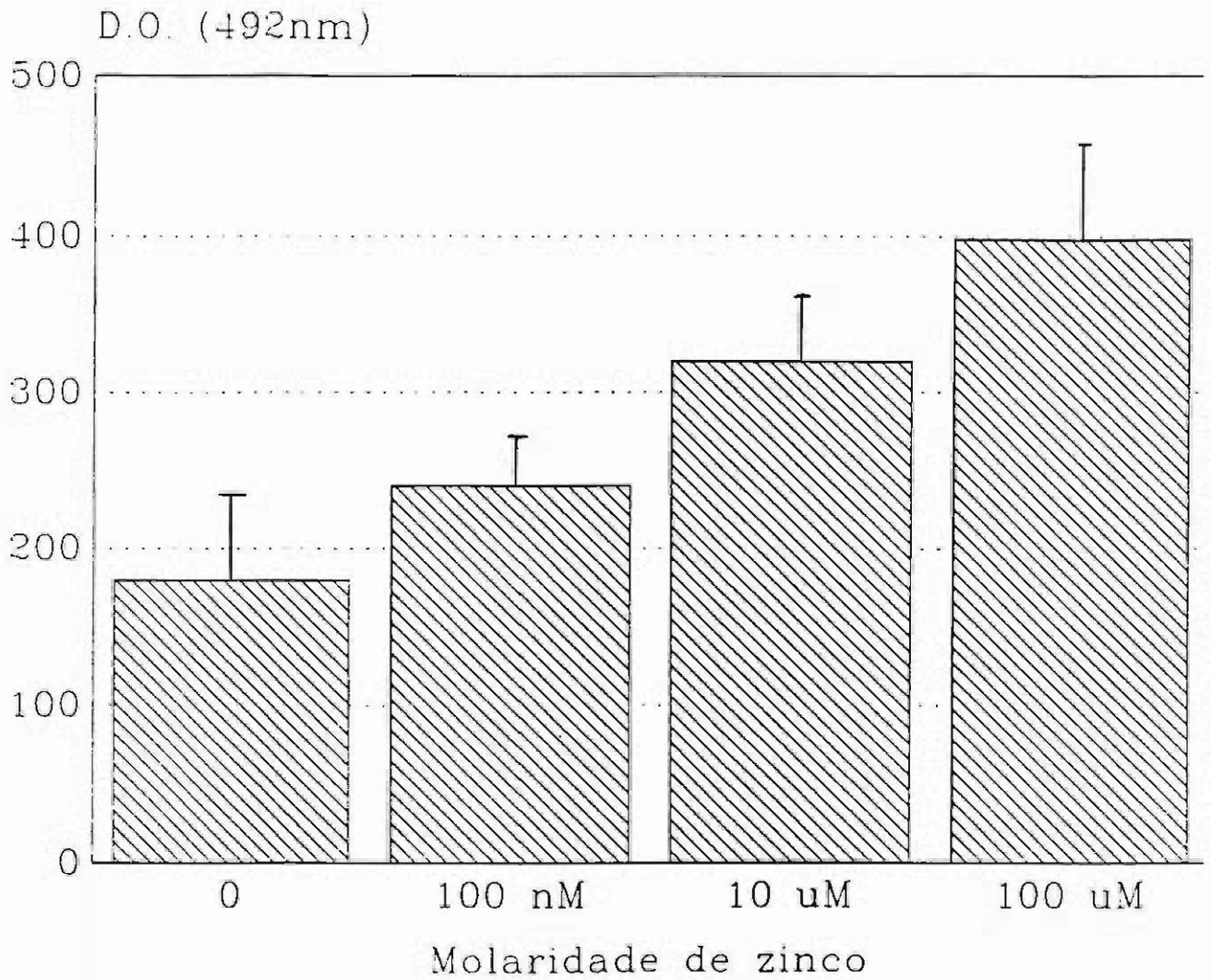


FIGURA 19: Influência de concentrações crescentes de zinco na interação colágeno/fibronectina.

### **III Análise filogenética das MMP**

#### **III.1 Construção de dendogramas das MMP e das metaloproteinasas**

Como já discutido na Introdução, a família das MMP é constituída por diversos membros com um razoável grau de homologia entre si. Uma maneira de relacionar tais sequências é a construção de árvores filogenéticas ou dendogramas. No dendograma da figura 20, construído usando CLUSTAL, percebe-se que as sub-classes (colagenases, estromelisinases e gelatinases) das MMP estão em troncos diferentes.

Com o objetivo de relacionar a família das MMP com algumas das outras famílias da super-família das metaloproteinasas, foi construído um dendograma englobando a maioria das famílias (figura 21). Evidencia-se nitidamente o tronco das astacinas, das MMP, da protease de Serratia entre outros.

#### **III.2 Alinhamento múltiplo de algumas MMP com Protease B de E. chrysanthemi**

A principal pergunta quanto a evolução das MMP é a existência ou não de uma relação filogenética entre esta família e algum membro bacteriano da super-família das metaloproteinasas. Como citado na Introdução, alguns grupos tem falhado na tentativa de encontrar tal relação. Baseado em uma recente publicação do grupo de Murphy (Murphy et.al., 1991), tentou-se também abordar este ponto nesta tese. O dendograma mostrado na figura 22

relaciona algumas MMP com estromelina 3, "hatching enzyme" de ouriço-do-mar e Protease B de *E. chrysanthemi*. Como também visualizado por Murphy, evidencia-se quatro troncos neste dendograma; MMP, stromelysin 3, "hatching enzyme" e a metaloproteinase bacteriana. Com o objetivo de analisar a presença ou não de algum padrão conservado nestes quatro troncos, um alinhamento múltiplo com um representante de cada tronco foi feito. A MMP escolhida foi a colagenase de fibroblasto. Uma homologia significativa entre as quatro sequências foi observada somente na região do núcleo enzimático (figura 23).

### **III.3 Construção das sub-sequências das metaloproteinases**

Com o objetivo de fazer uma análise mais quantitativa desta homologia, novas sequências, correspondendo ao núcleo enzimático, das metaloproteinases foram construídas. Várias perguntas permaneciam sem resposta, entre elas se a homologia observada na figura 23 também existia para outras metaloproteinases. A tabela 04 mostra os resíduos inicial e final destas novas sequências bem como sua nova terminologia e comprimento. Os critérios para a construção destas novas sequências se basearam no alinhamento mostrado na figura 23. Os resíduos de número 100 e 261 foram escolhidos como as extremidades da nova sequência collafrag. Como a partir de agora todas as comparações são feitas com collafrag, baseou-se nesta sequência para a construção das novas sub-sequências. Para tanto, repetiu-se o alinhamento mostrado na figura 23, trocando-se a Protease B por cada uma das metaloproteinases listadas na tabela 04. O início e o término de cada sub-sequência assim construída correspondende àqueles

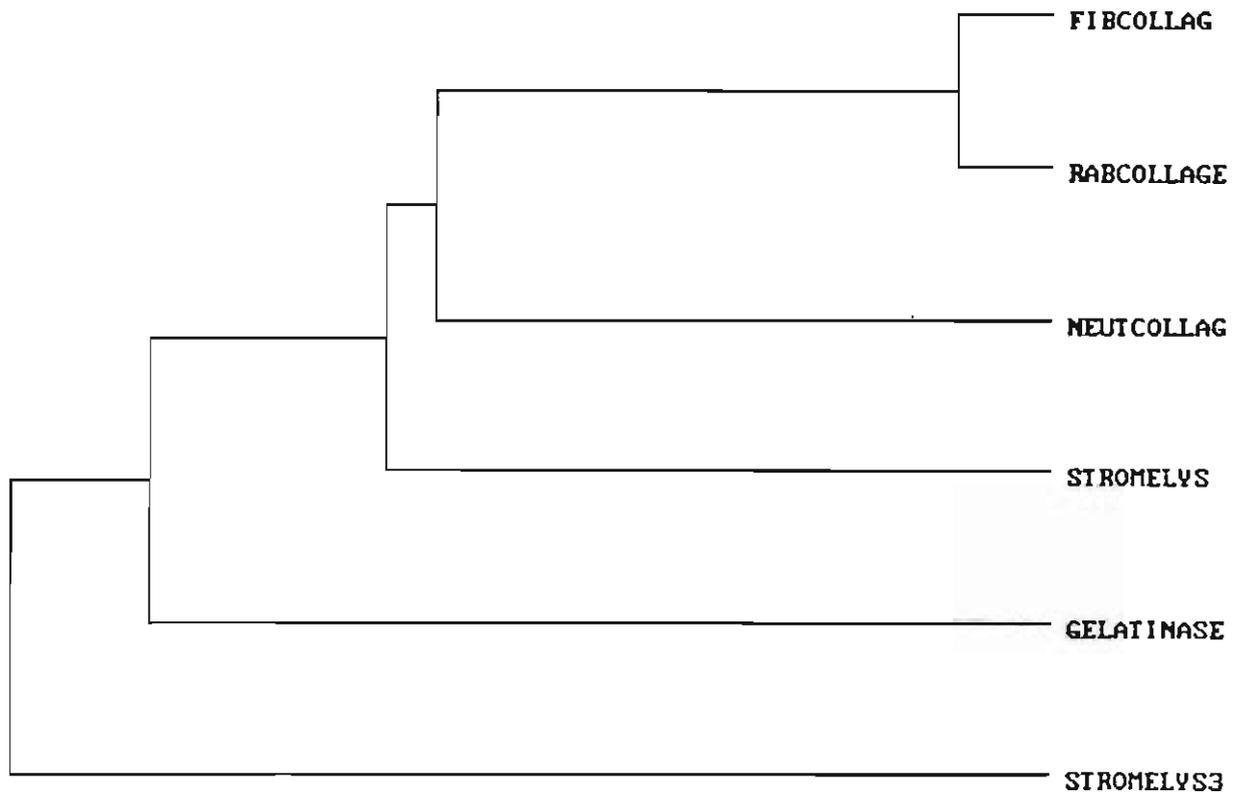


FIGURA 20: Dendrograma mostrando as três sub-famílias colagenases, estromelisininas e gelatinases dentro da família das MMP.

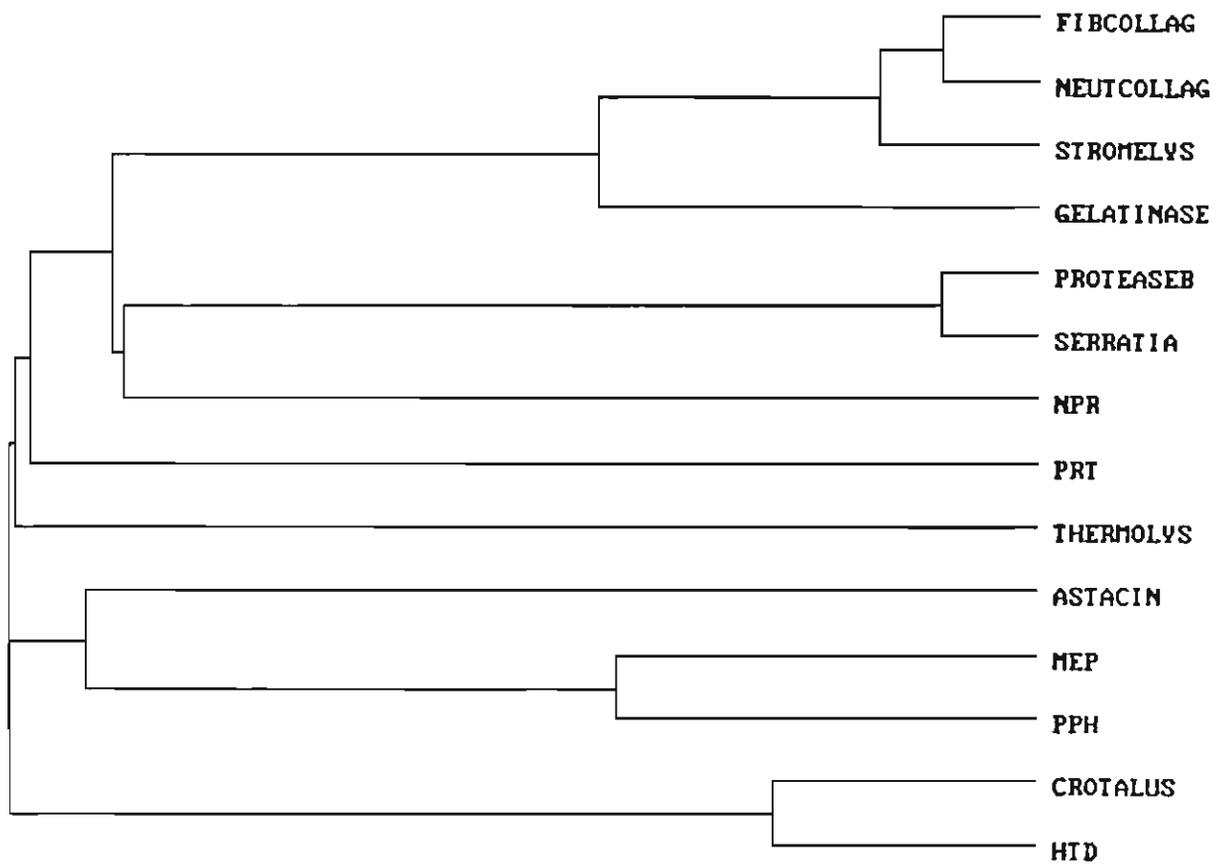


FIGURA 21: Dendograma mostrando as principais famílias dentro da super-família das metaloproteínases.

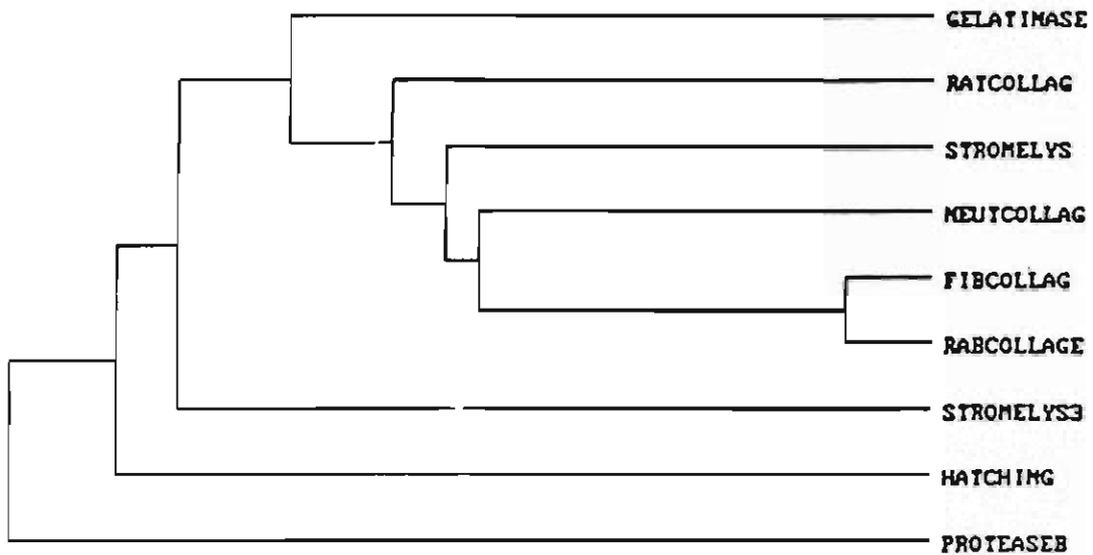


FIGURA 22: Dendograma das sequências gelatinase, collagenase de rato (ratcollag), estromelisina (stromelysin), collagenase de neutrófilo (neutcollag), collagenase de fibroblasto (fibcollag), collagenase intersticial de coelho (rabcollag), estromelisina 3 (stromelys3), "hatching enzyme" de ouriço do mar (hatching) e protease B de *E. chrysanthemi*. Observe a presença de quatro troncos principais.



resíduos que alinharam-se com os resíduos 100 e 261 da collagenase de fibroblasto.

#### III.4 Análise das sub-sequências

Usou-se o programa PCOMPARE do software PC/GENE para as comparações entre collafrag e as outras sub-sequências. O método usado é aquele descrito por Needleman and Wunsch e implementado por Dayhoff (1978) e Feng et.al. (1985). O método permite a escolha de quatro matrizes para comparação; "Dayhoff MDM-78 matrix", "unitary matrix", "structure/genetic matrix" e "genetic code matrix". O score de similaridade máxima obtido pela comparação de duas sequências é comparado com os scores máximos obtidos de 100 sequências randômicas de mesma composição e comprimento. O score de alinhamento obtido é o número de desvios-padrão pelo qual o score máximo das duas sequências analisadas excede a média dos scores obtidos com as sequências randômicas. Um score de alinhamento acima de 3 indica uma relação filogenética de média probabilidade enquanto um score de alinhamento acima de 5 indica uma relação altamente provável, principalmente se considerarmos as distâncias evolutivas.

Em nossa análise percebe-se que collafrag é filogeneticamente relacionado à somente proteafrag e serrafrag, independente da matriz usada (tabela 05). Scores significativos não foram obtidos com outras sub-sequências. Tanto protease B quanto protease de Serratia estão localizadas no mesmo tronco evolutivo como mostrado no dendograma da figura 21. Vale ressaltar que os scores obtidos na maioria das vezes

ultrapassaram o valor de 5 indicando uma provável relação filogenética.

As subsequências proteafrag e serrafrag foram usadas em alinhamentos simples com collafrag (dados não mostrados). O grau de homologia foi de 26,4 e 27,2, respectivamente.

ORIGINAL SEQUENCE	SUBSEQUENCE	NEW TERMINOLOGY	LENGHT
FIBROBLAST COLLAGENASE	..FVLT...AIYG..	COLLAFRAG	162
SERRATIA PROTEASE	..FSAE...PGDY..	SERRAFRAG	110
PROTEASE B	..FLNT...KLYG..	PROTEAFRAG	181
THERMOLYSIN	..KYRT...NAAL..	THERMOFRAG	56
NPR	..SVEL...STDG..	NPRFRAG	231
ASTACIN	..FVPR...NVDP..	ASTAFRAG	78
MEP	..RNAM...YDDN..	MEPFRAG	133

TABELA 04: Esta tabela mostra as principais características das novas sequências correspondendo ao núcleo enzimático de algumas metaloproteinases.

	<b>DAYHOFF</b>	<b>UNITARY</b>	<b>STRUCT. GENET.</b>	<b>GENETIC CODE</b>
<b>COLLAFRAG</b>	41,59 ± 0,51	80,7 ± 2,95	48,57 ± 0,59	56,24 ± 2,98
<b>PROTEAFRAG</b>	5,44 ± 0,3	5,44 ± 0,53	3,31 ± 0,39	4,62 ± 0,46
<b>SERRAFRAG</b>	3,66 ± 0,05	6,78 ± 0,89	6,02 ± 0,19	5,21 ± 0,19
<b>MEPFRAG</b>	2,15 ± 0,13	0,82 ± 0,05	1,56 ± 0,12	1,28 ± 0,11
<b>THERMOFRAG</b>	1,80 ± 0,19	0,03 ± 0,03	0,93 ± 0,11	0,64 ± 0,01
<b>ASTAFRAG</b>	1,50 ± 0,17	-0,78 ± 0,01	0,23 ± 0,09	0,45 ± 0,1
<b>NPRFRAG</b>	0,69 ± 0,07	-1,14 ± 0,07	0,814 ± 0,09	0,09 ± 0,09

TABELA 05: Valores dos scores de alinhamento obtidos da comparação de collafrag com todas as sequências listadas na ala xx usando quatro diferentes matrizes. O valor mostrado representa a média de quatro experimentos.

## DISCUSSÃO

### I. Interação colágeno/colagenase

Neste trabalho estudou-se a especificidade da enzima colagenase intersticial, o membro mais estudado da família das MMP, através da hipótese da hidropaticidade complementar de amino ácidos codificados por sequências complementares de DNA. A hipótese é aplicável somente naqueles modelos onde o sítio de interação de uma das proteínas é conhecido, como é o caso da interação estudada nesta tese. O sítio clivado pela colagenase na molécula do colágeno está caracterizado, o que possibilitou a dedução do peptídeo complementar. Como os colágenos intersticiais são constituídos por duas cadeias polipeptídicas diferentes, dois peptídeos complementares foram obtidos (TKKTLRT e SSNTLRS). Como esperado ambos os peptídeos apresentam perfis de hidropaticidade muito semelhantes. Da mesma forma, tal perfil de hidropaticidade foi também encontrado nas colagenases de fibroblasto humano (SQNPVQP) e neutrófilo humano (SSNPIQP). De fato, uma homologia a nível de sequência primária pode ser observada entre um dos peptídeos deduzidos e um dos reais. Um conceito cada vez mais sólido é de que a conformação das proteínas é mais conservada do que a sequência primária (Brentani, 1990). Sendo assim, uma semelhança no perfil de hidropaticidade pode significar uma semelhança na conformação como discutido por alguns autores (Brentani, 1990; Beattie, 1991; Souza et.al., 1992). Deve-se deixar claro, no entanto, que sequências flangeadoras são importantes na determinação de uma conformação específica. Este ponto foi recentemente abordado pelo grupo de M. Go trabalhando

com a enzima barnase (Ikura et.al., 1993). Baseado nos dados de difração de raios X desta proteína, é possível definir regiões contínuas de conformação compacta, os chamados módulos. O trabalho consistiu na análise de alguns módulos isolados da barnase, ou seja sem o restante da proteína. Os autores concluíram que estes módulos mantêm preferencialmente a conformação original encontrada na proteína inteira. Dessa forma, o restante da proteína estaria estabilizando a conformação preferencial do módulo isolado.

A abordagem experimental desta tese foi iniciada com a utilização de um dos peptídeos deduzidos, o TKKTLRT. Se a proposição de que TKKTLRT representa, ao menos conformacionalmente, o sítio de ligação do colágeno na colagenase é verdadeira, então o peptídeo deveria reconhecer a molécula do colágeno. Isto foi mostrado na figura 04a onde o peptídeo foi adsorvido em placa de poliestireno e a ligação de colágeno marcado foi medida. Duas críticas são bastante pertinentes em relação a este ponto. Uma delas refere-se à variedade de conformações possíveis de pequenos peptídeos em solução. No entanto, mais recentemente, o grupo de Richard Lerner tem mostrado que mesmo pentapeptídeos podem apresentar uma conformação preferencial (Wright et.al., 1990). Isto significa que pequenos peptídeos de fato apresentam múltiplas conformações, porém uma delas é preferencial, exatamente o que ocorre com os módulos da barnase. Isto poderia explicar a necessidade de uma alta concentração molar de peptídeos em ensaios de inibição (Fields, 1993). A segunda crítica refere-se a adsorção de pequenos peptídeos na placa de poliestireno que parece ser baixa

(Underwood & Steele, 1991). Várias estratégias vêm sendo utilizadas na tentativa de se aumentar esta taxa, inclusive a construção de polímeros do mesmo peptídeo. No caso específico deste trabalho, partiu-se de uma concentração inicial alta do peptídeo com o objetivo de que a taxa de adsorção fosse mais efetiva. Face a esta pequena discussão, uma outra abordagem foi também utilizada. A ligação de colágeno ao peptídeo foi medida através de uma coluna de Sepharose CNBr-4B (figura 05). Os resultados de ambos os ensaios mostraram uma interação entre o colágeno e o peptídeo. A especificidade de tal ligação foi mostrada através de ensaios de inibição onde o próprio peptídeo TKKTLRT agiu como inibidor (figura 06). O peptídeo SQNPVQP presente na colagenase de fibroblasto também apresentou um potencial inibitório sugerindo que ambos os peptídeos possam apresentar uma conformação preferencial similar, interagindo com o mesmo domínio na molécula do colágeno. Vale ressaltar que no trabalho de R. Lerner citado acima substituições que mantinham o caráter hidropático do aminoácido na maioria das vezes não alteravam a conformação preferencial dos peptídeos utilizados (Wright et.al., 1990).

Anticorpos contra TKKTLRT deveriam reconhecer a molécula da colagenase se o peptídeo representa um domínio da mesma. Este ponto foi abordado com diferentes estratégias. Primeiramente em um ensaio de ligação direta (ELISA), onde a colagenase de fibroblasto humano (gentilmente cedida pelo Dr. A. Eisen) foi adsorvida em placa de poliestireno. O soro anti-TKKTLRT reconheceu a enzima plaqueada e mais importante, esta ligação foi inibida pelo próprio peptídeo TKKTLRT, indicativo de

especificidade, e pelo peptídeo SQNPVQP, presente na molécula da collagenase de fibroblasto. Tais resultados indicam que anticorpos anti-TKKTLRT reconhecem epitopos presentes na sequência SQNPVQP da collagenase de fibroblasto, favorecendo novamente a idéia de uma conformação similar entre os dois peptídeos. A especificidade deste anticorpo foi também testada através de ensaios de imunofluorescência e imunoprecipitação.

Os anticorpos anti-TKKTLRT foram capazes de inibir atividade collagenolítica sugerindo que a sequência SQNPVQP, reconhecida por eles na collagenase, está envolvida no processo collagenolítico. Muitos questionariam a inibição da atividade de uma proteína de 50 kD por outra de 150 kD. Entretanto, mostrou-se que vários anticorpos monoclonais contra collagenase não apresentam qualquer efeito na atividade catalítica da enzima (Birkedal-Hansen et.al., 1988). Da mesma forma, os peptídeos TKKTLRT e SQNPVQP foram efetivos em inibir o potencial collagenolítico do sobrenadante de queratinócito. Necessitou-se de uma alta concentração molar dos peptídeos envolvidos para se obter uma inibição parcial da atividade collagenolítica. Como citado anteriormente este requerimento talvez se deva a adoção de várias conformações pelos peptídeos em solução. O peptídeo TKKTLRT também tem se mostrado efetivo na inibição da interação colágeno/collagenase de neutrófilo (K. Hasty, comunicação pessoal).

Todas as MMP apresentam uma região específica para a coordenação ao zinco presente no domínio central da molécula. Como todas as MMPs apresentam este domínio, fica evidente que domínios adicionais são responsáveis pela especificidade ao

substrato de cada membro. O que parece mais interessante é que este domínio central apresenta uma atividade proteolítica intrínseca e degenerada. A MMP PUMP que possui apenas o domínio de ativação e o núcleo enzimático, não apresenta uma atividade proteolítica específica contra determinado substrato sendo capaz de degradar fibronectina, laminina, gelatina, proteoglicanas e de ativar as procloagenases (Okada et.al.,1988). Da mesma maneira, uma forma recombinante da colagenase intersticial de fibroblasto compreendendo apenas o núcleo enzimático perde totalmente a especificidade para os colágenos intersticiais (Lowry, 1992). Além disto, as colagenases intersticiais podem sofrer um processo de auto-degradação que as faz perder, além do domínio rico em prolinas e do domínio carboxi-terminal homólogo à hemopexina, a capacidade de degradar colágeno intersticial (Clark e Cawston, 1989). Tais resultados originaram a suspeita de que a parte carboxi-terminal das colagenases intersticiais estivesse envolvida na especificidade ao substrato. Tal suspeita foi confirmada por Murphy et.al.(1992) que construiu proteínas quimeras de colagenase e estromelisina. Uma destas construções consistia do núcleo enzimático da colagenase mais a parte carboxi-terminal da estromelisina. Tal molécula híbrida perdeu a especificidade para o colágeno. Outra construção consistia na presença do núcleo enzimático da estromelisina mais a parte carboxi-terminal da colagenase. A enzima resultante desta construção manteve a capacidade de ligar-se ao colágeno perdendo, no entanto a capacidade de clivá-lo. Tais resultados indicavam claramente que a especificidade ao colágeno é dada por uma ou mais sequências presentes na porção carboxi-terminal da colagenase.

Os resultados discutidos nesta tese possibilitaram identificar uma determinada sequência nas collagenases intersticiais envolvida no processo de ligação ao substrato (Souza e Brentani, 1992). Tais sequências (SQNPVQP em collagenase de fibroblasto e SSNPIQP em collagenase de neutrófilo) estão presentes dentro do domínio rico em prolinas imediatamente após o núcleo enzimático (ver a estrutura modular das MMP na figura 01). Do ponto de vista estrutural, um fato chama bastante a atenção. É sabido que sequências ricas em prolinas podem adotar uma conformação parecida com aquela do colágeno ( Ramachandran, 1967). Sendo assim é atraente especular que uma conformação parecida com a do substrato poderia capacitar o domínio rico em prolinas de interagir com a tripla-hélice formando uma "tetra-hélice" temporária. É fundamental ressaltar que a região clivada pela collagenase na molécula de colágeno apresenta um relaxamento na tripla-hélice devido ao seu alto grau de hidrofobicidade e ao número reduzido de hidroxiprolinas (Arnet et.al., 1991). Resta a dúvida se tal relaxamento permitiria a interação de uma quarta hélice. Um fato bastante interessante ainda em relação a este tópico é o já mencionado processo de auto-degradação das collagenases. Como observado por alguns autores a clivagem sempre ocorre dentro desta região rica em prolinas e sempre tendo como P1' um resíduo hidrofóbico (Knauper et.al., 1993). Isto parece indicar que a região rica em prolinas possui uma conformação similar ao colágeno.

O envolvimento do domínio rico em prolinas no processo de ligação ao substrato foi também verificado por Hirose et.al.(1993). Trabalhando com collagenase de neutrófilo, este

grupo mostrou que a troca da sequência SSNPIQP pela sequência correspondente em estromelisina abole totalmente a atividade proteolítica da collagenase, confirmando nossa sugestão de que tal sequência é importante na ligação com o substrato. Dados mais recentes do mesmo grupo mostraram que tal mutante ainda apresenta a capacidade de se ligar ao colágeno porém com uma afinidade menor (K. Hasty, comunicação pessoal), sugerindo a presença de sítios adicionais dentro da molécula. Parece claro, no entanto, que estes sítios devem estar situados na vizinhança de SSNPIQP visto que as construções perdendo esta região, perdem também a atividade de ligação ao colágeno ( K. Hasty, comunicação pessoal). Além disso, foi mostrado que a ponte dissulfeto entre os resíduos 279 (imediatamente após o domínio rico em prolínas) e 464 é também muito importante na especificidade ao substrato, confirmando dados de Windsor et.al.(1991). A minha interpretação para a importância desta ponte dissulfeto reside no papel destas ligações no processo de "folding" de proteínas em geral (Gierash & King, 1990). Outra possibilidade é que a presença desta ponte dissulfeto estabilize uma determinada conformação do domínio rico em prolínas. De fato, os mutantes que perdem esta ponte dissulfeto ainda apresentam uma atividade collagenolítica, porém reduzida (Hirose et.al., 1993).

Outros dados relacionados ao processo já mencionado de autoativação das collagenases favorecem a idéia de um sítio de ligação ao substrato mais amplo. Na collagenase de fibroblasto, a clivagem autoproteolítica ocorre exatamente após a sequência SQNPVQP. Sendo assim esta sequência permanece dentro do domínio do núcleo enzimático que perde a atividade collagenolítica. Isto

indica que a sequência SQNPVQP não é suficiente para manter a capacidade de ligação ao substrato. No caso da colagenase de neutrófilo, a autoproteólise ocorre exatamente no meio da sequência SSNPIQP, entre a prolina e a isoleucina. Os dois fragmentos resultantes desta autoproteólise perdem a capacidade de se ligarem ao colágeno, indicando claramente que a sequência intacta é importante no processo de interação enzima/substrato (Knauper et.al., 1993). Da mesma forma, é sabido que estromelisina, a qual não possui nenhuma sequência hidropaticamente similar à SQNPVQP, interage com a estrutura em tripla-hélice dos colágenos intersticiais. Face à discussão acima, é possível concluir que a sequência SQNPVQP em colagenase de fibroblasto (ou SSNPIQP em colagenase de neutrófilo) é importante para a interação das enzimas com os substratos mas não suficiente. Sequências adicionais são necessárias para uma perfeita interação.

## **II- Interação colágeno/fibronectina**

Hauschka e White (1972) observaram que uma proteína sérica de alto peso molecular ligava-se especificamente ao colágeno. Outros grupos na mesma época verificaram que tal interação exercia um papel importante nas relações célula/ECM (Klebe, 1975). Posteriormente, esta proteína sérica foi caracterizada como fibronectina. Como descrito na introdução um dos aspectos mais interessantes a respeito desta interação é o fato de fibronectina interagir com o sítio do colágeno clivado pela colagenase intersticial. Isto faz com que toda a abordagem dada para a interação colágeno/colagenase possa ser usada também neste

modelo. Dentro deste raciocínio, o trabalho descrito por Owens e Barale (1986) é de extrema importância. Eles caracterizaram o peptídeo AAHEEICTTNEGVMY como o sítio de ligação ao colágeno ou gelatina na fibronectina. Percebe-se que os últimos resíduos da fibronectina apresentam um perfil de hidropaticidade muito similar ao perfil da sequência SQNPVQP. Isto origina a possibilidade de que a interação entre peptídeos hidropaticamente complementares seja também a base da interação fibronectina/colágeno. Recentemente foi mostrado, através de mutações sítio-dirigidas, que alguns resíduos na região clivada pela colagenase na cadeia alpha 1 do colágeno tipo I são fundamentais tanto para a interação com a colagenase quanto para a fibronectina (Dzamba et.al., 1993). Existe, no entanto, uma diferença quanto à afinidade da interação colágeno/colagenase e colágeno/fibronectina. Enquanto a afinidade da fibronectina é maior pela gelatina, a colagenase tem uma nítida preferência pelo colágeno nativo (Arnet et.al., 1990; Souza & Brentani, 1992). Entretanto, a preferência de fibronectina pela gelatina talvez se deva a presença de sítio adicionais na molécula específicos para gelatina.

O fato que a região contendo a sequência SQNPVQP na colagenase e a sequência TNEGVMY na fibronectina interagem com o mesmo domínio do colágeno originou a possibilidade de que ambas as sequências pudessem apresentar uma conformação muito similar. De fato, anticorpos que reconhecem a sequência SQNPVQP também reconhecem o fragmento da fibronectina que liga colágeno. Da mesma forma ambos os peptídeos inibiram parcialmente a interação colágeno/fibronectina quando pré-incubados com o colágeno. Esta

inibição parcial talvez se deva a presença de sítios de interação adicionais dentro de ambas as proteínas (Guidry et.al., 1990; Ingham et.al., 1991).

Dentro do segmento reportado por Owens e Baralle (1986) existe um peptídeo com razoável homologia com o sítio de ligação ao zinco de diversas metaloproteínases. De fato, Vidmar e colaboradores (1991) propuseram que esta sequência seja o aceptor de zinco essencial para a atividade gelatinolítica do fragmento amino-terminal de fibronectina. Neste trabalho, mostrou-se uma interação entre zinco e fibronectina. Decidiu-se investigar o possível papel deste cátion divalente na interação colágeno/fibronectina face à localização do sítio de ligação ao zinco estar adjacente à sequência TNEGVMY. Como mostrado na figura 16, zinco aumentou a interação entre colágeno e fibronectina. A determinação das constantes de afinidade com ou sem zinco fica impossibilitada pelo ensaio utilizado. A determinação do "binding" é dada por valores de densidade ótica que é uma medida indireta da quantidade de fibronectina ligada ao colágeno. No entanto, a comparação das curvas mostradas na figura 16 parece indicar que não há uma alteração na afinidade da fibronectina pelo colágeno, visto que os  $K_d$  determinados graficamente parecem ser muito próximos. O que ocorre parece ser um aumento no "binding" máximo, ou seja, na presença de zinco mais moléculas de fibronectina estão aptas a interagir com o colágeno. Isto eleva o ponto de saturação da ligação. O tratamento de fibronectina plasmática com 1,10-Phenantrolina diminuiu sensivelmente sua capacidade de interação com o colágeno. A ligação basal observada pode ser devido aos outros

sítios de interação descritos na literatura. Poderia se especular que a sequência TNEGVMY somente apresentaria uma atividade ligante de colágeno quando o zinco estivesse coordenado ao sítio adjacente. Do ponto de vista da hidropaticidade complementar, tal perspectiva se mostra bastante interessante. Ela mostra novamente a importância das sequências flanqueadoras na determinação da atividade ligante da sequência hidropaticamente complementar. A influência da 1,10-Phenantrolina na interação colágeno/fibronectina mais a captura de fibronectina em uma coluna de zinco mostra que a população de fibronectina plasmática pode estar sub-dividida em duas sub-populações, uma com e a outra sem zinco.

Recentemente, Husain (1993) reportou que u-PA apresentava uma afinidade para fibrina somente em tampões contendo zinco. Baseado no fato que plaquetas representam um reservatório de zinco, ele especulou que o metal poderia ter um papel na formação do trombo. Talvez seja possível extrapolar tal especulação para o modelo fibronectina/colágeno. Sem sombra de dúvida, um dano a um vaso pode expor a matriz sub-endotelial e a concentração aumentada de zinco no microambiente do trombo poderia amplificar a interação de plaquetas com o colágeno tendo fibronectina como ponte.

### **III. Evolução das MMP**

Árvores filogenéticas e análises de sequências das metaloproteinasas têm aparecido com frequência na literatura

(Murphy et.al., 1991; Jiang & Bond, 1992; Rawling & Barret, 1993; Souza & Brentani, 1993; Bode et.al., 1993). Jiang and Bond (1992), por exemplo, construíram uma árvore baseada na estrutura do sítio de ligação ao zinco de diversas metaloproteinases. Algumas metaloproteinases como thermolisina contêm o clássico HEXXH como o sítio de ligação ao zinco além de uma segunda sequência contendo um outro ácido glutâmico correspondendo ao terceiro ligante de zinco. Outras metaloproteinases como protease de Serratia, proteinases B e C de Erwinia e as MMP contêm uma outra sequência adjacente ao sítio de ligação ao zinco, (HEXXH)XXGXXH (Jiang and Bond, 1992; Murphy et.al., 1991). Há, no entanto, uma concordância em todos esses trabalhos quanto à divisão da super-família das metaloproteinases. As principais famílias são thermolisina, astacina, protease de Serratia, as enzimas de veneno de cobra e as MMP. Esta divisão é também observada na figura 21.

Uma das principais perguntas referente à evolução das metaloproteinases é a existência ou não de uma relação filogenética entre as MMP e as metaloproteinases bacterianas. Diversos autores não encontraram tal relação (Jongeneel et.al., 1989; Whitthan et.al., 1986). O dendograma da figura 22 de certa forma corrobora a árvore filogenética mostrada por Murphy et.al.(1991), onde estromelisina 3 não se agrupou com o tronco das MMP. Neste dendograma a "hatching enzyme" de ouriço-do-mar também não se agrupou com o tronco das MMP, apesar de possuir algumas características desta família (Lepage and Gache, 1990). Um alinhamento múltiplo contendo colagenase de fibroblasto, estromelisina 3, "hatching enzyme" e protease B de Erwinia

(incluída na família da protease de Serratia) mostrou que apenas a região central destas enzimas apresentava um certo grau de homologia (figura 23). Baseado nesta homologia, levantou-se a possibilidade de uma evolução divergente restrita ao núcleo enzimático entre as metaloproteinases bacterianas e as MMP eucarióticas (Souza and Brentani, 1993). Especulou-se que os outros domínios presentes na MMP poderiam ser aquisições recentes da família. Uma outra possibilidade seria uma evolução convergente do núcleo enzimático, ou seja, pela ação de uma seleção positiva ocorreria uma homologia a nível de sequência primária mesmo sem um ancestral comum. Vale ressaltar que a função do núcleo enzimático é muito similar em todas as metaloproteinases. Apesar do alinhamento múltiplo ser uma excelente ferramenta para este tipo de estudo, uma análise mais quantitativa desta homologia se fez necessária. Para tanto decidiu-se criar sub-sequências de várias metaloproteinases correspondendo ao núcleo enzimático. Esta estratégia teve como intenção restringir a análise à região de homologia, visto que a utilização da sequência inteira certamente diluiria o score de similaridade. De fato, talvez esta seja a razão da falha de outros autores em encontrar uma relação entre as MMP e as metaloproteinases bacterianas. Sem exceção, todos eles usaram em suas análises a sequência completa das enzimas. Além disto, tal estratégia permitiria verificar se a homologia observada ocorria com todas as metaloproteinases bacterianas.

Os resultados obtidos permitiram não só mostrar que a homologia observada no alinhamento da figura 23 é significativa bem como indicar que ela é restrita ao tronco da protease de

Serratia/protease B de Erwinia. Um alinhamento simples entre collafrag e proteafrag ou serrafrag mostrou uma homologia de 26,4% e 27,2% respectivamente. De fato, McFarrow (1987) observou uma grau de homologia similar entre protease de Serratia e colagenase de fibroblasto ao nível do núcleo enzimático. Além disto, Rawlings e Barret (1993) classificaram a protease de Serratia dentro da família das colagenases intersticiais que inclui todas as MMP.

Um trabalho recente de Bode et.al. (1993) mostrou uma árvore filogenética com algumas metaloproteinasas onde as MMP estavam localizadas próximas da protease de Serratia e da protease B de E. chrysanthemi. Neste mesmo trabalho, os autores comparam a estrutura tridimensional de astacina, adamalisina (metaloproteinase de veneno de cobra) e thermolisina. Eles concluem, baseado em uma topologia similar do zinco catalítico, que todas as metaloproteinasas com exceção de thermolisina apresentam uma relação filogenética entre si. A principal crítica quanto a esta análise refere-se à região analisada das enzimas. É sabido que regiões funcionalmente importantes sofrem uma pressão seletiva forte. (Doolittle, 1992). Esta similaridade na estrutura tri-dimensional pode ser devido a esta pressão sem necessariamente um ancestralidade comum.

Estas conclusões a respeito da evolução das MMP pode trazer importantes informações sobre a relação estrutura/função destas enzimas. Sabe-se, por exemplo, que o núcleo enzimático da colagenase de fibroblasto perde a especificidade para o colágeno nativo (Lowry et.al., 1992) apresentando uma atividade mais

degenerada. Isto também ocorre para a estromelina (Sanchez-Lopes et.al., 1988). Se confirmada esta relação filogenética entre as MMP e as metaloproteinasas bacterianas, fica implícito que a especificidade de cada MMP foi adquirida com a aquisição de outros domínios durante a evolução. Isto parece ter ocorrido com as gelatinases. Um domínio com alto grau de homologia com o "gelatin-binding domain" de fibronectina está presente adjacente ao núcleo enzimático em ambas as gelatinases (Wilhelm et.al., 1989). Como discutido por Wilhelm et.al. (1989), a introdução de novas sequências na vizinhança do núcleo enzimático pode contribuir para mudanças na especificidade ao substrato.

Recentemente, Matrisian (1992) fez uma excelente discussão deste tópico. Analisando a estrutura gênica de diversas MMP, ela concluiu que duplicações de um gene ancestral aliada a eventos de "exon shuffling" são os principais efetores na evolução das MMP. Sugere-se aqui que este gene ancestral corresponde a um gene do tronco da protease de *Serratia*/protease B das metaloproteinasas bacterianas. Há, entretanto, uma discordância quanto ao domínio de ativação. Matrisian acredita que o núcleo enzimático e o domínio de ativação já estavam presentes no gene ancestral. No modelo descrito aqui, o domínio de ativação foi também uma aquisição através de eventos de "exon shuffling".

Recentemente uma metaloproteinase de planta (SMEP) foi caracterizada, a qual apresentava uma similaridade estrutural e funcional com membros da família das MMP (McGeehan et.al., 1992). Esta similaridade, entretanto, está restrita ao núcleo

enzimático. Em um alinhamento simples, SMEP mostrou 37,7% de homologia com collafrag e 24,7 com serrafrag. SMEP pode então representar um intermediário na evolução das MMP. Outra sequência de planta tem sido caracterizada como uma metaloproteinase na alga unicelular Chlamidomonas reinhardtii (Kinashita et.al., 1992). Um padrão muito interessante nesta enzima é a presença de um domínio de ativação altamente homólogo ao domínio correspondente nas MMP. Esta descoberta origina a possibilidade de que o domínio de ativação tenha se originado antes da divergência planta/animal. Outra possibilidade seria a aquisição deste domínio pelos dois troncos de maneira independente após a divergência.

Em relação ao domínio carboxi-terminal com homologia à hemopexina, algumas evidências parecem indicar que o domínio foi adquirido pelo tronco animal após a divergência planta/animal. A "hatching enzyme" de ouriço-do-mar, por exemplo, possui o domínio de ativação, o núcleo enzimático e o domínio carboxi-terminal (Lepage & Gache, 1990). Além disto, a estrutura de PUMP perdendo o domínio carboxi-terminal e a sequência rica em prolinas, também favorece a idéia de uma aquisição posterior destes domínios (Matrisian, 1992).

Talvez o modo mais interessante de visualizar a evolução das MMP seja aquela que o faz em conjunto com a evolução da ECM. Desde que um critério de caracterização das MMP é a sua notável especificidade por componentes da ECM, parece claro que a especificidade ao substrato destas enzimas tenha se originado após o surgimento da ECM, ou seja, com o advento da

multicelularidade. Conceitualmente, a família das MMP se originou após o advento da ECM. A atividade catalítica, no entanto, foi herdada de enzimas procarióticas, mais especificamente da protease de *Serratia* e da protease B de *Erwinia*, como sugerido neste trabalho. Os mecanismos evolutivos que originaram o advento desta especificidade vem sendo discutidos por alguns autores (Matrisian, 1992; Wilhelm et.al., 1989; Souza & Brentani, 1993). Todos concordam que "exon shuffling" teve um papel fundamental neste processo. Vale discutir, no entanto, um outro aspecto notável. Sabe-se que o processo de deposição da ECM ocorre via múltiplas interações entre seus componentes. Isto significa que domínios protéicos nestes componentes são interagentes. Um exemplo é a interação fibronectina/gelatina abordada nesta tese. Se um destes domínios interagentes é adquirido por uma metaloproteinase, isto pode dar a enzima a capacidade de interagir com um componente da matriz. Como já discutido acima, no caso das gelatinases a aquisição de um "gelatin-binding domain" da fibronectina pode ter originado a especificidade da enzima (Wilhelm et.al., 1989). Sendo assim o fluxo de domínios de componentes estruturais da matriz para as MMP se constitui em um dos mecanismos responsáveis pela notável origem da especificidade das MMP.

#### **Origem da especificidade nas collagenases intersticiais**

A grande maioria dos dados aponta para a região rica em prolinas como o sítio de ligação ao colágeno nas collagenases intersticiais. Esta região compreende a primeira metade do exon 6

## COLLAGENASE: EXON 6

————— Y-X-Pro repeat —————

GGA CGT TCC CAA AAT CCT GTC CAG CCC ATC GGC CCA CAA ACC CCA  
 G R S Q N P V Q P I G P Q T P

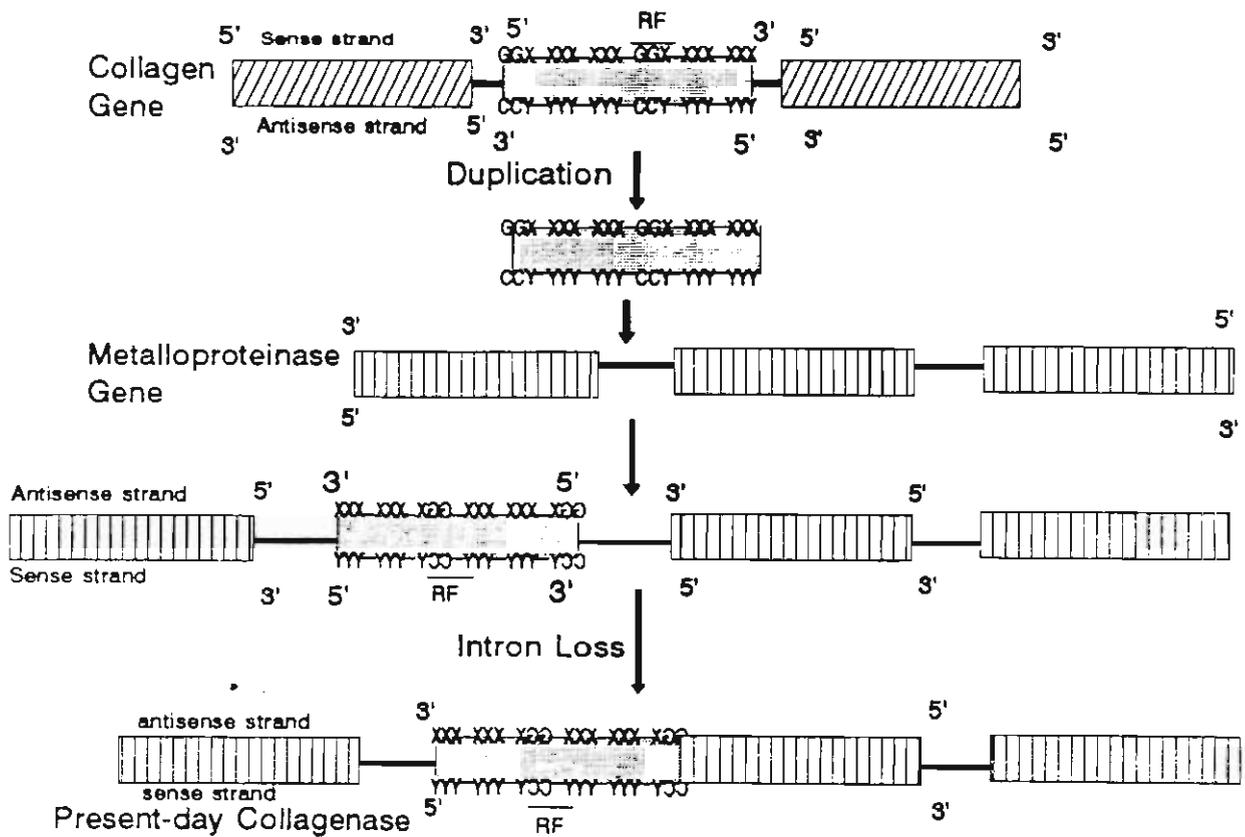
AAA GCG TGT GAC AGT AAG CTA ACC TTT GAT GCT ATA ACT ACG ATT  
 K A C D S K L T F D A I T T I

CGG GGA GAA GTG ATG TTC TTT AAA GAC AGA  
 R G E V M F F K D R

ADENDO 01: Sequência nucleotídica do exon 6 da colagenase de fibroblasto e a correspondente sequência de aminoácidos. Observe que a primeira metade do exon corresponde à repetição Y-X-Pro.

das collagenases de fibroblasto e neutrófilo (Collier et.al., 1988) (adendo 1). Analisando a sequência primária das collagenases, chama a atenção o fato desta região apresentar quase sempre uma prolina a cada três resíduos. Percebe-se uma repetição Y-X-Pro, onde Y e X correspondem a quaisquer aminoácidos. Tal sequência lembra a repetição encontrada nos colágenos intersticiais Gly-X-Y, com a substituição da glicina pela prolina. Curiosamente se observarmos os codons para glicina e prolina veremos que eles são complementares, i.e. GGx e CCx respectivamente. Visto a discussão acima sobre "exon shuffling" entre proteínas estruturais da ECM e enzimas MMP, uma possibilidade seria que a repetição Y-X-Pro pudesse ter se originado a partir do gene do colágeno. A hipótese seria que um exon do colágeno sofreu um processo de duplicação e uma das cópias foi inserida no gene de uma metaloproteinases ancestral. Neste processo de inserção, no entanto, o que era sense no colágeno tornou-se antisense na metaloproteinase (adendo 2). Este modelo está totalmente baseado na hipótese descrita por Brentani sobre o papel da fita antisense na evolução de proteínas interagentes.

A primeira consideração a ser feita quanto ao modelo refere-se a necessidade de uma mudança de fase na fita antisense para que as duas citosinas fiquem iniciando o codon. Somente assim será possível obter uma prolina a cada terceira posição. O uso de um fase de leitura alternativa após uma duplicação levando a uma sequência de aminoácidos totalmente diferente foi descrita previamente (Ohno, 1984). Outro detalhe é a substituição da primeira prolina da repetição por uma serina (SQNPVQP). É



ADENDO 02: Modelo propondo como a repetição de prolínas foi adquirida pelo gene da collagenase.



discutido acima. Sendo assim, a migração de um exon do colágeno para uma metaloproteinase somente poderia ter ocorrido após a divergência unicelular/multicelular. Fica claro, então que a repetição de prolínas não deveria existir nas metaloproteinases bacterianas se o modelo do adendo 2 é correto. De fato, um alinhamento entre colagenase de fibroblasto e protease B na região da repetição de prolínas mostra a ausência desta na metaloproteinase bacteriana (adendo 3).

O que talvez seja mais surpreendente em relação a este modelo é o fato que "shuffling" de um exon do colágeno para uma MMP pode ser observado. No caso da gelatinase B é encontrado logo após núcleo enzimático uma região com alto grau de homologia com o colágeno do tipo V. De fato, alguns autores sugeriram a possibilidade deste domínio ter sido adquirido através de "exon shuffling" (Matrisian, 1992).

### **Considerações finais sobre a hipótese da hidropaticidade complementar**

Restam poucas dúvidas a respeito da plausibilidade da hipótese da hidropaticidade complementar sob um ponto de vista químico. Obviamente que uma análise mais profunda das forças moleculares envolvidas se faz necessária mas a existência de interações hidrofóbico/hidrofílico é fato. Aliás, uma análise mesmo superficial de alguns dados cristalográficos mostra uma "promiscuidade" química impressionante, ou seja, existe uma grande variedade de interações possíveis.

O aspecto mais interessante da hipótese talvez resida nas suas implicações evolutivas. Devemos analisar a hipótese da hidropaticidade complementar com olhos de um evolucionista. Para um evolucionista, um processo generalizado é raro, visto que qualquer processo ou fenômeno é o produto de centenas de eventos estocásticos. Sendo assim, qualquer discussão a respeito da generalização da hipótese da hidropaticidade complementar torna-se irrelevante. A capacidade de interação entre duas proteínas é decorrente de um ou vários eventos que ocorreram na história evolutiva de ambas as proteínas. A principal mensagem dada pelos trabalhos de Brentani (1988, 1990) e por este trabalho é a possibilidade de que a utilização de sequências antisense em eventos de "exon shuffling" se constitua em um destas etapas.

**Conclusões:**

1) Os dados apresentados neste trabalho indicam que a sequência SQNPVQP na collagenase de fibroblasto e SSNPIQP na collagenase de neutrófilo estão envolvidas na interação das respectivas enzimas com colágeno nativo.

2) Baseado no fato que fibronectina interage com o domínio clivado pela collagenase nos colágenos intersticiais, foi possível abordar esta interação com as mesmas ferramentas usadas no estudo da interação colágeno/collagenase. Desta forma, apresentou-se aqui evidências de que a sequência TNEGVMY está envolvida na interação colágeno/fibronectina. Além disto, mostrou-se aqui que zinco é capaz de aumentar o "binding" entre colágeno e fibronectina.

3) A análise de diversas metaloproteinases indica que o núcleo enzimático das MMP é filogeneticamente relacionado ao mesmo domínio da Protease B e da protease de Serratia.

### Referências bibliográficas

- Adelman, J.P.; Bond, C.T.; Douglass, J. & Herbert, E. (1987) two mammalian genes transcribed from opposite strands of the same DNA locus. *Science* 235:1514-1517.
- Araga, S.; LeBoeuf, R.D. & Blalock, J.E. (1993) Prevention of experimental autoimmune myasthenia gravis by manipulation of the immune network with a complementary peptide for the acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8747-8751.
- Armstrong, B.C. & Krystal, G.W. (1992) Isolation and characterization of complementary DNA for N-cym, a gene encoded by the DNA strand opposite to N-myc. *Cell Growth Differ.* 3:385-390.
- Arnet, S.N.; Fields, G.; Birkedal-Hansen, H. & van Wart, H.E. (1991) Sequence specificities of human fibroblast and neutrophil collagenases. *J. Biol. Chem.* 266:6747-6755.
- Basset, P.; Bellocq, J.P.; Wolf, C.; Stoll, I.; Hutin, P.; Limacher, J.M.; Podjajcer, O.L.; Chenard, M.P.; Rio, M.C. & Chambon, P. (1990) A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 348:699-704.
- Beattie, J. (1990) Complementary peptides. Theory and practice. *J. of Endocrinol.* 126:179-181.
- Beck, K.; Hunter, I. & Engel, J. (1990) Structure and function of laminin: anatomy of a multidoamin glycoprotein. *FASEB J.* 4:148-160.
- Beynon, R.J. & Bond, J.S., (eds) (1989) *Proteolytic enzymes. A practical approach.* IRL Press.
- Birkedal-Hansen, B.; Moore, W.I.; Taylor, R.; Bhowan, A.S. & Birkedal-Hansen, H. (1988) Monoclonal antibodies to human fibroblast procollagenase. Inhibition of enzymatic activity, affinity purification of the enzyme, and evidence for clustering of epitopes in the NH<sub>2</sub>-terminal end of the activated enzyme.
- Birkedal-Hansen, H.; Moore, W.G.I.; Bodden, M.K.; Windsor, L.J.; Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. & Engler, J.A. (1993) Matrix metalloproteinase: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4:197-250.
- Blalock, J.E.; Whitaker, J.N.; Benveniste, E.N. & Bost, K.L. (1989) Use of peptides encoded by complementary RNA for generating anti-idiotypic antibodies of predefined specificity. *Meth. Enzimol.* 178:63-74.
- Bode, W.; Gomis-Ruth, F.X.; Huber, R.; Zwilling, R. & Stocker, W. (1992) Structure of astacin and implications for activation of astacin and zinc-ligation of collagenases. *Nature* 358:164-167.
- Bode, W. Gomis-Ruth, F.X. & Stocker, W. (1993) Astacins, serralytins, snake venom end matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the metzincins. *FESB Lett.* 331:134-140.

Bonfil, D.R.; Reddel, R.R.; Ura, H.; Reich, R.; Fridman, R.; Harris, C.C. & Kleinszanto, A.J.P. (1989) Invasive and metastatic potential of a v-Ha-ras-transformed human bronchial epithelial cell line. *J. Natl. Cancer Inst.* 81:587-594.

Bost, K.L.; Smith, E.M. & Blalock, J.E. (1985) Similarity between the corticotropin (ACTH) receptor and a peptide encoded by an RNA that is complementary to ACTH mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1372-1375.

Bost, K.L. & Blalock, J.E. (1986) Molecular characterization of a corticotropin (ACTH) receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 44:1-9.

Brentani, R.R. (1988) Biological implications of the complementary hydrophathy of amino acids. *J. theor. Biol.* 135:495-499.

Brentani, R.R. (1990) Complementary peptides and the evolution of interacting polypeptides. *J. Mol. Evol.* 31:239-243.

Brentani, R.R.; Ribeiro, S.F.; Potocnajak, P.; Pasqualini, R.R.; Lopes, J.D. & Nakaie, C.R. (1988) Characterization of the cellular receptor for fibronectin through a hydrophatic complementarity approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:364-367.

Burgeson, R.E. (1988) New collagens, new concepts. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4:551-577.

Burley, S.K. & Petsko, G.A. (1988) Weak interactions in proteins. In: Anfinsen, C.B.; Edsall, J.T.; Richards, F.M.; Gisenberg, D.S. (eds). *Advances in protein chemistry.* 39:125-189.

Carlin, B.; Jaffee, R.; Bender, B. & Chung A.E. (1981) Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 256:5209-5214.

Carr, D.J.J.; Bost, K.L. & Blalock, J.E. (1986) An antibody to a peptide specified by an RNA that is complementary to o-endorfin mRNA recognizes an opiate receptor. *J. Neuroimmunol.* 12:329-337.

Chu, M.L., de Wet, W.; Bernard, M.; Ding, J.F.; Morabito, M.; Myers, J.; Williams, C. & Ramirez, F. (1984) Human pro $\alpha$ 1(I) collagen gene structure reveals evolutionary conservation of a pattern of introns and exons. *Nature* 310: 337-341.

Collier, I.E.; Smith, J.; Kromberger, A.; Bauer, E.A.; Wilhelm, S.M.; Eisen, A. & Goldberg, G.I. (1988) The structure of the human skin fibroblast collagenase gene. *J. Biol. Chem.* 263:10711-10713.

Dillon, J.; Woods, W.T.; Guarcello, V.; LeBoeuf, R.D. & Blalock, J.E. A peptide mimetic of calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9726-9729.

Dzamba, B.J.; Wu, H.; Jaenish, R. & Peters, D.M. (1993) Fibronectin binding site in type I collagen regulates fibronectin fibril formation. *J. Cell Biol.* 121:1165-1172.

Dziadek, M.; Paulsson, M.; Aumailley, M. & Timpl, R. (1986) Purification and tissue distribution of small protein (BM-40) extracted from a basement membrane tumor. *Eur. J. Biochem.* 161:455-464.

Exposito, J. & Garrone, R. (1990) Characterization of a fibrillar collagen gene in sponges reveals the early evolutionary appearance of two collagen gene families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:669-6673

Elton, T.S.; Dion, L.D.; Bost, K.L.; Oparil, S. & Blalock, J.E. (1988) Purification of an angiotensin II binding protein by using antibodies to a peptide encoded by angiotensin II complementary RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2518-2522

Fassina, G. & Cassani, G. (1992) Design and recognition properties of a hydrophatically complementary peptide to human interleukin 1B. *Biochem. J.* 282:773-779.

Fassina, G. & Chaiken, I.M. (1988) Structural requirements of peptide hormone binding for peptide-potentiated self-association of bovine neurophysin II. *J. Biol. Chem.* 263:13539-13543.

Fassina, G.; Roller, P.P.; Olson, A.D.; Thorgeirsson, S.S. & Omichinski, J.G. (1989) Recognition properties of peptides hydrophatically complementary to residues 356-375 of the c-raf protein. *J. Biol. Chem.* 264:11252-11257.

Fields, G.B. (1993) Synthetic peptides and tumor cell metastasis. *Pep. Research* 6:115-120.

Fields, G.B.; Arnett, S.J.N.; Windsor, L.J.; Engler, J.A.; Birkedal-Hansen, H. & van Wart, H.E. (1990) Proteolytic activities of human fibroblast collagenase: Hydrolysis of a broad range of substrates at a single active site. *Biochem.* 29:6670-6677.

Fields, G.B.; Van Wart, H.E. & Birkedal-Hansen, H. (1987) Sequence specificity of human skin fibroblast collagenase. Evidence for the role of collagen structure in determining the collagenase cleavage site. *J. Biol. Chem.* 262: 6221-6226.

Garrone, R. (1984) Formation and involvement of extracellular matrix in the development of sponges. A primitive multicellular system. In: *The role of extracellular matrix in development*, R. Trelstad (ed), 461-478, Alan R. Liss, Inc.

Ghiso, J.; Saball, E.; Leoni, J.; Rostagno, A. & Frangione, B. (1990) Binding of cystatin C to C4: The importance of sense/antisense peptides in their interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1288-1291.

Gierash, L.M. & King, J. (eds) 1990 *Protein folding*. American Association for the Advancement of Science, N.Y.

Gilbert, W. (1978) Why gene in pieces? *Nature* 271:501-503.

Gilbert, W. (1987) The exon theory of genes. *Cold Spring Harbor Symp. Vol. LII*: 901-905.

Goldberg, G.I.; Wilhelm, S.M.; Kronberg, A.; Bauer, E.A.; Grant, G.A. & Eisen, A.Z. (1986) Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation induced rat protein. *J. Biol. Chem.* 261:6600-6605.

Gorcs, T.J.; Gotsshal, P.E.; Coy, D.H. & Arimura, A. (1986) Possible recognition of the GnRH receptor by an antiserum against a peptide encoded by a nucleotide sequence complementary to mRNA of a GnRH precursor peptide. *Peptides* 7:1137-1145.

Greenburg, G. & Hay, E.D. (1982) Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J. Cell Biol.* 95:333-339.

Gross, J. & Lapiere, C.M. (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:1014-1022.

Gross, J. & Nagai, Y. (1967) Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54:1197-1204.

Guidry, C.; Miller, E.J. & Hook, M. (1990) A second fibronectin-binding region is present in collagen  $\alpha$  chains. *J. Biol. Chem.* 265:19230-19236.

Hahn, L.H.E. & Yamada, K.M. (1979) Identification and isolation of a collagen-binding fragment of the adhesive glycoprotein fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1160-1163.

Har-el, R. & Tanzer, M.L. (1993) Evolution of the extracellular matrix in invertebrates. *FASEB J.* 7:1115-1123.

Harris, E.D.; Welgus, H.G. & Krane, S.M. (1984) Regulation of mammalian collagenases. *Collagen Rel. Res.* 4:493-512.

Hasty, K.A.; Pourmottabed, T.F.; Goldberg, G.I.; Thompson, J.P.; Spinella, D.G.; Stevens, R.M. & Mainardi, C.L. (1990) Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 265:11421-11424.

Hay, E.D. (1984) Cell-Matrix interactions in the embryo: Cell shape, cell surface, cell skeletons and their role in differentiation. In: *The role of extracellular matrix in development*, R. Trelstad (ed), 1-32, Alan R. Liss, Inc.

Hirose, T.; Patterson, C.; Pourmottabed, T.; Mainardi, C.L. & Hasty, K. (1993) Structure-Function relationship of human neutrophil collagenase: Identification of regions responsible for substrate specificity and general proteinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2569-2573.

Husain, S.S. (1993) Fibrin affinity of urokinase-type plasminogen activator. Evidence that  $Zn^{2+}$  mediates strong and specific interaction of single-chain urokinase with fibrin. *J. Biol. Chem.* 268:8574-8579.

Hynes, R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation and

- Ikura, T.; Go, N.; Khodha, D.; Inagaki, F.; Yanagawa, H.; Kawabata, M.; Kawabata, S.; Iwanaga, S.; Noguti, T. & Go, M. (1993) Secondary structural features of modules M2 e M3 of barnase in solution by NMR experiment and distance geometry calculation. *Proteins: Struc. Func. Genet.* 16:341-356.
- Irvine, J.W.; Roberts, S.F. & Lindberg, I. (1990) Eletrophoresis analysis of proteinases in sodium dodecil sulfate-polyacrilamide gels containing copolymerized radiolabeled protein substrates: Application to proenkephalin processing enzymes. *Anal. Biochem.* 190:141-146.
- Jiang, W. & Bond, J.S. (1992) Families of metallopeptidases and their relationships. *FEBS Lett.* 312: 110-114.
- Jongeneel, C.V.; Bouvier, J. & Bairoch, A. (1989) A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. *FEBS Lett.* 242: 211-214.
- Kang, C.Y.; Brunk, T.K.; Emmons, T.K.; Blalock, J.E. & Kolher, H. (1988) Inhibition of self-binding antibodies (autobodies) by a Vh-derived peptide. *Science* 240:1034-1036.
- Karran, L.; Gao, Y.; Smith, P.R. & Griffin, B.E. (1992) Expression of a family of complementary-strand transcripts in Epstein-Barr virus-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8058-8062.
- Keil-Dlouha, V. & Planchenault, T. (1986) Potential proteolytic activity of human plasma fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5377-5381.
- Kerr, L.D.; Hold, J.F. & Matrisian, L.M. (1988) Growth factor regulate transin gene expression through c-fos dependent and c-fod independent pathways. *Science* 242:1424-1428.
- Khokha, R. & Denhardt, D.T. (1989) Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases: a review of their role in tumorigenesis and tissue invasion. *Invasion and Metastasis* 9:391-405.
- Khokha, R.; Waterhouse, P.; Yagel, S. & Denhardt, D.T. (1989) Antisense RNA induced reduction in murine TIMP levels confers oncogenicity on Swiss 3T3 cells. *Science* 243:947-950.
- Kinoshita, T.; Fukuzawa, H.; Shimada, T.; Saito, T. & Matsuda, Y. (1992) Primary structure and expression of a gamete lytic enzyme in *Chlamydomonas reinhardtii*: Similarity of functional domains to matrix metalloproteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4693-4697.
- Kleinman, H.K.; Klebe, R.J. & Martin, G.R. (1981) Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell Biol.* 88:473-485.
- Kleinman, H.K.; McGoodwin, E.B. & Klebe, R.J. (1976) Localization of the cell attachment region in type I and II collagen. *Biochem. Biophys. res. Commun.* 72:426-432.

- Knauper, V.; Osthues, A.; DeClerck, Y.A.; Langley, K.E.; Blaser, J. & Tschesche, H. (1993) Fragmentation of human polymorphonuclear-leukocyte collagenase. *Biochem. J.* 291:847-854.
- Knutson, V.P. (1988) Insulin-binding peptides. *J. Biol. Chem.* 263:14146-14151.
- Kunisawa, T. & Otsuka, J. (1987) A possible mode of protein evolution. Role of the anti-sense strand in the generation of new proteins. *Prot. Seq. Data Anal.* 1:117-121.
- Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.
- Lascu, I.; Chaffote, A.; Bouchon, B.L. and veron, M. (1992) A pro/ser substitution in nucleoside diphosphate kinase of Drosophila melanogaster affects stability but not catalytic efficiency of rthe enzymes. *J. Biol. Chem.* 267:12775-12781.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leblond, C.P. & Inoue, S. (1989) Structure, composition and assembly of basement mebrane. *Am. J. Anat.* 185:367-390.
- Lepage, T. & Gache, C. (1990) Early expression of a collagenase-like hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. *EMBO J.* 9:3003-3012.
- Li, W.H. & Graur, D. (1990) Fundaments of molecular evolution. Sinauer Assoc., Inc. Publishers, Sunderlands, MA.
- Lin, C.Q. & Bissel, M.J. (1993) Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.* 7:737-743.
- Liotta, L.A.; Steeg, P.S. & Stetler-Stevenson, W.G. (1991) Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64: 327-336.
- Lowry, C.L.; McGeeham, G. & LeVine, H. (1992) Metal ion stabilization of the conformation of a recombinant 19 kDa catalytic fragment of human fibroblast collagenase. *Proteins: Struc. Func. Genet.* 12:42-48.
- Matrisian, L.M. (1992) The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays* 14:455-463.
- McFerro, J.H. (1987) Human fibroblast collagenase contains amino acid sequence homologous to the zinc-binding site of Serratia protease. *J. Biol. Chem.* 262:5943.
- McGeeham, G.; Burkhart, W.; Anderegg, R.; Becherer, J.D.; Gilikin, J.W. & Graham, J.S. (1992) Sequencing and characterization of the soybean leaf metalloproteinase. *Plant Physiol.* 99:1179-1183.
- Mignatti, P.; Robbins, E. & Rifkin, D.B. (1986) Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase

- Miyagima, N.; Horiuchi, R.; Shibuya, Y.; Fukushige, S.; Matsubara, K.; Toyoshima, K. & Yamamoto, T. (1989) Two *erba* homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus
- Monteagudo, C.; Merino, M.; Juan, J.; Lotta, L. & Stetler-Stevenson, W.G. (1992) Immunohistologic distribution of type IV collagenase in normal, benign and malignant breast tissue. *Am. J. Pathol.* 136:585-592.
- Murphy, G.; Allan, J.A.; Willenbrock, F.; Cockett, M.I.; Connel, J.P. & Docherty, A.J.P. (1992) The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *J. Biol. Chem.* 267:9612-9618.
- Murphy, G.J.P., Murphy, G. and Reynolds, J.J. (1991) The origin of matrix metalloproteinases and their familial relationships. *FEBS Lett.* 289: 4-7.
- Nagase, H.; Ogata, Y.; Suzuki, K.; Enghild, J.J. & Salvesen, G. (1991) Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem. Soc. Transactions* 19:715-718.
- Nagata, K.; Humphries, M.J.; Olden, K. & Yamada, K.M. (1985) *J. Cell Biol.* 101:386-394.
- Nemethy, G. & Sheraga, H.A. (1967) The structure of water and hydrophobic bonding in proteins. III. The thermodynamic properties of hydrophobic bonds in proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 66:1773-1789.
- Ohno, S. (1988) Universal rule for coding sequence construction: TA/CG deficiency-TG/CT excess. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9630-9634.
- Ossowski, L. & Reich, E. (1983) Antibodies to plasminogen activators inhibit human tumor metastasis. *Cell* 35:611-619.
- Owens, R.J. & Baralle, F.E. (1986) Mapping the collagen-binding site of human fibronectin by expression in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 5:2825-2830.
- Pasqualini, R.; Chamone, D.F. & Brentani, R.R. (1989) Determination of the putative binding site for fibronectin on platelet glycoprotein IIb/IIIa complex through a hydrophobic complementarity approach. *J. Biol. Chem.* 264:14566-14570.
- Paulson, M. (1992) Basement membrane proteins: structure, assembly and cellular interactions. *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 27:93-127.
- Petersen, M.J.; Woodley, D.T.; Stricklyn, G.P. & O'Keefe, E.J. (1987) Production of procollagenase by cultured human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 262:835-840.
- Piershbacher, M.D.; Hayman, E.G. & Ruoslahti, E. (1981) Localization of the cell-attachment site in fibronectin with monoclonal antibodies and proteolytic fragments of the molecule. *Cell* 26:259-270.

Piershbacher, M.D. & Ruoslahti, E. (1984) The cell attachment of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309:30-35.

Quantin, B.; Murphy, G. & Breathnach, R. (1989) PUMP 1 cDNA codes for a protein with characteristics similar to those of classical collagenase family members. *Biochemistry* 28:5327-5334.

Rawlings, N.D. & Barret, A.J. (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290:205-218.

Ramachandran, G.N. (1967) *Treatise on collagen*. Academic Press, N.Y.

van der Rest, M. & Garrone, R. (1991) Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5:2814-2823.

Rogers, J. (1985) Exon shuffling and intron insertion in serine protease genes. *Nature* 315: 458-459.

Ruoslahti, E. (1988) Fibronectin and its receptor. *Ann. Rev. Biochem.* 57:375-392.

Sappino, A.P.; Busso, N.; Belin, D. & Vassalli, J.D. (1987) Increase of urokinase type plasminogen activator gene expression in human lung and breast carcinomas *Cancer Res.* 47:4043-4046.

Sanches-Lopes, R.; Nicholson, R.; Gesnel, M.C.; Matrisian, L.M. & Breathnach, R. (1988) Structure-function relationship in the collagenase family member transin. *J. Biol. Chem.* 263:11892-11899.

Saunders, S.; Jalkanen, M.; O'Farrel, S. & Bernfield, M. (1989) Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *J. Cell Biol.* 108:1547-1556.

Shai, Y.; Brunck, T.K. & Chaiken, I.M. (1989) Antisense peptide recognition of sense peptides: sequence simplification and evaluation of forces underlying the interaction. *Biochemistry* 28:8804-8811

Souza, S.J.; Sabbaga, J.; D'Amico, E.; Pasqualini, R.R. & Brentani, R.R. (1992) Anti-platelet autoantibodies from ITP patients recognize an epitope in GP IIb/IIIa deduced by complementary hydrophathy. *Immunology* 75:17-22.

Souza, S.J.; Pacheco, M.; Sonohara, S.; Brentani, M.M. & Brentani, R.R. (1994) Regulation of extracellular matrix-degrading proteases. *Ciên. Cult.*, in press.

Souza, S.J. & Brentani, R.R. (1992) Collagen-binding site in collagenase can be determined using the concept of sense/antisense peptide interactions. *J. Biol. Chem.* 267:13763-13767.

Souza, S.J. & Brentani, R.R. (1993) Sequence homology between a bacterial metalloproteinase and eukaryotic matrix metalloproteinases. *J. Mol. Evol.* 36:596-598.

Trelstad, R.L., ed. (1984) *The role of extracellular matrix in*

van Wart, H.E. & Birkedal-Hansen, H. (1990) The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5578-5582.

Weber, M. (1992) Basement membrane proteins. *Kidney International* 41:620-628.

Werb, Z.; Tremble, P.M.; Behrendtsen, O.; Crowley, E. & Damsky, C.H. (1989) Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J. Cell Biol.* 109:877-889.

Wilhelm, S.M.; Collier, I.E.; Marmer, B.L.; Eisen, A.Z.; Grant, G.A. & Goldberg, G.I. (1989) SV-40 transformed human lung fibroblast secrete a 92 kDa type collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.* 264:17213-17221.

Woessner, J.F. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 5:2145-2154.

Wolfenden, R.V.; Cullins, P.M. & Southgate, C.C.F. (1978) Water, protein folding and the genetic code. *Science* 206:575-580.

Wright, P.E.; Dyson, H.J.; Waltho, J.P. & Lerner, R.A. (1990) Folding of peptide fragments of proteins in water solution. In: *Protein folding*, Gierash, L.M. & King, J. (eds), pp 95-102, American association for the Advancement of Science, N.Y.

Wu, W.; Byrne, M.H.; Stacey, A.; Goldring, M.B.; Birkhead, J.R.; Jaenish, R. & Krane, S.M. (1990) Generation of collagenase-resistant collagen by site-directed mutagenesis of murine pro $\alpha$ 1(I) collagen gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5888-5892.

Underwood, P.A. & Steele, J.G. (1991) Practical limitations of stimulation of protein adsorption to polymer surfaces *J. Immunol. Meth.* 142:83-94.

Vallee, B. & Auld, D.S. Active-site zinc ligands and activated H<sub>2</sub>O of zinc enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:220-224.

Vellard, M.; Sureau, A.; Soret, J.; Martiniere, C. & Perbal, B. (1992) A potential splicing factor is encoded by the opposite strand of the trans-spliced c-myc exon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2511-2515.

Vuorio, E. & Crombrughe, B. (1990) The family of collagen genes. *Ann. Rev. Biochem.* 59:837-872.

Yurchenko, P.D. & Schittny, J.G. (1990) Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 4:1577-1590.