

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

GABRIEL LUIZ COCCO NUNES

Estudos da relevância biológica da modulação da atividade da elastase de neutrófilo por glicosaminoglicanos e da susceptibilidade de peptídeo sintético derivado do Inibidor Tissular de Metaloproteases -1 (TIMP-1) à atividade da catepsina L humana.

Mogi das Cruzes, SP
2007

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

GABRIEL LUIZ COCCO NUNES

Estudos da relevância biológica da modulação da atividade da elastase de neutrófilo por glicosaminoglicanos e da susceptibilidade de peptídeo sintético derivado do Inibidor Tissular de Metaloproteases -1 (TIMP-1) à atividade da catepsina L humana.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Área de Concentração: Biológica

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar de Almeida

Mogi das Cruzes, SP
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Nunes, Gabriel Luiz Cocco

Estudos da relevância biológica da modulação da atividade da elastase de neutrófilo por glicosaminoglicanos e da susceptibilidade de peptídeo sintético derivado do inibidor tissular de metaloproteases 1 (TIMP-1) à atividade da catepsina L humana / Gabriel Luiz Cocco Nunes. -- 2007.

77 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -
Universidade de Mogi das Cruzes, 2007

Área de concentração: Ciências biológicas
Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar de Almeida

1. TIMP-1 2. Elastase de neutrófilo 3. Catepsina L
4. Glicosaminoglicanos I. Título II. Almeida, Paulo
Cezar de

CDD 572.7

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às dez horas do dia treze de abril de dois mil e sete, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Estudos da relevância biológica da modulação da atividade da elastase de neutrófilo por glicosaminoglicanos e da susceptibilidade de peptídeo sintético derivado do Inibidor Tissular de Metaloproteases - 1 (TIMP - 1) à atividade da catepsina L humana" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Gabriel Luiz Cocco Nunes**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 55 (cinquenta e cinco), a saber: 31 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Paulo Cezar de Almeida da Universidade de Mogi das Cruzes e Daniel Carvalho Pimenta do Instituto Butantan e Emer Suavinho Ferro da Universidade de São Paulo, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou a candidata. Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

aprovado por unanimidade
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 13 de abril de 2007

Comissão Examinadora

Julgamento

[Assinatura]
Prof. Dr. Paulo Cezar de Almeida
[Assinatura]
Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta
[Assinatura]
Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro

aprovado
(aprovado(a)/reprovado(a))
APROVADO
(aprovado(a)/reprovado(a))
APROVADO
(aprovado(a)/reprovado(a))

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para sua realização. Pessoas as quais passaram, e por vezes, permaneceram ativas na minha caminhada deixando marcas indeléveis e lembranças maravilhosas. A cada um e ao todo, deixo meus mais sinceros votos de amizade e carinho.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos mais honestos e sinceros:

A Deus, pela força e estrutura espiritual fornecida nessa jornada;

Aos meus pais, Martha e Edson, pelo apoio, confiança e por acreditar que eu seria capaz de ir mais além;

A minha irmã, Nathalia, pelo exemplo de força de vida e de como ser um grande guerreiro;

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar de Almeida por ter me ensinado, me orientado, me mostrado como evoluir neste trabalho;

Ao Amigo Paulo Cezar de Almeida, obrigado pela amizade e respeito;

Ao Prof. Dr. Ivarne Luiz dos Santos Tersariol, pela confiança em mim depositada;

Ao Amigo Fábio Henrique Dyszy, que me acompanha desde o início, sempre bem disposto a ajudar e trabalhar em equipe, e também pela grande amizade;

Aos amigos do CIIB que conquistei nestes seis anos, amigos que foram, amigos que chegaram e amigos que voltaram: Tiago Rodrigues, Tatinha, Kátia, Carlos Oliveira, Cristiano, Vivian, Cíntia, Fabrício, Bruna ...

Aos Amigos da Policlínica, que me acolheram e me auxiliaram neste novo ambiente: Gibi, Mara, Marly, André, Tatiana Marassi, Erik ...;

Aos amigos de todas as horas, que me deram forças e me apoiaram: Patrícia Pelissaro, Lú e Marcão, Gabriella Floriano, André (Grampola), Pingo e Adriana ...

RESUMO

Enzimas proteolíticas participam de diversos processos fisiopatológicos, como degradação intracelular, processamento de pró-hormônios e pró-proteínas, artrite reumatóide, processos inflamatórios e cancerígenos. Dentre estes processos destaca-se a remodelação local da matriz extracelular, seja de maneira direta ou indireta, através da ativação de outras enzimas. Em nosso trabalho avaliamos a capacidade das enzimas catepsina L (E.C. 3.4.22.15) e elastase de neutrófilo (E.C. 3.4.21.37) ativarem a remodelação local da matriz extracelular via degradação do Inibidor Tissular de metalo-protease 1 (TIMP-1) e a modulação deste evento por glicosaminoglicanos. Para tal utilizou-se técnicas de cinética enzimática com peptídeo sintético derivado do TIMP-1 (Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp), análise por eletroforese em SDS-Page e também espectrometria de massas. Os resultados das cinéticas enzimáticas (k_M , K_{cat} e K_{cat}/k_M) indicam que a elastase de neutrófilo e a catepsina L possuem a capacidade de hidrolizar o peptídeo sintético (que mimetiza a região de interação entre o TIMP-1 e a Pró-Metalo protease 9) como também, no caso da elastase, a atividade é modulada positivamente na presença de heparina, dado confirmado pela eletroforese em SDS-Page com a molécula integral de TIMP-1 em diferentes tempos de incubação. Entretanto a catepsina L, mostra-se mais eficiente na degradação do TIMP-1 (K_{cat}/k_M $2,270 \pm 0,113 \mu M^{-1}s^{-1}$) do que a elastase de neutrófilo, mesmo quando modulada por heparina (K_{cat}/k_M $0,33 \pm 0,03$ e $1,10 \pm 0,09 \mu M^{-1}s^{-1}$, respectivamente). Os dados de espectrometria de massas indicaram o local exato da hidrólise. Uma vez que ambas as enzimas estão presentes em processos tumorais e inflamatórios estes dados são importantes na compreensão do mecanismo de regulação destes processos, sinalizando que existe um controle fino da degradação da matriz extracelular e que este pode ser intensificado por efeitos em cascata.

Palavras-chave: TIMP – 1; Elastase de Neutrófilo; Catepsina L; Glicosaminoglicanos

ABSTRACT

Proteolytic enzymes participate in a variety of physiological processes, such as intracellular degradation, processing of prohormones and proproteins, rheumatoid arthritis, inflammatory and cancerigenous processes. Among these processes, it is distinguished the local remodeling of extracellular matrix, directly or indirectly, through the activation of other enzymes. In this work, it was assessed the capacity of the enzymes cathepsin L (E.C. 3.4.22.15) and neutrophil elastase (E.C. 3.4.21.37) in activating the local remodeling of the extracellular matrix through the degradation of tissular inhibitor of metalloprotease 1 (TIMP-1) and the modulation of this event by glycosaminoglycans. For this, there were used techniques of enzymatic kinetics with synthetic peptides derived from TIMP-1 (Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp), electrophoresis analysis in SDS-Page and also mass spectrometry. The results of enzymatic kinetics (k_M , K_{cat} e K_{cat}/k_M) indicate that neutrophil elastase and cathepsin L have the capacity of hydrolyzing the synthetic peptides (that mimetizes the region of interaction between TIMP-1 and the pro-matrix metalloprotease-9) and also that, in the case of elastase, the activity is positively modulated in the presence of heparin, what was confirmed by electrophoresis in SDS-Page with the integral molecule of TIMP-1 in different incubation times. However, the cathepsin L shows to be more efficient in degrading TIMP-1 (K_{cat}/k_M $2,270 \pm 0,113 \mu M^{-1}s^{-1}$) than the neutrophil elastase, even when modulated by heparin (K_{cat}/k_M $0,33 \pm 0,03$ e $1,10 \pm 0,09 \mu M^{-1}s^{-1}$, respectively). The data from spectrometry indicated the exact site of the hydrolysis. Once both enzymes are present in tumoral and inflammatory processes, these data are important for comprehending the regulatory mechanisms of these processes, signaling that there is a fine control of extracellular matrix degradation and that this one may be intensified by cascade effects.

Key-words: TIMP – 1; Neutrophil Elastase; Cathepsin L; Glycosaminoglycans

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estrutura tridimensional da catepsina L em modelo de fita.	20
Figura 2 Detalhe do sítio ativo da catepsina L.	21
Figura 3 Estrutura tridimensional da elastase de neutrófilo em modelo de fita.	25
Figura 4 Estrutura cristalográfica do complexo formado entre o TIMP-1 e a MMP-3	26
Figura 5 Nomenclatura de Schechter e Berger.	30
Figura 6 Representação esquemática da interação entre a elastase de neutrófilo e um dado substrato.	36
Figura 7 Curva de atividade da elastase em função do pH, na ausência e presença de heparina.	48
Figura 8 Espectro de massa do substrato Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp	51
Figura 9 Espectro de massa do incubado de catepsina L com o substrato sintético.	53
Figura 10 LC/MS do incubado com catepsina L.	55
Figura 11 Espectro de massa do incubado de elastase com o substrato derivado do TIMP-1.	57
Figura 12 Eletroforese em gel SDS (12,5%) avaliando a influência da heparina na catalise da molécula de TIMP-1.	58
Figura 13 Gráficos construídos a partir dos dados de densitometria do gel de eletroforese.	59
Figura 14 Representação da estrutura do peptídeo Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp.	62
Figura 15 Figura esquemática indicando o ponto de hidrólise do peptídeo derivado do TIMP-1 pela elastase.	63
Figura 16 Figura esquemática indicando o ponto de hidrólise do peptídeo derivado do TIMP-1 pela catepsina L.	66
Figura 17 Resumo esquemático dos resultados obtidos.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação de peptidases de acordo com seu mecanismo de catálise.	16
Tabela 2 Aminoácidos constituintes do subsítio S ₂ da papaína e catepsinas B e L.	33
Tabela 3 Diferenças observadas na constante de afinidade determinadas por cinética michaelianas na presença e ausência de heparina.	48
Tabela 4 Constantes de afinidade da elastase de neutrófilo em função do pH na presença e ausência de heparina.	49
Tabela 5 Constantes de afinidade para catepsina L, suando o substrato comercial e o substrato sintético.	49
Tabela 6 Porcentagens de TIMP-1 remanescentes e produto formado a partir da degradação do TIMP-1 em diversos tempos de incubação na ausência de heparina.	60
Tabela 7 Comparação da especificidade da catepsina L e elastase na presença e ausência de heparina.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abz	Ácido orto-aminobenzoico
Da	Daltons
DMF	Dimetilformoamida
E-64	L-Trans-Epoxisuccinil-L-Leucilamino (4-guanidino)-butano
EDDnp	Etilenodiamino-dinitro-fenil
HNE	Elastase de neutrófilo humana
K_{cat}	Constante catalítica
K_{cat}/k_M	Constante de especificidade
k_M	Constante de Michaelis-Menten
MCA	Metilcumarina
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
MMP	Metalo-protease
MMP-3	Metalo-protease 3 (stromelisina 1)
PMMP-9	Pró Metalo-protease 9 (pró-gelatinase)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
TIMP	Inibidor Tissular de Metalo-protease
UAF	Unidades arbitrárias de fluorescência

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
Cys	Cisteína
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Características gerais.	14
1.2. Cisteíno-Peptidases.	17
1.2.1 Catepsina L	18
1.3. Serino-Peptidases.	23
1.3.1. Elastase de Neutrófilo.	24
1.4. Mecanismo de catálise.	27
1.4.1. Serino-Peptidases.	27
1.4.2. Cisteíno-Peptidases.	28
1.5. Especificidade.	29
1.5.1 Catepsina L.	31
1.5.1.1. Subsítio S ₁	32
1.5.1.2. Subsítio S ₂	32
1.5.1.3. Subsítio S ₃	33
1.5.1.4. Subsítio S' ₁	33
1.5.1.5. Subsítio S' ₂	34
1.5.2. Elastase de Neutrófilo.	34
1.5.2.1. Subsítio S ₁	35
1.5.2.2. Subsítio S ₂	32
1.5.2.3. Subsítios S ₃ e S ₄	36
1.5.2.4. Subsítio S' ₁	37
1.5.2.5. Subsítio S' ₂	37
1.5.2.6. Subsítio S' ₃	37
2. OBJETIVOS.	38
3. MATERIAIS E MÉTODO	39
3.1. Enzimas, Substratos e Moduladores.	39
3.1.1. Elastase de Neutrófilo.	39
3.1.2. Catepsina L.	39
3.1.3. Substratos cumarínicos Z-FR-MCA e MeOsuc-AAPV-MCA.	40
3.1.4. Inibidor Tissular de Metaloproteases – 1.	40
3.1.5. Heparina.	40
3.2. Substrato sintético derivado da seqüência do TIMP-1.	40
3.3. Estudo das cinéticas enzimáticas.	41
3.3.1. Titulação do substrato Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp.	41
3.3.2. Calibração do fluorímetro para o grupo Abz.	42

3.3.3. Calibração do fluorímetro para MCA.	43
3.3.4. Cinéticas enzimáticas.	43
3.4. Espectrometria de massas.	44
3.4.1. Amostras.	45
3.4.2. Maldi-Tof.	45
3.4.3. LC-MS.	46
3.5. Eletroforese.	46
4. RESULTADOS.	47
4.1. Cinéticas enzimáticas.	47
4.1.1. Elastase de Neutrófilo.	47
4.1.2. Catepsina L.	49
4.2. Espectrometria de Massas.	50
4.2.1. Catepsina L.	52
4.2.2. Elastase de Neutrófilo.	56
4.3. Eletroforese.	58
5. DISCUSSÃO.	61
REFERÊNCIAS.	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características Gerais

Proteases, proteinases e peptidases, bem como enzimas proteolíticas, são denominações atribuídas às proteínas que possuem a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas em peptídeos e/ou proteínas. O *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) recomenda o termo peptidase para estas enzimas.

As peptidases são divididas em duas subclasses: as endopeptidases (EC 3.4.21-24 e EC 3.4.99) e as exopeptidases (EC 3.4.11-19). As endopeptidases atuam no interior da cadeia polipeptídica e são organizadas em dois grupos, baseado no mecanismo de catálise. A especificidade das endopeptidases é utilizada exclusivamente para identificar cada enzima em cada grupo. Estas enzimas estão divididas nas seguintes subclasses: serino-endopeptidases (EC 3.4.21), cisteíno-endopeptidases (EC 3.4.22), aspartil-endopeptidases (EC 3.4.23), metalo-endopeptidases (EC 3.4.24) e treonino-endopeptidases (EC 3.4.25). As endopeptidases que não se incluem nas subclasses EC 3.4.21-25 são elencadas na subclasse E.C 3.4.99.

As exopeptidases, por sua vez, atuam tanto na porção N-terminal como na porção C-terminal da cadeia polipeptídica. Quando atuam na região C-terminal as exopeptidases podem liberar um único aminoácido e são denominadas carboxipeptidases (EC 3.4.16-18) ou dipeptídeos, recebendo a denominação peptidil-dipeptidases (EC 3.4.15). As carboxipeptidases são divididas em quatro grupos em função do mecanismo de catálise: serino-carboxipeptidases (EC 3.4.16), as metalo-carboxipeptidases (EC 3.4.17) e as cisteíno-

carboxipeptidases (EC 3.4.18). As exopeptidases que reconhecem a região N-terminal da cadeia polipeptídica podem liberar um único aminoácido, chamadas aminopeptidases (EC 3.4.11), dipeptídeos ou tripeptídeos, as dipeptidil-peptidases e tripeptidil-peptidases (EC 3.4.14), respectivamente.

A organização das peptidases em famílias segue um critério evolutivo, introduzido por Rawlings e Barrett na década de 1990. Os grupos compõem-se por membros com similaridade em suas seqüências primárias estatisticamente consideráveis com ao menos um membro da família, na parte da molécula responsável pela atividade proteolítica. Cada uma das famílias é nomeada por uma letra indicando o tipo de catálise, assim sendo, S (serino-peptidases), T (treonino-peptidases), C (cisteíno-peptidases), A (aspartil-peptidases), M (metalo-peptidases) e U (desconhecida), seguido de um número atribuído de maneira arbitrária. O agrupamento em clãs ocorre quando as peptidases apresentam sinais de relações ancestrais, entretanto divergiram de tal maneira que não se pode mais comprovar suas relações por meio da simples comparação entre as estruturas primárias (RAWLINGS E BARRETT, 1993; BARRETT E RAWLINGS 1995). A evidencia mais clara entre a relação dos membros dos clãs e suas famílias são a homologia de estrutura tridimensional e o alto grau de homologia entre as seqüências de aminoácidos na região do centro ativo. A nomenclatura do clã é formada por uma letra indicativa do tipo de catálise (assim como para as famílias), seguida de uma segunda letra maiúscula arbitrária.

As enzimas proteolíticas que pertencem às quatro classes descritas na Tabela 1 estão envolvidas na patogênese de várias doenças incluindo infecções parasitárias, virais e bacterianas, hipertensão arterial, desordens de coagulação e câncer, entre outros.

Tabela 1 – Classificação de peptidases de acordo com seu mecanismo de catálise.

	PEPTIDASES REPRESENTATIVAS	Aminoácidos presentes no sítio catalítico.
SERINO-PEPTIDASES		
Clã AS	Tripsina, Quimotripsina	His, Asp, Ser
Clã SB	Subtilisina	Asp, His, Ser
Clã SC	Carboxipeptidase C	Ser, Asp, His
Clã SE	Carboxipeptidase de <i>Streptomyces</i>	Ser, Lys
Clã SF	Repressor Lexa	Ser, Lys
Clã SH	Assemblina de Citomegalovírus	His, Ser, His
CISTEÍNO-PEPTIDASES		
Clã CA	Papaína	Cys, His, Asn
Clã CB	Endopeptidases virais quimotripsina-símile	His, Cys, Glu
Clã CC	Endopeptidases virais papaína-símile	Cys His
Clã CD	Caspase	His, Cys
Clã CE	Endopeptidases de Adenovírus	His, Cys
ASPARTIL-PEPTIDASES		
Clã AA	Pepsina	Asp, Asp
Clã AB	Endopeptidases de Nodavírus	Asp, Asp
METALO-PEPTIDASES		
Clã MA	Termolisina	Glu, Asp, His/ Zn ²⁺
Clã MB	Astacina	His, His, His(/Asp)/ Zn ²⁺
Clã MC	Metalocarboxipeptidases	His, Glu, His/ Zn ²⁺
Clã MD	Zinco D-Ala-A-Ala peptidases	His, Asp, His/ Zn ²⁺
Clã ME	Pitrisina	His, His, Glu/ Zn ²⁺
Clã MF	Leucil aminopeptidase	Asp, Asp, Glu, Zn ²⁺
Clã MG	Metionil aminopeptidase	Asp, Lys, Asp, Zn ²⁺ Asp, His, Glu, Co ²⁺ Asp, Asp, Glu, Co ²⁺

Fonte: Adaptado a partir de Expert Protein Analysis System – ExPASy (2007).

1.2 Cisteíno-Peptidases

As cisteíno-peptidases são encontradas em uma grande gama de seres vivos, englobando protozoários, plantas e animais. Os tecidos de mamíferos apresentam um grande número de cisteíno-peptidases, dentre elas estão: a catepsina B (EC 3.4.22.1), catepsina L (EC 3.4.22.15), catepsina S (EC 3.4.22.27), catepsina H (EC 3.4.22.16) e catepsina C (EC 3.4.14.1), todas localizadas nos lisossomos.

A papaína (EC 3.4.22.2) foi a primeira enzima a ser classificada como cisteíno-peptidase (SMITH & KIMMEL, 1960) sendo, portanto, a mais investigada dessa classe; e foi a primeira a ter sua estrutura tridimensional resolvida (DRENTH ET AL, 1968). As cisteíno-peptidases que compõe a família da papaína participam do metabolismo celular, nos processos de conversão de pró-hormônios e pró-proteínas, na degradação de proteínas da matriz extracelular, em todas as etapas de progressão tumoral, na distrofia muscular e artrite reumatóide (SIEWINSK ET AL, 1994; II ET AL, 1993; MORT E BUTTLE, 1997; CATALDO ET AL 1994).

As catepsinas B e L, cisteíno-peptidases pertencentes à família da papaína, podem participar na formação de metástase através da degradação de vários componentes da matriz extracelular (SHEAHAN ET AL, 1989; BUCK ET AL, 1992). A relação entre as cisteíno-peptidases com componentes da membrana basal é importante na compreensão do papel biológico dessa classe de enzimas nos processos de invasão tumoral e também na remodelação da matriz (GUINEC ET AL, 1992). Dados da literatura indicam que a papaína e a catepsina B possuem a capacidade de interagirem com a lâmina da membrana basal (DALET-FUMERON ET AL, 1998), estes resultados reforçam o papel proposto das cisteíno-peptidases na degradação de componentes da matriz extracelular. Em função disso, as

interações de cisteíno-peptidases com glicosaminoglicanos podem ser fundamentais para o entendimento dos processos de remodelação tecidual (ALMEIDA ET AL, 1999).

1.2.1 Catepsina L

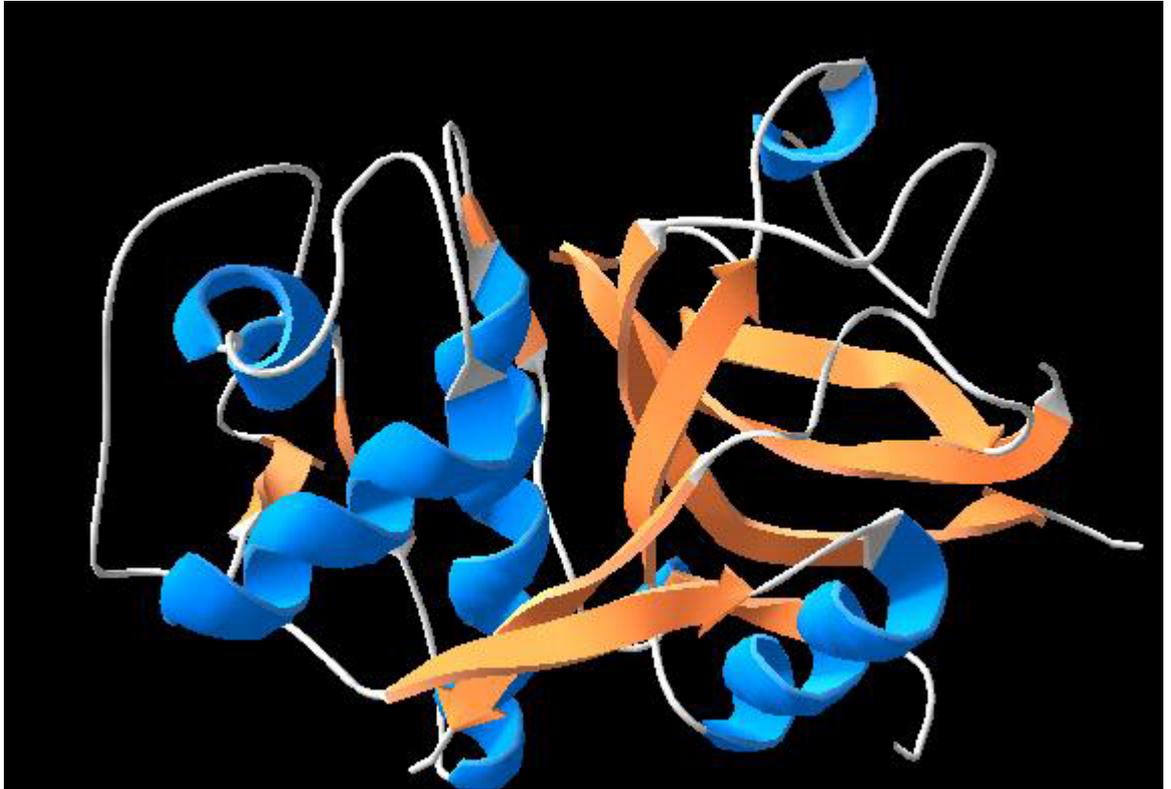
A catepsina L madura (Figura 1) é oriunda de um precursor (pré-pró-proteína) de alta massa molecular (~36KDa) que não apresenta atividade catalítica, uma vez que é inibido pela sua pró-região. O grau de homologia entre os pró-peptídeos da catepsina L e da papaína é inferior do que aquele observado entre as enzimas maduras, e apresenta apenas dois motivos conservados sendo que um deles também é encontrado no pró-peptídeo da catepsina B (KARRER ET AL, 1993). O precursor da catepsina L é formado por um peptídeo sinal (pré-peptídeo) com 17 resíduos de aminoácidos, um pró-peptídeo com 96 resíduos e uma enzima de baixa massa molecular (21KDa, 220 resíduos de aminoácidos) (CARMONA ET AL., 1996). Enquanto a catepsina B é encontrada unicamente em mamíferos a catepsina L é relatada em várias espécies animais como o homem, rato, porco, rã, pomba carpa e *Euglena gracillis* (BOHLEY E SEGLEN, 1992).

A comparação entre as seqüências primárias da papaína, catepsina B (rato) e catepsina L (galinha), mostra que as regiões N-terminal (aminoácidos 1-70, numeração da papaína) e C-terminal (118-212) apresentam identidade de seqüência mais alta, em relação ao domínio central que possui importantes inserções e deleções. De maneira geral, as seqüências das catepsinas H e L conservam mais as características da papaína, ao contrário da catepsina B que difere de forma importante.

As estruturas secundárias das catepsinas H, L e B mostram uma importante conservação de domínios organizados em α -hélice e dobras β (DUF0UR, 1988). A catepsina

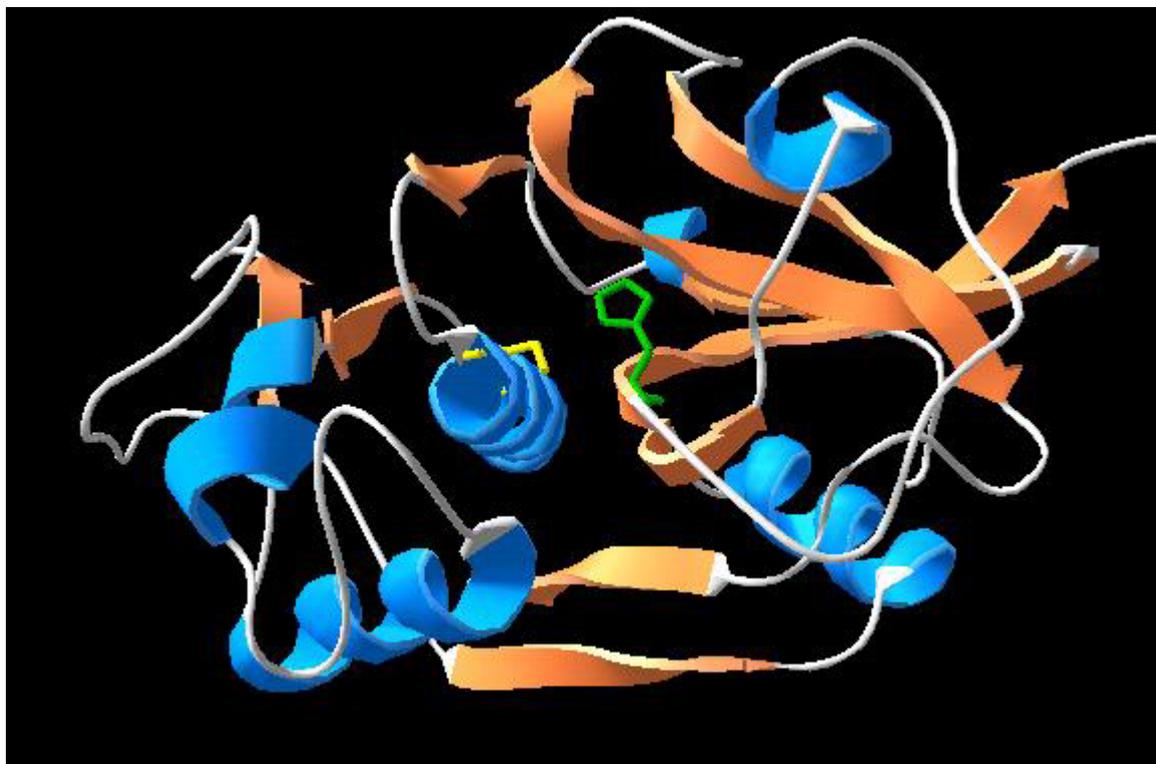
L possui uma estrutura típica de cisteíno-peptidases pertencente à família da papaína, ela é organizada por dois domínios que flanqueiam o sítio ativo, composto pela Cys²⁵ e His¹⁶³. A Cys²⁵ está no domínio composto predominantemente por estruturas do tipo α -hélice, enquanto a His¹⁶³ localiza-se no domínio oposto, com estruturas do tipo dobras β (Figura 2). Pela comparação dos sítios ativos das catepsinas B e L, através das cristalografias de raios-X, temos: (a) os subsídios S' de ambas as enzimas são completamente diferentes, em função da alça de oclusão próxima ao final dos subsítios S' da catepsina B; (b) O subsítio S₂ da catepsina L é raso e limitado em relação a catepsina B; (c) O subsítio S₃ de ambas enzimas apresentam a maior similaridade entre todos os demais, entretanto a catepsina L acomoda grupos mais volumosos.

Figura 1: Estrutura Tridimensional da catepsina L em modelo de fita. Do lado esquerdo está o domínio predominantemente formado por estruturas do tipo α -hélices (em azul) e ao lado direito o domínio constituído por folhas- β (laranja).



Fonte: PDB File: 1icf

Figura 2: Detalhe do sítio ativo da catepsina L, evidenciando as cadeias laterais da Cys²⁵ (em amarelo) e His¹⁶³ (em verde).



Fonte: PDB file 1HNE

A catepsina L é considerada, até o momento, a mais ativa das cisteíno-peptidases lisossômicas, por hidrolisar os mesmos substratos protéicos com velocidade até dez vezes superior quando comparada com a catepsina B.

Dentre as funções da catepsina L existem fortes evidências de funções específicas como processamento de pró-hormônios, neuro-peptídicos e, também, a conversão de tiroglobulina em tiroxina nas células epiteliais da tireóide (HONEY AND RUDENSKY, 2003; FRIEDRICHS ET AL., 2003; YASOTHORNSRIKUL ET AL., 2003).

Um outro ponto de atuação da catepsina L é a remodelação da matriz extracelular. A atuação das peptidases na remodelação da matriz é essencial para tanto para a sua maturação quanto para uma deposição controlada dos seus componentes. Extracelularmente, os colágenos são degradados por collagenases, gelatinases e estromelisinases. Essas proteases clivam o colágeno em pontos específicos, liberando 1/3 da molécula e seu complementar de

2/3, que são então fagocitados por macrófagos e fibroblastos (EVERTS, ET AL 1996). No interior dessas células os fagossomos contendo componentes da matriz são fusionados aos lisossomos onde as catepsinas completam a degradação. Além da degradação intracelular dos colágenos, as catepsinas podem degradar os componentes da matriz *in loco*. As células capazes de liberar catepsinas para o meio extracelular são os macrófagos (catepsinas B, K, L e S), mastócitos (catepsinas C e L) e células tumorais (catepsinas B, L e S) (PUNTURIERI ET AL, 2000; WOLTERS ET AL, 1998; HEIDTMANN ET AL, 1993).

Recentemente atribuiu-se a catepsina L a participação na apresentação de antígenos em macrófagos, através do principal complexo de histocompatibilidade classe II (MHC-II).

Antígenos extracelulares, que são incorporados por macrófagos, são comumente degradados no sistema lisossomo/endossomo. Os peptídeos resultantes expressam-se na superfície celular após a formação do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II). Os heterodímeros $\alpha\beta$ do MHC-II são sintetizados no retículo endoplasmático. Durante a fase inicial da síntese, o heterodímero $\alpha\beta$ se associa com uma proteína de membrana tipo II, a cadeia invariável (Ii), para formar um complexo monomérico de $\alpha\beta Ii$. O complexo $\alpha\beta Ii$ atravessa o complexo de Golgi e é então direcionado ao sistema lisossomo/endossomo onde ocorre a degradação da porção Ii do complexo monomérico, permitindo assim que as moléculas do MHC-II encontrar e ligar-se a peptídeos antigênicos. O processo proteolítico participa ativamente na geração do complexo MHC-II – Peptídeos antigênicos, sobretudo em dois pontos chaves: (i) degradação do Ii, que é um pré-requisito para a ligação do MHC-II com os peptídeos; e (ii) geração dos peptídeos antigênicos a partir de proteínas maiores (BÜHLING ET AL, 2004).

1.3 Serino-peptidases

As serino-peptidases estão entre as primeiras enzimas a serem estudadas extensivamente. O interesse nesta família de peptidases é mantido em parte por um crescente reconhecimento de seu envolvimento em diversos processos fisiológicos e patológicos. Somado ao papel biológico, feito pelas enzimas digestivas como a tripsina, as serino-peptidases também atuam amplamente como reguladoras, através da ativação proteolítica de precursores protéicos (VAN DE VEM ET AL., 1993). Exemplos desta regulação incluem a ativação do tripsinogênio em tripsina (HUBER & BODE, 1978) e o controle de diversos passos da cascata de coagulação (fatores VIIa, IXa, Xa) (DAVIE ET AL., 1991).

Um motivo para o contínuo estudo das serino-peptidases têm sido a sua caracterização para a compreensão dos mecanismos correlacionais entre estrutura e função. Até recentemente as enzimas pertencentes a essa classe de peptidases eram divididas em dois grupos distintos em função de sua estrutura: as similares a quimiotripsina e as similares a subtilisina. (MATTHEWS, 1977). Entretanto a estrutura cristalográfica da carboxipeptidase II de trigo revelou um terceiro grupo estrutural.

As três classes de serino-peptidases distinguem-se pela ausência de algum motivo conservado na estrutura secundária ou terciária, mas em cada caso, os resíduos catalíticos de serina e a histidina possuem uma orientação geométrica idêntica. Em menor grau, os grupos adjacentes que estabilizam o estado de transição do substrato estão arranjados de maneira similar (LIAO ET AL., 1992).

1.3.1 Elastase de neutrófilo

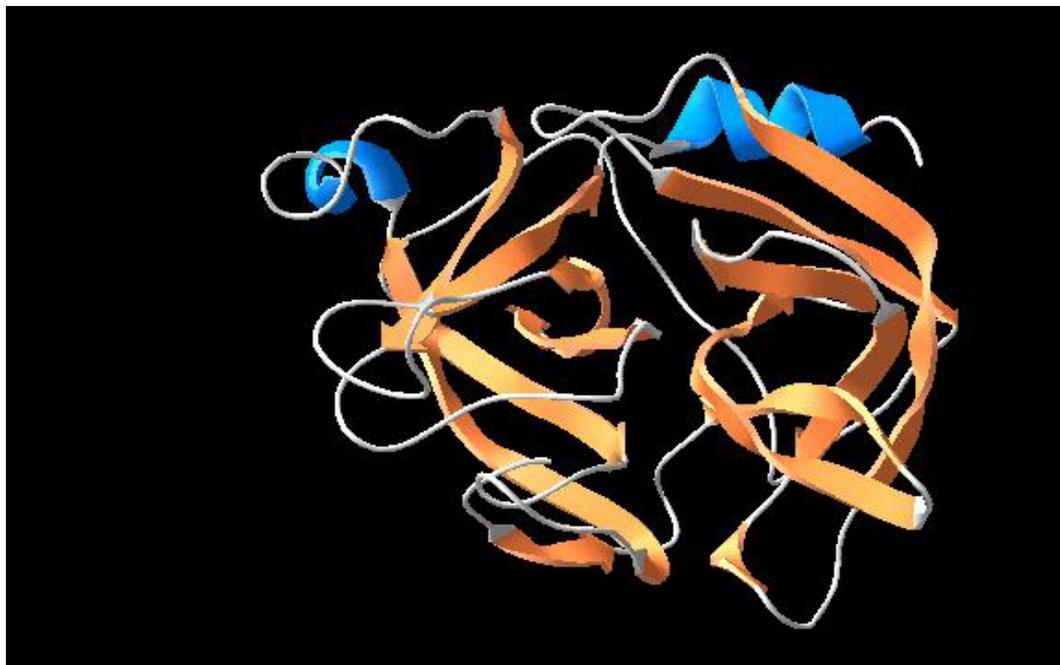
A elastase de neutrófilo (E.C. 3.4.21.37) é uma enzima lisossomal, de aproximadamente 25kDa, armazenada em grandes quantidades nos grânulos azurófilos de leucócitos e neutrófilos em mamíferos, pertencente à família das quimiotripsina, caracterizada assim, pela tríade catalítica formada pelos resíduos Asp⁸⁸, Ser¹⁷³ e His⁴¹ na enzima em sua forma ativa (BEYNON E BOND, 1989).

Intracelularmente essa enzima é responsável pela degradação de microorganismos exógenos que são fagocitados pelas células fagocitárias. Caso seja lançada para o meio extracelular, a elastase pode promover uma degradação local da matriz extracelular o que facilita a migração do neutrófilo e também pode modular a expressão de citocinas na superfície epitelial e endotelial. A modulação inata de citocininas pela elastase é um potencial iniciador e polarizador da resposta imune adaptativa (FITCH ET AL, 2006).

Estruturalmente as proteases da família da quimiotripsina consistem em dois domínios, ambos apresentando extensas regiões de folhas- β antiparalelas dispostas como em um barril e uma região C-terminal em α -hélice. Em alguns casos, como na elastase, o segmento que conecta os dois domínios também é organizado na forma de uma α -hélice. (CZAPINSKA E OTLEWSKI, 1999) (Figura 3).

É sabido que durante processos inflamatórios (ITOH. E NAGASE, 1995) e também na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (PETTERSON E ADLER, 2002) neutrófilos liberam grandes quantidades de elastase para a matriz extracelular, provocando um *burst* local desta enzima. Uma vez na matriz, a elastase desencadeia o processo de remodelação local da matriz através da ativação das metalo-proteases (MMPs), facilitando assim a migração de macrófagos, e outras células fagocitárias.

Figura 3: Estrutura tridimensional da elastase de neutrófilo. É possível verificar a existência de dois domínios bem definidos, formados exclusivamente por folhas- β (em laranja)

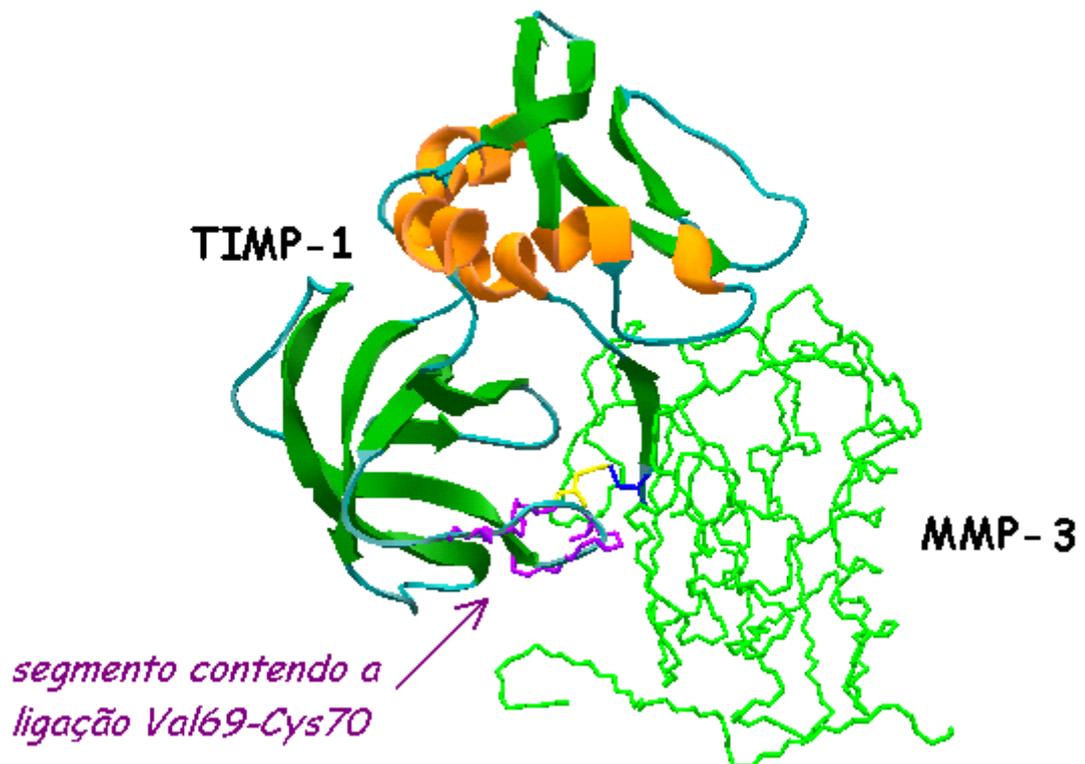


Fonte: PDB: 1HNE

As MMPs de matriz extracelular caracterizam-se pela dependência de Zn^{2+} em seus centros ativos para atividade catalítica, esse íon coordena a estrutura dessas proteases conferindo-lhes correto posicionamento dos resíduos de Glu e His, responsáveis pela atividade catalítica. Pertencem a essa família as gelatinases, estromelinas, matrilisinas, entre outras (BEYNON E BOND, 1989). O mecanismo de inibição dessa categoria de proteases envolve o bloqueio do Zn^{2+} necessário para catálise, por inibidores endógenos denominados *Tissue Inhibitors of Metalloproteases* (TIMPs) através da formação de complexos estequiométricos 1:1 (NAGASE ET AL, 1997). Esse grupo de inibidores é considerado como regulador do *turnover* da matriz extracelular (EMONARD E GRIMAUD, 1990). O TIMP-1 em particular, é uma glicoproteína que apresenta massa molecular variando entre 29-30 kDa consistindo de 184 aminoácidos (NAGASE, 1996), sendo descrito como capaz de inibir a conversão da pró-gelatinase (PMMP-9) para sua forma ativa (TAYLOR ET AL, 1996) e

também capaz de inibir a atividade da estromelina-1 (MMP-3), como apresentado na Figura 4, que é responsável pelo processamento proteolítico da PMMP-9. Entretanto, a PMMP-9 encontra-se normalmente complexada ao TIMP-1, não permitindo sua ativação (NAGASE, 1997).

Figura 4: Estrutura cristalográfica do complexo formado entre o TIMP-1 e a MMP-3. Segmento contendo a ligação Val⁶⁹-Cys⁷⁰ que foi utilizado como base para o desenho do peptídeo sintético.



Fonte: adaptado de Gomis-Ruth F. X et al (1997)

O arranjo das pontes dissulfeto do TIMP-1 indicam que ele é constituído de dois domínios, o N-terminal (resíduos 1-124) e o C-terminal (resíduos 127-184). A interação entre TIMP-1 e o precursor da MMP-9 ocorre através do domínio C-terminal do inibidor e domínio C-terminal hemopexina da PMMP-9.

Em estudos da degradação do TIMP-1, o que resulta em um aumento da atividade de metalo-proteases na matriz extracelular, foi determinado que a elastase de neutrófilo é capaz de inativar o TIMP-1, através da clivagem da ligação Val⁶⁹-Cys⁷⁰ que se localiza no domínio N-terminal, capaz de se complexar à MMP-3 (NAGASE E AL, 1997; YOTH E NAGASE, 1995).

1.4 Mecanismo de catálise

1.4.1 Serino-peptidases

Um mecanismo baseado em dados químicos e estruturais é apresentado aqui em relação a quimiotripsina, embora seja aplicável a todas as serino-peptidases.

Após a ligação do substrato à enzima, o resíduo de Ser¹⁹⁵ (numeração da quimiotripsina) promove um ataque nucleofílico ao grupo carbonila da ligação peptídica a ser clivada formando um intermediário tetraédrico. Estudos estruturais por difração de raios-X indicam que a Ser¹⁹⁵ está perfeitamente posicionada para que ocorra este ataque. O ataque envolve a transferência de um próton do anel imidazólico da His⁵⁷ formando um íon imidazol. Esse processo é auxiliado pelo efeito de polarização do íon carboxilato não solvatado do Asp¹⁰² que forma uma ponte de hidrogênio com a His⁵⁷. O intermediário tetraédrico tem uma existência bem definida, apesar de temporária.

O intermediário tetraédrico decompõe-se no intermediário acil-enzima sob a força impulsora da doação do próton N₃ da His⁵⁷. O grupo amino de saída é liberado da enzima e

substituído por uma molécula de água do solvente. O intermediário acil-enzima é altamente suscetível à clivagem hidrolítica.

O intermediário acil-enzima é deacilado pelo reverso das etapas anteriores, seguido da liberação do produto carboxilado resultante, regenerando a enzima ativa. Neste processo a água é o nucleófilo que ataca e a Ser¹⁹⁵ é o grupo de saída.

1.4.2 Cisteíno-peptidases

As enzimas do Clã CA seguem um mesmo mecanismo de catálise, baseando na alta nucleofilicidade do grupo tiol (-SH) do resíduo Cys²⁵ (numeração da papaína) presente no sítio ativo, que ataca nucleofílicamente o carbono da carbonila da ligação peptídica susceptível à hidrólise. Também, o resíduo Hys¹⁵⁹, por intermédio do par iônico imidazol-tiolato, confere elevada nucleofilicidade ao grupo tiol da Cys²⁵ (POLGAR, 1990). Além da Cys²⁵ e da Hys¹⁵⁹, o resíduo Asn¹⁷⁵ tem sua importância para a atividade das enzimas do clã CA, por interagir com a Hys¹⁵⁹ por intermédio de forças de Van Der Waals, formando assim a tríade catalítica Cys-His-Asn.

O mecanismo proposto para a catálise das cisteíno-peptidases é baseado no mecanismo descrito para as serino-peptidases. A primeira etapa da reação de hidrólise por uma endopeptidase da família C₁ é a ligação não covalente entre a enzima e o substrato, formando o complexo de Michaelis. A etapa seguinte é a acilação da enzima e a formação do primeiro produto, R'NH₂. A acil-enzima reage com uma molécula de H₂O para a formação de segundo produto (desacilação da enzima), regenerando, assim, a enzima ativa. Storer e Ménard (1994) propõem que as etapas de acilação e desacilação da enzima envolvem a formação de dois intermediários tetraédricos e quatro estados de transição. Tais intermediários são acompanhados pela formação de carga negativa no oxigênio da carbonila

do substrato, denominado oxianion, que é estabilizado pela formação de duas pontes de hidrogênio, uma na cadeia principal no resíduo Cys²⁵ e outra na cadeia lateral do resíduo Gln¹⁹ (MÉNARD ET AL, 1995).

1.5 Especificidade

A habilidade de uma enzima em diferenciar dois ou mais substratos que competem entre si, poder ser encarada como a definição de especificidade de uma dada enzima a um substrato. A natureza das interações eletrostáticas dos aminoácidos e as interações destes com os aminoácidos envolvidos no mecanismo de catálise são fatores que se correlacionam diretamente na especificidade enzimática.

O estudo da especificidade de uma peptidase utilizando substratos naturais gera informações qualitativas a cerca dos sítios de hidrólise, entretanto, não permite quantificar e delinear a especificidade primária destas enzimas. Um exemplo é o estudo da especificidade da catepsina B sobre a cadeia β da insulina. Em pH ácido, a atividade exopeptidásica é maior quando comparada à atividade endopeptidásica, o que leva a uma difícil caracterização do local exato da hidrólise.

Os substratos peptídicos sintéticos permitem detectar de maneira mais clara a atividade enzimática, determinar as suas constantes cinéticas características e também fazer comparações diretas em relação à especificidade primária entre duas ou mais enzimas.

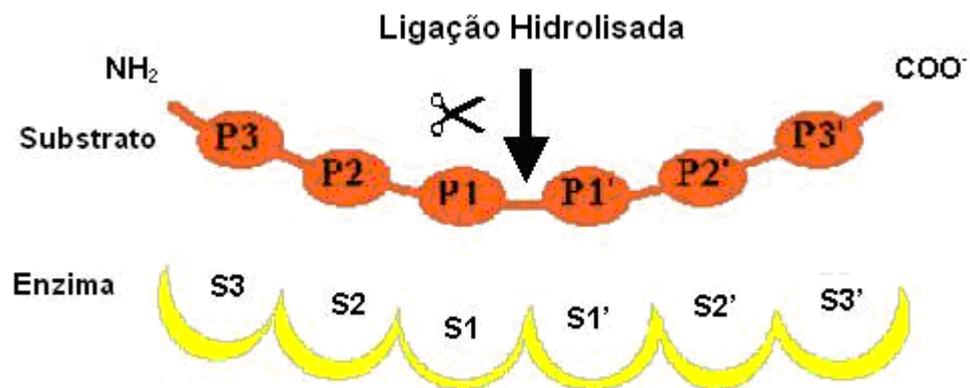
Quando em 1967 Schechter e Berger relataram seu trabalho fundamental sobre sítios de ligação de substratos da papaína, coube-lhes apenas confiar em dados cinéticos. O estudo avaliou a dependência das cinéticas de substratos na extensão de uma cadeia de polialanina e os experimentos demonstraram que as cinéticas são influenciadas pela extensão da cadeia polipeptídica em sete aminoácidos e, assim, concluíram que existem sete subsítios de ligação

na molécula da papaína (S_1 - S_4 e S'_1 - S'_3), cada um podendo acomodar um único aminoácido de um dado substrato (P_1 - P_4 e P'_1 - P'_3). (Figura 5)

Os subsítios S_n interagem com os aminoácidos P_n situados do lado N-terminal do sítio de clivagem, e os subsítios S'_n interagem com os aminoácidos P'_n localizados na região C-terminal do sítio de clivagem (SCHECHTER E BERGER, 1967).

A nomenclatura sugerida por Schechter e Berger (1967) permitiu descrever o sítio ativo de diversas peptidases. As definições das interações enzima substrato e sua nomenclatura tornaram-se padrões para a designação dos subsítios de interações de um substrato polipeptídico e uma enzima proteolítica.

Figura 5: Nomenclatura de Schechter e Berger. Os subsítios da enzima interagem com os aminoácidos na posição P_n no substrato, situado ao lado N-terminal do ponto de hidrólise e os subsítios S'_n com os aminoácidos P'_n localizados no lado C-terminal.



1.5.1 Catepsina L

Quando um número suficiente de estruturas protease/inibidor tornou-se disponível, as definições de Schechter e Berger (1967) em relação aos subsítios de ligação do substrato sobre as enzimas da família da papaína foram redefinidas. A base e as paredes dos subsítios de ligação são formadas por quatro segmentos da cadeia. Duas alças curtas no domínio L (resíduos 19-25 e 61-69) e duas alças longas no domínio R (resíduos 136-162 e 182-213) (TURK E GUNCAR, 2003).

As estruturas sobrepostas de complexos de catepsinas com inibidores análogos a substratos revelam que os resíduos do substrato ligam-se ao longo da fenda catalítica em uma conformação estendida. Com as cadeias laterais orientadas para os domínios L e R, de maneira alternada. Os resíduos P_2 , P_1 e P'_1 ligam-se de maneira bem definida aos seus respectivos subsítios. Esta acomodação é orientada pelas interações que envolvem átomos da cadeia principal e das cadeias laterais. Os subsítios S_1 e S'_1 permitem apenas uma ligação superficial do substrato, em contra ponto o subsítio S_2 apresenta-se como uma cavidade mais profunda. A localização do resíduo P_3 é mediada somente por interações da cadeia lateral. Em função disso, as geometrias de ligação estão dispersas por uma ampla área e exclusivas para cada substrato.

A localização de subsítios de ligação além de S_3 e S'_2 não é prejudicada pelas interações da cadeia principal. Cada resíduo liga-se na superfície da enzima à sua própria maneira. Em função disso Turk et al (1998) sugerem que as ligações além de S_2 e S'_2 não deveriam ser classificadas como subsítios, mas sim como áreas. Dessa maneira as peptidases pertencentes à família da papaína representam uma classe especial de peptidase, a qual apresenta um número limitado de subsítios, em oposição as serino-peptidases da família da

quimiotripsina que possuem seis subsítios. As descrições dos subsítios da catepsina L estão mais bem esclarecidas nos tópicos que seguem.

1.5.1.1 Subsítio S₁

O subsítio S₁ das enzimas da família da papaína acomoda preferencialmente resíduos básicos. A maioria dos substratos sintéticos descritos para essa família contém Lys ou Arg na posição P₁ (BROCKLEHURST, 1990).

1.5.1.2 Subsítio S₂

O aminoácido que ocupa o subsítio S₂ é crucial para a diferenciação das peptidases da família da papaína.

A maioria dos substratos descritos contém Phe na posição S₂ (BARRETT E KIRSCHKE, 1981), entretanto, o subsítio S₂ aceita de maneira geral aminoácidos hidrofóbicos aromáticos (LECAILLE ET AL, 1999) ou não aromáticos (BRÖMME ET AL, 1999). A natureza dos aminoácidos envolvidos no subsítio S₂ pode explicar as diferentes especificidades encontradas nas peptidases da família da papaína (TABELA 2) (MUSIL ET AL, 1991).

Tabela 2 – Aminoácidos constituintes do subsítio S₂ da papaína e catepsinas B e L.

Enzima	Aminoácidos (numeração da papaína)				
	68	133	157	160	205
Papaína	Pro	Val	Val	Ala	Ser
Catepsina B humana	Pro	Ala	Gly	Ala	Glu
Catepsina L humana	Met	Ala	Met	Gly	Ala

Fonte: Adaptado a partir de Portaro et al (2000)

1.5.1.3 Subsítio S₃

O subsítio S₃ da catepsina L é formado por resíduos de Asn⁶⁶, Glu⁶³ e Leu⁶⁹. Poucos são os resultados sobre a especificidade em relação ao subsítio S₃ disponíveis na literatura. Koga et al (1990) demonstraram que a catepsina L, em contra ponto à papaína, acomoda um aminoácido hidrofóbico nesta posição.

De acordo com os dados obtidos a partir da cristalografia da catepsina L os subsítios S₃ das catepsinas B e L podem ser considerados similares em termos de sua especificidade.

Considerando-se apenas os resíduos hidrofóbicos, a ordem preferencial na catepsina L é: Phe, Trp, Leu e Tyr. Os substratos que apresentam His na posição P₃, também são bastante susceptíveis a hidrolise pela catepsina L, entretanto, resíduos ácidos fazem com que a hidrolise seja afetada negativamente (PORTARO ET AL, 2000).

1.5.1.4 Subsítio S'₁

Os subsítios S'₁ da papaína, catepsina B e catepsina L possuem um amplo grau de especificidade. As diferenças residem no tamanho e na hidrofobicidade deste subsítio. A

catepsina B acomoda preferencialmente resíduos hidrofóbicos e volumosos, enquanto a catepsina L aceita substratos com aminoácidos como Ser, Ala, Asn, Gln e Lys na posição P₁'.

(MÉNARD ET AL, 1993).

1.5.1.5 Subsítio S'₂

A especificidade do subsítio S'₂ da catepsina L é muito similar ao da papaína, sendo ambas enzimas capazes de hidrolisar com eficiência substratos que contenham Phe em P'₂ (BRÖMME E KIRSCHKE, 1993).

O S'₂ da catepsina L é, por sua natureza, preferencialmente hidrofóbico, acomodando principalmente Trp, Leu e Tyr (PORTARO ET AL, 2000). Este padrão também foi observado em cristalografia de raios-X da pró-catepsina L, onde a Met⁷⁵ da pró-região interage com o Trp¹⁷⁷ da enzima. (COULOMBE ET AL, 1996).

1.5.2 Elastase de Neutrófilo

A elucidação das estruturas espaciais de diversas enzimas pertencentes à família da quimiotripsina, como por exemplo, quimiotripsina bovina, elastases suínas e de neutrófilo e trombina, mostra que domínio catalítico e os sítios de ligação do substrato nas enzimas similares a quimiotripsina estão localizados no espaço entre os domínios destas enzimas. Os resíduos funcionais estão posicionados preferencialmente na alça de ligação. O subsítio S₁, constituído por três folhas β (resíduos 189-192, 214-216 e 226-228; numeração da quimiotripsina) e por um sítio de ligação de oxianion (Gly¹⁹³ e Ser¹⁹⁵), pertencem ao barril-β

C-terminal (CZAPINSKA E OTLEWSKI, 1999). Os demais subsítios estão sumarizados na figura 6, e suas descrições são dadas nos subitens abaixo.

1.5.2.1 Subsítio S₁

A especificidade neste grupo é dada, sobretudo pela interação entre o aminoácido que ocupa a posição P₁. A elastase tem por preferência resíduos hidrofóbicos de pequenas ou médias dimensões. O subsítio S₁ possui uma forma semi-esférica e possui uma característica bastante hidrofóbica. Curiosamente este subsítio contém uma carga negativa da Asp²²⁶ que, no entanto, não está disponível para a interação com a cadeia lateral do aminoácido P₁, uma vez que está bloqueado pela Val²¹⁶ e Val¹⁹⁰. O subsítio S₁ acomoda bem resíduos de Leu, Ile, Val ou Met. A intensa ligação de cadeias laterais de Ile e/ou Val é uma característica própria da elastase que a distingue de praticamente todas as outras serino-peptidases. Uma possível explicação para essa característica pode ser a grande flexibilidade intrínseca deste subsítio como consequência da sua constituição e interação com outras porções da estrutura (BODE ET AL, 1989).

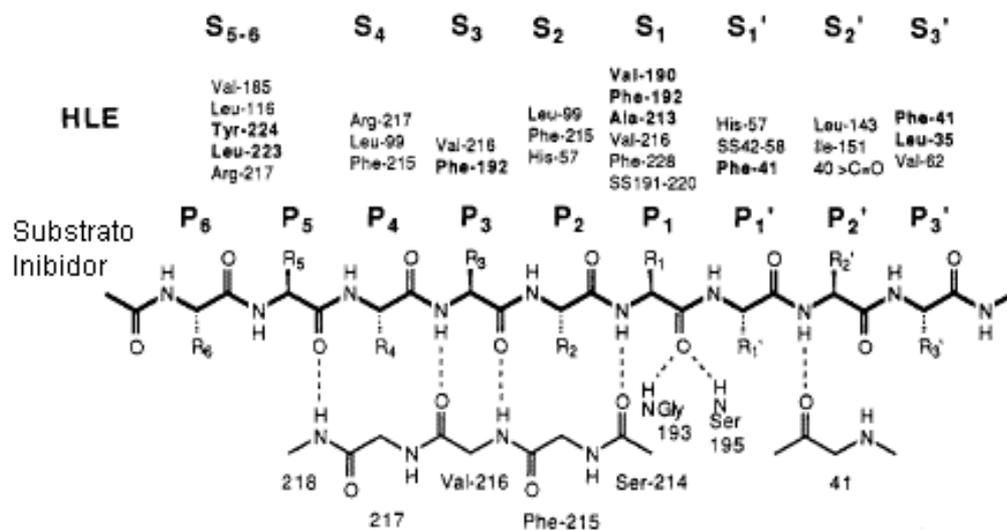
1.5.2.2 Subsítio S₂

O subsítio S₂ da elastase, pautado pelos resíduos Phe215 - Leu99 e próximo ao anel imidazol da His57, apresenta-se em forma de taça e bastante hidrofóbico. Ele acomoda cadeias laterais de tamanho médio e com característica hidrofóbica, tendo preferência por resíduos de prolina (BODE ET AL, 1989).

1.5.2.3 Subsítios S_3 e S_4

. Cadeias laterais longas e hidrofóbicas podem fazer interações hidrofóbicas com a superfície da enzima, sobretudo com a Phe¹⁹² e a Val²¹⁶. Em conformidade ao já visto para outras serino-peptidases, a interação entre P3-S3 é caracterizada por duas pontes de hidrogênio intramoleculares entre os grupos NH do substrato e a carbonila do da Val²¹⁶. Cadeias laterais de Ala direcionam-se através das cadeias laterais da Phe²¹⁵ e da Arg²¹⁷ do subsítio S_4 em direção a moléculas de água. Curiosamente, substratos com Lys em P₃ ou P₄ são muito menos reativas do que quando comparadas com Ala. Em contraste substratos com resíduos de cadeia lateral aromática ou grupos hidrofóbicos longos e com carga são mais bem aceitos e estabilizam melhor o substrato na enzima (YASUTAKE E POWERS, 1981).

Figura 6: Representação esquemática da interação entre a elastase de neutrófilo (HLE) e um dado substrato. Os subsítios estão representados por S1, S1', etc. e os resíduos do substrato por P₁, P'₁ etc.



Fonte: adaptado a partir de Bode et al (1989)

1.5.2.4 Subsítio S'₁

O subsítio S'₁ é reativamente hidrofóbico, ladeado pelas Cys⁴² e Cys⁵⁸, que formam uma ponte dissulfeto, e pela Phe⁴¹. Este subsítio não possui uma alta especificidade em relação às cadeias laterais que acomoda, podendo, assim, receber quase todos os aminoácidos, com duas exceções: Pro ou resíduos muito volumosos e hidrofóbicos, como Trp (BODE, 1989).

1.5.2.5 Subsítio S'₂

Estudos de afinidade para este subsítio indicam que ele possui uma grande afinidade por cadeias laterais fenólicas, como da Tyr.

1.5.2.6 Subsítio S'₃

O subsítio S'₃ é formado pelas cadeias laterais da Phe⁴¹, Leu³⁵ e Val⁶³ o que lhe confere uma característica hidrofóbica levando-o a acomodar de maneira preferencial substratos com P'₃ que possuam longas cadeias alifáticas (BODE, 1989).

2 OBJETIVOS

a) Estudar a especificidade das enzimas catepsina L e Elastase de Neutrófilo Humana em relação ao substrato sintético derivado da seqüência do Inibidor Tissular de Metallo Protease – 1 (TIMP-1) em relação aos seus substratos comerciais e determinação das constantes cinéticas (k_M , K_{cat} e K_{cat}/k_M) para cada um dos casos;

b) Determinar a influência da heparina nas constantes de especificidade da elastase.

c) Caracterizar os produtos de hidrólise de cada uma das enzimas através dos fragmentos gerados e analisados por espectrometria de massa;

d) Correlacionar às posições P e P' do substrato hidrolisado com a especificidade e características dos subsítios S e S'.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Enzimas, Substratos e Moduladores

3.1.1 Elastase de Neutrófilo.

A elastase de neutrófilo (50 μ g) foi adquirida comercialmente da Calbiochem / Novabiochem (La Jolla, Califórnia USA), foi diluída em 100 μ l de tampão HEPES 10mM, 0,14 M NaCl, em pH 7,4. O sítio ativo foi titulado com fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), de acordo com (BARRETT, 1981).

3.1.2 Catepsina L

A enzima catepsina L foi expressa, purificada e ativada como descrito por Illy (1997). A concentração estoque (736 μ M). A titulação do sítio ativo da enzima foi feita com inibidor L-Trans-Epoxisuccinil-L-Leucilamino (4-guanidino)-butano (E-64) de acordo com Barrett e Kirschke (1981). Todo o processo de expressão foi feito no Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes (NIB – UMC) sob a orientação do Prof. Dr. Luiz R. Nunes e Prof^ª Dr^ª. Regina C. de Oliveira

3.1.3 Substratos Cumarínicos Z-FR-MCA e MeOSuc-AAPV-MCA.

Os substratos derivados cumarínicos utilizados para os ensaios fluorimétricos foram adquiridos comercialmente da Sigma-Aldrich.

3.1.4 Inibidor Tissular de Metaloproteases – 1 Recombinante

Cedido pela Prof^a. Dr^a. Gillian Murphy do Departamento de Oncologia da Universidade de Cambridge, Reino Unido.

3.1.5 Heparina

A heparina de pulmão bovino foi cedida pelo Prof. Dr. Ivarne Luiz dos Santos Tersariol do Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica da Universidade de Mogi das Cruzes (CIIB-UMC).

3.2 Substrato sintético derivado da seqüência do TIMP-1

O substrato Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp foi sintetizado no Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) pela Prof^a Dr^a Maria Juliano e Pr. Dr. Luiz Juliano Neto. A modificação realizada no peptídeo em relação a seqüência natural do TIMP-1 foi a substituição do resíduo de Cys⁷⁰ por um resíduo de Met (Abz-

AMESV**M**GYFHRSQ-EDDnp). Essa modificação foi introduzida por conveniência para a síntese do mesmo.

Trata-se de um substrato fluorescente com supressão interna de fluorescência cuja aplicação no estudo da especificidade de proteases está bem consolidada. O substrato contém um grupo fluorescente, ácido orto-aminobenzóico (Abz) ligado à porção N-terminal e um supressor da fluorescência, etilenodiamino-dinitro-fenil (EDDnp), na porção C-terminal. Enquanto a cadeia peptídica estiver íntegra e os dois grupos estiverem relativamente próximos à fluorescência do composto será mínima. A partir do momento da hidrólise a fluorescência irá aumentar.

Por se tratar de um aumento proporcional ao número de moléculas hidrolisadas, este índice de variação de fluorescência torna-se uma medida direta da velocidade de hidrólise que pode ser utilizada para a determinação das constantes cinéticas.

3.3 Estudos das cinéticas enzimáticas

3.3.1 Titulação do substrato Abz-AMESV**M**GYFHRSQ-EDDnp

Para a titulação do substrato Abz-AMESV**M**GYFHRSQ-EDDnp foram feitas cinco diluições em água, que foram então submetidas a leitura da absorbância ($\lambda = 365 \text{ nm}$) no espectrofotômetro U-2001 da Hitachi (Japão) com cubetas de quartzo de 3mL e caminho óptico de 1cm. Os valores de absorbância obtidos eram analisados através de regressão linear com o software GRAFIT v. 3.01 (Leatherbarrow, 1993) da onde se origina uma reta

(absorbância x volume de substrato) cujo coeficiente angular foi utilizado para determinar a concentração (em μM) a partir da equação:

$$[\text{substrato}] \equiv \frac{\text{coeficiente angular}}{\varepsilon}$$

sendo $\xi = 17300 \text{ M}^{-1}$.

3.3.2 Calibração do fluorímetro para o grupo Abz.

Para padronizar o fluorímetro (mod. F-2500, Hitachi, Japão) efetuou-se primeiramente a hidrólise total do substrato (Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp) em concentrações crescentes (0,054 μM , 0,108 μM , 0,162 μM , 0,216 μM e 0,270 μM) com papaína (10nM). A fluorescência do substrato foi monitorada em $\lambda_{\text{EX}} = 320\text{nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 420\text{nm}$, fendas de excitação e emissão 10nm e 20nm, respectivamente, e 700V. Os dados obtidos foram analisados por regressão linear no software GRAFIT v. 3.01 (Leatherbarrow, 1993) de onde se obteve uma reta (fluorescência x concentração). O coeficiente angular desta reta corresponde à constante do aparelho, em UAF/ μM . Essa constante permite a conversão da velocidade de UAF/min para M/min.

3.3.3 Calibração do fluorímetro para MCA

Concentrações de MCA livre (5 à 100nM) foram submetidos à leitura da sua fluorescência, monitorados em $\lambda_{EX} = 360\text{nm}$, $\lambda_{EM}=480\text{nm}$, fendas de excitação e emissão 10nm e 10nm, respectivamente, e 700V. Os dados obtidos foram analisados por regressão linear no software GRAFIT v. 3.01 (Leatherbarrow, 1993) de onde se obteve uma reta (fluorescência x concentração). O coeficiente angular desta reta corresponde à constante do aparelho, em UAF/ μM . Essa constante permite a conversão da velocidade de UAF/min para M/min.

3.3.4 Cinéticas Enzimáticas

A solução estoque do substrato Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp foi preparada em DMF 10% em H_2O , a solução de Z-FR-MCA foi feita diretamente em H_2O , ambas mantidas à 4°C. Na determinação dos parâmetros cinéticos utilizou-se fluorímetro F-2500 (Hitachi, Japão) ajustado como descrito anteriormente. Foram utilizadas cubetas de caminho óptico 1cm e volume final 2mL.

Para a elastase de neutrófilo os ensaios foram feitos em tampão Hepes 10mM, 0,14 M NaCl, em pH 7,4 e 0,05% de Triton X-100. Sendo a concentração final de 2,0nM. Para as cinéticas com heparina a concentração final foi de 50 μM . Para a catepsina L os ensaios foram feitos em tampão acetato de sódio 400mM, EDTA1mM em pH 5,5 e DTT (5mM) para a ativação, sendo a concentração final de 2,0nM.

Para a curva de pH com a elastase de neutrófilo (pH 5,0 – 10,0), na ausência e presença de heparina, utilizou-se tampão acetato de sódio 25mM, MES 25mM, TRIS 25mM, Glicina 25mM, 0,14 M NaCl e 0,05% Triton X-100.

Para assegurar que as soluções de reação estavam livres de contaminantes com atividade proteolítica, foram mantidas no compartimento termostaticado durante 5 minutos e monitorada sua fluorescência, antes da adição da enzima.

A variação linear da fluorescência por unidade de tempo foi convertida em nanomols de substrato hidrolisado por minuto, baseado na curva de fluorescência da solução do peptídeo com concentração previamente conhecida.

As constantes cinéticas foram determinadas a partir das velocidades iniciais de hidrólise ($\leq 10\%$ da hidrólise total, através da extrapolação da fluorescência máxima possível, para cada concentração de substrato) utilizando a equação descrita por Michaelis-Menten, no software GRAFIT v. 3.01 (Leatherbarrow, 1993). A velocidade máxima, expressa em UAF/min, foi então corrigida para mM/min permitindo o cálculo das constantes cinéticas. Os desvios padrão, na determinação de K_m e k_{cat} foram sempre menores que 5%.

3.4 Espectrometria de Massas

As análises por espectrometria de massas foram feitas no Centro de Toxicologia Aplicada do Instituto Butantan (CAT-CEPID) sob a orientação do Prof. Dr. Daniel C Pimenta.

3.4.1 Amostras

Para os ensaios de espectrometria de massas, foram preparadas as seguintes soluções:

- a) Controle: Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp (10mM), em solução aquosa.
- b) Incubado 1: Catepsina L (10nM) mais Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp (10 μ M), em tampão acetato de sódio 400mM, EDTA1mM em pH 5,5 e DTT (5mM).
- c) Incubado 2: Elastase (10nM) mais Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp (10 μ M) em tampão Hepes 10mM, 0,14 M NaCl, em pH 7,4.

Todas as amostras foram mantidas por 60 minutos em banho termostaticado a 37°C. Após o tempo de incubação a atividade enzimática foi interrompida com a adição de inibidores específicos, para a catepsina L foi usado E-64 e para elastase de neutrófilo PMSF.

3.4.2 MalDI-ToF

Para a espectrometria de massas tipo MALDI-TOF, as análises foram realizadas em um instrumento MALDI-ToF/Pró (Amersham). As amostras, em solução, foram misturadas na proporção 1:1 (v:v) com uma solução supersaturada de matriz para peptídeos (ácido cinâmico) ou matriz para proteínas (ácido sinápico), depositadas sobre a placa de amostragem (0,4-0,8 μ L) e deixadas secar no ambiente. Foi utilizado o modo automático de controle do equipamento e aquisição de dados do software de controle do equipamento.

3.4.3 LC-MS

As amostras previamente secas foram dissolvidas em 0,1% ácido fórmico e depositadas no amostrador do auto-injetor. 20 μ L de amostra são injetadas em um sistema de HPLC/Espectrometria de Massas (LC/MS) tipo Quadrupolo, MSQ Surveyor (Thermo Finnigan) sob fluxo constante de 1 mL/min, e submetida a uma separação cromatográfica por fase reversa em coluna Bischoff NPS C18 1.5 (4.6 x 14 mm), utilizando como solventes A: ácido fórmico 0,1% e solvente B: ACN: H₂O:ácido fórmico/900:100:0,1 e um programas de gradiente linear de 0 a 100% de B em 6 minutos. O controle do instrumento, a aquisição e o processamento de dados foram realizados pelo pacote de programas Xcalibur (Thermo Finnigan).

3.5 Eletroforese

Para a análise eletroforética foram preparados dois incubados, a saber:

- a) Elastase + TIMP-1; e
- b) Elastase + TIMP-1 + Heparina

A partir destes incubados foram sendo retiradas alíquotas em tempos pré-determinados: 20, 40, 60, 90 e 120 minutos. As alíquotas foram aplicadas em gel de SDS-Page (12,5%) segundo Laemmli (Laemmli, U.K., 1970). O gel foi corado com nitrato de prata e analisado por densitometria.

4 RESULTADOS

4.1 Cinéticas enzimáticas

4.1.1 Elastase de Neutrófilo

Visando a necessidade de um substrato que nos permitisse o acompanhamento da atividade da elastase de neutrófilo humano, optamos pela utilização do substrato comercial derivado cumarínico MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-MCA, que foi utilizado como padrão para a comparação com os dados obtidos para o substrato Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp (Tabela 3).

O substrato também foi ensaiado na presença de heparina, como modulador da atividade catalítica. Na determinação das constantes de especificidade (k_{cat}/k_M) após a determinação individual das constantes de afinidade (K_M) e de catálise (k_{cat}) observamos que o valor determinado para hidrólise do peptídeo Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp na presença de heparina é aproximadamente quatro vezes maior, diferentemente do peptídeo comercial, que apresenta um decréscimo na atividade (Tabela 3).

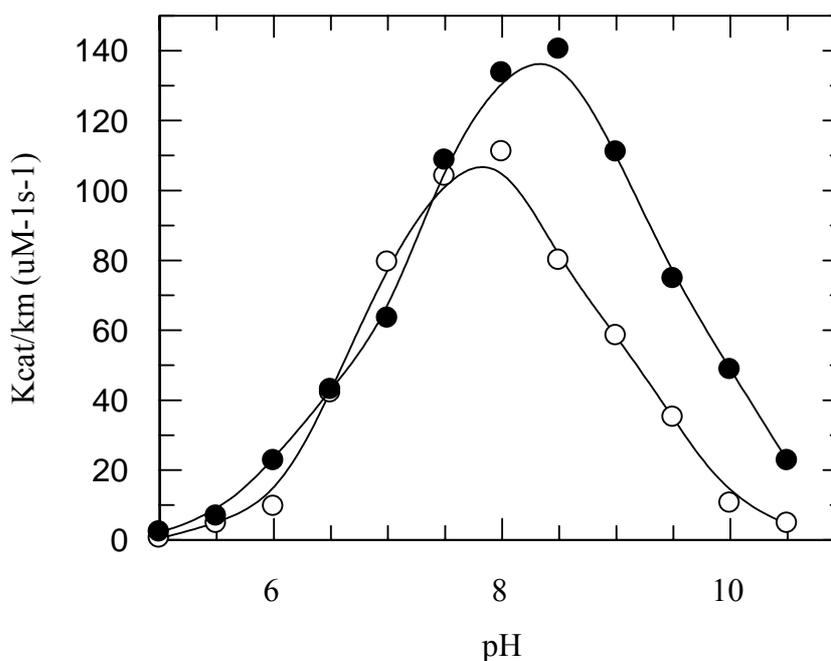
Tabela 3: Diferenças observadas na constante de afinidade determinadas por cinética michaelianas na presença e ausência de heparina.

	Cinéticas Michaelianas [E]: 2,0 nM	Cinéticas Michaelianas + 50 μ M heparina [E]: 2,0 nM
	k_{cat}/k_M ($mM^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/k_M ($mM^{-1}s^{-1}$)
MeOSuc-AAPV-MCA	$30,0 \pm 3,0$	$20,0 \pm 2,0$
Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp	$330,0 \pm 30,0$	$1100,0 \pm 90,0$

Fonte: Dados obtidos experimentalmente.

A figura 7 mostra a atividade enzimática (k_{cat}/K_M) da elastase em função do pH na ausência e presença de heparina (50 μ M). Quando a enzima é ensaiada na presença de heparina existe uma variação de 0,5 no pH ótimo da enzima, indo de 8,0 para 8,5. Os valores das constantes de afinidade estão listados na tabela 4.

Figura 7: Curva de atividade da elastase em função do pH (5,5 – 10,5) na ausência de heparina (pontos brancos) e na presença de 50 μ M de heparina (pontos pretos)



Fonte: Dados obtidos experimentalmente.

Tabela 4: Constantes de afinidade da elastase de neutrófilo em função do pH na presença e ausência de heparina.

pH	Sem heparina k_{cat}/k_M ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Heparina (50 μM) k_{cat}/k_M ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
5,0	0,462	2,263
5,5	4,676	6,788
6,0	9,580	22,641
6,5	42,070	43,006
7,0	79,460	63,385
7,5	104,005	108,654
8,0	111,015	133,559
8,5	79,934	140,347
9,0	58,432	110,918
9,5	35,060	74,700
10,0	10,515	48,663
10,5	4,67669	22,641

Fonte: Dados obtidos experimentalmente.

4.1.2 Catepsina L

À mesma maneira que procedido para a elastase de neutrófilo, utilizou-se um substrato comercial, derivado cumarínico, o Z-FR-MCA para verificar a atividade enzimática e também como padrão para comparação dos dados com o substrato derivado da seqüência do TIMP-1.

As constantes cinéticas, neste caso, foram determinadas individualmente por cinética Michaeliana (Tabela 5).

Tabela 5: Constantes de afinidade para a catepsina L, usando o substrato comercial (Z-FR-MCA) e o substrato sintético derivado da seqüência do TIMP-1 (Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp).

Substrato	k_{cat}/K_M ($\text{m M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Z-FR-MCA	$1350,0 \pm 67,0$
Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp	$2270,0 \cdot 110,0$

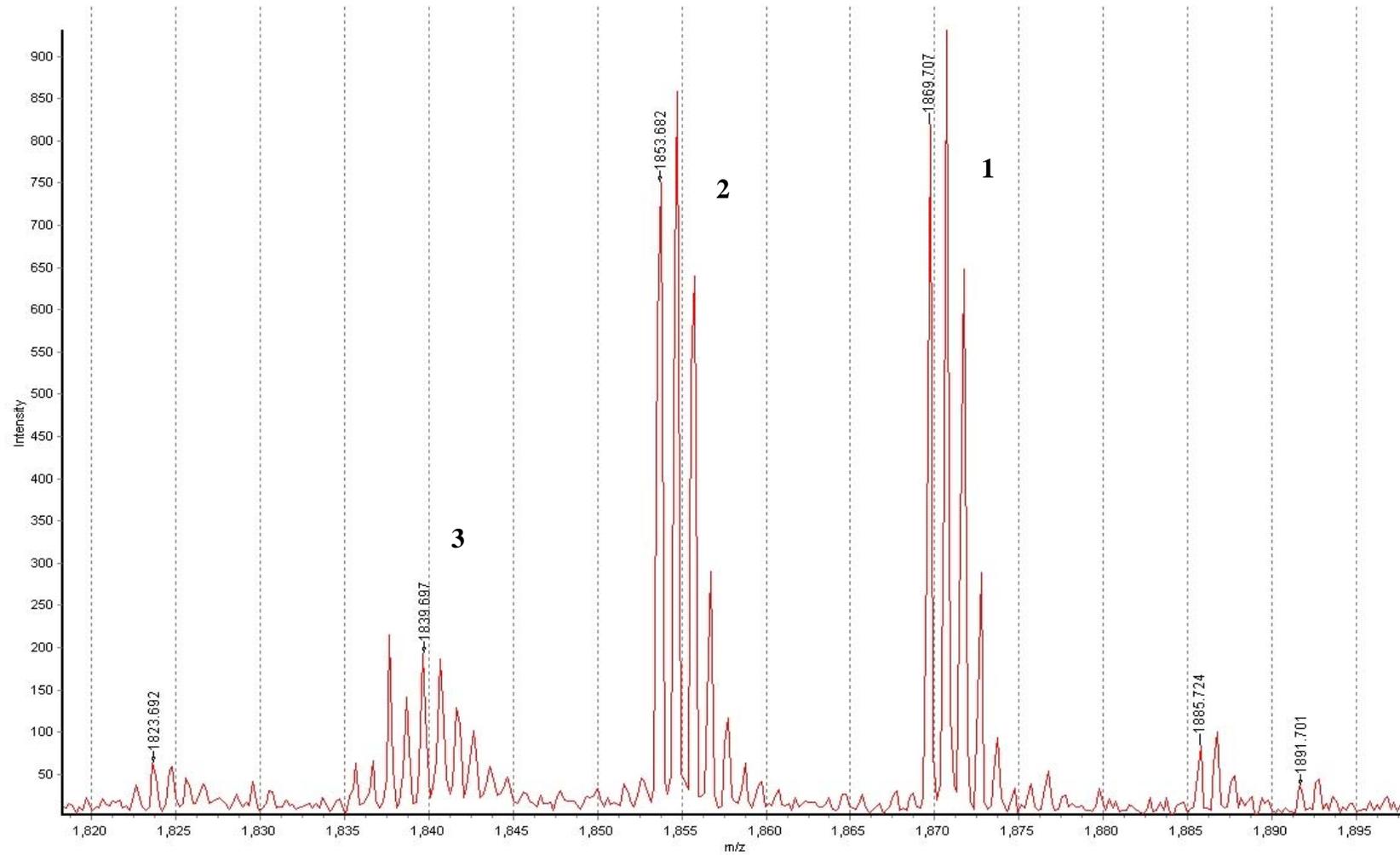
Fonte: Dados obtidos experimentalmente.

4.2 Espectrometria de Massas

Em um primeiro momento, como o intuito de avaliar a integridade do substrato, foi feito o espectro de Massas apenas deste, nas mesmas condições em que seria submetido à hidrólise pelas enzimas. O resultado está apresentado na figura 8.

No espectro de Massas do substrato é possível evidenciar três picos distintos (numerados de 1 a 3). O pico de número 1 corresponde ao substrato íntegro, e apresenta uma massa de 1885,72 Da, o que corresponde ao peso calculado através da seqüência de aminoácidos. Os picos dois e três, também se referem ao substrato na sua totalidade, entretanto possuem uma diferença de massa de 16 e 32 unidades (picos 2 e 3 respectivamente) em relação ao pico 1. Essa diferença é em função de os grupos Abz/EDDnp perderem moléculas de oxigênio durante o processo de ionização da amostra. A perda dessas moléculas de oxigênio também se reflete aumentando a intensidade do pico, uma vez que a intensidade do sinal observado está ligada diretamente a quão protonável é a seqüência em questão.

Figura 8: Espectro de Maldi-Tof, do substrato Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp. O pico **1** refere-se ao substrato íntegro, assim como os picos **2** e **3**. A diferença entre eles é referente a perda de um e dois oxigênios pelos grupos Abz/EDDnp. (Fonte: Dados obtidos experimentalmente.)



Esses dados demonstram que o substrato está íntegro na solução estoque usado para os ensaios posteriores, portanto, qualquer fragmento de massa molecular menor ao descrito anteriormente para a molécula íntegra, é devido exclusivamente ao processo hidrolítico das enzimas.

4.2.1 Catepsina L

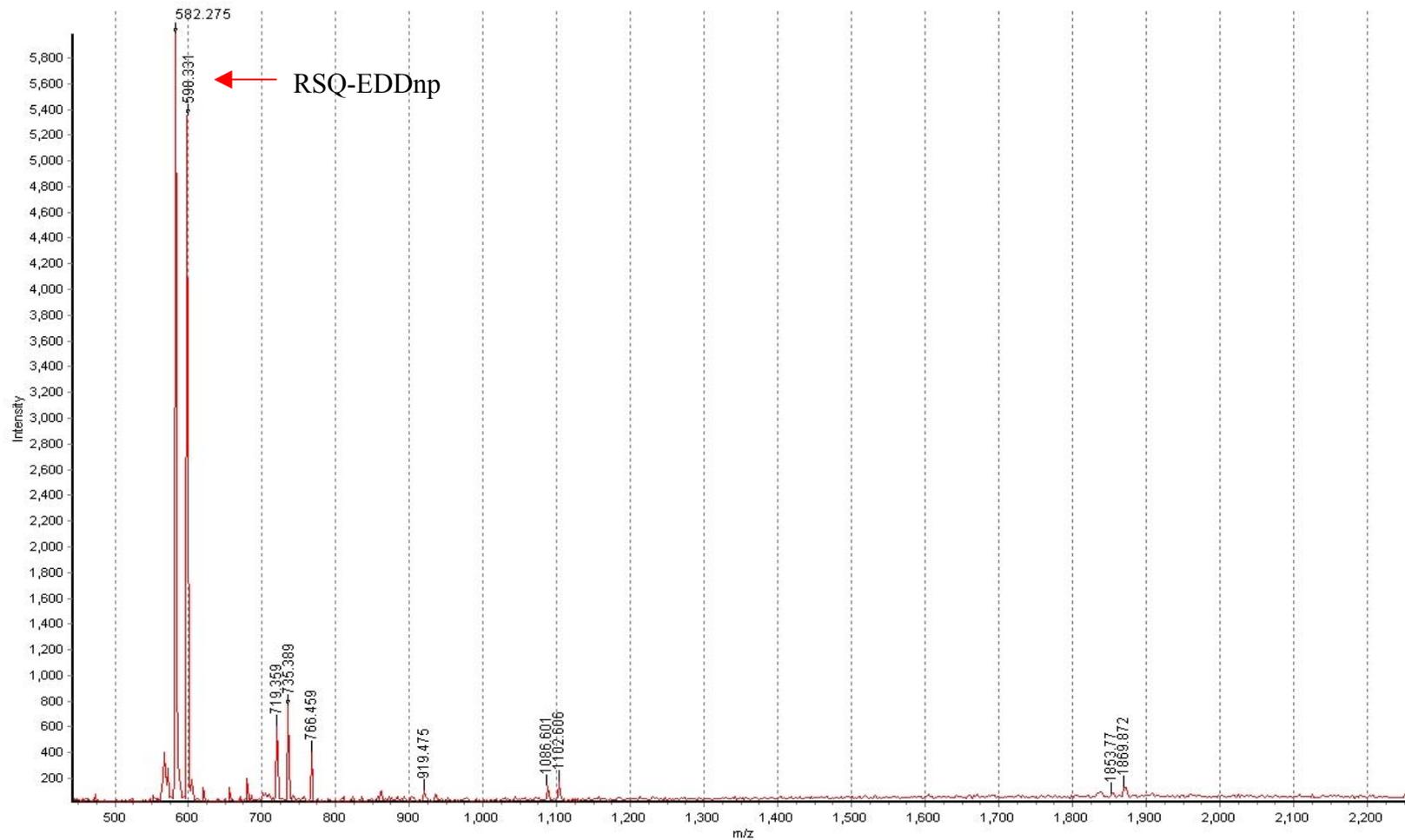
Após confirmar-se pelas cinéticas enzimáticas a habilidade da catepsina L em hidrolisar o substrato Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp, passamos para os experimentos de espectrometria de Massas, para, então, identificar a ligação peptídica hidrolisada.

O incubado contendo o substrato e catepsina L foi primeiramente analisado por espectrometria de Massas do tipo MALDI-TOF em função da necessidade de um volume pequeno de amostra e rapidez na aquisição dos dados. A figura 9 mostra os dados obtidos.

O espectro de massa do incubado mostra um pico com uma boa intensidade de sinal e com uma massa molecular de 582 Da. Este pico refere-se ao produto de hidrólise obtido pela ação da catepsina L. Após análise dos possíveis pontos de hidrólise presentes na molécula do substrato, verificou-se que a ligação hidrolisada foi entre o resíduo de His e o resíduo de Arg, gerando os fragmentos Abz-AMESVMGYFH e RSQ-EDDnp. A massa real calculada do fragmento RSQ-EDDnp é de 614 Da, a diferença entre esta e a observada experimentalmente deve-se mais uma vez à perda de um oxigênio pelo grupo EDDnp.

Para confirmar a hidrólise no ponto sugerido, uma alíquota do incubado foi submetida à espectrometria de massa do tipo LC-MS, uma vez que o fragmento (1290 Da) não apresentaria sinal mensurável no MALDI-TOF uma vez que não possui resíduos que possam ser protonáveis e, com isso, identificados com clareza.

Figura 9: Espectro de massa do incubado de catepsina L com o substrato sintético. A seta indica o fragmento gerado pela ação enzimática. O produto de hidrólise possui uma massa real de 614Da, referente a seqüência RSQ-EDDnp. A diferença entre a massa calculada e a encontrada deve-se a perda de um oxigênio. (Fonte: Dados obtidos experimentalmente.)

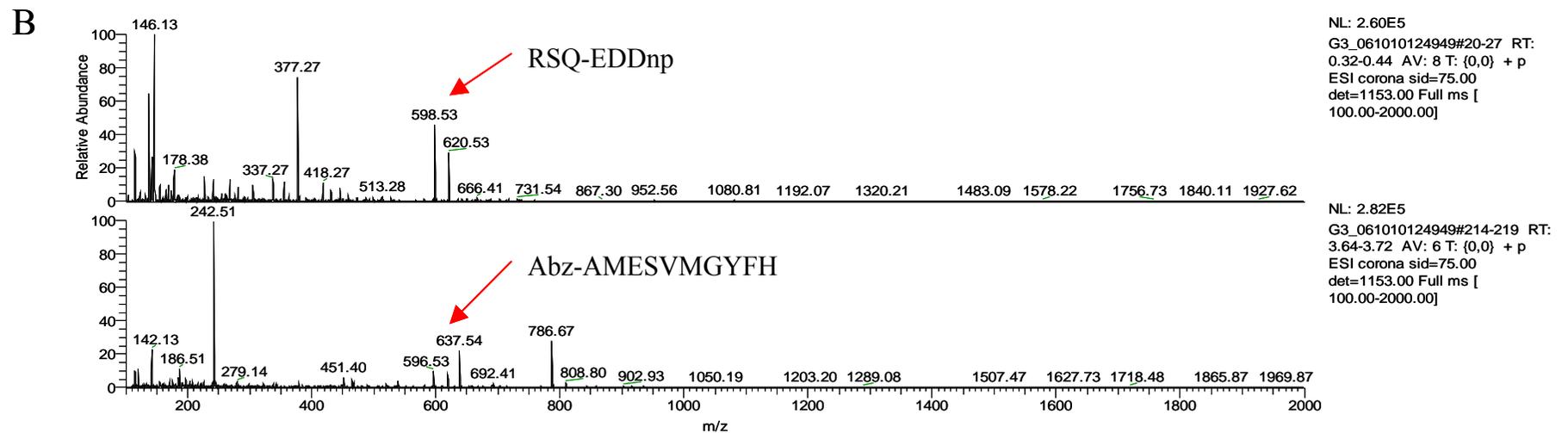
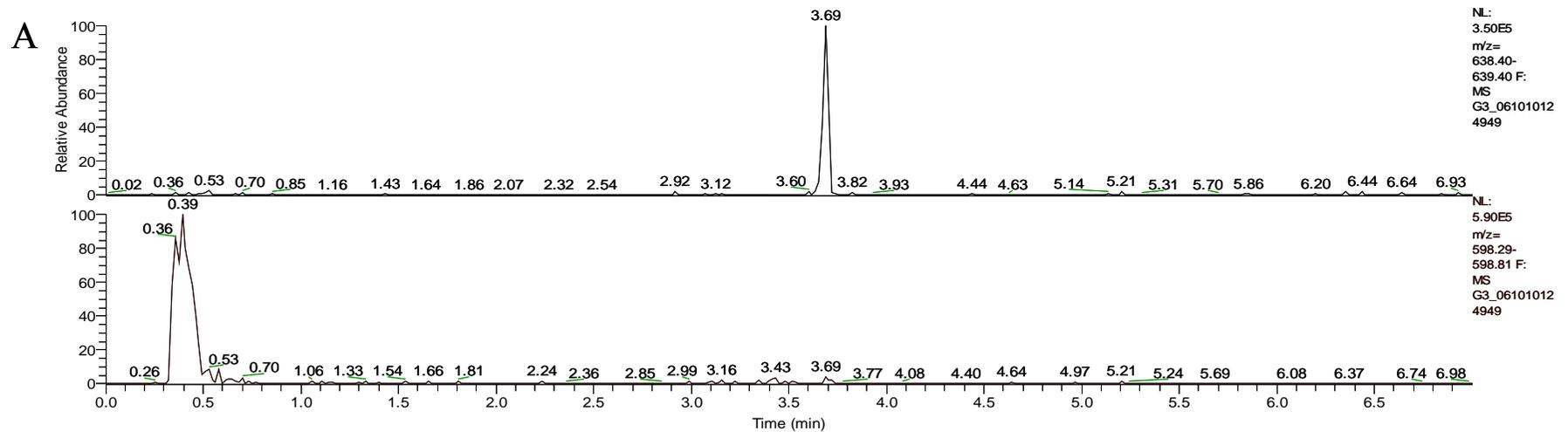


A figura 10 refere-se aos experimentos de LC-MS. Na parte superior (Figura 9 A) podemos verificar dois cromatogramas de fase reversa onde se observa a eluição da região C-terminal no início do gradiente e o produto N-terminal, em função da sua característica mais hidrofóbica, é retido mais tempo na coluna o que aumenta o seu tempo de retenção. Os tempos de retenção são de 0,39 minutos e 3,69 minutos, respectivamente.

A figura 9 B apresenta o espectro de massa para cada um dos picos observados. Na parte superior da figura a região C-terminal com $m/z = 598$ e na parte inferior o fragmento N-terminal com duas cargas, ou seja, $m/z = 637$ ($m=1290 - 16$, correspondendo a perda de um oxigênio e $z=2$). Os demais íons que podem ser vistos no cromatograma podem ser da fase móvel, impurezas, fragmentação das moléculas ou reagentes presentes no incubado.

Ao verificar-se a presença do fragmento com massa de 1290 Da pelo método LCMS, pode-se, com clareza afirmar o ponto de hidrólise sugerido pelos experimentos prévios em MALDI-TOF.

Figura 10: LCMS do incubado com catepsina L. Em **A** está o cromatograma de fase reversa, onde o pico com tempo de retenção de 3,69 minutos é a porção N-terminal do substrato e o pico com tempo de retenção de 0,39 minutos é referente a porção C-terminal. Em **B** está o espectro de massa de cada pico, onde na parte superior vemos a região C-terminal (598,53Da) e na parte inferior a porção N-terminal com duas cargas (637Da), ambos indicados com uma seta vermelha e sua seqüência. (Fonte: Dados obtidos experimentalmente.)

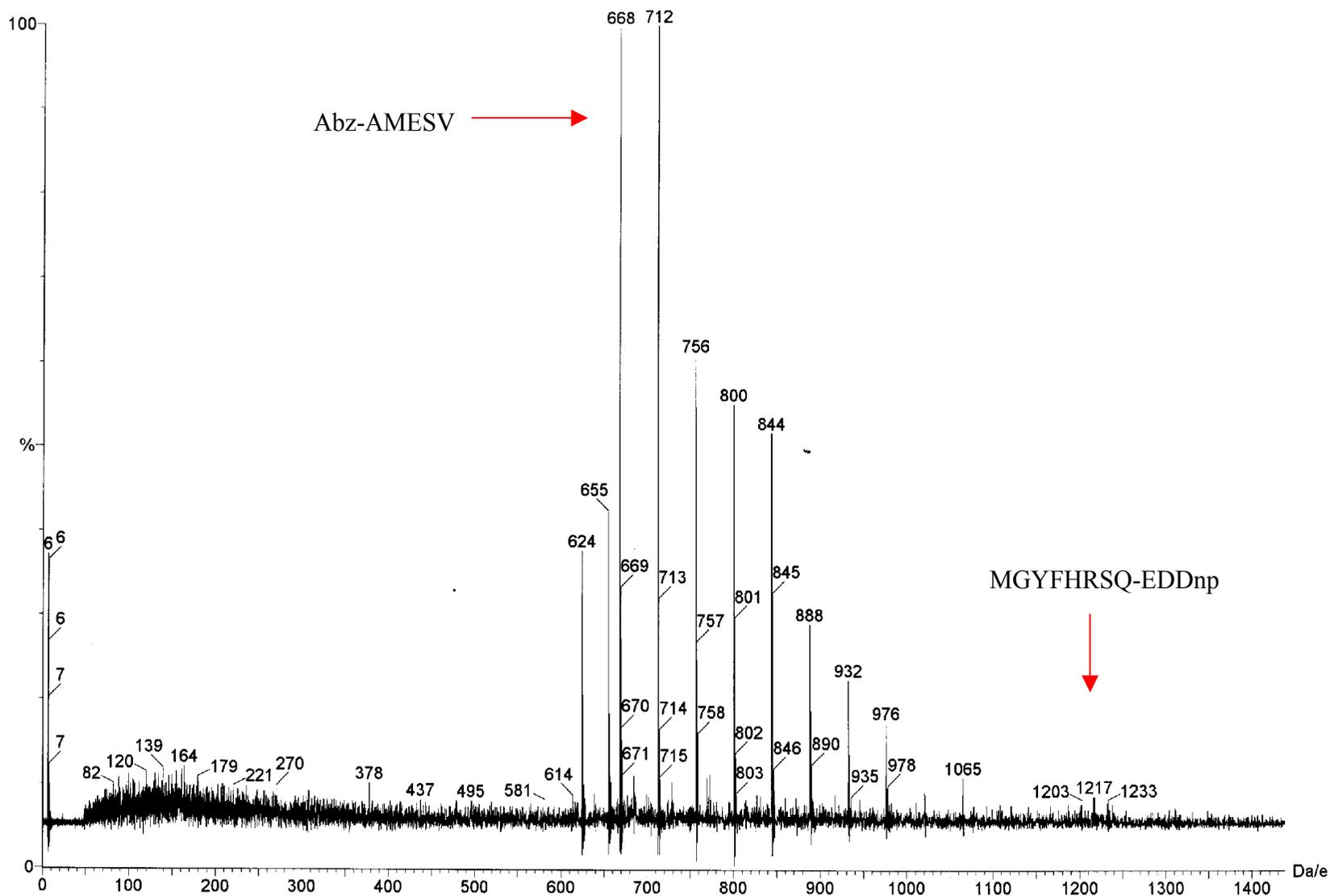


4.2.2 Elastase de Neutrófilo

O incubado com elastase foi submetido também a análise por MALDI-TOF com o intuito de verificar o ponto de hidrólise. Após análise dos possíveis pontos de hidrólise presentes na molécula do substrato correlacionando-os com as massas presentes no espectro obtido (Figura 11), verificou-se que a ligação hidrolisada foi entre o resíduo de Met e o resíduo de Val, dando origem aos fragmentos e, sendo a massa de cada fragmento 668 e 1217 Da, respectivamente. Os picos referentes aos produtos gerados estão destacados na figura, com as suas respectivas seqüências.

No caso deste incubado não houve a necessidade de fazer ensaios utilizando LCMS, uma vez que os dois fragmentos puderam ser observados com o uso do Maldi-Tof.

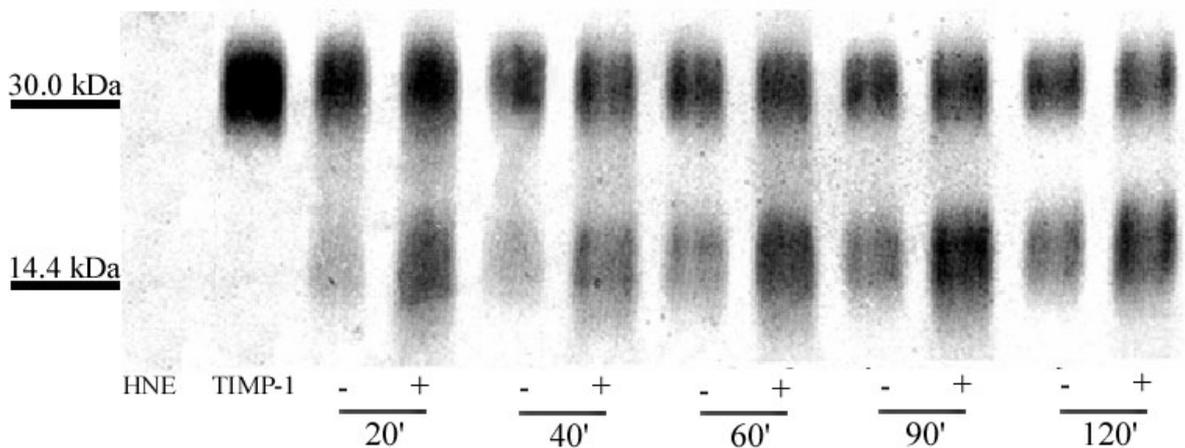
Figura 11: Espectro de Maldi-Tof do incubado de elastase com o substrato derivado do TIMP-1. Os produtos de hidrolise estão indicados com a seta vermelha, e sua seqüência correspondente. (Fonte: Dados obtidos experimentalmente.)



4.3 Eletroforese

Visando uma correlação mais informações acerca da influência da heparina como modulador da elastase na degradação do TIMP-1, nosso próximo passo foi avaliar, através de eletroforese em gel de SDS-Page, a degradação da molécula integral do TIMP-1 na ausência e presença de heparina em diferentes tempos de incubação e analisar posteriormente por densitometria. A figura 12 mostra os resultados obtidos, as pistas marcadas com (+) são aquelas onde a elastase foi incubada com heparina nas pistas marcadas com (-) não houve incubação com heparina, os tempos de incubação estão descritos em minutos.

Figura 12: Eletroforese em gel SDS (12,5%) avaliando a influência da heparina na catalise da molécula de TIMP-1. As pistas marcadas com o sinal (-) não possuem heparina e as pistas marcadas com (+) possuem heparina.

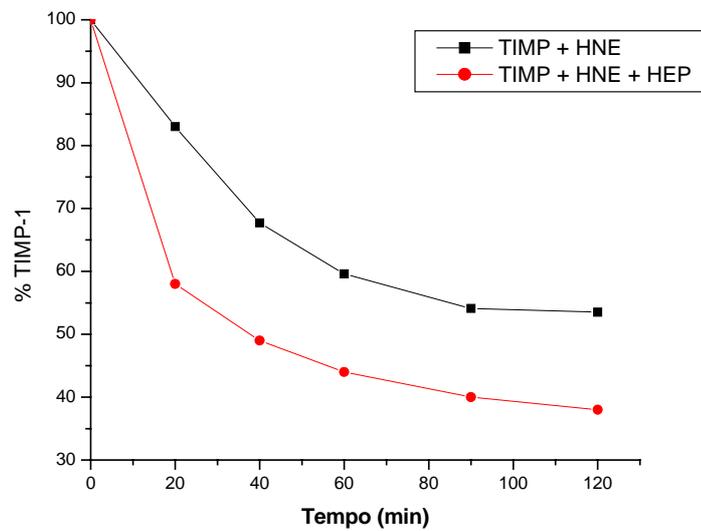


Fonte: Dados obtidos experimentalmente.

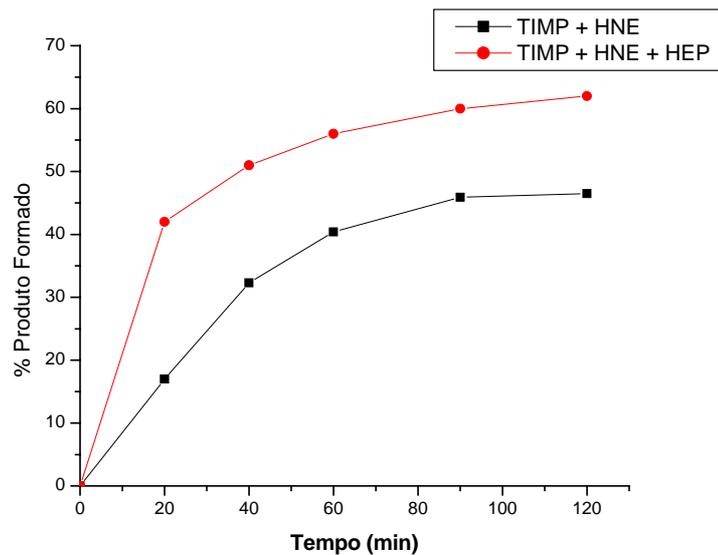
Foi realizada a análise por densitometria das bandas observadas nos ensaios de eletroforese realizados conforme Figura 13. Os valores estão listados na tabela 6

Figura 13: Gráficos construídos a partir dos dados de densitometria do gel de eletroforese. Em **A** verifica-se o consumo da molécula de TIMP-1 pela elastase e em **B** o aparecimento do produto de hidrólise.

A



B



Fonte: Dados obtidos experimentalmente.

Tabela 6: Porcentagens de TIMP-1 remanescente e produto formado a partir da degradação do TIMP-1 em diversos tempos de incubação na presença e ausência de Heparina. As porcentagens foram calculadas a partir dos dados obtidos pela densitometria do gel em SDS-Page.

Tempo (min)	% TIMP		% Produto formado	
	Sem Heparina	Com Heparina (50 μ M)	Sem Heparina	Com Heparina (50 μ M)
0	100	100	0	0
20	83	58	17	42
40	67,7	49	32,3	51
60	59,6	44	40,4	56
90	54,1	40	45,9	60
120	53,5	38	46,5	62

Fonte: Dados obtidos experimentalmente.

5 DISCUSSÃO

A hidrólise do inibidor tissular da metaloproteases-1, TIMP-1, constitui passo fundamental na regulação da atividade das metaloproteases-3 e -9, e, conseqüentemente, na degradação da matriz extracelular. A habilidade da elastase em processar o TIMP-1 é relatada na literatura por Nagase et al (1997) e Ioth e Nagase (1995). Em nosso trabalho apresentamos aspectos cinéticos deste processo e a influência de glicosaminoglicanos na degradação do inibidor.

No presente estudo foi observado a influência da heparina na hidrólise do TIMP-1 pela elastase, com utilização da proteína de TIMP-1 integral, bem como com o emprego de substrato sintético com apagamento intramolecular da fluorescência contendo 13 resíduos de aminoácido referentes às posições de 65 a 76 do inibidor humano.

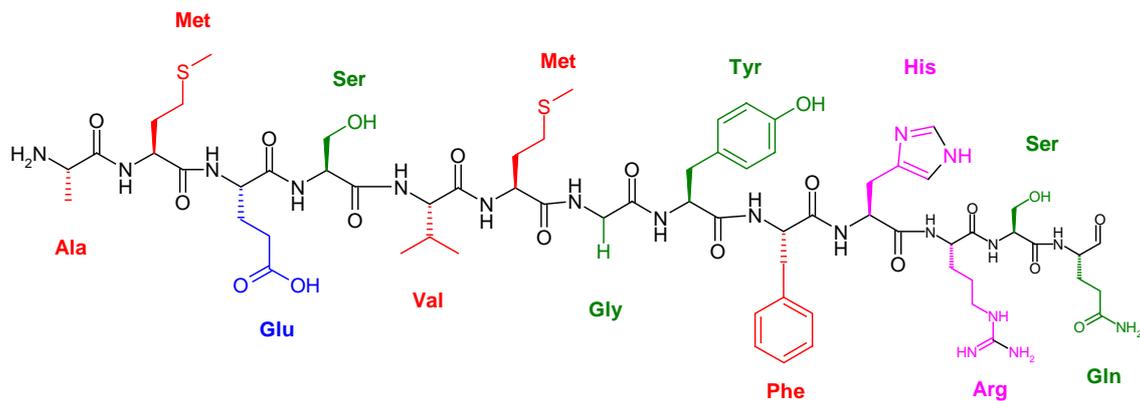
Nos ensaios realizados a heparina foi utilizada como modelo de glicosaminoglicano polisulfatado, neste caso o heparan sulfato presente na matriz extracelular e na superfície das células, e a elastase de neutrófilo como protease presente em processos inflamatórios e tumorais.

Outra protease estudada, como capaz de hidrolisar o TIMP-1, foi a catepsina L, a qual reconheceu o peptídeo sintético empregado como substrato. Todavia, não tivemos material disponível para realizar ensaios da proteína de TIMP-1 integral com esta enzima. A verificação da potencial atividade da catepsina L como enzima capaz de degradar o TIMP-1 teve como base a indicação da literatura de que esta protease é encontrada na matriz extracelular em processos tumorais (WOLTERS ET AL, 1998; SKRYDLEWSKA, 2005).

Nos ensaios com o peptídeo sintético a análise de especificidade das enzimas estudadas foi realizada tendo em vista que um peptídeo de 13 resíduos de aminoácidos

(Figura 14), contendo os resíduos mostrados, não deve apresentar estrutura rígida, a qual deve ter transição contínua em solução aquosa.

Figura 14: Representação da estrutura do peptídeo Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp



A hidrólise do peptídeo Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp pela elastase de neutrófilo humano ocorreu entre os mesmos resíduos de Val⁶⁹↓Met⁷⁰ como demonstrado para hidrólise da proteína do TIMP-1 integral por Nagase et al (1997). Todavia, com a utilização do peptídeo sintético também foi possível observar que a atividade enzimática sobre a seqüência do substrato na presença de 50 µM de heparina foi aproximadamente 3,3 vezes maior que quando comparado aos ensaios cinéticos realizados na ausência de heparina. Estes dados indicaram que a interação da elastase com a heparina poderia promover uma regulação positiva na degradação do TIMP-1 por esta enzima. Esta indicação foi confirmada em ensaios de eletroforese em SDS com a proteína integral de TIMP-1 na presença e ausência de heparina, onde foi observado que a formação de produto no tempo inicial reflete os dados cinéticos, ou seja, cerca de 3 vezes mais produto formado. (Figura 13).

Com relação a aspectos de especificidade da elastase humana de neutrófilo (HNE) na hidrólise do substrato derivado da seqüência do TIMP-1, observa-se que o mesmo apresenta no subsítio P₁ um resíduo de valina. A preferência do subsítio S₁ da HNE é por resíduos pertencentes ao grupo dos alifáticos e hidrofóbicos, como Leu e Ile (BODE, 1989). A similaridade entre as cadeias laterais da Leu e Ile quando comparadas com a da Val, justifica essa acomodação.

A posição P₂ é ocupada por um resíduo de serina, que possui um grupo OH em sua cadeia lateral. A interação desse aminoácido com o subsítio S₂ pode ser prejudicada por essa característica, uma vez que à mesma maneira do subsítio S₁, ele acomoda preferencialmente resíduos hidrofóbicos. A interação entre P₂ e S₂ pode ser consequência das demais interações entre o substrato do TIMP-1 e a enzima, não sendo, portanto, fundamental na ação enzimática.

Conforme descrito por Yasutake e Powers (1981), substratos com cadeias laterais longas e dotadas de carga são bem aceitas pelos subsítios S₃ e S₄ promovendo uma melhor interação do que quando comparado a cadeias laterais unicamente hidrofóbicas e curtas. Na posição P₃ do substrato está localizado um resíduo de Glu, e em P₄ a presença de um resíduo de Ser. As cadeias laterais dos resíduos de Glu (P₃) e Ser (P₄) não são as ideais para estes subsítios, uma vez que não promovem os contatos para a estabilização do substrato na enzima, através de pontes de hidrogênio (BODE, 1989).

Em relação aos resíduos posicionados na porção P', a primeira posição é ocupada por uma Met, o que vai de encontro a característica pouco hidrofóbica do subsítio S'₁, entretanto, excetuando-se resíduos de prolina e resíduos essencialmente hidrofóbicos e muito volumosos, este subsítio não possui um alto grau de especificidade, podendo acomodar os demais aminoácidos.

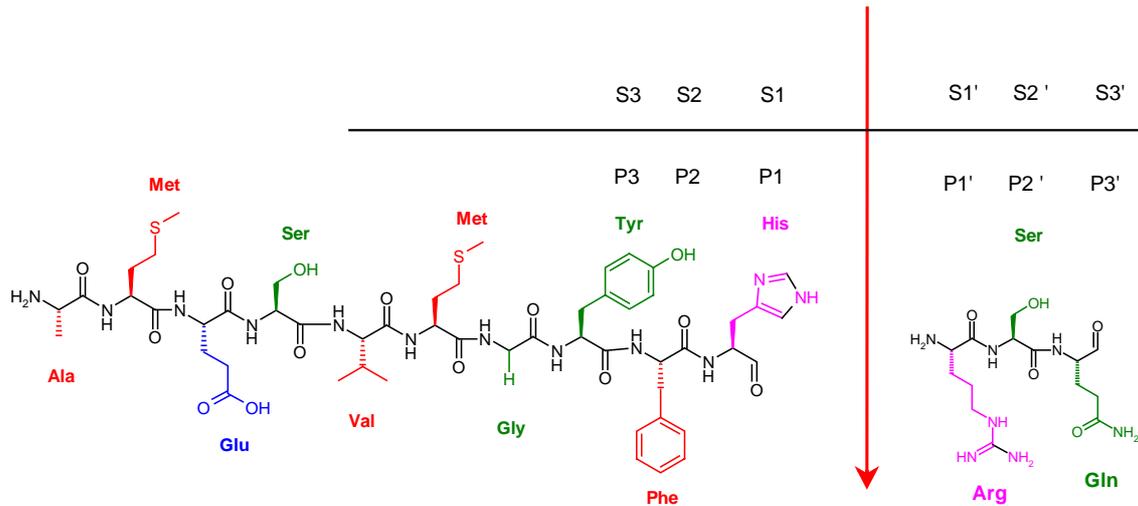
A posição P'₂ é ocupada por um resíduo de Gly, que possui em sua cadeia lateral apenas um átomo de hidrogênio. Mesmo não se tratando de um aminoácido com as características essenciais para subsítio S'₂, que acomoda resíduos de cadeias laterais fenólicas, a interação pode ser apenas superficial, não sendo, portanto fundamental para o posicionamento do substrato do TIMP-1 na enzima.

O subsítio S'₃ acomoda cadeias alifáticas de características hidrofóbicas, entretanto na posição P'₃ existe uma tirosina, que em sua cadeia lateral apresenta um grupo fenol. Como a cadeia lateral da Tyr é volumosa o contato deste resíduo com o subsítio deve ser superficial, mantido por interações hidrofóbicas, com os resíduos de Phe, Leu, e Val nele localizado.

Outro ponto de interesse em nosso estudo foi monitorar a participação da catepsina L como uma possível protease capaz de hidrolisar o TIMP-1, ativando assim as metaloproteases de matriz facilitando assim a migração de células tumorais.

A catepsina L mostrou-se capaz de reconhecer o peptídeo Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp como seu substrato, hidrolisando a ligação His⁷⁴↓Arg⁷⁵. Ainda com o uso do substrato sintético pudemos avaliar que, assim como para a elastase, existe a influência da região P' na acomodação do substrato na enzima. Em comparação ao substrato comercial, Z-FR-MCA, onde na região P' está tão somente o grupamento MCA o peptídeo Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp pode-se observar que o substrato derivado do TIMP-1 é 1,7 vezes mais susceptível à ação da catepsina L. (Figura 16).

Figura 16: Figura esquemática indicando o ponto de hidrólise do peptídeo derivado do TIMP-1 pela Catepsina L e os aminoácidos que ocupam os subsítos desta enzima



O subsítio S₁ da catepsina L, assim como das outras enzimas pertencentes à família da papaína, não é o responsável pela especificidade primária da enzima e acomoda preferencialmente resíduos básicos. A partir dos nossos dados de espectrometria de massa evidenciamos que o resíduo de His ocupa a posição P₁ no substrato de maneira eficiente, por se tratar de um aminoácido com cadeia lateral básica, indo de encontro ao descrito para as enzimas da família da papaína. (BROCKLEHURST, 1990).

O resíduo em P₂ trata-se de uma Phe. Segundo o trabalho Barrett e Kirschke (1981) o subsítio S₂ das proteases da família da papaína interage com aminoácidos hidrofóbicos, em função de sua natureza físico-química. Portaro et al (2000) confirmam este resultado, e demonstram que dentre os resíduos hidrofóbicos, a catepsina L aceita preferencialmente resíduos de Phe. Esta combinação de S₁ com resíduos básicos flanqueados por um resíduo hidrofóbico em S₂ mostra-se como fundamental para o reconhecimento do substrato e posterior ação hidrolítica.

Em P₃ o substrato apresenta um resíduo de Tyr, que possui característica hidrofóbica. A especificidade do subsítio S₃ encontra-se em acomodar resíduos hidrofóbicos mais

volumosos. A presença do resíduo de Tyr na posição P_3 corrobora com essa especificidade, entretanto é o que possui a menor afinidade pelo subsítio, quando comparado com os demais resíduos do mesmo grupo físico-químico (KOGA ET AL, 1990), possivelmente pela presença de um grupo OH ligado ao anel benzênico, contribuindo com uma característica levemente polar e com isso perturba a interação neste subsítio.

Segundo a literatura, o subsítio S'_1 da catepsina L é de certa maneira inespecífico, podendo, com isso, acomodar um grande número de resíduos. Entretanto, a catepsina L, apresenta uma preferência por não hidrofóbicos (MENÁRD ET AL, 1993). O substrato derivado do TIMP-1 apresenta em P'_1 um resíduo de Arg. Não existem, entretanto, dados na literatura de substratos que contenham esse aminoácido na posição P'_1 , contudo devido a sua similaridade com o resíduo de Lys a enzima seja capaz de acomodá-la, entretanto com alguma diferença na especificidade.

Segundo Brömme e Kirschke (1993) a catepsina L tem forte preferência por aminoácidos hidrofóbicos em S'_2 , dentre os quais Trp, Leu e Tyr. No substrato sintético derivado do TIMP-1 o aminoácido que ocupa a posição P'_2 é uma Ser que possui em sua cadeia lateral um grupo OH, o que está fora dos padrões de especificidade do subsítio. A interação do resíduo de Ser em S'_2 possivelmente está ocorrendo como uma consequência das demais interações dos outros subsítios, que acabam por forçar a orientação da Ser em S'_2 .

Um dado interessante de nosso trabalho foi verificar que o substrato Abz-AMESVMGYFHRSQ-EDDnp é mais susceptível a ação da catepsina L do que quando comparado com a elastase, mesmo na presença de heparina. Ao analisarmos as especificidades dos subsítios de ambas as enzimas em relação ao substrato a catepsina L mostra-se como aquela que possui as melhores características para a acomodação do substrato, isso fica mais evidente quando se comparam os valores das constantes de

especificidade, onde a catepsina L, mesmo na ausência de heparina possui um valor 6,9 vezes maior quando comparada com a elastase na ausência de heparina e 2,0 vezes na presença de heparina. (tabela 7)

Tabela 7: Comparação da especificidade da catepsina L e elastase na presença de heparina

Enzimas	K_{cat}/k_M ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	
	<i>Sem Heparina</i>	<i>Heparina (50μM)</i>
Elastase	0,330 \pm 0,030	1,100 \pm 0,090
Catepsina L	2,270 \pm 0,113	---

Uma característica de processos inflamatórios e tumorais é a acidificação do micro ambiente variando de pH 7,2 até 5,5. Essa acidificação é um fator importante no controle do “turnover” dos componentes da matriz; uma diminuição no pH da matriz leva a alteração na síntese de proteínas e de proteoglicanos em cartilagens, por exemplo (RAZAQ S. ET AL, 2003). O balanço entre a entrada e saída de prótons da célula é de grande importância uma vez que grande parte das exercidas pelos neutrófilos, como a eliminação de microorganismos, migração celular, citotoxicidade de células tumorais e liberação de enzimas dos grânulos azurófilos, são dependentes diretamente do pH. (COAKLEY, 2002).

Em relação aos dados que obtivemos, temos que a elastase atua eficientemente em pH alcalino (7,5-8,5) ao passo que a catepsina L, por tratar-se de uma enzima lisossomal, tem um pH ótimo próximo a 5,5. Quando são liberadas para a matriz nos processos descritos, a catepsina L atua de maneira eficiente, uma vez que está em um ambiente que possui um pH próximo a aquele que ela necessita para sua ação. Especificamente no caso de processos inflamatórios a ação da catepsina L pode estar diretamente ligada à fase pré-aguda e aguda, que em função da liberação de diferentes mediadores do sistema imune possui o pH ideal para a atuação desta enzima. Ao contrário, a elastase que irá encontrar um ambiente

completamente desfavorável, e por conta disso, terá sua atividade reduzida em aproximadamente 90% (tabela 4). Entretanto, na fase crônica do processo inflamatório, o pH do micro ambiente está mais próximo ao pH fisiológico, favorecendo assim a ação da elastase.

Por conta de estar em um ambiente que favorece a sua denaturação, a ação da elastase no processo inflamatório (pré-agudo e agudo) contará com um tempo reduzido, isso evidencia que o pH ácido encontrado no micro ambiente, atua como um regulador da ação enzimática, uma vez que se a elastase fosse liberada em condições fisiológicas a degradação da matriz não seria apenas local, mas sim se propagaria de modo a causar lesão tecidual, de maneira reversível, no caso de ativar apoptose, ou irreversível, que é o caso da necrose. Ao se restaurar a homeostase da lesão a catepsina L que estava ativa, passa a sofrer redução na sua atividade também. Nossos dados em conjunto com a literatura, parecem mostrar que a elastase e a catepsina L atuam em momentos diferentes no processo inflamatório e tumoral.

A elastase atua em um único ponto na molécula de TIMP-1, como fica evidente tanto nos experimentos de espectrometria de massas com o peptídeo sintético quanto na eletroforese utilizando a molécula integral do TIMP-1, mesmo com outros pontos favoráveis a hidrólise. Em função dessa característica podemos avaliar a elastase como uma enzima processadora. Quanto a ação da catepsina L, ainda falta-nos avaliar a sua ação sobre a molécula integral do TIMP-1, para determinar de maneira factível que esta possui também ação processadora, ao invés de meramente degradar o TIMP-1, em partes que não sejam importantes no processo de inibição das MMPs pelo TIMP-1, mesmo que os ensaios com espectrometria de massa mostrem que o peptídeo sintético é susceptível a sua ação.

Nossos resultados indicam que a elastase quando na matriz extracelular, em processos inflamatórios liga-se a heparina. Uma vez complexada à heparina, a elastase é capaz de processar o TIMP-1 com maior eficiência. Entretanto a catepsina L, também presente na

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P.C., NANTES, I.L., RIZZI, C.C.A., JUDICE, W.A.S., CHAGAS, J.R., JULIANO, L., NADER, H.B., E TERSARIOL I.L.S. Cysteine proteinase activity regulation: A possible role of heparin and heparin-like glycosaminoglycans. **J. Biol. Chem.** v.274 n.43 30433-30438, 1999.
- BARRETT AJ, KIRSCHKE H. CATHEPSIN B, CATHEPSIN H, AND CATHEPSIN L. **Methods Enzymol.** v.80, Pt C p.535-561, 1981.
- BARRETT, A.J E RAWLINGS, N.D. Families and clans of serine peptidases. **Arch. Biochem. Biophys.** v.318, p.274-250, 1995.
- BARRETT, A.J.; Leukocyte elastase. **Methods Enzymol** v.80 p.581-588, 1981.
- BEYNON R. J., BOND J. S. **Proteolytic Enzymes : A practical approach.** Oxford University Press, 1989.
- BODE W, MEYER E JR, POWERS JC. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. **Biochemistry.** v.28, n.5, p.1951-1963, 1989.
- BOHLEY, P., E SEGLEN, P.O. Proteases and proteolysis in the lysosome. **Experientia.** v.48, 151-157, 1992.
- BROCKLEHURST K. Papain and related proteins. **Nature.** v.345, n.6274 p.394, 1990.

BROMME D, KIRSCHKE H. N-peptidyl-O-carbamoyl amino acid hydroxamates: irreversible inhibitors for the study of the S2' specificity of cysteine proteinases. **FEBS Lett.** v.322, n.3, p.211-214, 1993.

BRÖMME D, LI Z, BARNES M, MEHLER E. Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization. **Biochemistry.** v.38 n.8 p.2377-2385, 1999.

BUCK, M.R., KARUTIS, D.G., DAY, N.A., HONN, K.V., E SOLANE, B.,F. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumor tissues. **Biochem J.** v.282, p.273-278, 1992.

BÜHLING F, WALDBURGN, REISENAUER A, HEIMBURG A., GOLPON H. E WELTE T. Lysosomal cysteine proteases in the lung: role in protein processing and immunoregulation. **Eur Respir J** v.23, p.620-628, 2004.

CARMONA, E., DUFOUR, E., PLOUFFE, C., TAKEBE, S., MANSON, P., MORT, J. S., E MENARD, R. Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases. **Biochemistry** v.35, p.8149-8157, 1996.

CATALDO, A. M. HAMILTON, D. J. E NIXON, R. A. Lysosomal abnormalities in degenerating neurons link neuronal compromise to senile plaque development in Alzheimer disease. **Brain Res.** v. 640, n.1-2, p.68-80, 1994.

COAKLEY, R. J., TAGGART C., MCEVALNEY N. G., O'NEILL S. J., Cytosolic pH and the inflammatory microenvironment modulate cell death in human neutrophils after phagocytosis **Blood** v. 100 n. 9 p. 3383-3391, 2002

COULOMBE R, GROCHULSKI P, SIVARAMAN J, MENARD R, MORT JS, CYGLER M. Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. **EMBO J.** v.15, n.20, p.5492-5503, 1996.

CZAPINSKA H, OTLEWSKI J. Structural and energetic determinants of the S1-site specificity in serine proteases. **Eur J Biochem.** v.260 n.3, p.571-595, 1999.

DALET-FUMERON, V., BOUDJENNAH, L., E PAGANO, M. Binding of the cysteine proteinases papain and cathepsin B-like to coated laminin: use of synthetic peptides from laminin and from the laminin binding region of the beta 1 integrin subunit to characterize the binding site. **Arch. Biochem. Biophys.** v.358, p.283-290, 1998.

DAVIE EW, FUJIKAWA K, KISIEL W. The coagulation cascade: Initiation, maintenance and regulation. **Biochemistry** v.30 p.10363-10370, 1991.

DRENTH, J., JANSONIUS J.N., KOEKOEK, R., SWEN, H. M., E WOLTHERS, B.G Structure of papain. **Nature** v.218 n.145, p.929-932 1968.

DUFOR, É. Sequence homologies, hydrophobic profiles and secondary structures of cathepsin-B, cathepsin-H and cathepsin-L: Comparison with papain and actinidin. **Biochimie** v.70, n.10, p.1335-1342, 1998.

EMONARD H., GRIMAUD J. A. Matrix metalloproteinases. A review. **Cell. Mol. Biol.** v.36, p.131-153, 1990.

EVERTS V, VAN DER ZEE E, CREEMERS L, BEERTSEN W. Phagocytosis and intracellular digestion of collagen, its role in turnover and remodeling. **Histochem J** v.28 p229–245, 1996.

FITCH PM, ROGHANIAN A, HOWIE SE, SALLENAVE JM. Human neutrophil elastase inhibitors in innate and adaptive immunity. **Biochem Soc Trans.** v.34, n.2, p.279-282, 2006.

FRIEDRICHS, B., TEPEL, C., REINHECKEL, T., DEUSSING, J., VON FIGURA, K., HERZOG, V., PETERS, C., SAFTIG, P. AND BRIX, K. Thyroid functions of mouse cathepsins B, K and L. **J. Clin. Invest.** v.111, p.1733-1745, 2003.

GOMIS-RUTH F. X., MASKOS K., BETZ M., BERGER A., HUBER R., SUZUKI K., YOSHIDA N., NAGASE H., BREW K., BOURENKOV G. P., BARTUNIK H., BODE W. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. **Nature**, v.389 n.6646, p.77-81, 1997.

GUINEC, N., DALET-DUMERON, V., E PAGANO, M. Quantitative study of the binding of cysteine proteinases to basement membranes. **FEBS Lett.** v.24, p.305-308, 1992.

HEIDTMANN HH, SALGE U, HAVEMANN K, KIRSCHKE H, WIEDERANDERS B. Secretion of a latent, acid activatable cathepsin L precursor by human non-small cell lung cancer cell lines. **Oncol Res.** v.5, p.441–451, 1993.

HONEY, K. AND RUDENSKY, A. Y. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. **Nat. Rev. Immunol.** v.3, 472-482, 2003.

HUBER R, BODEW . Structural basis of the activation and action of trypsin. **Acc Chem Res** v.11 p.114-122, 1978.

II, K., ITO, H., KOMINAMI, E., E HIRANO, A., Abnormal distribution of cathepsin proteinases and endogenous inhibitors (cystatins) in the hippocampus of patients with alzheimer-disease, parkinsonism-dementia complex on guan, and senile dementia and in the aged. **Virchows. Arch. A. Pathol. Histophatol.** v.423 n.3, p.185-194, 1993.

ITOH Y., NAGASE H. Preferential inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 that is bound to the precursor of matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) by human neutrophil elastase. **J. Biol. Chem,** v.270 n.28, p.16518-16521, 1995.

KARRER, K.M., PEIFER, S.L., E DITOMAS, M.E. Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine proteinase genes. **Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.** v.90, p.3063-3067, 1993.

KOGA H, YAMADA H, NISHIMURA Y, KATO K, IMOTO T. Comparative study on specificities of rat cathepsin L and papain: amino acid differences at substrate-binding sites are involved in their specificities. **J Biochem** v.108, n.6, p.976-982, 1990.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** v.227, p.680-685, 1970

LECAILLE F, SERVEAU C, GAUTHIER F, LALMANACH G. Revisiting the S2 specificity of papain by structural analogs of Phe. **FEBS Lett** v.445 n.2-3 p.311-4, 1999.

LIAO D, BREDDAM K, SWEET RM, BULLOCK T, REMINGTON SJ. Refined atomic model of wheat serine carboxypeptidase II at 2.2 Å resolution. **Biochemistry** v.31, p.9796-9812, 1992.

LLY, C; QURAIISHI, O.; WANG, J.; PURISIMA, E.; VERNET, T.; MORT, J.S. Role of the occluding loop in cathepsin B activity. **J. Biol. Chem.** v.272 p.1197-1202, 1997.

MATTHEWS BW. X-RAY STRUCTURE OF PROTEINS. In: Neurath H, Hill RL, eds. **The proteins, vol 3**. New York: Academic Press. pp 404-590, 1977.

MENARD R, CARMONA E, PLOUFFE C, BROMME D, KONISHI Y, LEFEBVRE J, STORER AC. The specificity of the S1' subsite of cysteine proteases. **Fesb Lett** v.328, n.1-2, p.107-110, 1993.

MENARD R, PLOUFFE C, LAFLAMME P, VERNET T, TESSIER DC, THOMAS DY, STORER AC. Modification of the electrostatic environment is tolerated in the oxyanion hole of the cysteine protease papain. **Biochemistry.** v. 34, n.2, p.464-471, 1995.

MORT J.S., BUTTLE D.J. Cathepsin B. **Int. J. Biochem. Cell. B.** v.29, n.5, p.715-720, 1997.

MUSIL D, ZUCIC D, TURK D, ENGH RA, MAYR I, HUBER R, POPOVIC T, TURK V, TOWATARI T, KATUNUMA N, ET AL. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. **EMBO J.** v.10, n.9, p.2321-2330, 1991.

NAGASE H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. **Biol. Chem.** v.378, p.151, 1997.

NAGASE H. Zinc Metalloproteases in Health and Disease, (Hope, N. M. ed.) p.153-204, Taylor & Francis, London, 1996.

NAGASE H., SUZUKI K., CAWSTON T. E., BREW K. Involvement of a region near valine-69 of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 in the interaction with matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1). **Biochem. J.** v.325 p.163-167, 1997.

PETTERSON, C. A., ADLER K.B. Airways Inflammation and COPD* Epithelial-Neutrophil Interactions. **Chest.** v. 121 n.5 142S 150S, 2002

POLGAR, L. Mechanims of Protease Action, **CCR Press**, Boca Raton, Flórida, 123, 1990.

PORTARO FC, SANTOS AB, CEZARI MH, JULIANO MA, JULIANO L, CARMONA E. Probing the specificity of cysteine proteinases at subsites remote from the active site: analysis of P4, P3, P2' and P3' variations in extended substrates. **Biochem J.** v.347, n.1, p.123-129, 2000.

PUNTURIERI A, FILIPPOV S, ALLEN E, ET AL. Regulation of elastinolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. **J Exp Méd.** v.192 p.789–800, 2000.

RAWLINGS, N.D E BARRETT, A.J. Evolutionary families of peptidases. **Biochem J.** v.290, p. 205-218, 1993.

RAZAQ, S. WILKINS, R.J., URBAN, J.P. The effect of extracellular pH on matrix turnover by cells of the bovine nucleus pulposus. **Eur. Spine J.** v. 12 p. 341-349, 2003

SCHECHTER, I E BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.27 n.2, p.157-162, 1967.

SHEAHAN, K., SHUJA, S., E MURNANE, M.J. Cysteine protease activities and tumor development in human colorectal carcinoma. **Cancer Res.** v.49, p.3809-3814, 1989.

SIEWINSK, M., GUTOWICZ, J., KIELAN, W. E BOLANOWSKI, M. Cysteine peptidase inhibitors and activator in urine of patients with colorectal-cancer. **Oncology** v.51 n.5, p.446-449, 1994.

SKRYDLEWSKA E., SULKOWSKA, M., KODA M., SULKOWSKI S. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. **World Journal Gastroenterol.** v.11(9) p.1251-1266, 2005

SMITH E.L E KIMMEL J.R. The enzymes 4, 2nd (Boyer, P.D., Larely, H. e Myrback, K. ed) New York, **Academic Press** p.133-173, 1960.

SPENCER J.L., STONE, P.J., NUGENT, M.A. New Insights into the Inhibition of Human Neutrophil Elastase by Heparin. **Biochemistry** v.45 p.9104-9120, 2006

STORER, A., C. E MÉNARD, R. Catalytic mechanism in the papain family of cysteine peptidases. **Methods Enzymol.** v.224, p.468-500, 1994.

TAYLOR K. B., WINDSOR L.J., CATERINA N.C.M., BODDEN M. K., ENGLER J. A. The mechanism of inhibition of collagenase by TIMP-1 **J. Biol. Chem.** v.271, p.23938-23945, 1996.

TURK, D. E GUNGAR, G. Lysosomal Cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. **Acta Cryst.** p.203-213, 2003.

VAN DE VEN WJ, ROEBROEK AJ, VAN DUIJNHOFEN HL. Structure and function of eukaryotic proprotein processing enzymes of the subtilisin family of serine proteases. **Crit Rev Oncogen** v.4 p.115-136, 1993.

WOLTERS PJ, RAYMOND WW, BLOUNT JL, CAUGHEY GH. Regulated expression, processing, and secretion of dog mast cell dipeptidyl peptidase I. **J Biol Chem** ; v.273, p.15514–15520, 1998.

YASOTHORNSRIKUL, S., GREENBAUM, D., MEDZIHRADESKY, K. F., TONEFF, T., BUNDEY, R., MILLER, R., SCHILLING, B., PETERMANN, I., DEHNERT, J., LOGVINOVA, A. ET AL. Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.100, p.9590-9595, 2003.

YASUTAKE A, POWERS JC. Reactivity of human leukocyte elastase and porcine pancreatic elastase toward peptide 4-nitroanilides containing model desmosine residues. Evidence that human leukocyte elastase is selective for cross-linked regions of elastin. **Biochemistry.** v.20, n.13, p.3675-3679, 1981.