

GIOIA MAGDA

Relazione conclusiva: “Borsa di studio C.I.R.C.M.S.B.”

Tutor: Prof. Massimiliano Coletta

“Caratterizzazione della modulazione funzionale dell’attività proteolitica svolta dalla gelatinasi MMP-2”.

Studi cinetici del processamento dei substrati naturali (collagene bovino di tipo I, collagene di tipo IV e fibronectina)

Introduzione

Le metalloproteasi di matrice (MMP) sono una famiglia di enzimi prevalentemente prodotti da cellule del tessuto connettivo, secreti come zimogeni nella matrice extracellulare. Le MMPs sono endopeptidasi multidominio zinco e calcio dipendenti che operano una specifica attività proteolitica su gran parte dei costituenti della matrice extracellulare. I prodotti di degradazione delle proteine di matrice partecipano alla regolazione del comportamento cellulare; svolgendo un ruolo chiave nel regolare la degradazione della matrice extracellulare, le MMPs risultano coinvolte in numerosi processi di rimodellamento tissutale associati alla crescita ed allo sviluppo e in varie patologie.

In base all’efficienza di proteolisi dei componenti della matrice ed alla composizione in domini la famiglia viene suddivisa in quattro classi principali: *gelatinasi* (MMP-2, MMP-9), *collagenasi* (MMP-1, MMP-8, MMP-13), *stromelisine* (MMP-3, MMP-10, MMP-12), *metalloproteasi di membrana* (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP).

Dal punto di vista strutturale ogni membro della famiglia è costituito da un propeptide amino terminale, un dominio catalitico (che presenta almeno 2 ioni calcio e 2 ioni zinco) e un dominio C-terminale strutturalmente simile all’emopexina.

Le gelatinasi (chiamate anche collagenasi di tipo IV), sono molecole caratterizzate da un’elevata efficienza proteolitica nei confronti della gelatina e sono ritenute implicate in una varietà di processi patologici quali la proliferazione tumorale e la formazione di metastasi (1). Attualmente sono conosciute due gelatinasi la MMP-2 (gelatinasi-A) e la MMP-9 (gelatinasi-B). Entrambe contengono, rispetto alle altre MMPs, una sequenza aggiuntiva inserita in un loop del dominio catalitico; questa sequenza assume la conformazione di tipo II trovata nella fibronectina (Fig.1); le due gelatinasi differiscono per il peso molecolare, 72 kDa la MMP-2 e

92 kDa la MMP-9 e possono essere distinte anche per la differente efficienza nel degradare la gelatina (maggiore per la MMP-2).

L'efficienza proteolitica delle gelatinasi è influenzata da variazione di pH: l'optimum per l'attività catalitica si ha a pH 8.5, mentre a pH inferiore a 6.5 l'enzima risulta estremamente instabile.

La presenza del dominio fibronectin-like conferisce alle gelatinasi la capacità di interagire con diverse macromolecole della matrice; oltre alla gelatina, prodotto di degradazione delle molecole di

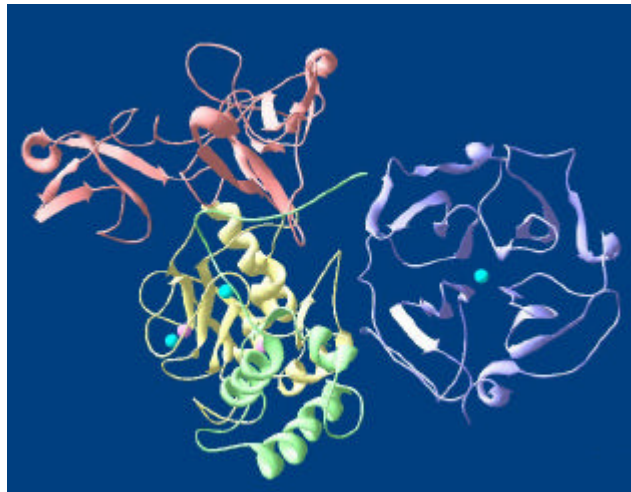


Figura 1: Struttura cristallografica della pro-MMP2: in rosa dominio fibronectin-like, in viola dominio heamopexine-like, in giallo dominio catalitico, in verde propeptide.

collagene, le gelatinasi processano infatti altre molecole presenti nella matrice extracellulare, tra queste vanno ricordate l'elastina, la laminina, la fibronectina e gli aggregani.

Le gelatinasi, ed in particolar modo la MMP-2, possono inoltre degradare anche diversi tipi di collagene nativo sia di tipo fibrillare che di tipo non fibrillare: collagene I, il collagene V ed il collagene VII. E' utile sottolineare che a 25°C, come la collagenasi MMP-1, la MMP-2 è in grado di tagliare la molecola nativa di collagene in due frammenti rispettivamente $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$ della lunghezza della molecola nativa (2). L'abilità nel degradare il collagene varia in base alla durata dell'esposizione agli agenti riducenti ed alla temperatura (3).

Una serie di studi hanno mostrato come alcune molecole, presenti in estratti vegetali, sono in grado di ridurre l'attività di alcune metalloproteasi ed in particolare della gelatinasi. Queste molecole, polifenoli presenti nel tè verde, interagiscono selettivamente con la matrice extracellulare influenzando positivamente le caratteristiche funzionali della stessa. Tutti gli studi effettuati utilizzando sia i polifenoli che i loro precursori, come l'EGCG (epigallocatechingallato), hanno confermato sia lo spiccato tropismo degli stessi nei confronti della matrice extracellulare e delle molecole presenti nella matrice, sia l'attività inibitoria nei confronti delle gelatinasi. Diversi studi suggeriscono che l'EGCG inibisce l'attività di alcune MMPs, quali collagenasi e gelatinasi, come pure l'attivazione della pro-MMP-2. In particolare, l'attività della MMP-2, valutata in fluorescenza, mostra un'inibizione dose dipendente con $IC_{50}=6\mu M$. Dati preliminari indicano che l'inibizione da parte dell'EGCG è di tipo non competitivo. Molto poco è conosciuto circa i meccanismi molecolari attraverso i quali l'EGCG blocca l'attività gelatinolitica (4).

MATERIALI E METODI

La MMP-2 ricombinante è disponibile commercialmente. La purezza delle preparazioni è stata misurata utilizzando elettroforesi in ambiente denaturante e riducente (SDS gel-PAGE)(Marini et al. 1989).

Attivazione delle proteasi

Le proteasi native sono state attivate incubando 100 µl di una soluzione contenente 0.1 µg/ml di pro-gelatinasi in p-aminofenil mercuril acetato (APMA) a 37°C per 2 ore. Questo trattamento sposta l'equilibrio conformazionale della pro-proteasi verso una forma aperta, attivata autocataliticamente attraverso la rottura dei legami esistenti, che per quanto riguarda l'MMP-2, sono localizzati tra i residui 71 e 81.

Saggi enzimatici

L'attività enzimatica delle MMPs in varie condizioni è stata valutata utilizzando il substrato fluorogenico MCA-Pro-Leu-Gly≈Leu-DPA-Ala-Arg-NH₂. Gli esperimenti sono stati condotti a 37°C ad una concentrazione finale di MMP-2 pari a 0.01 nM; la soluzione utilizzata (Tris/HCl 50 mM, NaCl 0.1 M, CaCl₂ 10mM, 0.05% Brij 35) è stata tamponata a valori di pH compresi tra 9 e 5. Il pH è stato misurato sia prima che dopo ciascun esperimento e sono stati acquisiti solo i dati degli esperimenti in cui non si erano verificati cambiamenti di pH. Esperimenti preliminari sono stati condotti per valutare se il DMSO, solvente utilizzato per la diluizione del substrato, non è in grado, alle concentrazioni utilizzate, di modificare l'attività delle MMPs. Per rilevare la fluorescenza emessa in seguito alla proteolisi del substrato sintetico, è stato utilizzato lo spettrofluorimetro Jobin-Yvon (mod. JY-3) regolato alla lunghezza d'onda, di emissione e di eccitazione, pari a 395 e 328 nm rispettivamente. La quantità di substrato è stata calibrata, all'inizio di ogni set di esperimenti, aggiungendo alla MMP-2, una quantità limitata di substrato; al completamento della reazione l'ampiezza del segnale registrato è stata valutata e utilizzata per la successiva standardizzazione. Dal punto di vista dell'analisi va sottolineato che le misure della velocità iniziale sono state riferite all'intervallo di tempo durante il quale è stato consumato fino al 10% del substrato; i valori ottenuti, una volta normalizzati come descritto, sono stati espressi sotto forma di nanomoli processate al secondo.

È stato valutato anche l'effetto dell'EGCG sull'attività enzimatica della MMP-2 impiegando concentrazioni di EGCG comprese tra 30 e 100 µM.

Zimografia

L'attività proteolitica della MMP-2 nei confronti di substrati naturali (gelatina e collagene I) è stata valutata mediante l'utilizzo della zimografia. Questa tecnica, che consiste

in una corsa elettroforetica effettuata in condizioni native permette l'individuazione delle proteasi in base alla loro attività biologica. La separazione è stata ottenuta utilizzando un gel costituito dal 12% di acrilammide e contenente 1 mg/ml di gelatina o di collagene di tipo-I. Il gel, dopo la corsa, è stato sottoposto per due volte ad un lavaggio della durata di 15 minuti con una soluzione 2% Triton per rimuovere l'eccesso di SDS presente nel gel e nel tampone di corsa. Dopo la rimozione dell' SDS il gel viene incubato a 37° per 18 ore in un tampone di incubazione (50 mM Tris/HCl, 0.15 M NaCl, 2% Triton, pH 7.6) per lasciar avvenire la reazione enzimatica di proteolisi; questa reazione è stata visualizzata colorando e decolorando l'intero gel come descritto precedentemente (5). Per valutare l'effetto del EGCG sul processamento dei substrati naturali è stato utilizzato anche un tampone d'incubazione 100 µM EGCG. Le aree del gel in cui sono localizzate le proteasi, per effetto della loro attività, si presenteranno come delle bande chiare di idrolisi evidenti sullo sfondo omogeneo blu del gel (causato dalla presenza del substrato). E' importante sottolineare che nella zimografia ogni campione, costituito da 10 µg/ml di MMPs purificata diluita con una soluzione tampone 5X, non è stato bollito ma solo incubato; la denaturazione, infatti, inattiverebbe le proteasi presenti nel campione. Come marcatori proteici sono state utilizzate proteine di peso molecolare standard.

La specificità della reazione è stata confermata incubando alcuni gel di controllo in presenza di 20mM EDTA (acido etilendiammoniotetracetico) o 0.3 mM 1,10-fenantrolina (inibitore delle MMPs) o 1 mM fenilmetilsulfonilfluoride (inibitore delle proteasi a serina).

Esperimenti di Frammentazione (SDS-PAGE):proteolisi di substrati naturali.

A 37°C la fibronectina, il collagene di tipo I e il collagene di tipo IV vengono degradati dalla MMP-2 attraverso una successione di eventi proteolitici. Gli esperimenti di frammentazione sono stati effettuati aggiungendo la MMP-2 attivata (0.01 nM) ad una soluzione contenente diverse concentrazioni di substrato in tampone di incubazione (Tris/HCl 50 mM, NaCl 0.1 M, CaCl₂ 10 M pH 7.4). Per valutare la velocità e l'efficienza della reazione, aliquote delle soluzioni sono state raccolte ad intervalli regolari e analizzate mediante una corsa elettroforetica (SDS-PAGE). L'intensità delle bande visualizzate sui gel è stata valutata con un densitometro laser (LKB 2202 Ultrascan); la concentrazione relativa di ogni banda è stata calcolata interpolando i valori ottenuti con quelli derivati utilizzando una soluzione di collagene standard. Come esperimento di controllo, è stata utilizzata la soluzione di ciascun substrato incubata nelle stesse condizioni in assenza di enzima. I valori dei parametri cinetici e termodinamici (K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_m) relativi all'efficienza proteolitica sono stati ricavati mediante la metodologia di Lineweaver-Burk.

Per valutare la modulazione dell'attività enzimatica operata dall'EGCG tali esperimenti sono stati condotti in differenti condizioni sperimentali: a pH compresi tra 5 e 9 e in diverse concentrazioni di EGCG da 10 a 100 μ M. Mediante misure densitometriche, dopo 3h di attività enzimatica è stata misurata (per le diverse concentrazioni di EGCG) la percentuale di collagene I residuo.

Titolazione dell'EGCG

Mediante lo spettrofotometro JascoV-530 sono stati rilevati gli spettri (nella regione compresa tra 250-400nm) di soluzioni 90 μ M di EGCG di incubazione (Tris/HCl 50 mM, NaCl 0.1 M, CaCl_2 10 M ad ogni unità di pH compresa tra 5 e 9). Le due forme misurate ai pH estremi, presentano uno spettro differente, inoltre la sovrapposizione di tali spettri evidenzia la presenza di un punto isobestico a 280nm. Lo spettro dell'EGCG presenta un massimo di assorbimento a 322 nm.

Dicroismo circolare

Il cambiamento conformazionale del collagene nel corso della proteolisi è stato valutato utilizzando la tecnica del dicroismo circolare (CD). Si richiede l'utilizzo di questo approccio in quanto l'assenza di residui aminoacidici in grado di assorbire a lunghezze d'onda comprese tra 220 e 700 nm non permette l'identificazione delle variazioni conformazionali successive alla degradazione della molecola stessa attraverso un'analisi spettrofotometrica classica. Va inoltre ricordato che il dicroismo circolare permette di identificare alterazioni della struttura secondaria difficilmente valutabili utilizzando le metodologie classiche e che la tripla elica, tipica struttura secondaria della molecola di collagene, possiede un suo caratteristico spettro di dicroismo circolare.

Per le nostre osservazioni spettroscopiche il collagene bovino di tipo I è stato intrappolato all'interno di un gel sottile (0.5 mm) polimerizzando agarosio (0.6%) a bassa temperatura di gelificazione (37°C) in presenza della proteina solubilizzata a pH 3 (1 μ M). In breve, alla soluzione di agarosio a 37°C viene rapidamente aggiunta la soluzione di collagene. La soluzione è stata versata tra due lastre di vetro (Mini-proteanII, Bio-Rad) ed immediatamente raffreddata per ottenere un gel omogeneo. La concentrazione finale è: 0.6% per l'agarosio e 1 μ M per il collagene. In seguito, una porzione omogenea del gel (dello spessore pari a 0.5 mm) è stata tagliata ed immersa, per tutta la notte, in soluzione tamponante a diversi pH (in presenza e in assenza di EGCG 10-100 μ M); utilizzando questo sistema è stato possibile valutare, a diversi pH, l'effetto dell'EGCG sulla struttura del collagene nativo evitando peraltro la precipitazione del collagene stesso che avviene a pH superiori a 4. Il campione così preparato (singole fibre di collagene nativo a diversi pH) è stato usato per le

misure di dicroismo circolare, ponendo in una cuvetta di quarzo una porzione del gel in presenza di MMPs.

Gli spettri di dicroismo circolare sono stati registrati nella regione del lontano UV (240-190 nm) tramite spettropolarimetro Jasco J710. Ogni spettro è il risultato dalla media di quattro differenti misure.

Come controlli, per valutare la correttezza dell'approccio sperimentale utilizzato, sono stati effettuati tre differenti spettri CD: uno spettro del collagene intrappolato nel gel a pH 3, uno spettro effettuato sul collagene in soluzione a pH 3 (alla stessa concentrazione del collagene intrappolato), ed infine uno spettro di gel di agarosio polimerizzato in assenza di collagene. I dati ottenuti sono stati utilizzati come background per costruire una linea di base. Gli spettri CD in presenza della MMP vengono effettuati aggiungendo la proteasi ad una concentrazione finale di 0.01 nM alla cuvetta contenente il collagene intrappolato. Prima di effettuare le misure si è atteso un periodo di circa 10' consentire all'EGCG di diffondere uniformemente all'interno del gel.

Microscopia elettronica

Per chiarire in che modo l'EGCG si leghi alle fibre di collagene, sono state misurate le variazioni nella struttura periodica caratteristica dei collagene di tipo fibrillare (D=67nm). Gli esperimenti sono condotti in collaborazione con il laboratorio del Prof. A. Modesti (Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"). Tendini murini rimossi chirurgicamente dagli animali sacrificati prima di esser fissati in glutaraldeide sono stati posti per 24h in 4 diverse soluzioni di tampone di incubazione (Tris/HCl 50 mM, NaCl 0.1 M, CaCl₂ 10 M pH 7.4): il controllo è stato posto semplicemente nel tampone di incubazione (ct), il primo campione è stato in un tampone di incubazione in cui è stata sciolta una quantità di EGCG tale per cui la concentrazione finale è di 100 µM di EGCG (exp)(Figura 6). Per verificare le molecole di EGCG legate alla fibra di collagene prevengano l'attività collagenasica della gelatinasi MMP-2, sono stati confrontati i dati provenienti da campioni incubati con MMP-2 in presenza ed in assenza di EGCG; al tampone di incubazione utilizzato per il secondo campione è stata aggiunta MMP-2 attivata (6nM), il terzo campione è stato trattato con un tampone d'incubazione contenente sia MMP-2 nM che EGCG 100 µM.

DISCUSSIONE

È stata condotta un'analisi cinetica e termodinamica dell'attività idrolitica della MMP-2 nelle interazioni con macromolecole naturali; in particolare, abbiamo cercato di caratterizzare la

specificità di substrato della MMP-2 e la modulazione dell'attività proteolitica svolta da fitopolifenoli.

Nel corso dello studio abbiamo valutato quantitativamente l'efficienza proteolitica svolta dalla MMP-2 nei confronti dei principali substrati naturali presenti nella matrice extracellulare: collagene di tipo I, collagene di tipo IV e fibronectina. La MMP-2, come altre proteasi, procura la degradazione delle macromolecole presenti nella matrice extracellulare attraverso una serie di eventi proteolitici che portano alla completa degradazione del substrato (6).

Per quel che riguarda il primo evento proteolitico la MMP-2, come altre MMPs, segue il meccanismo di Michaelis-Menten,; quindi, è stato possibile ricavare i valori dei parametri k_{cat}/K_m , k_{cat} e K_m conducendo le cinetiche di degradazione a varie concentrazioni dei diversi substrati (Esperimenti di Frammentazione). E' stato possibile, in questo modo, ottenere un'informazione quantitativa dalla comparazione della specificità di substrato.

MMP-2	k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (M)
Collagen I	$3.46 \cdot 10^4$	2.17	$6.27 \cdot 10^{-5}$
Collagen IV	$3.89 \cdot 10^4$	1.10	$2.83 \cdot 10^{-5}$
Fibronectin	$6.59 \cdot 10^3$	0.035	$5.29 \cdot 10^{-6}$
MMP-8			
Collagen I	$8.91 \cdot 10^4$	4.75	$5.33 \cdot 10^{-5}$

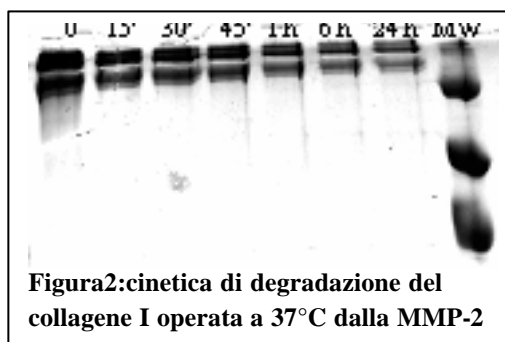
Tabella 1: Parametri catalitici ottenuti a pH 7.4 e 37°C dal processamento di substrati naturali.

Confrontando i valori numerici riportati nella tabella, si nota che la gelatinasi MMP2, nonostante abbia un'elevata affinità per la fibronectina (K_M), ha una velocità di proteolisi inferiore di un ordine di grandezza rispetto alla velocità mostrata per il processamento delle altre due macromolecole. Inoltre, dalla Tabella 1 appare evidente che, nonostante venga classificata come una gelatinasi, la MMP-2 è in grado di digerire le molecole di collagene fibrillare con un'efficienza proteolitica paragonabile a quella mostrata dalle collagenasi (MMP-8).

Dalla letteratura risulta che a 25°C la MMP-2 processa la tripla elica di collagene I secondo un meccanismo che procede in due fasi simile a quello svolto dalle collagenasi; il primo evento proteolitico genera i caratteristici frammenti $\frac{3}{4}$ e $\frac{1}{4}$, i successivi tagli si

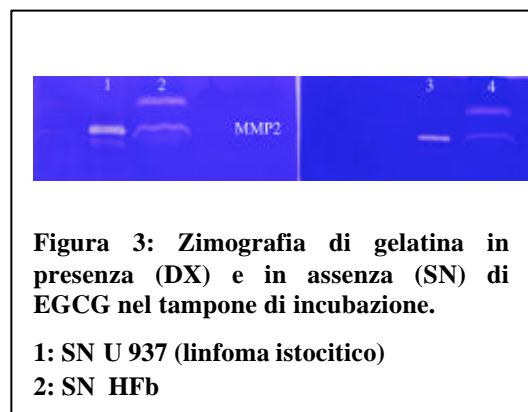
verificano in molteplici siti della molecola generando quindi brevi frammenti non ancora definiti (6).

I dati ottenuti con gli Esperimenti di Frammentazione hanno mostrato che alla temperatura corporea la MMP-2 presenta una differente modalità di frammentazione proteolitica del collagene I; questo risulta evidente già dalle prime fasi dell'evento catalitico (vedi Figura 2): infatti, a 37°C nonostante sia evidente la



scomparsa del substrato, i prodotti derivanti dal primo evento proteolitico non sono identificabili. Questa differenza di comportamento alle due temperature è probabilmente da attribuire a una differente energia di attivazione tra il primo evento proteolitico e i successivi tagli enzimatici; quindi mentre a temperatura più bassa il prodotto del primo taglio è più stabile, l'aumentare della temperatura incrementa l'efficienza dei tagli successivi. Il primo taglio proteolitico della molecola di collagene I viene quindi effettuato, a 25°C, in un unico sito specifico, mentre, a 37°C si può verificare su

molteplici siti. Inoltre, è stato condotto uno studio termodinamico e cinetico dell'effetto modulatore svolto dal fitopolifenolo nei confronti dell'attività enzimatica della gelatinasi MMP-2. Mediante zimografia è stato possibile dimostrare

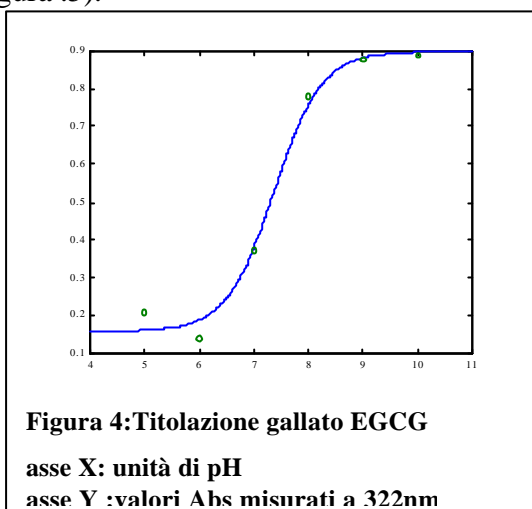


che l'attività delle MMP-2 secrete da cellule in coltura viene inibita da concentrazioni 100µM di EGCG (Figura 3).

A pH fisiologico alla concentrazione pari a 100µM l'EGCG svolge un effetto inibitorio sull'attività enzimatica dell'MMP-2 esercitata su substrati sia sintetici fluorogenici sia naturali (gelatina e collagene I).

L'EGCG è un flavonolo che può essere facilmente ossidato al O-chinone corrispondente; questa molecola può svolgere la funzione di accettore o di donatore di idrogeno. Le due forme presentano uno spettro differente, riportando in grafico il valore di assorbimento relativo a 322 nm misurato a diversi pH è stato possibile ricavare che il valore del pK_a è pari a 7.37 (figura 4). L'effetto del fenolo sull'idrolisi del collagene I esercitata dal MMP-2 è stato valutato mediante Esperimenti di Frammentazione condotti in differenti condizioni sperimentali (a pH compresi tra 6 e 9 e in diverse concentrazioni di EGCG tra 30 e 100 µMe di collagene I tra).

L'effetto modulatore dell'EGCG sull'attività catalitica della MMP-2 varia a seconda del pH (figura .5).



A pH9, l'EGCG è presente nella forma protonata e all'aumentare della concentrazione di EGCG si verifica un'inibizione della proteolisi.

A pH6, l'EGCG è presente nella forma deprotonata e svolge un'attività inibitoria nell'intervallo compreso tra 10 e 30 μM , a concentrazioni superiori (comprese tra 60 e 90 μM) svolge un effetto attivatorio.

Da dati presenti in letteratura risulta che il polifenoli sono in grado di legarsi alle proteine

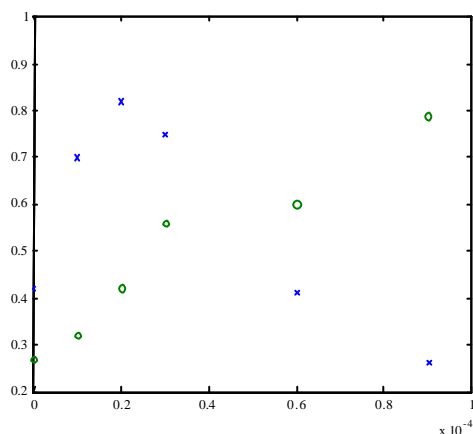


Figura5:Effetto del EGCG sulla degradazione del collagene di tipo I a pH 6 (x blu) e pH 9 (pallini verdi).

alterata dall'interazione tra le due molecole (dati non mostrati).

strutturali della matrice extracellulare, infatti, l'EGCG oltre ad legare l'enzima è in grado di legare anche le fibre di collagene presenti nel tendine di topo; l'interazione è tale da alterare il passo tipico delle fibre di collagene 64nm (ct) (Figura 6). Tuttavia spettri di dicroismo circolare hanno mostrato che la tipica struttura a tripla elica del collagene non viene

Bibliografia

1. Stetler-Stevenson et al. (1993) *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 541-573.
2. Aimes, R.T et al (1995) . *J. Biol. Chem.* **270**, 5872-5876
3. Ebe, J.A. et al. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30964-30970.
4. Spiridione G et al. (2001) *Cancer* **91** 822-832.
5. Marini S, et al. (1989) . *Biol Chem Hoppe Seyler Oct*; **370**(10):1085-92.
6. Murphy G. et al(2001) *FEBS Letters* ; **503** 158-162.

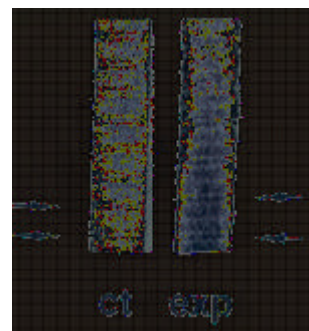


Figura 6: Microscopia elettronica
 ct : controllo;
 exp: tendine di topo trattato con 100 mM di EGCG.