

00381
32



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios de Posgrado

Clonación del gen del TIMP-2
de cobayo.

T E S I S

Que para obtener el Grado Académico de
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

p r e s e n t a

M. en C. JORGE / MELENDEZ ZAJGLA

Directora de Tesis: Dra. Annie Pardo Semo

México, D.F.

2000

MAR 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Clonación del gen del TIMP-2 de cobayo.

Resumen

En el presente trabajo se muestra la clonación del ADNc del inhibidor tisular de las metaloproteasas 2 de cobayo. La clonación se realizó utilizando dos bibliotecas de ADNc provenientes de pulmón de cobayo. La clona más grande posee 3.5 kb de longitud y un marco abierto de lectura que codifica para una proteína de 220 aminoácidos. La correcta identificación de este ADN se demuestra mediante el alto porcentaje de identidad y similitud global (>97%) con respecto a su contraparte humana y de roedor. Como se esperaba, la proteína codificada por este ADN posee actividad como inhibidor tisular de metaloproteasas, al ser expresada en un células de hámster chino (CHO). Los dos principales transcritos se expresan en la mayor parte de los tejidos analizados, con excepción del hígado. La regulación de este gen asemeja a la de un gen constitutivo, modificándose poco o nada por la acción de diversas hormonas y factores de crecimiento, así como en condiciones patológicas (daño pulmonar agudo por hiperoxia).

Agradecimientos

A los miembros del comité de exámen por su tiempo en la revisión de la tesis y sus útiles críticas del mismo.

A la Dra. Annie Pardo y al Dr. Selman por su constante apoyo durante la realización de la presente tesis.

A mis padres

A Vilma por su apoyo y ayuda

Abreviaturas

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido Ribonucleico
DEPC	Dietil pirocarbonato
DO	Densidad optica
DTT	Ditiotrietol
EGF	Factor de crecimiento epidermico
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
IL	Interleucina
IPTG	Isopropiltiogalactosido
MMLV-RT	Reverso transcriptasa de virus moloney murino
MMP	Metaloproteasa de matriz
PCR	Reaccion en cadena de la polimearasa
Pfu	Unidades formadoras de placa
RACE	Amplificacion rapida de extremos de ADNc
RT	Reverso transcriptasa
SDS	Sodio dodecil sulfato
TGF	Factor de crecimiento transformante

TIMP

Inhibidor tisular de metaloproteasas

TNF

Factor de necrosis tumoral

CLONACION DEL TIMP- 2 DE COBAYO	1
RESUMEN	6
INTRODUCCION	7
Metaloproteasas de matriz.	8
Inhibidores tisulares de las metaloproteasas.	17
OBJETIVOS	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS PARTICULARES	29
MATERIAL Y METODOS	30
Obtención de ARN total.	30
Obtención de ARN mensajero.	31
Northern Blot.	31
Transfecciones.	32
Southern blot	33
Obtención de la biblioteca de pulmón de cobayo.	36
Tamizado de la biblioteca	40
Secuenciación manual.	41
RACE.	44
Zimograma reverso.	47
Cultivo Celular	47
RESULTADOS	48
-Elaboración de la biblioteca de ADNc de pulmón de cobayo.	48
-Tamizado de la biblioteca	48
-Characterización clonas cml y cm2	50
-Clonación del extremo 5' del ADNc del TIMP-2 de cobayo	53
-Expresión del Timp-2 en tejidos	60
-Regulación de la expresión del Timp-2 <i>in vitro</i>	60
-Expresión del Timp-2 recombinante	61
-Modulación del Timp-2 <i>in vivo</i>	63
DISCUSION	66
CONCLUSIONES	69
REFERENCIAS:	80

RESUMEN

En el presente trabajo se muestra la clonación del ADNc del inhibidor tisular de las metaloproteasas 2 de cobayo. La clonación se realizó utilizando dos bibliotecas de ADNc provenientes de pulmón de cobayo. La clona más grande posee 3.5 kb de longitud y un marco abierto de lectura que codifica para una proteína de 220 aminoácidos. La correcta identificación de este ADN se demuestra mediante el alto porcentaje de identidad y similitud global (>97%) con respecto a su contraparte humana y de roedor. Como se esperaba, la proteína codificada por este ADN posee actividad como inhibidor tisular de metaloproteasas, al ser expresada en un células de hámster chino (CHO). Los dos principales transcritos se expresan en la mayor parte de los tejidos analizados, con excepción del hígado. La regulación de este gen asemeja a la de un gen constitutivo, modificándose poco o nada por la acción de diversas hormonas y factores de crecimiento, así como en condiciones patológicas (daño pulmonar agudo por hiperoxia).

INTRODUCCION

La matriz extracelular, una compleja red de colágenas, proteoglicanos y glicoproteínas, desempeña un papel central en el mantenimiento de la integridad estructural de organismos multicelulares que van desde los más sencillos y primitivos hasta los más complejos mamíferos. Asimismo, la matriz participa en la dirección del desarrollo y morfogénesis embrionaria de vertebrados e influencia procesos celulares básicos como la proliferación, diferenciación, migración y adhesión. Esta compleja estructura consiste de por lo menos 50 proteínas. Los componentes más abundantes de la matriz son la colágena (en particular la tipo I) y la fibronectina, aunque esta composición varía de manera muy importante en diversos tejidos y en formas especializadas de la matriz, como la membrana basal. La matriz extracelular es una estructura dinámica en equilibrio entre la degradación y síntesis de novo de sus componentes (51). La degradación de la matriz extracelular se lleva a cabo principalmente por un grupo de enzimas denominadas metaloproteasas de matriz (MMPs), que consiste en una gran familia de proteínas con un complejo sistema de regulación transcripcional y postranscripcional. En este último caso destacan los inhibidores tisulares de la metaloproteasas de matriz (TIMPs, por sus siglas en inglés), los cuales son proteínas que se

unen de manera no covalentes con las enzimas inhibiendo en general, su activación.

Metaloproteasas de matriz.

Aunque muchas proteasas son capaces de degradar componentes específicos de la matriz extracelular, se considera que las MMPs son los mediadores fisiológicos de este proceso. Existen diversas razones para respaldar esta aseveración: La mayoría de las MMPs son proteínas secretadas, lo cual las coloca en el lugar de su acción, sus actividades enzimáticas son máximas a pH fisiológico y son reguladas en procesos de remodelación de tejidos que involucran cambios en la estructura de la matriz extracelular. Como se mencionó anteriormente, existen múltiples niveles de regulación de estas enzimas, transcripcionales y postrcripcionales, lo cual sugiere que se requiere un control estricto de las mismas para la regulación de la continuidad de los procesos normales. Asimismo, la desregulación de estas enzimas en procesos patológicos como la fibrosis, la artritis y el cáncer, apoyan esta noción.

Las metaloproteasas de matriz pertenecen a una familia de proteínas con las siguientes características: ser inhibidas por los TIMPs, dependencia de iones de zinc para mantener la integridad estructural y de iones de calcio

para la catálisis de su sustrato. Asimismo, presentan un prototipo de dominios que comprenden el propéptido, el catalítico y el dominio carboxilo tipo hemopexina. La mayor parte de las MMPs son secretadas como zimógenos inactivos que deben ser procesados por cortes específicos para la activación. En general, estas enzimas se clasifican, basándose en la especificidad de sus sustratos y en los dominios que poseen en cinco grupos: gelatinasas, colagenasas, estromelisinias, metaloproteasas de membrana y otras (no asignadas a los grupos anteriores). Actualmente se reconocen numéricamente 19 miembros:

(Tabla 1)

MMP-1	Colagenasa intersticial
MMP-2	Gelatinasa A
MMP-3	Estromelisinina 1
MMP-7	Matrilisinina
MMP-8	Colagenasa de neutrófilos
MMP-9	Gelatinasa B
MMP-10	Estromelisinina 2
MMP-11	Estromelisinina 3
MMP-12	Metaloelastasa
MMP-13	Colagenasa 3
MMP-14	Metaloproteasa de membrana 1
MMP-15	Metaloproteasa de membrana 2
MMP-16	Metaloproteasa de membrana 3
MMP-17	Metaloproteasa de membrana 4
MMP-18	Sin nombre específico
MMP-19	Sin nombre específico
MMP-20	Enamelisinina
MMP-23	Sin nombre específico
MMP-24	Metaloproteasa de membrana 5

Tabla 1. Metaloproteasas de matriz

Estructura de las metaloproteinasas

Estas enzimas poseen una estructura de dominios conservados entre los diferentes miembros (Figura 1). El primero de ellos, el dominio propeptídico es removido para la activación de la enzima. Una región de este propéptido, altamente conservado, (PRCGVPD), es responsable de mantener inactiva a la enzima. El dominio catalítico posee la secuencia conservada HEXGH, que probablemente es la responsable de la unión al zinc. Con la excepción de las matrilisinas, estas enzimas también poseen un dominio carboxilo terminal con homología a la hemopexina y a la vibronectina. Asimismo, las gelatinasas en particular poseen dominios adicionales con semejanza a proteínas de matriz extracelular. En particular, las gelatinasas presentan un dominio con similitud al sitio de unión a fibronectina de las colágenas, que al parecer media su unión con la colágena extracelular (57). Adicionalmente la gelatinasa B presenta además un sitio con similitud a la colágena V. Finalmente, cabe destacar la presencia del dominio carboxilo terminal transmembranal de la metaloproteasas de membrana (MMP-MT1-5).

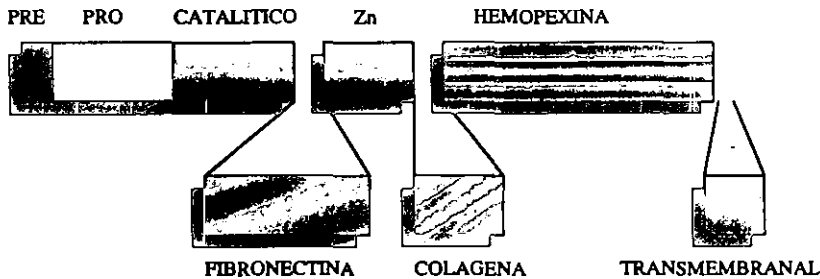


Figura 1. Estructura de las metaloproteasas

Evolución de las metaloproteasas

Se ha sugerido que los diversos miembros de esta familia provienen de duplicación y reorganización de exones provenientes de un gen primordial (18). Este gen debiera contener al sitio catalítico, dado a que es el elementos esencial mínimo para su función. A este primordio se debió duplicar y adicionar el dominio propeptídico, que regularía la actividad enzimática. Estas dos regiones se encuentran en todas las enzimas y sus límites no corresponden a uniones bien definidas entre intrones y exones, razón por la cual se piensa que son derivados por duplicación del primordio. Otro caso es la presencia del sitio tipo hemopexina, en el que este se encuentra bien limitado en exones, lo cual

señala la posible adición posterior. Esta estructura sufriría una segunda duplicación y adición del dominio de unión a fibronectina para crear a la gelatinasa A, la cual nuevamente se duplicaría para dar lugar a la gelatinasa B, a la cual se le adicionaría el dominio de colágena tipo V. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que los genes de la colagenasa intersticial y la estromelisina, los cuales solo poseen la estructura básica con hemopexina, se encuentran localizados en el cromosoma 11, mientras que los genes de las gelatinasas están en el 16. La adición de estas regiones parece haber permitido a estas enzimas tener la especificidad de sustrato que presentan. El dominio catalítico aislado posee actividad proteolítica contra caseína, hecho que puede verificarse con la matrilisina, cuya estructura contiene únicamente este dominio. Asimismo, versiones truncadas de la estromelisina y colagenasa intersticial poseen esta misma actividad. (74). Sin embargo, ninguna de estas enzimas trucas poseen actividad en contra de la colágena nativa. A este respecto, es sugestivo que la matrilisina, una enzima que únicamente posee el dominio catalítico, presenta la mayor actividad descrita contra proteoglicanos y glicoproteínas. Existe la hipótesis de que estos elementos de la matriz se presentaron durante la evolución antes que las colágenas fibrilares, lo

cual apoyaría la hipótesis de que la matrilisina es el remanente del gen primordial (51).

Colagenasas

Esta subfamilia está compuesta por la colagenasa intersticial, la colagenasa de neutrófilos y la colagenasa 3 (MMP-1, 8 y 13, respectivamente). Estas enzimas degradan principalmente colágenas tipo I y III(35,52), además de agrecan(64) y colágena tipo II. La colagenasa intersticial (MMP-1) también degrada colágena VII, X, tenascina, entactina (78,93,58,80,42)y cataliza la remoción del propéptido de la progelatinasa B (MMP-9) y progelatinasa A (MMP-2), (20,75) activándolas.

Gelatinasas

Este grupo está compuesto por dos miembros, la gelatinasa A y B. Estas enzimas degradan principalmente colágena tipo IV, V, VII, X, gelatina, fibronectina, laminina, elastina y agrecan. (20,14,28,95)

Estromelisinias

Esta familia está compuesta por 3 miembros, denominados por número. La estromelisina 3, a diferencia de la 1 y 2, posee una inserción de 11

aminoácidos en donde se localiza un sitio consenso de corte (RxKR) para furina, una serín proteasa localizada en el aparato de golgi. Esta inserción implica que la enzima es capaz de activarse intracelularmente. Las estromelisininas poseen actividad enzimática sobre colágena IV, laminina, fibronectina, elastina, agregan y en menor medida colágena II, IX, X y XI (58,68,56,59)

Metaloproteinasas de membrana

Esta familia, compuesta por cinco miembros, designados por número (MT-MMP 1 a 5) están caracterizadas por la presencia de una región transmembranal que las capacita para anclarse a la membrana celular. Asimismo, al igual que la estromelisina 3, poseen un sitio de reconocimiento para la furina, que probablemente medía su activación intracelular. Estas proteínas poseen actividad enzimática contra otros miembros de la familia, activándolas mediante el corte de su región propeptídica. El ejemplo más destacado es el de la MMP 14 (MT-MMP1) que es capaz de activar a la progelatinasa A (76).

Regulación de las metaloproteinasas de matriz

Durante condiciones fisiológicas normales, es necesario que ocurra una remodelación de la matriz celular para permitir una diversidad de procesos que dependen de diferenciación celular. Este proceso de remodelación lo llevan a cabo en gran parte las metaloproteasas de matriz, al ser reguladas mediante la unión de receptores a matriz extracelular y por una variedad de factores de crecimiento, a nivel transcripcional. De la misma manera, existen otros complejos niveles de regulación, entre los que se incluye la estabilidad del mensajero, la secreción de la proenzima, la activación de la misma por corte en su propéptido y finalmente su asociación con inhibidores (TIMPs y/o alfa-2 macroglobulina).

Factores de crecimiento:

Existen una gran diversidad de factores de crecimiento y citocinas que regulan la expresión de este grupo de enzimas. Los ARN de las colagenasas son reguladas positivamente por el factor de necrosis tumoral (TNF) (44), Interleucina-1 (IL-1) (4), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (30), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (25), etc. De manera inversa, los transcritos de estas enzimas son regulados negativamente por el factor transformante beta (TGF- β) (4), ácido retinóico y glucocorticoides (92). Es

interesante destacar que el TGF- β regula diferencialmente a la colagenasa 1 y a la 3, inhibiendo la expresión de la primera y sobreexpresando a la segunda. Este efecto está mediado al parecer por un sitio AP-1 en el promotor de ambos genes (102). Asimismo, varios de estos factores de crecimiento son capaces de regular la expresión a varios niveles, incluyendo la estabilidad del mensajero (92). Es importante destacar que, en humanos, la colagenasa 3 no se expresa más que en procesos patológicos (osteoartritis y cáncer) por lo que la regulación que se ha reportado en general se encuentra en procesos patológicos o en células neoplásicas.

El mensajero de la estromelina 1 se induce por las citocinas IL-1 y TNF, y por factores de crecimiento como el EGF y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Asimismo, es regulado negativamente por TGF- β y ácido retinóico (92). En contraste, la estromelina 2 se expresa en niveles muy bajos en pocos tipos celulares y su mensajero no es modulado por los factores antes mencionados. La estromelina 3 es regulada de manera similar a la estromelina 1, aunque los tipos celulares en los cuales se expresa difiere de manera importante.

Las gelatinasas son expresadas diferencialmente en distintos tipos celulares. Con algunas excepciones la gelatinasa B es expresada por células

de la línea monocítica, como macrófagos alveolares y leucocitos polimorfonucleares y por células epiteliales, mientras que la gelatinasa A es secretada por fibroblastos de piel y células transformadas. La gelatinasa B es inducida por TGF- β , EGF, IL-1 y HGF, entre otras citocinas (46,90,99). Por el contrario, la gelatinasa A posee una expresión basal poco regulable. Una excepción a la regla es el TGF- β , que, a diferencia de las demás MMPs, induce la expresión de ambas gelatinasas.

Inhibidores tisulares de las metaloproteasas.

Las metaloproteasas son inhibidas por una clase especial de proteínas denominadas TIMPs (por Tissue Inhibitors of MetalloProteinases). Actualmente se han identificado cuatro miembros, denominados por número: TIMP-1 a 4. Estas proteínas pequeñas poseen diversas actividades de inhibición selectiva para las metaloproteasas, además de presentar otras funciones al parecer no relacionadas con esta capacidad inhibitoria, como modulación de la proliferación de diversos tipos celulares, y actividad potenciadora de la eritropoyesis. Los TIMP 1, 2 y 4 son secretados, después del corte de su péptido señal en una forma

soluble, mientras que el TIMP-3 se asocia con la matriz extracelular. Estas proteínas forman complejos de alta afinidad con las metaloproteasas inactivándolas de manera irreversible. Existe doce residuos de cisteína muy conservados entre los cuatro miembros que forman seis puentes disulfuro, esenciales para la formación de su estructura nativa (13). Los extremos amino terminales de ellas también se encuentran conservados, lo cual sugiere que se trata de la región inhibitoria, mientras que las regiones carboxilo son divergentes, por lo cual se ha postulado que funcionan para proveer la selectividad de la inhibición y unión a las MMPs.

En general los TIMPs poseen una estructura terciaria compuesta por cinco cadenas tipo beta (beta sheets) antiparalelas que forman una estructura de barril, conformadas por cinco círculos (loops) formados por los puentes disulfuro. (87)

El mecanismo de inhibición de los TIMP no está totalmente dilucidado, aunque en general se acepta que está mediado por una unión estequiométrica 1:1. Se ha postulado que no existe un sitio específico en la estructura primaria al cual se le pueda atribuir este papel, sino que se requiere de integridad estructural para preservar su función inhibitoria (13). Este hecho está apoyado por la reciente cristalización del TIMP-1

unida a la estromelina 3, en la que se observa que las cinco cadenas que forman la estructura terciaria de esta proteína ocupan la bolsa (pocket) del sitio catalítico de la estromelina. Particularmente el primer puente disulfuro del TIMP-2 se coordina con el zinc del sitio catalítico de la enzima y un brazo del inhibidor hace contacto con el sitio que provee especificidad a la estromelina, completando su función (32), un hecho apoyado por otros reportes (60).

TIMP-1

El TIMP-1 fue aislado inicialmente como una proteína que potenciaba la eritropoyesis (16C8), que resultó poseer actividad como inhibidor de metaloproteasas (23). Esta proteína de 184 residuos y 21 kDa (al ser secretada), posee dos sitios consenso para glicosilación en los residuos 30-32 y 85-87 y un ARN mensajero de 0.9 kilobases, expresado principalmente en ovario (49). Por lo general este inhibidor se glicosila, por lo que el peso molecular aparente de ella es de 28 a 30 kDa. Esta modificación no es necesaria para su actividad. El TIMP-1 inhibe la activación selectiva de la progelatinasa B (95) estromelina 1(55) y colagenasa intersticial (13).

La expresión de TIMP-1 es inducida por TGF- β , EGF, PDGF, IL-1, IL-11, bFGF, PMA, ácido retinóico, oncostatina M y PGE2 (91) (11). Es por lo tanto, interesante destacar que el ácido retinóico posee efectos contrarios sobre el sistema enzima-inhibidor, dado a que reprime la expresión de varias metaloproteasas.

El TIMP-1 posee otras actividades como potenciador de la eritropoyesis (mencionado anteriormente) y factor de diferenciación en células B (36), como factor de crecimiento en distintos tipos celulares incluyendo fibroblastos, células epiteliales y hematopoyéticas en varias especies de mamíferos (38), por un mecanismo que parece requerir una vía de señalización mediada por AMPc (19). Es interesante el hecho de que el TIMP reducido o alquilado, que no puede unirse a las metaloproteasas de matriz y por lo tanto no posee actividad inhibitoria de estas, no pierde su capacidad para modular la proliferación celular, lo cual habla de la posible existencia de un receptor membranal específico, hecho que ha sido demostrado in vitro (19). Queda la duda si este receptor es una de las metaloproteasas de membrana conocidas (2,3 o 4), un nuevo miembro de estas u otro receptor no relacionado, aunque parece poco probable que una de las MMP-MTs pudiera unir a un TIMP reducido. Al TIMP-1 también se le han asignado funciones promotoras de la esteroidogénesis in vitro,

aunque no se ha demostrado in vivo (66). Otro de los hallazgos interesantes es la capacidad de esta proteína multifuncional para actuar como factor de elongación celular (1). Además, el TIMP-1 puede modular la expresión de otros TIMPs in vivo, por mecanismos desconocidos (65), así como de metaloproteasas, en particular colagenasa 1, por un mecanismo que depende de su actividad inhibitoria de metaloproteasas (17). Dado el papel que las metaloproteasas desempeñan en la angiogénesis, no es de extrañar que el TIMP-1 también pueda participar en este fenómeno (86). El TIMP-1 también puede ser un factor antiapoptótico, particularmente en tejido mamario (3) y centros germinales de células B (36). Finalmente, cabe destacar que existe una acumulación del TIMP-1 en los núcleos de algunos tipos celulares durante la fase S del ciclo celular, de manera específica, lo cual hace pensar en la posibilidad de otras funciones intracelulares de esta proteína(100).

TIMP-2

Esta proteína de 194 residuos y un peso de 21 kDa, no presenta glicosilación alguna y posee dos transcritos principales, de 3.8 kilobases y de 1.2 kilobases, aunque se han detecta un par más que se expresan en menor cantidad (82). Todos los transcritos poseen el marco abierto de

lectura para la proteína completa y su diferencia en tamaño está dada por la elección de sitios alternos de poliadenilación, por lo cual cada uno de ellos varía en el tamaño de la región 3' no traducida (37). Se expresa principalmente en cerebro, corazón, pulmón ovario, testículo y piel, aunque se detecta en menor cantidad en otros tejidos (49). Es interesante el hecho de que existe variación en diversas líneas celulares en la cantidad relativa de expresión de cada uno de ellos, e incluso se ha descrito que durante la acumulación de proteínas de matriz extracelular en cultivos seriales de células de riñón, se puede presentar un cambio radical en los niveles relativos de ellos(77). El TIMP-2 inhibe a la gelatinasa A y B con mayor actividad que el TIMP-1 (39) aunque también puede tener actividad inhibitoria sobre otros precursores y enzimas activas, como la matrilisina, colagenasa 1, estromelisina 1 y MMP-MT 1(88) (22).

Recientemente se identificó un receptor para el TIMP-2, que, coincidentemente, resultó ser un miembro de la subfamilia de las metaloproteasas de membrana, la MMP-MT 1 (85). La MMP-MT1 activada une a la región carboxilo terminal del TIMP-2 con una constante de afinidad de 2.54×10^{-9} M. A su vez, este complejo funciona como otro receptor para la región carboxilo terminal de la gelatinasa A, con una constante menor (0.56×10^{-9} M), pero significativa, que lleva finalmente a

la activación de esta enzima. Es por ello muy interesante que el TIMP-2 pueda funcionar como una especie de adaptador para la activación de la gelatinasa A y como un inhibidor para la misma. Al parecer, la formación de este complejo trimérico sirve como un medio para concentrar a estos elementos y permitir por lo tanto un mayor procesamiento. De esta manera, bajas concentraciones del TIMP-2 inducirían un mayor procesamiento, mientras existan sitios no ocupados de receptor, y por ende una mayor activación de la gelatinasa A. Por el contrario, a mayores concentraciones del inhibidor, se saturarían los receptores y el TIMP-2 libre funcionaría como un inhibidor de la gelatinasa A. (45). Por lo tanto, la activación de la gelatinasa A en la superficie celular es un proceso complejo que requiere de bajos niveles de TIMP-2, síntesis rápida de la MMP-MT 1 de una manera coordinada y seguramente regulada estrictamente (45). Por otro lado, el hecho de que ambas proteínas se coregulen durante el desarrollo apoya el papel de este complejo trimérico en la activación fisiológica de la progelatinasa A(8). Se ha propuesto que existen otros receptores para el TIMP-2, aunque esto no ha sido comprobado (101). Además, no se excluye que otras metaloproteasas puedan, en distintos tipos celulares o procesos fisiológicos, activar a la

progelatinasa A unida al TIMP-2, como en el caso de la estromelisinina 1 (53).

En general, el TIMP-2 es una proteína que se expresa de manera constitutiva y no es regulable por los factores que normalmente estimulan o reprimen a las metaloproteasas de matriz o a sus inhibidores. Esto es apoyado por la estructura de su promotor, característico de un gen constitutivo, con alto contenido de GC, incluso una isla CpG, y metilación variable, que al parecer no juega un papel en su expresión (21). Una excepción a esta regla es el TGF- β , que regula negativamente al TIMP-2 en líneas celulares de melanoma, fibrosarcoma y fibroblastos de pulmón fetales (83). Sin embargo, existen reportes contradictorios en otras líneas celulares. En trofoblasto, el TIMP-2 es inducido por esta citocina (33), mientras que en cartílago no hay modulación de la expresión (98). Este fenómeno parece también depender de la combinación de estímulos que recibe la célula, dado a que ha sido demostrado que la exposición conjunta de hepatocitos de rata a dexametasona, prostaglandina E2 y varias citocinas, lleva a la sobreexpresión de TIMP-2 (72).

El TIMP-2 también posee una serie de actividades adicionales a su capacidad inhibitoria de MMPs. Al igual que el TIMP-1, posee actividad potenciadora de la eritropoyesis (84). Asimismo, promueve la

proliferación de células de fibrosarcoma por un mecanismo dependiente de la activación del segundo mensajero AMPc (19), así como de células de sistema linfohematopoyético a concentraciones con un orden de magnitud menores que el TIMP-1 (38) y de células epiteliales de córnea (73). Por el contrario, en células microvasculares endoteliales es capaz de inhibir la proliferación inducida por bFGF (54). Estos resultados contradictorios pueden explicarse por diferencias entre distintos tipos de tejidos, además de por la presencia o ausencia de cofactores endógenos o exógenos en los medios utilizados. Se ha demostrado que en ausencia de cualquier cofactor, el TIMP-2 inhibe la proliferación, mientras que adicionando cofactores como la insulina, promueve el crecimiento (63). De manera interesante, el TIMP-2 puede tener un papel en la modulación a la respuesta de citocinas, ya que es capaz de modular la transducción de la vía del factor de necrosis tumoral (TNF- α) al inhibir el desprendimiento fisiológico de su receptor (shedding), activando por tanto su vía (50). Dada la capacidad que tiene la matriz extracelular para modular diversos procesos celulares, no es de extrañar que la sobreexpresión de TIMP-2, que lleva a la acumulación de matriz, sea capaz de inducir adhesión y migración celular e inhibir la angiogénesis (67). Es también interesante

destacar que el TIMP-2 puede proteger a diversas células de la apoptosis (89).

TIMP-3

El TIMP-3 es una proteína que se asocia a la matriz extracelular en cuanto se secreta, posee 188 residuos y un peso molecular de 21 kDa. Posee un sitio potencial para glicosilación (residuos 196-198) pero no existe evidencia de que se encuentre glicosilada in vivo. Presenta un solo transcrito de 4.5 kilobases cuya distribución semeja a la del TIMP-2 (49). De manera similar al TIMP-1, el TIMP-3 es idéntico a otra proteína clonada denominada mig-5, un gen inducible por mitógenos que se induce a la mitad de la fase G1 del ciclo celular (94).

El TIMP-3 puede inhibir, por lo menos en ensayos in vitro, a la colagenasa 1, estromelisina 1 y gelatinasa A y B (7). No existen estudios mecanísticos más elaborados.

A diferencia del TIMP-2, TIMP-3 es regulable por diversos estímulos y durante el desarrollo (6). Es inducido por HGF (12), PDGF y TGF- β , solos o en combinación (27), glucocorticoides (47) y reprimido por IL-1 (40).

Al igual que los otros miembros de la familia, el TIMP-3 posee actividades adicionales a su capacidad para inhibir a las metaloproteasas. En particular, no se ha reportado algún efecto sobre la proliferación, aunque es capaz de inducir la síntesis de ADN, sin producir crecimiento. Este fenómeno se debe a la capacidad de esta proteína para inducir apoptosis posterior a esta inducción de síntesis (9). El efecto apoptótico ha sido reportado en otras líneas celulares (2,81). Al parecer este efecto parece estar mediado por la capacidad del TIMP-3 de inhibir a la enzima responsable de producir el desprendimiento del receptor para el TNF- α , permitiendo así un mecanismo autócrino que lleva a la muerte (81). Al igual que los otros miembros de la familia, su capacidad para inhibir a las metaloproteasas permite que participe en procesos de migración, adhesión y angiogénesis (15,31,5).

TIMP-4.

Esta proteína soluble de 225 aminoácidos con un peso molecular de 22 kDa se expresa principalmente en corazón, cerebro, ovario y músculo esquelético (34,48,96). Dado a que fué clonado muy recientemente, se conoce poco acerca de su función y regulación. En particular, esta proteína es capaz de inhibir a la gelatinasa A, de manera similar al TIMP-2.

Es indudable la relevancia que poseen los TIMPs en diversos procesos fisiológicos y patológicos, en los que la remodelación de la matriz interviene, por lo que es importante el estudio de los mismos. El cobayo es un animal que posee muchos beneficios como modelo de distintas patologías, en particular las pulmonares, debido a su fácil manejo, tamaño y parecido con el ser humano. Por estas razones, la presente tesis se encaminó a la clonación y caracterización del TIMP-2 de cobayo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Clonar y caracterizar al inhibidor tisular de la metaloproteasas 2 (TIMP-2) de cobayo

OBJETIVOS PARTICULARES

- Producir una biblioteca de ADNc de pulmón de cobayo.
- Aislar el ADNc del TIMP-2 a partir de esta biblioteca.
- Secuenciar el ADNc y comprobar que se trata del TIMP-2.
- Verificar la actividad de este gen mediante la producción de proteína recombinante.
- Caracterizar la expresión en distintos tejidos del cobayo.
- Analizar la regulación *in vitro* de su expresión mediante distintas hormonas y factores de crecimiento, así como en un modelo patológico *in vivo*.

MATERIAL Y METODOS

Obtención de ARN total.

El ARN fué extraído utilizando la técnica de Chomczynski y Sacchi (16), utilizando un reactivo comercial (TRIZOL, Gibco BRL). Brevemente, en el caso de tejidos 100 mg de estos fueron homogenizados mediante un politrón en 1 ml de TRIZOL y para los casos en los que se utilizaron células en cultivo, estas se lisaron directamente (1×10^6 células en un mililitro de TRIZOL). Las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente agregándose 200 μ l de cloroformo, para ser agitadas durante 15 segundos e incubadas a temperatura ambiente durante 3 minutos. Posterior a una centrifugación a 12 000 x g durante 15 minutos a 4 ° C. se recuperó la fase acuosa y se precipitó con un volumen de isopropanol. Los botones se lavaron con etanol al 70% y se disolvieron en TE. Se midió la absorbancia a 260/280 nm con el fin de cuantificarlo y verificar su calidad (v.g. rel 260/280 menores a 1.8 no fueron usadas). El ARN fué sometido a electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa (formaldeído-MOPS) para finalmente ser transferido a membranas de nylon cargadas (hybond-N+, millipore).

Obtención de ARN mensajero.

Oligo(dt) celulosa (50 OD 260 unidades/g) se hidrató con tres lavados en TES (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1% SDS) a temperatura ambiente y fue resuspendida a una concentración final de 100 mg/ml. El ARN total se aforó a un volumen final de 600 μ l en TES , se calentó a 65 ° C durante 5 minutos y se enfrió en hielo. Se agregó 1/10 de volumen de NaCl y 600 mg de la celulosa oligo dt hidratada, se incubó durante 10 minutos a 37 ° C con agitación suave. La muestra se centrifugó a 12 000 x g a temperatura ambiente durante 5 minutos. El botón se lavó con Na-TES y se volvió a centrifugar. Se agregaron 400 μ l de agua libre de ARNasas y se incubó nuevamente a 55 ° C durante 5 minutos para eluir en ARNm. El paso de elución se repitió 5 veces recolectando cada vez el sobrenadante. A cada fracción se midió la absorbancia a 260/280 nm. Se precipitaron las fracciones con 2.0 M de acetato de amonio y dos volúmenes de etanol al 100%.

Northern Blot.

Para realizar la cuantificación de los transcritos particulares, los ADNc de las genes correspondientes, aislados de los vectores que los contenían, fueron marcados radioactivamente con dCTP³²P, mediante la técnica de "random primer" utilizando un kit comercial (Gibco, BRL o Stratagene).

Después de purificarlos mediante cromatografía por centrifugado, usando sephadex 50, fueron hibridados en condiciones estrictas (68 ° C) a las membranas que contenían los ARN, utilizando solución de hibridación comercial (Stratagene) por 2 horas. Después de lavados estrictos (65-68 ° C), con SDS 0.1 % y SSC 1 % durante 15 minutos y SDS 0.1% y SSC 0.1 % durante 15 minutos (dos veces) las membranas se expusieron de 2 a 48 horas a radiografías hyperfilm (Amersham) con dos intensificadores a - 70 ° C.

Transfecciones.

Células CHO (células de ovario de hamster chino) se crecieron en monocapa con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (v/v), a 37 ° C en una atmósfera de aire/CO₂ (19:1). Se transfectó el plásmido pBK-CMVgTIMP2 (ver adelante), conteniendo el cDNA del TIMP-2 por lipofección (DOTAP), para generar líneas estables se seleccionaron con G418 (geneticinak Gibco, BRL) a 1 mg/ml durante tres semanas. La expresión del gen se verificó con zimografía reversa. El plásmido pBK-CMVgTIMP2 fué obtenido al subclonar todo el ADNc del TIMP-2 de cobayo (clona cm4) en el plásmido pBK-CMV (ver anexos), eliminando previamente el operón lacZ mediante digestión enzimática. El

plásmido resultante coloca al TIMP-2 bajo regulación del promotor mínimo de citomegalovirus, lo cual permite su expresión en células de mamífero.

Southern blot

Se obtuvo ADN de fibroblastos de ratón (NIH), sangre periférica humana, de células JH4 de cobayo y de timo de rata. Para el caso de células en cultivo NIH y JH4 se lavaron con TBS y se resuspendieron en 5-10 volúmenes de TBS frío centrifugándose a 1500 x g durante 10 minutos a 4 ° C. El botón obtenido se resuspendió en TE (pH 8) a una concentración de 5×10^7 células/ml. A continuación se agregó 10 ml de buffer de extracción (Tris.Cl (pH 8.0) 10 mM), 0.1 M EDTA (pH 8.0), 20 µg /ml ARNasa pancreática, 0.5% SDS, y se incubó durante 60 minutos a 37 ° C.

Para obtener el ADN de sangre periférica, se obtuvieron 20 ml de sangre con 3.5 ml de una solución ácido cítrico/dextrosa (ácido cítrico 0.48 g, citrato de sodio 1.32 g, glucosa 1.47 g por cada 100 ml). La sangre se centrifugó a 1300 x g por 15 minutos y se descartó el sobrenadante. El proceso se repitió dos veces más. La capa superior se transfirió a otro tubo y se disolvió en 15 ml de buffer de extracción, incubándose durante 60 minutos a 37 ° C. Para los casos en los que se utilizó tejido para extraer

ADN (timo), se homogeneizaron 100 mg de tejido en 10 volúmenes de buffer de extracción y se incubó como en el caso anterior.

A todas las muestras se les agregó proteinasa K a una concentración final de 100 μg /ml y se incubaron durante 3 horas a 50 ° C, para agregárseles un volumen de fenol saturado con Tris.Cl (pH 8). Los tubos se mezclaron suavemente y se centrifugaron a 5000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se repitió la extracción con fenol cloroformo dos veces más. El ADN se precipitó de la fase acuosa con 0.2 volúmenes de acetato de sodio 10 M y dos volúmenes de etanol, temperatura ambiente, recolectándose la medusa con una pipeta pasteur o por centrifugación a 5000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavó el ADN con etanol al 70% y se disolvió en 1 ml de TE (pH 8.0) por cada 5×10^6 células con agitación durante 12 a 24 horas. Se midió la absorbancia a 260 y 280 nm. Las muestras se consideraron adecuadas si presentaban una relación 260/280 nm mayor de 1.75. Una alícuota se sometió a electroforesis en un gel de garosa al 0.8 % para comprobar la integridad del ADN.

Para la realización del southern blot, 30 μg de cada ADN se aforaron a 900 μl de Tris-Cl 10 mM pH (8.0), y se le agregó 100 μl del buffer para restricción 10X y 30 U de enzima Eco RI o BamHI, con el fin de incubarlos

a 37 ° C durante 2 horas. Las digestiones se purificaron con extracción fenol-cloroformo y se precipitaron con etanol. Después de centrifugar el botón se disolvió en TE y se les agregó 2 µl de solución de carga, se corrieron en un gel de agarosa al 0.7% en 0.5 TBE con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio durante una noche a 10 V. Después de desnaturalizar el ADN en 1.5 mM NaCl y 0.5 N de NaOH con agitación constante durante 45 minutos a temperatura ambiente, el gel se neutralizó por 30 minutos en una solución de Tris pH 7.4 1 M mas 1.5 M NaCl a temperatura ambiente, con agitación. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa por medio de capilaridad, utilizando SSC 10x como buffer de elución. El ADN digerido se fijó a la membrana con luz UV (Stratalinker) durante 30 segundos. Para la hibridación se utilizó una sonda heteróloga (humana) de colagenasa I purificada a partir del plásmido pColasa mediante electroforesis y elución de un gel de agarosa. La sonda fué marcada como se describe en la sección de Northern Blot e hibridada en la misma forma. Los lavados se realizaron de manera poco estricta, iniciando con temperaturas bajas (60 ° C) e incrementándolas después de exposiciones seriadas a radiografías (usando dos intensificadores a -70 ° C), hasta encontrar bandas bien definidas.

Obtención de la biblioteca de pulmón de cobayo.

La biblioteca fué contruída de la siguiente manera:

-Síntesis de la primera hebra de ADNc.

En una reacción de 50 μ l: 5 μ l de buffer de síntesis 10X, 3 μ l de mezcla de nucleósidos (dATP, dGTP, dTTP, y 5-methyl dCTP), 2 μ l de primer de unión (1.4 μ g / μ l) "GAGA" con un sitio Xho I y 18pb de poly(dT) (5'gagagagagagagagagagaactagtctcgagggtttttttttttttttt3'), 1 μ l de Inhibidor de ARNasa, 5 μ g de ARNm, esta mezcla se incubó 10 minutos a temperatura ambiente para permitir que el templete y los primer se alinearan. Para iniciar la transcripción se le agregaron 1.5 μ l de MMLV-RT (50 U/ml). En un tubo separado se transfirió 0.5 μ l de la mezcla de reacción y se le agregó 0.5 μ l de 32 P dATP (800 Ci/mmol) para usarse como control de calidad de la síntesis de la primera hebra de ADN. Se incubaron durante 60 minutos a 37 ° C. La reacción control se corrió en un gel de acrilamida y se expuso con una radiografía X-Omat (Kodak).

Síntesis de la segunda hebra y producción de extremos romos. La reacción de la primera hebra se puso en hielo y se le agregó 20 μ l del buffer 10X de la segunda hebra, 6 μ l de nucleósidos, 113.9 μ l de agua estéril pretratada con DEPC) y 2 μ l de 32 PdATP (800 Ci/mmol), 2 μ l de ARNasa H (1.5 U/ μ l) y

11.1 de ADN polimerasa I (9.0 U/ μ l). Se incubó la reacción durante 2 1/2 horas a 16 ° C y se le agregó 23 μ l de dNTP y 2 μ l de ADN polimerasa Pfu para incubarse durante 30 minutos a 72 ° C con el fin de rellenar los extremos. Se agregó a continuación acetato de sodio a una concentración final de 3M y 200 μ l de fenol (pH 7)-cloroformo [1:1 v/v] para agitarse con vórtex. Se centrifugó a 8000 rpm brevemente y la fase acuosa se transfirió a un tubo, se agregó un volumen de cloroformo, se agitó y centrifugó; la fase acuosa se precipitó con acetato de sodio 3M (20 μ l) y 400 μ l de etanol al 100%. El ADN así obtenido se precipitó a -20 ° C durante una noche y se centrifugó a 10 000 durante 60 minutos a 4 ° C con el fin de recuperarlo. Finalmente se descartó el sobrenadante radioactivo y se lavó el botón en 500 μ l de etanol al 70% (v/v).

Ligación de los adaptadores Eco RI. El botón se resuspendió en 9 μ l de adaptadores Eco RI y se incubó a 4 ° C durante 30 minutos. Se tomó una alícuota de 1 μ l para análisis por electroforesis de la síntesis de la segunda hebra. A los 8 μ l restantes se les agregó: 1 μ l de buffer de ligasa 10X, 1 μ l de rATP 10 mM, 1 μ l de Ligasa de ADN T4 (4 U/ μ l), se incubó a 8 ° C durante una noche y a 4 ° C durante dos días . Para inactivar la ligasa se incubó a 70 ° C durante 30 minutos.

Defosforilación de los extremos Eco RI. La reacción se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente durante 5 minutos y se le agregó: 1 μ l de buffer de ligasa 10X, 2 μ l de rATP, 6 μ l de agua estéril, y 1 u de polinucleótido cinasa T4 (10 U/ml), se incubó a 37 ° C durante 30 minutos y se calentó a 70 ° C por 30 minutos más, para dejarse enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Digestión Xho I. A la reacción se le agregó 28 μ l de buffer de XhoI y 3 μ l de enzima XhoI (40 U/ml) y se incubó 1.5 horas a temperatura ambiente. A continuación al ADN se le agregaron 5 μ l de buffer STE para someterse a cromatografía en una columna de sefacril S-500, con el fin de seleccionar producto de más de 500 pares de bases.

Separación por la columna de sefacril S-500. El ADN se colocó en la columna que se centrifugó a 400 g durante 2 minutos (fracción 1), se agregaron 60 μ l de buffer STE a la columna y se recolectó la segunda fracción, se agregó 60 μ l más de STE a la columna y se recolectó la tercera fracción por centrifugación a 400 x g. De cada fracción se sometieron a electroforesis 5 μ l en un gel de acrilamida no desnaturalizante al 5%.

Cada fracción se purificó con un volumen de fenol-cloroformo (1:1 v/v) y después de centrifugar y recuperar la fase acuosa se le agregó un volumen de cloroformo, se centrifugó y se volvió a recuperar la fase acuosa, la cual se precipitó finalmente con un volumen de etanol al 100% durante una noche a -20°C .

Ligación del ADNc en el vector Uni-ZAP XR. A esta reacción se agregaron: 1 μl de vector Uni-ZAP XR (1 μg), 1.6 μl de ADNc (100 ng), 0.5 μl de buffer de ligasa 10X, 0.5 μl de rATP 10 mM pH 7.5, 9 μl de agua y 0.5 μl de ADN ligasa T4. Paralelo a esto se realizó una ligación control con 0.4 μg de inserto control. Se incubó la reacción a 12°C una noche y a 4°C durante dos días. El producto se utilizó para empaquetamiento *in vitro*.

Empaquetamiento. 5 μg de ADN ligado se mezclaron con una alícuota del extracto de empaquetamiento. se incubó a 22°C durante 2 horas, se agregó 500 μl de buffer SM y 20 μl de cloroformo. La reacción empaquetada se centrifugó brevemente para eliminar los restos y el sobrenadante conteniendo los fagos se tituló.

Titulación de fagos. A un microlitro y a un microlitro de una dilución 1:10 de la reacción de empaquetamiento se les agregó 200 μ l de células XL-1 Blue MRF' (DO 600=0.5), y se incubaron a 37 ° C durante 15 minutos. Inmediatamente después se les agregó 2-3 ml de top agar NZY (48 ° C), 15 μ l de IPTG 0.5 M (en agua), y 50 μ l de X-gal [250 mg/ml (en DMF)], se sembraron sobre cajas con agar NZY previamente gelificadas y se incubaron durante a 37 ° C. Las placas blancas fueron de 10 a 100 veces más numerosas que las azules ($<1 \times 10^5$), las cuales representan el ruido de fondo, por lo que la ligación se consideró exitosa.

Tamizado de la biblioteca

En cajas de 150 mm con NZY agar se sembraron 50,00 pfu (unidades formadoras de placa) con 600 μ l de células XL-1 Blue (Stratagene) (a una OD 600 de 0.5) por caja y 6.5 ml de Top agar de NZY por caja. Las cajas se crecieron a 37 ° C una noche, se enfriaron durante 2 horas a 4 ° C y a cada una se le colocó una membrana de nitrocelulosa dos minutos, orientándose debidamente mediante marcas con agujas estériles. El ADN en las membranas se desnaturalizó durante dos minutos en solución de desnaturalización (1.5 M NaCl y 0.5 NaOH), se neutralizó en 1.5 M de NaCl y 0.5 M de Tris-HCl pH 8 durante 5 minutos. Finalmente se lavaron

en 0.2 M de Tris-HCl pH 7.5 y 2xSSC durante 30 segundos. El ADN se fijó a las membranas con luz UV (Stratalinker) a 120 000 uJ de energía por 30 segundos. Las membranas se hibridaron usando diversas sondas de ADNc radiactivas, como se indica en resultados y después de lavarlas y exponerlas se recolectaron las clonas positivas con ayuda de un bisturí. Estas clonas se disolvieron en 1 ml de STEM, se titularon en placas de 100 mm, y se repitió el tamizado de dos a tres veces mas siguiendo el mismo procedimiento.

Secuenciación manual.

El templete de doble hebra se desnaturalizó, agregándose 2 µl de buffer de reacción y 1 µl de primer T3 o T7 (correspondientes a sitios ubicados en los extremos 5' y 3' del inserto) en un volumen de 10 µl y calentándose a 65 ° C durante 2 minutos para enfriarse lentamente a <35 ° C por 30 minutos con el fin de que ocurra la alineación. Después se agregó 1 µl de DTT 0.1 M , 2 µl de mezcla de marcaje y 0.5 µl de [³⁵S] dATP y 2 µl de polimerasa secuencasa diluida. Se transfirieron 3.5 µl de la mezcla de marcaje a cada tubo de terminación, los cuales contienen 2.5 µl de mezcla de terminación (A,C,T,G) precalentados a 37 ° C, para incubarse a 37 ° C durante 5 minutos. La reacción se detuvo por adición

de 4 μ l de solución de paro. Se calentaron a 75 ° C durante 2 minutos antes de cargarlos en un gel desnaturalizante de secuenciación al 5 %.

PCR degenerados. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se usaron los siguientes oligonucleótidos degenerados:

734 5' CCNCGNTGTG(TC)GGNGTN \dot{C} CNGA 3'

735 5' TGNCC(AG)AA(TC)TC(AG)TGNGCNGNAC 3' (29)

Y35 5' CCI(AC)GITG(CT)GGI(AG)(AT)ICCIGA 3'

Y36 5' TGICCIA(ATG)(CIT)TC(AG)TGI(AG)CIGC 3' (97)

que fueron diseñados para las secuencia propeptídica y para el sitio catalítico los cuales están conservados en todas las metaloproteinasas. Las reacciones se realizaron en un volumen de 50 μ l compuesto de 10 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM Tris-HCl pH (8.8), 10 mM KCl, 2 mM MgSO_4 , 0.1% Tritón X-100, 0.2 μ M de cada oligonucleótido, 0.8 mM dNTP, y 1 U de Taq, Ultra, o Pfu polimerasa. La Reacción de Transcriptasa Reversa-PCR (RT-PCR) se realizó partiendo de ARN total o ARN mensajero. La primera hebra de ADNc se transcribió en 20 μ l de 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.05 M KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 μ M de cebadores al azar, 4 mM dNTP y 1 U/ μ l de transcriptasa reversa. La reacción se incubó a 42 ° C durante 30 minutos.

Después se utilizó el ADNc para realizar la PCR en un volumen de 100 μ l por 30-40 ciclos a 95 ° C por un minuto, 50 ° C por un minuto y a 72 ° C por 1 minuto (las temperaturas de alineación variaron con respecto a cada uno de los cebadores usados, así como las concentraciones de $MgCl_2$ y en ocasiones los tiempos de extensión). Los productos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa 1 % en TBE o TAE. Para la clonación de estos productos, amplicones obtenidos como se describe utilizando las enzimas Pfu o Ultma, fueron fosforilados, purificados en geles de agarosa mediante un kit comercial (GeneClean, BIO 101), y ligados al vector pBK-CMV linearizado con Sma I y defosforilado previamente en una reacción que incluía 1 unidad de enzima ligasa de ADN T4, PEG 8000 al 4% y 1 mM de ATP en el buffer de reacción adecuado por 18 horas a temperatura ambiente. Las clonas positivas fueron seleccionadas en cajas petri con medio LB-agar conteniendo kanamicina, X-gal e IPTG. Las clonas blancas poseen insertos que rompen con el marco de lectura de la β -galactosidasa, a diferencia de las clonas azules que poseen completo el marco y pueden procesar al X-gal.

RACE.

Esta técnica está encaminada a la obtención de extremos 5' y 3' desconocidos a partir de una secuencia de ADNc conocida. En el caso presente se utilizó el kit de clontech (marathon cDNA amplification kit), según las instrucciones del proveedor, con algunas pequeñas modificaciones que se señalan a continuación. Para este fin se diseñaron cebadores complementarios a porciones 5' y 3' del fragmento inicialmente clonado del TIMP-2.

- 1) ggatcatggggcagcgcgatcttg
- 2) ccagtccatccagaggcactcatcggg

El primer paso fué sintetizar ADNc de doble hebra. Para este fin se aisló ARN total a partir de células JH4 (línea establecida de fibroblastos de pulmón de cobayo), mediante el método de Chomczynski y Sacchi (16). A partir de este ARN se purificó ARN mensajero utilizando columnas de oligodT- celulosa. La integridad del ARN se comprobó en cada paso usando geles desnaturalizantes de formaldehído. La síntesis de la primera hebra se realizó usando el cebador TTCTAGAATTCAGCGGCCGC(T)₃₀ que posee una cola de poliT capaz de hibridar con la cola de poliA de los mensajeros o en su defecto un primer específico de los mencionados

anteriormente. En la reacción se utilizó 1 μg de ARN total, 10 picomoles del primer, 10 μM de deoxinucleótidos, buffer 1x para la enzima, 500 μCi de dCTP marcado radioactivamente con fósforo 32 en alfa, con el fin de seguir el producto de la síntesis y transcriptasa reversa (MMLV) (100 unidades). Después de la incubación a 42 ° C por 1 hora, la reacción se detuvo y se procedió a la síntesis de la segunda hebra, siguiendo un proceso similar al descrito en el punto de elaboración de biblioteca (ver arriba). El ADNc de doble hebra fué rasurado y ligado a adaptadores fosforilados en el extremo 5', mediante el uso de T4 ADN ligasa. El adaptador permite un PCR supresivo. El ADN así obtenido es purificado, y sometido a electroforesis en gel de agarosa para comprobar, mediante autoradiografía, el éxito de la síntesis y la eficiencia de la misma.

Modelo de hiperoxia en cobayo

Grupos de tres a cinco cobayo se expusieron en una cámara húmeda a oxígeno al 100%. Mediciones repetidas demostraron que la concentración de este fué mayor al 95%. A diversos tiempos después de iniciada la exposición, los cobayos fueron anestesiados con fenobarbital y sacrificados. La traquea fué canalizada y los pulmones lavados con 10 ml de solución salina en dos ocasiones. El líquido obtenido fué centrifugado a

1500 x g durante 5 minutos para obtener las células, que fueron fijadas para conteo. El sobrenadante se filtro por una gasa y congeló a -70°C hasta su uso.

Determinación de la relación peso húmedo/seco: Un lóbulo del pulmón fué pesado y sometido a desecación por 5-6 días, hasta que dos determinaciones del peso coincidieron. La relación entre la primera medición y la última representa la cantidad de líquido en el mismo.

Determinación de proteína de lavado bronquioalveolar La proteína en el lavado fué determinada por triplicado mediante la técnica de Bradford utilizando una curva de albúmina.

Zimograma de gelatina.

Alícuotas de 10 μl de lavado bronquioalveolar concentrado 10 veces mediante secado y centrifugación (speedvac) o en su defecto 5 μg de proteína de tejido pulmonar se sometieron a electroforesis en geles de zimograma. Los geles de zimografía contienen 1 mg/ml de gelatina desnaturalizada en acrilamida al 7% conteniendo SDS. Después de la electroforesis, los geles se lavaron dos veces en una solución de 2.5% de tritón y 50 mM de Tris-Cl pH 7.0, para ser incubados toda la noche en una solución de 50 mM Tris-Cl pH 7.0 y 5 mM de CaCl_2 . Los geles se tiñeron

con azul de Coomasie después de ser fijados. Como estándares se usaron 10 μ l de medio condicionado de fibroblastos humanos (MMP-2) o 0.1 μ l de medio condicionado de células de osteosarcoma U2OS (MMP-9).

Zimograma reverso.

Se sometieron a electroforesis 25 μ l de medio condicionado de 24 horas por células CHO transfectadas con un vector de expresión conteniendo el ADNc de gTIMP-2 o su control sin ADNc alguno. El gel utilizado fue desnaturalizante de acrilamida al 12% conteniendo 1 mg/ml de gelatina y una mezcla de gelatinasa A y B humana purificadas de sobrenadante de cultivos (Chemicon). Después de correr el gel en 25 mM Tris, 250 mM de glicina y 0.1 % de SDS, se lavó a temperatura ambiente en 2.5% de tritón X-100, 5 mM CaCl₂, 50 mM Tris/HCl pH 7.5 por una hora. Después de lavar el gel con agua destilada se incubó por 24 horas a 37 ° C en 5 mM CaCl₂, 50 mM Tris/HCl pH 7.5 y se tiñó con azul de Coomassie.

Cultivo Celular

Las células JH4 fueron cultivadas en medio mínimo esencial de Dulbecco, con 10% de suero fetal bovino y 5% CO₂. Para los experimentos mencionados en la tesis, se sembraron células al 90% de confluencia en cajas de 12 o 24 pozos, se dejaron reposar toda la noche para ser

incubadas con los factores requeridos por 24 horas más. Estos fueron: PMA, TGF- β , dexametasona, TNF, H₂O₂, NAC, IL-1 β , HGF y EGF.

RESULTADOS

-Elaboración de la biblioteca de ADNc de pulmón de cobayo.

Para este fin se utilizaron 5 μ g de ARN mensajero purificado mediante columnas de oligodT-celulosa, a partir de pulmón adulto de cobayo, según lo mencionado en material y métodos. El vector utilizado para la construcción fué lambda-zap, un derivado de lambda que posee dentro de su secuencia al plásmido pbluescript sk-, el cual puede ser rescatado mediante excisión controlada por un fago ayudador. Para la construcción se utilizó una estrategia de clonación en la que los ADNc se clonan de manera orientada (5' a 3'). El tamaño de la biblioteca no amplificada fué de 2.5×10^5 pfu (unidades formadoras de placas), al ser tituladas en una cepa permisiva.

-Tamizado de la biblioteca

Para este fin, la cepa XL-Blue 1 MRF' de E. coli fué infectada con 5×10^5 pfu de la biblioteca, para ser sembradas en cajas petri de 150 mm (5×10^4 pfu por caja). Después de la aparición de las placas se obtuvieron réplicas (lifts) en filtros de nitrocelulosa de cada una de ellas. El ADN en estos

incubadas con los factores requeridos por 24 horas más. Estos fueron: PMA, TGF- β , dexametasona, TNF, H₂O₂, NAC, IL-1 β , HGF y EGF.

RESULTADOS

-Elaboración de la biblioteca de ADNc de pulmón de cobayo.

Para este fin se utilizaron 5 μ g de ARN mensajero purificado mediante columnas de oligodT-celulosa, a partir de pulmón adulto de cobayo, según lo mencionado en material y métodos. El vector utilizado para la construcción fué lambda-zap, un derivado de lambda que posee dentro de su secuencia al plásmido pbluescript sk-, el cual puede ser rescatado mediante excisión controlada por un fago ayudador. Para la construcción se utilizó una estrategia de clonación en la que los ADNc se clonan de manera orientada (5' a 3'). El tamaño de la biblioteca no amplificada fué de 2.5×10^5 pfu (unidades formadoras de placas), al ser tituladas en una cepa permisiva.

-Tamizado de la biblioteca

Para este fin, la cepa XL-Blue 1 MRF' de E. coli fué infectada con 5×10^5 pfu de la biblioteca, para ser sembradas en cajas petri de 150 mm (5×10^4 pfu por caja). Después de la aparición de las placas se obtuvieron réplicas (lifts) en filtros de nitrocelulosa de cada una de ellas. El ADN en estos

filtros fué desnaturalizado y fijado a las membranas para posteriormente ser hibridados. Para este fin, el ADNc del TIMP-2 humano, purificado por medio de elución a partir de geles de agarosa a partir del plásmido pGEX-hTIMP 2 , fué marcado radioactivamente, por medio de la técnica de marcaje por cebadores aleatorios (random primer). Los filtros fueron hibridados con esta sonda marcada en las condiciones mencionadas en material y métodos. A continuación los filtros fueron lavados en condiciones poco estrictas, debido a la naturaleza heteróloga de la sonda y expuestas a radiografías (Figura 2).

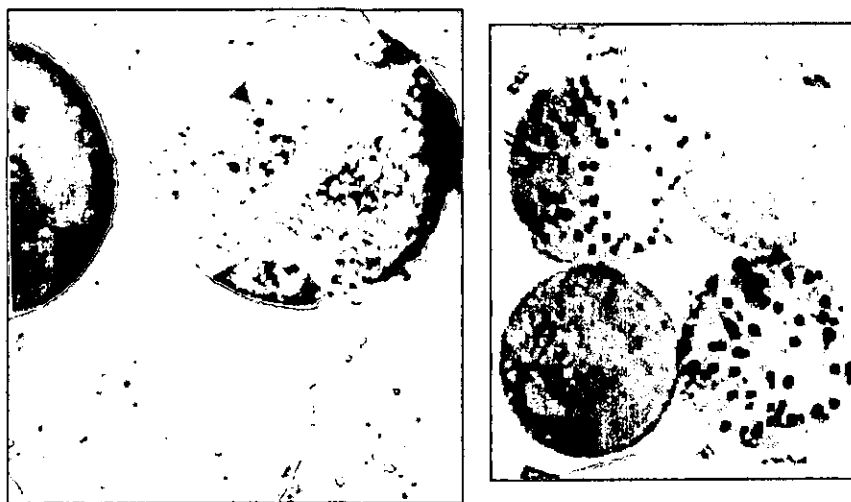


Figura 2. Autorradiografías de los tamizados primario (panel izquierdo) y terciario (panel derecho) del TIMP-2 de cobayo. Las flechas señalan clones positivos.

En este primer tamizado fué posible encontrar 5 placas positivas. Estas placas fueron aisladas, eluidas, tituladas y sembradas en cajas de 100 mm (5×10^3 pfu x placa) para un segundo tamizado, con el fin de enriquecer el material, realizado en las mismas condiciones que en el primario. En este tamizado se perdieron 3 de las clonas. El proceso es repetido dos veces más (tamizado terciario y cuaternario) hasta que el 100% de cada una de las clonas son positivas.

Mediante este procedimiento se aislaron dos clonas, denominadas cm1 y cm2. Estas clonas se sometieron a excisión in vivo, utilizando el fago ayudador. Los plásmidos, conteniendo el ADNc de interés, se propagaron en la cepa XL-Blue 1 de E. coli. Posterior a crecimiento a mediana escala y purificación de estos plásmidos se procedió a caracterizar los ADNc contenidos en ellos.

-Caracterización clonas cm1 y cm2

La digestión de los plásmidos mediante enzimas de restricción (Eco RI y Xho I) permite liberar los ADNc, lo cuales poseen un tamaño de 400 y 600 pares de bases para cm1 y cm2, respectivamente. Utilizando la técnica de secuenciación por dideoxinucleótidos de manera manual, se estableció la estructura primaria de ambas clonas, utilizando cebadores

complementarios a secuencias del plásmido (sitios T3 y T7), a ambos lados del inserto (figura 3).

-Clonación del extremo 5' del ADNc del TIMP-2 de cobayo

Con el fin de obtener el extremo 5' de este ADNc se procede a realizar un PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando la secuencia ya conocida del ADNc y sitios adyacentes del fago/plásmido de la biblioteca en cuestión. Para este fin se diseña un cebador complementario al extremo 5' de la clona más completa (cm1) como antisentido. El cebador sentido se localiza al lado del inserto, siendo el sitio promotor T3. De esta manera es posible amplificar un segmento comprendido entre un fragmento común a todos los fagos de la biblioteca (sitio T3) y el específico al ADNc en estudio. Repetidos ensayos de PCR sólo dieron como resultado amplificaciones de fragmentos de 400-600 pares de bases, lo cual indica que en la biblioteca no se encuentra un ADNc de mayor tamaño que los ya aislados. Por estas razones se procede a realizar un ensayo de RACE, usando ARN mensajero fresco aislado de ARN proveniente de pulmón de cobayo y células JH4 (fibroblastos de pulmón de cobayo).

El RACE (por Rapid Amplification of CDNA Ends) es una técnica de amplificación de extremos 5' o 3' desconocidos. En esta técnica se produce ADNc de doble hebra a partir de una fuente adecuada de ARN

mensajero. A este ADNc con extremos romos se le liga un adaptador que posee un sitio de unión a un cebador específico. Utilizando un cebador sentido o antisentido y el cebador complementario al adaptador, es posible amplificar por PCR la región desconocida. Usando esta técnica con ADNc de doble hebra obtenido de pulmón de cobayo y el cebador descrito antes, no fué posible amplificar un segmento de tamaño adecuado, a pesar de repetidos intentos. Finalmente se intentó mejorar la sensibilidad mediante el uso de cebadores "nested". En este caso, posterior a una amplificación primaria, se realiza una segunda amplificación usando un cebador que localizado dentro de la secuencia preamplificada. Esto teóricamente incrementa la sensibilidad y especificidad. Pese a ello, no fué posible amplificar una región específica. La razón que podría explicar este hecho es la posible presencia de un tramo extramadamente rico en guaninas y citosinas en el extremo 5' del gen de TIMP-2, como en el caso del gen humano y bovino.

Finalmente, para obtener las regiones faltantes, se realizó un tamizado de una nueva biblioteca, obtenida del Dr. Colin Bingle, derivada a partir de ARN mensajero de pulmón de cobayo neonato. Usando las técnicas antes descritas, se obtuvieron dos clonas, denominadas cm3 y cm4. Estas clonas poseen insertos de 3.3 y 3.5 kilobases, respectivamente. Se secuenciaron

los extremos 5' y 3' de ambas clonas mediante métodos manuales, comprobando, en el caso de los extremos 5', de la identidad de las clonas. En el caso de la región 3', no fué posible identificar ninguna región al compararla con la base de datos (Genbank). Se seleccionó la clona cm4, la más larga, para realizar la secuenciación completa mediante métodos automatizados. Para este fin, se utilizó "primer walking", estrategia que consiste en secuenciar una región aproximada de 500 pares de bases, sintetizar un nuevo cebador complementario a la nueva secuencia deducida y volver a realizar la secuenciación, avanzando de esta manera hasta completar la estructura primaria del ADNc. La secuencia final del TIMP-2 de cobayo se muestra en la figura 4. De esta manera se obtuvieron en total cuatro clonas para el mismo gen que comparten, la misma estructura primaria. El ADNc clonado predice un marco de lectura de 663 nucleótidos, que codificarían para una proteína de 220 aminoácidos, con significativas homologías con los TIMP-2 clonados a la fecha (figura 4), con 97.2% identidad y 99% similitud con el TIMP-2 humano, 97.2% de identidad y 98.6% de similitud en el caso de la rata y 96.8% de identidad y 98.6% de similitud con el ratón (figura 5). Asimismo, posee regiones definidas que son características de las proteínas TIMP-2 (24), incluyendo la secuencia DVGGKKEY (residuos 82-89) y la inserción NDIYGN (residuos

59-64). Como se comentó, el extremo 5' posee un tramo rico en guaninas y citosinas (78%), lo cual podría explicar la dificultad para aislar este fragmento por medio de RACE. Asimismo, las clonas más largas poseen un gran segmento 3' no traducido (2641 pares de bases en el caso de la clona más larga). Aunque este segmento de ADNc no ha sido clonado en otras especies, su estructura general y tamaño concuerda con el del gen del TIMP-2 humano (37), en el cual se presentan 5 señales de poliadenilación, dos de las cuales coincidirían con los extremos 3' de los cuatro ADNc clonados en el presente trabajo.

atctggcacgagcctgcccggagccgctcgcctgcccgcccccaccgctttcttgcggccgcccgcgctgc
 cgcccagaagctgccccagcgggtgccctagccgctccgaaagccccggggagaaagtttgccgcccgc
 tcgggggaggtgagagggggcgtgccgccccgccgacccccggcccgc

1 Met Gly Ala Thr Ala Arg Ser Leu Arg Leu Ala Leu Gly Leu Leu Leu Leu Gly
 1 atg ggc gcc aag gcc cgc cgc ctg cgg ctg gcg cta ggc ctg ctg ctc ctg ggg
 19 Thr Leu Pro Arg Gly Ala Asp Ala Cys Ser Cys Ser Pro Val His Pro Gln Gln
 55 acc ctg ccg cgc gga gcc gac gcc tgc agc tgc tcc ccg gtg cac ccg caa cag
 37 Ala Phe Cys Asn Ala Asp Val Val Ile Arg Ala Lys Ala Val Ser Glu Lys Glu
 109 gcg ttt tgc aat gcg gac gta gtg atc agg gcc aag gcg gtc agt gag aag gag
 55 Val Asp Ser Gly Asn Asp Ile Tyr Gly Asn Pro Ile Lys Arg Ile Gln Tyr Glu
 163 gta gac tct ggg aac gac atc tat ggc aac ccc atc aag agy atc cag tac gag
 73 Ile Lys Gln Ile Lys Met Phe Lys Gly Pro Glu Lys Asp Ile Glu Phe Ile Tyr
 217 atc aag cag ata aag ttc ttc aaa gga cct gag aaa gac ata gag ttt atc atc
 91 Thr Ala Pro Ser Ser Ala Val Cys Gly Val Ser Leu Asp Val Gly Gly Lys Lys
 271 aca gcc cct tcc tog gca gtg tgc ggg gtc tcc ctg gnt gtc ggt ggg aag aag
 109 Glu Tyr Leu Ile Ala Gly Lys Ala Glu Gly Asp Gly Lys Met His Ile Thr Leu
 325 gna tat ctc att gca gga aag gcc gag ggg gat ggc aag atg cac atc acc ctc
 127 Cys Asp Phe Ile Val Pro Trp Asp Thr Leu Ser Thr Thr Gln Lys Lys Ser Leu
 379 tgt gac ttc att gtg ccc tgg gac acc ctg agt acc acc cag aag aag agc ctg
 145 Asn His Arg Tyr Gln Met Gly Cys Glu Cys Lys Ile Thr Arg Cys Pro Met Ile
 433 aac cac agy tgc atc ggc tgt gaa tgc aag atc acg cgc tgc ccc atg atc
 163 Pro Cys Tyr Ile Ser Ser Pro Asp Glu Cys Leu Trp Met Asp Trp Val Thr Glu
 487 cca tgc tac atc tcc tcc ccg gat gag tgc ctc tgg atg gac tgg gtc aca gaa
 181 Lys Ser Ile Asn Gly His Gln Ala Lys Phe Phe Ala Cys Ile Lys Arg Ser Asp
 541 aaa agt atc aat ggg cac cag gcc aag ttt ttc gcc tgc atc aag aga agc gac
 199 Gly Ser Cys Ala Trp Tyr Arg Gly Ala Ala Pro Pro Lys Gln Glu Phe Leu Asp
 595 ggc tcc tgt gca tgg tac cgt ggg gcg gca ccc ccc aag cag gag ttt ctt gag
 217 Ile Glu Asp Pro ...
 649 atc gag gac cca taa

gaggcttagacgactgctgtggccaactgagaagcctctaagagtttagactggtccagctc
 tgacatcctttctcggaaacagcatgaataaaaccctcatccaaatgggtcacatcagtgta
 tctgcocctcccattgtccttgtaaaactggtttggtgctggaggagcagtgggccaga
 tgcctctgaccttcccctcccagccgggacccaagtgtctcagttcttgatcctggtggtg
 gcaggggtgggacattcagactcctcccagggcctccttgacacccatcccagaggtggggcg
 gcagcatttaggttcccgctgctgtggttggggcagagcctggaaatgagcattttgcagaaa
 cgtttgaggtcattgtaagactgcgtagcaggcctaccaggtcctcttcacatcctagagggg
 cgtgtccctcactttctgcagcagcacctctctggtctaggttggcagtcctcctcttga
 agtgccactcactcccctgagccactgtggactccttcaggctccagaagcagccctggacc
 caggggctcatctctagagaagtcccactcagtttacgaatctacaaaatgccagtaggagc
 cctctccgggaccacacagatgtgcagcgaagacaccgctgctgagccagatttcagcttca
 gcaagctctctgcctcccactcccatagccccagctcctctctgggtgtctgtgtggttcc
 ctgcaggacaggtgtctgggaaggagggttgcctcagttgccctcgtagtccacccaaact
 cagttgctcctgcctcctcccacccgacatcggggagctggatgagccacagagctttgct
 tccccaaagcgtcgtgcggttggctggctgtgttccctgtttgcacaaactgaggatgaga
 tgcctggttttgcctcagagcttaataagctctcccctcaaggctgagggctcactatt
 ttgttgggtttctgcaagtgcattagctaaagtgtatgaagcctcaccagggaggtgagc
 agcttgcgtgacacttttgagttcttctggcctctaggatgctgtgagcctgttttaagagc
 atctcagtttcttaagataatctcttagataatgtgtgaacgcaagctgaggtttgccaaga
 tgcctctctgttctctacgtcacaaagattaccatttaagacacagggaaactagggaaact
 acctatcccaggaataatgtttctgatccaataccatgggagttcacacatgcaagaactc
 ccagttaccaacacagagaaactctgcttctcctcttaccaatgttgaagaatagggctctct
 gaacacaaacacacacatgcacacagacacacacactatgtaaacacatgtagtgtgcaaac
 aatgcaagaaa tctgcagccagggatggccctctgcaaaatgcttcccagtgccatctct
 ctaagcctgtttatctcgaaaaaactgaagactcctgacccccagtgggcagcagccct
 atgccctctgggacctggtcagcacagaatgtgatgacttccccttcccaggacaaactgggag
 actatccaggaatcaactcctgcctgagggcacttcaatgctgtacagtgatgaaagtgtg
 tgagatgtcataatggaccagttccatgtgatttcagatataaccaccaccagacccccgc

```

ccatcaatatagcaccctgccctgtagcttccctgtaggtgatatcatatgtaacatttgc
cctgtttctgctgactcctgaaatgttttgggttatcttgacatccgctgtgatcattcctg
tgcgtgtttttattacccttgatagctgttagacttgcacttccgagacacggttactgca
tcaaggaagcatctgaccocagagtggaaggcgtggcgtggtagctggcctgtgacagtggatc
ccttctaaatctttctttgggtccctgactatctttgcttttccctgctcccatTTTTGGTTT
cgggttcaaattattacaaggaaagaacctctgagtggtttgggttctaaaagtggccttta
tattcagctctgcacacactggcttcttaaccaggctgagcagcaggagacaacaagacctat
caagaggaagtgccagtggcagctgagagggacggccactcaaacaccttcacagtaagAAC
tgccacacgcatagtgtgagaagtatctccatctggcctgtttaattatgtgttctatcct
aagcaccactcttttctccctctatcttctcatgcaagcaactcaaaatatttAAAAA
tgaagtttacattgtagttgttttAAAAatctttgcttgataagtattaaggaatattggact
ctccgcataaattaaagctttgttgattctgtctgttttgggttgattttgttgtttgtc
tgtggggtagcaatgtgttcatgctggaatatgaagtctgagaccctggcccgagctggaa
ccatgagagtgttgaaatcaacaagcagactgcccagatgtctgagctttgttcat

```

Figura 4. Secuencia completa consenso del TIMP-2 de cobayo. La flecha indica el extremo nativo predicho de la proteína secretada. La secuencia DVGGKKEY que caracteriza al TIMP-2 se encuentra subrayado. Asimismo, la inserción NDIYGN, que es típica del TIMP-2 en otras especies se encuentra sobre doble línea.

Cobayo	MGATARSLRLALGLLLLLGTLPARGADACSCSPVHPQQAFCNADVIRAKAV
humano	MGAAARTLRLALGLLLLLATLLRPADACSCSPVHPQQAFCNADVIRAKAV
ratón	MGAAARSLRLALGLLLLLASLVRPADACSCSPVHPQQAFCNADVIRAKAV
rata	MGAAARSLRLALGLLLLLATLLRPADACSCSPVHPQQAFCNADVIRAKAV
	.*.*.**.*.******
Cobayo	SEKEVDSGNDIYGNPIKRIQYEIKQIKMFKGPEKDIEFIYTAPSSAVCGV
humano	SEKEVDSGNDIYGNPIKRIQYEIKQIKMFKGPEKDIEFIYTAPSSAVCGV
ratón	SEKEVDSGNDIYGNPIKRIQYEIKQIKMFKGPKDIEFIYTAPSSAVCGV
rata	SEKEVDSGNDIYGNPIKRIQYEIKQIKMFKGPKDIEFIYTAPSSAVCGV
	*****.*****
Cobayo	SLDVGGKKEYLIAGKAEGDGKMHITLCDFIVPWDTLSTQKKS LNHR YQM
humano	SLDVGGKKEYLIAGKAEGDGKMHITLCDFIVPWDTLSTQKKS LNHR YQM
ratón	SLDVGGKKEYLIAGKAEGDGKMHITLCDFIVPWDTLSTQKKS LNHR YQM
rata	SLDVGGKKEYLIAGKAEGDGKMHITLCDFIVPWDTLSTQKKS LNHR YQM

cobayo	GCECKITRCPMIPCYISSPDECLWMDWVTEKSINGHQAKFFACIKRSDGS
humano	GCECKITRCPMIPCYISSPDECLWMDWVTEK NINGHQAKFFACIKRSDGS
ratón	GCECKITRCPMIPCYISSPDECLWMDWVTEKSINGHQAKFFACIKRSDGS
rata	GCECKITRCPMIPCYISSPDECLWMDWVTEKSINGHQAKFFACIKRSDGS

cobayo	CAWYRGAAPPKQEFLDIEDPX
humano	CAWYRGAAPPKQEFLDIEDPX
ratón	CAWYRGAAPPKQEFLDIEDPX
rata	CAWYRGAAPPKQEFLDIEDPX

Figura 5. Alineación de secuencia peptídica predicha de TIMP-2. A la izquierda se muestran las especies alineadas. * identidad. . similitud

-Expresión del Timp-2 en tejidos

Utilizando el ADNc de Timp-2 clonado como sonda, se procedió a realizar un ensayo de northern blot en diversos tejidos del cobayo (figura 6). Se presentaron dos transcritos principales, de 3.8 kb y 1.2 kb (este último solo observable mediante sobreexposición), resultado similar al reportado por otros autores. Asimismo, se encontró expresión en todos los tejidos analizados, con excepción de hígado, nuevamente conforme a lo reportado para otras especies (10).

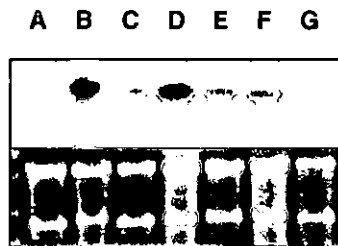


Figura 6: Expresión del ARNm del TIMP-2 en distintos tejidos. A) Cerebro B) Riñón, C) Intestino, D) Bazo, E) Corazón, F) Pulmón, G) Hígado. Panel superior Northern Blot, panel inferior: ARN ribosomal

-Regulación de la expresión del Timp-2 *in vitro*

A continuación se realizó un análisis de regulación de la expresión de este gen en fibroblastos derivados de pulmón de cobayo (línea celular JH4).

Para este fin, estos fibroblastos se expusieron a diversos agentes, conocidos moduladores de la expresión de metaloproteasas de matriz y/u otros TIMPs. Como se muestra en la figura 7, el TIMP-2 presenta una regulación casi constitutiva, regulándose de manera negativa únicamente mediante la exposición al TGF- β .

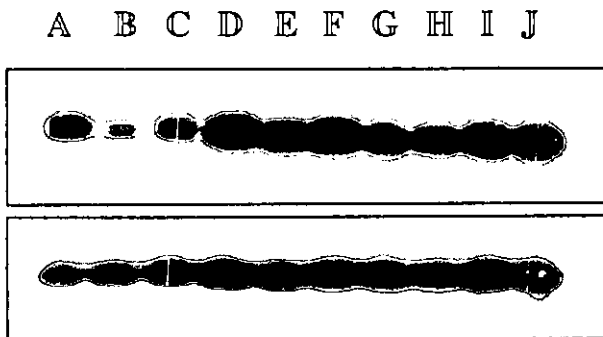


Figura 7. Niveles de RNAm de TIMP-2 detectado por Northern Blot en células JH4 expuestas por 24 horas a diferentes estímulos. El panel superior muestra la señal obtenida después de hibridar con la sonda radioactiva (ADNc) de TIMP-2 y A) Control, B) TGF beta C) TNF alfa, D) IL-1, E) EGF, F) PMA a baja concentración G) PMA a alta concentración H) Dexametasona, I) Peróxido de hidrógeno, J) N-acetil cisteína. Panel inferior muestra la señal con la sonda del 18S ribosomal.

-Expresión del Timp-2 recombinante

Con el fin de comprobar que el ADNc clonado posee realmente actividad como TIMP, el inserto de la clona cm4 fué subclonado en el vector de

expresión eucariote pBK-CMV, al cual se le retiró el promotor y secuencia condificadora para beta galactosidasa. De esta manera, el plásmido obtenido posee la secuencia codificadora para TIMP-2 de cobayo regulada por el promotor del citomegalovirus, así como un gen de resistencia a neomicina (transposón Tn4), lo cual permite seleccionar las clonas positivas mediante geneticina (G418). Esta construcción fué introducido en células CHO-K1 (de ovario de hámster chino) mediante lipofección y seleccionadas por 3 semanas mediante el uso de la geneticina. Al final de este mes células transfectadas con el vector parental únicamente (testigos) y con el vector de expresión del gTIMP-2 se sembraron a idénticas densidades y el medio condicionado obtenido fué sometido a zimograma reverso, como se detalla en materiales y métodos. A pesar de que las células CHO-K1 expresan cantidades significativas de TIMP-2 per se, fué posible encontrar un incremento en los niveles de esta proteína, mediante este ensayo (figura 8).

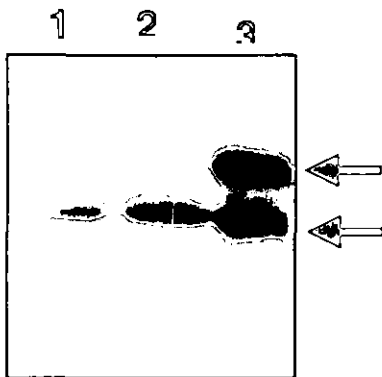


Figura 8. Zimograma reverso. 1) Sobrenadante de células transfectadas con el vector pBK-CMV 2) Sobrenadante de células transfectadas con el vector conteniendo el ADNc del TIMP-2 de cobayo 3) Estándares con TIMP 1 y 2 humanos purificados. Flecha superior TIMP-1, flecha inferior TIMP-2.

-Modulación del Timp-2 *in vivo*

Finalmente, se analizó la expresión del TIMP-2 durante un proceso patológico. Para este fin, cobayos de la cepa Hartley fueron expuestos a una concentración de 100% de oxígeno por 24 y 48 horas, un proceso que provoca un daño agudo al pulmón, que se caracteriza por cambios importante en la matriz extracelular de este órgano y en la expresión de las metaloproteasas de matriz (70). En la tabla 2 se muestran varios parámetros usados como marcadores de daño pulmonar. Aunque la

relación peso húmedo/seco, que señala la cantidad de agua en el pulmón, no varía significativamente, la cantidad de proteína en el lavado bronquioalveolar aumenta significativamente a las 24 y 72 horas. Este parámetro señala la pérdida de continuidad de la barrera alveolo-capilar y la salida de proteínas (básicamente albúmina) del plasma hacia el alveolo. Asimismo, el número de células se incrementa significativamente a las 72 horas de exposición al oxígeno.

TABLA 2

<i>Tiempo</i>	<i>Rel. húmedo/seco</i>	<i>Prot. LBA</i>	<i>Células LBA</i>
0 horas	7.91 ± 0.3	103 ± 2	4.8 ± 0.62
24 horas	8.37 ± 0.6	141 ± 4 *	4.3 ± 0.25
72 horas	8.44 ± 0.3	164 ± 0.7 *	6.4 ± 0.34 *

Tabla 2. Parámetros de daño pulmonar agudo en cobayos expuestos a hiperoxia. Rel. húmedo/seco: Relación entre peso del pulmón húmedo y seco. Prot. LBA: proteínas totales del lavado bronquioalveolar, expresadas en mg/ml⁻³. Células LBA: Células totales del lavado bronquioalveolar (x10⁸/ml). p < 0.05 T student, corrección de Yates

Como se observa en la figura 9, no se presentaron cambios importantes en la expresión del transcrito para el TIMP-2.

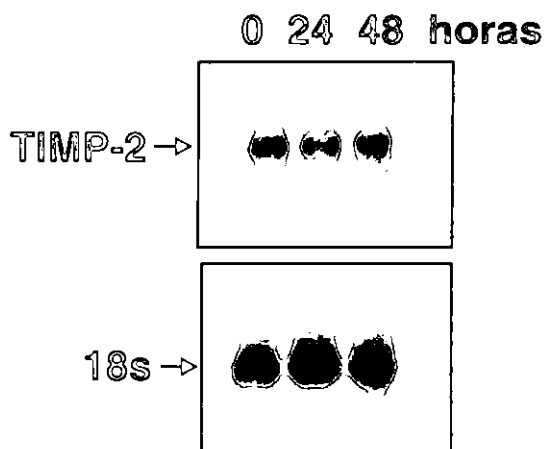


Figura 9. Regulación de la expresión del ARNm del TIMP-2 en un modelo de hiperoxia pulmonar. Panel superior TIMP-2, panel inferior 18s.

Este resultado se presenta junto con una sobreexpresión de las gelatinasas de 72(MMP-2) y ligeramente de la gelatinasa de 92 kDa (MMP-9) en el pulmón, como se observa en las muestras de lavado bronquioalveolar y tejido sometidas a un zimograma de gelatina (Figura 10). Tanto el precursor como la forma activa de la MMP-2 se incrementan.

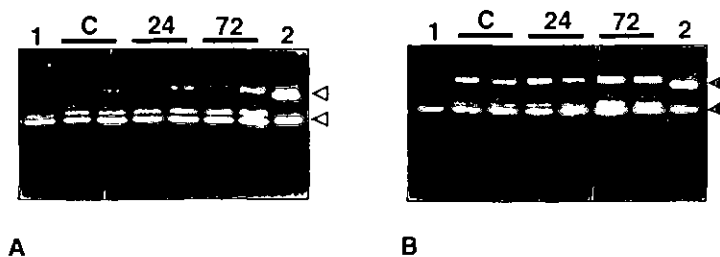


Figura 10. Zimograma de gelatina. Muestras obtenidas de **A)** Lavado bronquioalveolar y **B)** Tejido fresco de cobayos expuestos a 95% de hipoxia por los tiempos indicados sobre la figura. **A)** Gelatinasa de 72 kDa (medio condicionado por fibroblastos humanos) **B)** Gelatinasas de 72 y 92 kDa (medio condicionado por células de osteosarcoma U2OS).

DISCUSION

En el presente trabajo se clonó una porción mucho mayor de la secuencia 3' no traducida del TIMP-2 de cobayo que la clonada en otras especies, lo cual confirma la presunción de Hammani y cols (37) de que los distintos transcritos surgen a partir de sitios alternativos de poliadenilación. Resultados de estos mismos autores no señalan que los diferentes tamaños de secuencias 3' puedan estar relacionados con la estabilidad del

mensajero y por ende su vida media, aunque estos autores no realizaron mediciones en condiciones de estimulación o represión de la expresión, eventos en los que la vida media de los mensajeros sufren en ocasiones cambios notables. Estos transcritos se expresan ubicuamente, a excepción del hígado, como se reporta por otros autores para otras especies (49), aunque en condiciones patológicas es posible observarlo (49,61). En general, la regulación de estos transcritos es pobre, comportándose como un gen constitutivo, un resultado similar al de otros autores (21,37). Pese a esto, fué posible observar una disminución en la expresión del TIMP-2 en fibroblastos de pulmón tratados con factor transformante B, un resultado disímil al de algunos autores (98), pero similar a los resultados de otros autores en este tipo de células (26). Estos resultados se deben muy probablemente al tipo celular estudiado. Es interesante destacar que aunque la expresión de los transcritos no se modifica en muchas situaciones, esto no excluye una regulación cotraduccional o postraduccional. Recientemente ha sido reportado por Shofuda y cols (79) una disparidad entre los niveles de expresión del mensajero y proteína del TIMP-2 en diversas líneas celulares humanas, lo cual hace pensar que la síntesis de la proteína podría ser un nivel de regulación no estudiado aún. Esto podría ser debido a una regulación cotraduccional de la

proteína (un hecho raro pero reportado) o, con mayor probabilidad a un efecto metabólico, en el que la internalización del TIMP-2 por la célula podría jugar un papel. Se ha demostrado que el TIMP-1 es internalizado por la célula y llevado a núcleo (71). Aunque no se ha estudiado, este efecto de este tipo podría estar presente en el TIMP-2, al unirse con la MMP MT₁. Sería interesante estudiar si existe algún efecto de este tipo y si el tamaño de la secuencia 3' no traducida pudiera ejercer algún papel en la regulación cotraduccional, de existir tal. Resultados preliminares señalan que en geles no reductores, el TIMP-2 de extractos celulares migra como una proteína de 90 kDa, lo cual podría señalar su existencia como un complejo con otras(s) proteína(s) (resultados no mostrados).

Recientemente se ha postulado una reclasificación del cobayo, debido a razones fisiológicas y moleculares, separándolos de otros roedores miomórficos (v.g. rata y ratón) y colocándolos en su propio orden (caviomorfa). El TIMP-2 de cobayo posee alta identidad y similitud con su contraparte humana (97.2% identidad y 99% similitud), y es interesante destacar que el parecido es aún mayor que con el de otros roedores, un hecho que se comparte con las secuencias parciales de otros genes de esta grupo de enzimas e inhibidores. Este hecho apoyaría la idea de que el cobayo representa un orden distinto al de los demás roedores.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se muestra la clonación del ADNc del inhibidor tisular de las metaloproteasas 2 de cobayo. La identidad de este ADN se demuestra mediante el alto porcentaje de identidad y similitud global (>97%) con respecto a su contraparte humana y de roedor. Como se esperaba, la proteína codificada por este ADN posee actividad como inhibidor tisular de metaloproteasas. Los dos principales transcritos se expresan en la mayor parte de los tejidos analizados. La regulación de este gen asemeja a la de un gen constitutivo, modificándose poco o nada por la acción de diversas hormonas y factores de crecimiento y en condiciones patológicas.

ANEXOS

ANEXO 1

OTROS RESULTADOS.

-Clonación de un fragmento de la colagenasa intersticial (MMP-1) y metaloproteasa de membrana 3 (MMP-16) de cobayo.

De manera inicial se procedió a realizar un ensayo de southern blot sobre ADN de cobayo, con el fin de determinar la posible presencia del gen que codifica para esta proteína. Como se muestra en la figura 11, fué posible

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se muestra la clonación del ADNc del inhibidor tisular de las metaloproteasas 2 de cobayo. La identidad de este ADN se demuestra mediante el alto porcentaje de identidad y similitud global (>97%) con respecto a su contraparte humana y de roedor. Como se esperaba, la proteína codificada por este ADN posee actividad como inhibidor tisular de metaloproteasas. Los dos principales transcritos se expresan en la mayor parte de los tejidos analizados. La regulación de este gen asemeja a la de un gen constitutivo, modificándose poco o nada por la acción de diversas hormonas y factores de crecimiento y en condiciones patológicas.

ANEXOS

ANEXO 1

OTROS RESULTADOS.

-Clonación de un fragmento de la colagenasa intersticial (MMP-I) y metaloproteasa de membrana 3 (MMP-16) de cobayo.

De manera inicial se procedió a realizar un ensayo de southern blot sobre ADN de cobayo, con el fin de determinar la posible presencia del gen que codifica para esta proteína. Como se muestra en la figura 11, fué posible

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se muestra la clonación del ADNc del inhibidor tisular de las metaloproteasas 2 de cobayo. La identidad de este ADN se demuestra mediante el alto porcentaje de identidad y similitud global (>97%) con respecto a su contraparte humana y de roedor. Como se esperaba, la proteína codificada por este ADN posee actividad como inhibidor tisular de metaloproteasas. Los dos principales transcritos se expresan en la mayor parte de los tejidos analizados. La regulación de este gen asemeja a la de un gen constitutivo, modificándose poco o nada por la acción de diversas hormonas y factores de crecimiento y en condiciones patológicas.

ANEXOS

ANEXO 1

OTROS RESULTADOS.

-Clonación de un fragmento de la colagenasa intersticial (MMP-1) y metaloproteasa de membrana 3 (MMP-16) de cobayo.

De manera inicial se procedió a realizar un ensayo de southern blot sobre ADN de cobayo, con el fin de determinar la posible presencia del gen que codifica para esta proteína. Como se muestra en la figura 11, fué posible

identificar bandas positivas en el ADN genómico del cobayo, lo cual apoya el hecho de que este gen existe en el cobayo.

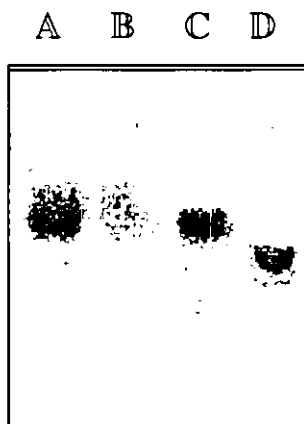


Figura 11. Southern blot. Presencia del gen de la colagenasa I en el ADN de cobayo. A) ADN humano digerido con Eco RI B) ADN de cobayo sin digerir C) ADN cobayo digerido con Hind III D) ADN cobayo digerido con Eco RI.

Dado el resultado positivo, se utilizó una estrategia para identificar un fragmento del ADNc de esta enzima que ayudara posteriormente a clonar el gen completo. En esta estrategia es posible amplificar una región de casi todas las metaloproteasas de matriz, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores degenerados complementarios a regiones conservadas en todas estas enzimas. Los fragmentos esperados son de 300 pares de bases, en el caso de la subfamilia de las colagenasas y estromelisininas y de 450 pares de bases, en el caso de las gelatinasas. Para

este fin se extrajo ARN total a partir de la línea celular JH4 (fibroblastos de pulmón de cobayo), expuestos a PMA, un éster de forbol que es conocido por su capacidad de inducir la expresión de la colagenasa intersticial en diversas líneas celulares de otras especies. De manera inicial se usaron los cebadores descritos por Freije, et al (29),(ver material y métodos, cebadores 734 y 735) los cuales, a pesar de repetidos intentos y modificaciones, no lograron amplificar ninguna región específica, al ser clonados y secuenciados. Por esta razón se utilizó un nuevo par de cebadores degenerados (97), pero con un punto de fusión más alto, lo cual favorece la amplificación específica (Y35 y Y36, ver material y métodos). Los primeros ensayos demostraron la amplificación de una región del peso esperado (alrededor de 300 y 450 pares de bases). Estos amplicones fueron clonados en el vector pBK-CMV, amplificados en la cepa DH-5 α de E. coli, purificados, verificados en la presencia de insertos de los tamaños adecuados y sometidos a secuenciación manual. Se secuenciaron 15 clonas de ambos pesos moleculares, dando como resultados amplificación de regiones del ARN ribosomal pertenecientes a un tipo de micoplasma, que se encontraban contaminando a la línea celular. Por esta razón, se volvió a solicitar la línea celular a su fuente original (ATCC) para realizar nuevamente la amplificación. Utilizando el

proceso descrito, en diversos experimentos se obtuvo la amplificación de fragmentos del peso esperado. Estos fragmentos fueron clonados, verificados y amplificados. En total se secuenciaron 35 clonas de cada uno de los fragmentos obtenidos (300 y 450 pares de bases). Entre algunos otras regiones amplificadas, se obtuvieron probables fragmentos de dos metaloproteasas de matriz, la colagenasa tipo I, y la metaloproteasa de membrana tipo 3 (MMP-MT-3) (Figura 12).

MMP-1

```
gggtgctgatgtggctcagtttgcctcactgaggggaacctcgtgggatcaaacacatctgacctac
aggattgaaaattacacgccagatttgccaagagcagatgtggacctgccattgagaaagcctccaact
ctggagtaatgtcacacctctacatttcaccaaggctctgagggtcaagcagacatcatgatatctttgtca
ggggagatcatcgggacaactctcctttgatggacctggaggaaatcttgcctatgctttcaaccaggccc
aggattggaggggatgctcattttgatgaagatgaaaggtggaccaacaatttcagagagtacaacttac
atcgtgttgcggcacatgaattcggaca
```

MMP-16

```
ccccgatgcggtgtacctgaccagacaagaggtagctccaaattcatattcgtcgaaagcgatgcatg
acaggacagaaatggcagcacaagcacatcacttacagtataaagaacgtaactccaaaagtaggagac
cctgagactcgtaaagctattcgcgtgcctttgatgtgtggcagaatgtaactcctctgacattgaagaag
ttcctacagtgaattagaaaatggcaaacgtgatgtggatataccattatcttgcactggttccatggg
gacagctctccctttgatggagagggaggattttggcacaagcctacttccctggaccaggaattggagga
gataccattttgactcagatgagccatggacactaggaaatcctaatacatgatggaatgacttattcttg
tagcagtccatgaactgggacatgctctgggattggagcattccaa
```

Figura 12. Secuencia clonada de la colagenasa I (MMP-1) y la metaloproteasa de membrana 3 (MMP-16) de cobayo.

La homología con su contraparte humana se muestra en la figura 13. A pesar de repetidos intentos por clonar el resto de la secuencia de la MMP-I, mediante tamizado en 4 ocasiones de tres bibliotecas de pulmón de cobayo, por medio de RACE-PCR con oligonucleótidos "nested", y mediante PCR usando regiones del vector en la biblioteca, no fué posible obtener una secuencia más completa.

gcol1 CCCAGAGGTG---TGCCTGATGTGGCTCAGTTTGTCTCACTGAGGGGGA
hcol1 CCCAGATGTGGAGTGCCTGATGTGGCTCAGTTTGTCTCACTGAGGGGAA
***** *** *****

gcol1 ACCTCGCTGGGATCAAACACATCTGACCTACAGGATTGAAAATTACACGC
hcol1 CCCTCGCTGGGAGCAAACACATCTGACCTACAGGATTGAAAATTACACGC

gcol1 CAGATTTGCCAAGAGCAGATGTGGACCATGCCATTGAGAAAGCCTTCCAA
hcol1 CAGATTTGCCAAGAGCAGATGTGGACCATGCCATTGAGAAAGCCTTCCAA

gcol1 CTCTGGAGTAATGTCACACCTCTACATTTACCAAGGTCTCTGAGGGTCA
hcol1 CTCTGGAGTAATGTCACACCTCTGACATTTACCAAGGTCTCTGAGGGTCA

gcol1 AGCAGACATCATGATATCTTTTGTGAGGGGAGATCATCGGGACAACCTCTC
hcol1 AGCAGACATCATGATATCTTTTGTGAGGGGAGATCATCGGGACAACCTCTC

gcol1 CTTTTGATGGACCTGGAGGAAATCTTGCTCATGCTTTTCAACCAGGCCCA
hcol1 CTTTTGATGGACCTGGAGGAAATCTTGCTCATGCTTTTCAACCAGGCCCA

gcol1 GGTATTGGAGGGGATGCTCATTTTGATGAAGATGAAAGGTGGACCAACAA
hcol1 GGTATTGGAGGGGATGCTCATTTTGATGAACATGAAAGGTGGACCAACAA

gcol1 TTTCAGAGAGTACAACCTTACATCGTGTGCGGCACATGAATTCGGACA
hcol1 TTTCACAGAGTACAACCTTACATCGTGTGCGGCTCATGAATTCGGCCA
***** *****

```

Conejo  PRCGVPDVAQFVLTPGNPRWEQTHLTYRIENYTPDLSRADVDNAIEKAFQ
bovino  PRCGVPDVAPFVLTPGKSCWENTNLTYRIENYTPDLSRADVDQAIKAFQ
cobayo  PRCGVPDVAQFVLTEGEPRWDQTHLTYRIENYTPDLPRADVDHAIEKAFQ
humano  PRCGVPDVAQFVLTEGNPRWEQTHLTYRIENYTPDLPRADVDHAIEKAFQ
porcino PRCGVPDVAEFVLTPGNPRWENTHLTYRIENYTPDLSREDVDRAIEKAFQ
***** ***** * . * . * . ***** . * *** *****

conejo  LWSNVTPLTFTKVKSGQADIMISFVRGDHRDNSPFDGPEGQLAHAHQPGGL
bovino  LWSNVTPLTFTKQVSEGQADIMISFVRGDHRDNSPFDGPGGNLAHAHQPGA
cobayo  LWSNVTPLHFTKQVSEGQADIMISFVRGDHRDNSPFDGPGGNLAHAHQPGP
humano  LWSNVTPLTFTKQVSEGQADIMISFVRGDHRDNSPFDGPGGNLAHAHQPGP
porcino LWSNVSPLTFTKQVSEGQADIMISFVRGDHRDNSPFDGPGGNLAHAHQPGP
***** . * ***** ***** ***** * . *****

conejo  GIGGDVHFDEDDRWTKDFRNYNLYRVAACHELGH
bovino  GIGGDAHFDDEWWTSNFQDYNLYRVAACHEFGH
cobayo  GIGGDAHFDDEDERWTNNFREYNLHRVAACHEFGH
humano  GIGGDAHFDDEHERWTNNFTEYNLHRVAACHELGH
porcino GIGGDAHFDDEDERWTKNFRDYNLYRVAACHELGH
***** *** . . . * * * . * . * * * * * * * * * *

```

Figura 13. Alineación parcial de la colagenasa de cobayo (gcoll) y la colagenasa 1 humana (hcoll). En la página anterior se presenta la secuencia nucleotídica, en el panel superior la proteína predicha. * identidad, ~ similitud.

mt 3h CCCCATGCGGTGTACCTGACCAGACAAGAGGTAGCTCCAAATTTTCATAT
 mt 3c CCTCGATGTGGTGTGCCTGACCAAACAAGAGGCAGCTCTAAATTTAACAT
 mt 3g CCCCCGAGGTGTTGGCCGGATCAGACGAGAGGTAGCTCCAAATTTAATGT
 ** * * * *

mt 3h TCGTCGAAAGCGATATGCATTGACAGGACAGAAATGGCAGCACAAAGCACA
 mt 3c CCGTCGTAAACGATATGCATTAACAGGACAGAAGTGGCAACACAAGCATA
 mt 3g TCGTCGAAAGCGGTATCGATTAACAGGACAGAAGTGGCAGCACAAAGCATA
 ***** ** ** ** * ** *****

mt 3h TCACTTACAGTATAAAGAACGTAACCTCCAAAAGTAGGAGACCCTGAGACT
 mt 3c TCGCTTACAGCATTAAAGAACGTCACCTCCAAAAGTAGGTGATGETGAAACT
 mt 3g TCACGTACAGTATAAAGAACGTAACCTCCAAAAGGTAGGAGACCCTGAGACC
 ** * ***** ** ***** ***** ** * ** *

mt 3h CGTAAAGCTATTTCGCCGTGCCTTTGATGTGTGGCAGAATGTAACCTCTCT
 mt 3c CGTAAAGCCATTTCGCCGTGCCTTTGATGTGTGGCAGAATGTAACCTCTCT
 mt 3g CGTAAAGCTATTTCGCCGTGCCTTTGATGTGTGGCAGAATGTAACCTCTCT
 ***** *****

mt 3h GACATTTGAAGAAGTTCCTACAGTGAATTAGAAAATGGCAAACGTGATG
 mt 3c AACATTTGAAGAAGTTCCTTATATTGAATTAGAAAATGGCAAGAGAGACG
 mt 3g GACATTTGAAGAAGTTCCTACAGTGAATTAGAAAATGGCAAACGTGATG
 ***** ** * ***** * * *

mt 3h TGGATATACCCATTATTTTGCATCTGGTTTCCATGGGGACAGCTCTCCC
 mt 3c TGGATATTACGATCATTTTGCATCAGGTTTTCATGGAGACAGTTCTCCC
 mt 3g TGGATATAACCATTATTTTGCATCTGGCTTCCACGGAGACAGTTCTCCC
 ***** * ** ***** ** ** ** * ** *

mt 3h TTTGATGGAGAGGGAGGATTTTGGCACATGCCTACTTCCCTGGACCAGG
 mt 3c TTTGATGGGGAGGGAGGATTTTGGCCCATGCATATTTCCCTGGGCCAGG
 mt 3g TTTGATGGGGAGGGAGGATTTTGGACACATGCCTATTTCCCTGGACCAGG
 ***** ***** * ***** ** *****

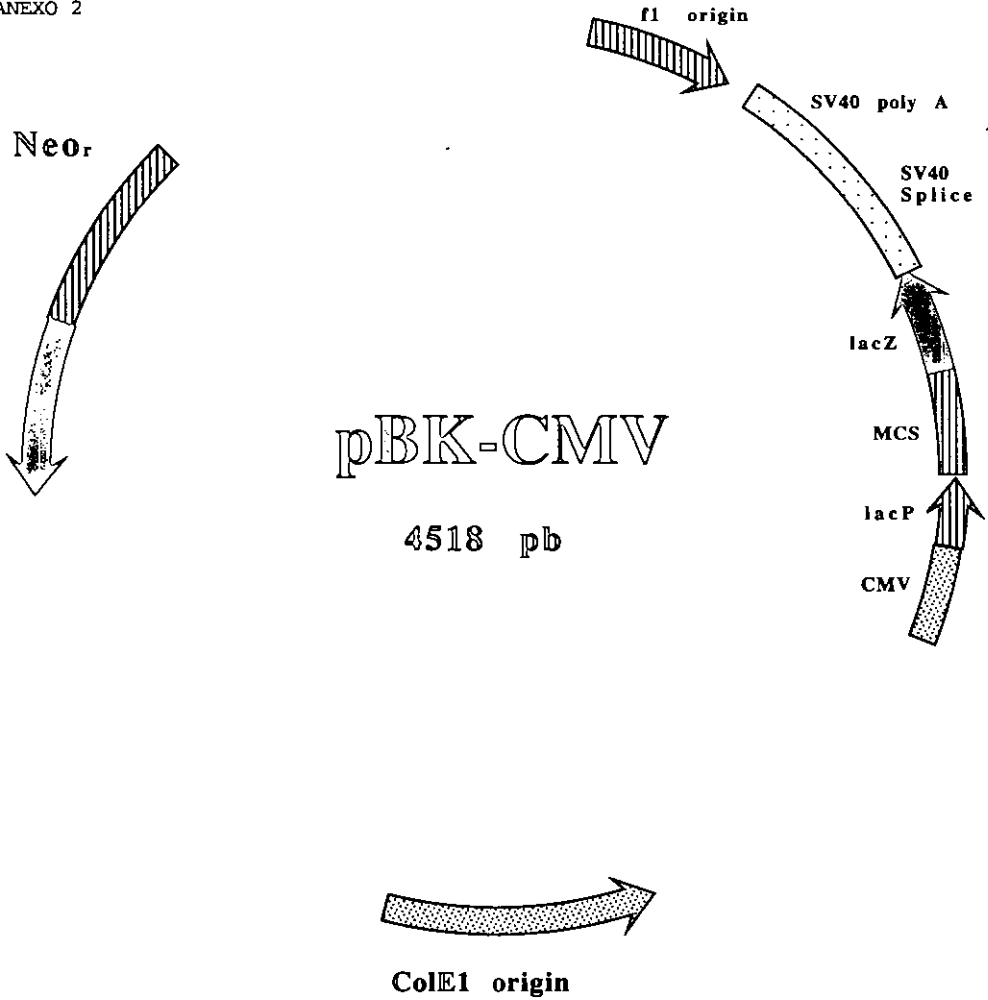
mt 3h AATTGGAGGAGATACCCATTTTGACTCAGATGAGCCATGGACACTAGGAA
 mt 3c AATTGGGGGAGACACTCATTTTGACTCAGATGAACCATGGACTTTGGGAA
 mt 3g AATCGGAGGGGACACTCATTTTGACTCCGATGAGCCATGGACACTAGGAA
 *** ** * ** * ***** ***** *

mt 3h ATCCTAATCATGATGGAATGACTTATTTCTGTAGCAGTCCATGAACCTG
 mt 3c ATCCTAATCATGATGGAATGATCTGTTTCTAGTGGCTGTGCACGAACCTG
 mt 3g ATCCTAATCATGATGGAATGACTTATTTCTCGTCGCCGCCACGAGATC
 ***** * ***** ** ** * ** *


```
mt3h      GGACATGCTCT
mt3c      GGACATGCTCT
mt3g      GG-CGGG----
          ** * *
```

Figura 14. Alineación de la secuencia parcial de la MT3 de cobayo (mt3g) con la secuencia de MT3 de pollo (mtc) y MT3 humana (mt3h). * identidad, · similitud.

En el presente trabajo no fué posible clonar en su totalidad el ADNc de la MMP-I, pese a múltiples intentos, sin embargo, recientemente Huebner y cols (41), publicaron la clonación de un pequeño fragmento de 172 pares de bases, proveniente de cartílagos inflamado de cobayo. Este hecho y los demás descritos en la presente tesis y artículos publicados (43,69) apoyan la existencia de esta enzima en cobayos. La secuencia se encuentra hacia el extremo 3' de la secuencia clonado por nosotros, lo cual debería facilitar la clonación de la mayor parte del marco abierto de lectura mediante PCR convencional. Es interesante destacar que la presencia de esta enzima en cobayo implicaría una discusión de orden filogenético, debido a que, como se ha mencionado, los roedores no poseen esta enzima. Sin embargo, recientemente se ha postulado una reclasificación del cobayo, debido a razones fisiológicas y moleculares, separándolos de otros roedores miomórficos (v.g. rata y ratón) y colocándolos en su propio orden (caviomorfa). Esto podría explicar la existencia de esta enzima en este animal y el mayor parecido de los ADNc clonado con su contraparte humana que con su contraparte de roedor.



Plásmido pBK-CMV. MCS: multicloning site

CMV: promotor eucariote proveniente de citomegalovirus

Neor: resistencia a neomicina

ColE1: origen de replicación del plásmido

fl: origen de replicación filamentosa

lacp: promotor lac procaríote

lacZ: enzima de selección

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

REFERENCIAS:

1. Agrez, M. V., C. J. Meldrum, A. T. Sim, R. H. Aebersold, I. M. Clark, T. E. Cawston, and G. F. Burns. 1995. A fibroblast elongation factor purified from colon carcinoma cells shares sequence identity with TIMP-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 206:590-600.
2. Ahonen, M., A. H. Baker, and V. M. Kahari. 1998. Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res.* 58:2310-2315.
3. Alexander, C. M., E. W. Howard, M. J. Bissell, and Z. Werb. 1996. Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 transgene. *J Cell Biol.* 135:1669-1677.
4. Alvares, O., R. Klebe, G. Grant, and D. L. Cochran. 1995. Growth factor effects on the expression of collagenase and TIMP-1 in periodontal ligament cells. *J Periodontol.* 66:552-558.
5. Anand-Apte, B., M. S. Pepper, E. Voest, R. Montesano, B. Olsen, G. Murphy, S. S. Apte, and B. Zetter. 1997. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38:817-823.
6. Apte, S. S., K. Hayashi, M. F. Seldin, M. G. Mattei, M. Hayashi, and B. R. Olsen. 1994. Gene encoding a novel murine tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), TIMP-3, is expressed in developing mouse epithelia, cartilage, and muscle, and is located on mouse chromosome 10. *Dev Dyn.* 200:177-197.
7. Apte, S. S., B. R. Olsen, and G. Murphy. 1995. The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem.* 270:14313-14318.
8. Apte, S. S., N. Fukai, D. R. Beier, and B. R. Olsen. 1997. The matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) gene is structurally distinct from other MMP genes and is co-expressed with the TIMP-2 gene during mouse embryogenesis. *J Biol Chem.* 272:25511-25517.
9. Baker, A. H., A. B. Zaltsman, S. J. George, and A. C. Newby. 1998. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest.* 101:1478-1487.
10. Blavier, L., and Y. A. DeClerck. 1997. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 is expressed in the interstitial matrix in adult mouse organs and during embryonic development. *Mol Biol Cell.* 8:1513-1527.
11. Borden, P., and R. A. Heller. 1997. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Euk Gene Exp.* 7:159-178.
12. Castagnino, P., J. V. Soriano, R. Montesano, and D. P. Bottaro. 1998. Induction of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 is a delayed early cellular response to hepatocyte growth factor. *Oncogene.* 17:481-492.
13. Caterina, N. C., L. J. Windsor, A. E. Yermovsky, M. K. Bodden, K. B. Taylor, H. Birkedal-Hansen, and J. A. Engler. 1997. Replacement of conserved cysteines in human tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Biol Chem.* 272:32141-32149.

14. Chin, J. R., G. Murphy, and Z. Werb. 1985. Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblast in parallel with collagenase. *J Biol Chem.* 260:12367-12376.
15. Chin, J. R., and Z. Werb. 1997. Matrix metalloproteinases regulate morphogenesis, migration and remodeling of epithelium, tongue skeletal muscle and cartilage in the mandibular arch. *Development.* 124:1519-1530.
16. Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 161:156-159.
17. Clark, I. A., L. K. Powell, and T. E. Cawston. 1994. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) stimulates the secretion of collagenase from human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 203:874-880.
18. Collier, J. E., G. A. P. Bruns, G. L. Goldberg, and D. S. Gerbard. 1991. On the structure and chromosome location of the 72 and 92 kDa human type IV collagenase genes. *Genomics.* 9:429-434.
19. Corcoran, M. L., and W. G. Stetler-Stevenson. 1995. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via a cAMP-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 270:13453-13459.
20. Crabe, T., C. Ioannou, and A. J. P. Docherty. 1993. Human progelatinase A can be activated by autolysis at a rate that is concentration dependent and enhance by heparin bound o the C terminal domain. *Eur J Biochem.* 218:431-438.
21. De Clerck, Y. A., M. I. Darville, Y. Eeckhout, and G. G. Rousseau. 1994. Characterization of the promoter of the gene encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *Gene.* 139:185-191.
22. DeClerck, Y. A., T. D. Yean, H. S. Lu, J. Ting, and K. E. Langley. 1991. Inhibition of autoproteolytic activation of interstitial procollagenase by recombinant metalloproteinase inhibitor MI/TIMP-2. *J Biol Chem.* 266:3893-3899.
23. Docherty, A. J. P., A. Lyons, B. J. Smith, E. M. Wright, P. E. Stephens, T. J. R. Harris, G. Murphy, and J. J. Reynolds. 1985. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature.* 318:66-69.
24. Douglas, D. A., Y. E. Shi, and Q. A. Sang. 1997. Computational sequence analysis of the tissue inhibitor of metalloproteinase family. *J Protein Chem.* 16:237-255.
25. Dunsmore, S. E., J. S. Rubin, S. O. Kovacs, M. Chedid, W. C. Parks, and H. G. Welgus. 1996. Mechanisms of hepatocyte growth factor stimulation of keratinocyte metalloproteinase production. *J Biol Chem.* 271:24576-24582.
26. Eickelberg, O., E. Kohler, F. Reichenberger, S. Bertschin, T. Woodtli, P. Erne, A. P. Perruchoud, and M. Roth. 1999. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3 [In Process Citation]. *Am J Physiol.* 276:L814-24.
27. Fabunmi, R. P., A. H. Baker, E. J. Murray, R. F. Booth, and A. C. Newby. 1996. Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors or metalloproteinases-1, -2, and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem J.* 315:(Pt 1):335-42.
28. Fosang, A. J., P. J. Neame, K. Last, and J. A. Hardingham. 1992. The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases and cathepsin B. *J Biol Chem.* 267:19470-19474.
29. Freije, J. M. P., I. Díez-Itza, M. Balbin, L. M. Sánchez, R. Blasco, J. Tolivia, and C. López-Otín. 1994. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinases produced by breast carcinomas. *J Biol Chem.* 269:16766-16773.

30. Ganser GL., Stricklin GP, and Matrisian LM. 1991. EGF and TGF alpha influence in vitro lung development by the induction of matrix-degrading metalloproteinases. *Int. J. Dev. Biol.* 35:453-461.
31. Gomez, D. E., D. F. Alonso, H. Yoshiji, and U. P. Thorgeirsson. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 74:111-122.
32. Gomis-Ruth, F. X., K. Maskos, M. Betz, A. Bergner, R. Huber, K. Suzuki, N. Yoshida, H. Nagase, K. Brew, G. P. Bourenkov, H. Bartunik, and W. Bode. 1997. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature.* 389:77-81.
33. Graham, C. H., I. Connelly, J. R. MacDougall, R. S. Kerbel, W. G. Stetler-Stevenson, and P. K. Lala. 1994. Resistance of malignant trophoblast cells to both the anti-proliferative and anti-invasive effects of transforming growth factor- beta. *Exp Cell Res.* 214:93-99.
34. Greene, J., M. Wang, Y. E. Liu, L. A. Raymond, C. Rosen, and Y. E. Shi. 1996. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem.* 271:30375-30380.
35. Gross, J., F. Harper, E. D. Harris, P. A. McCroskery, J. H. Highberger, C. Corbett, and A. H. Kang. 1974. Animal collagenases: Specificity of action and structure of the substrate cleavage site. *Biochem Biophys Res Comm.* 61:605-612.
36. Guedez, L., L. Courtemanch, and M. Stetler-Stevenson. 1998. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood.* 92:1342-1349.
37. Hammani, K., A. Blakis, D. Morsette, A. M. Bowcock, C. Schmutte, P. Henriot, and Y. A. DeClerck. 1996. Structure and characterization of the human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene. *J Biol Chem.* 271:25498-25505.
38. Hayakawa, T., K. Yamashita, E. Ohuchi, and A. Shinagawa. 1994. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci.* 107:(Pt 9):2373-9.
39. Howard, E. W., E. C. Bullen, and M. J. Banda. 1991. Preferential inhibition of 72- and 92-kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J Biol Chem.* 266:13070-13075.
40. Huang, H. Y., Y. Wen, J. C. Irwin, J. S. Kruessel, Y. K. Soong, and M. L. Polan. 1998. Cytokine-mediated regulation of 92-kilodalton type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 messenger ribonucleic acid expression in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:1721-1729.
41. Huebner, J., I. G. Otterness, E. M. Freund, B. Caterson, and V. B. Kraus. 1998. Collagenase 1 and collagenase 3 expression in a guinea pig model of osteoarthritis. *Arthritis Reum.* 41:877-890.
42. Iami, K., M. Kusakabe, T. Sakakura, I. Nakamishi, and Y. Okada. 1994. Susceptibility of tenascin to degradation by matrix metalloproteinases. *FEBS Lett.* 352:216-218.
43. Jiménez-García L.F.R., Montesano Pérez-Ramos J., Selman M., and Pardo A. 1994. Cellular source of collagenase and TIMP-1 in carrageenin-induced granuloma. *Exp Mol Pathol.* 60:130-139.
44. Johansson, N., J. Westermarck, S. Leppa, L. Hakkinen, L. Koivisto, C. LopezOtin, J. Peltonen, J. Heino, and V. M. Kahari. 1997. Collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression by HaCaT keratinocytes is enhanced by tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta. *Cell Growth Diff.* 243-250:

45. Kinoshita, T., H. Sato, A. Okada, E. Ohuchi, K. Imai, Y. Okada, and M. Seiki. 1998. TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads. *J Biol Chem.* 273:16098-16103.
46. Kondapaka, S. B., R. Fridman, and K. B. Reddy. 1997. Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int J Cancer.* 70:722-726.
47. Leco KJ, e., e. Khokha R, *. Pavloff N, *. Hawkes SP, and Edwards DR. 1994. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem.* 269:9352-9360.
48. Leco, K. J., S. S. Apte, G. T. Taniguchi, S. P. Hawkes, R. Khokha, G. A. Schultz, and D. R. Edwards. 1997. Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues. *FEBS lett.* 401:213-217.
49. Leco, K. J., S. S. Apte, G. T. Taniguchi, S. P. Hawkes, R. Khokha, G. A. Schultz, and D. R. Edwards. 1997. Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues. *FEBS lett.* 401:213-217.
50. Lombard, M. A., T. L. Wallace, M. F. Kubicek, G. L. Petzold, M. A. Mitchell, S. K. Hedges, and J. W. Wilks. 1998. Synthetic matrix metalloproteinase inhibitors and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2, but not TIMP-1, inhibit shedding of tumor necrosis factor-alpha receptors in a human colon adenocarcinoma (Colo 205) cell line [In Process Citation]. *Cancer Res.* 58:4001-4007.
51. Matrisian, L. M. 1992. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays.* 14:455-463.
52. Miller, E. J., E. D. Harris, E. Chang, J. E. Finch, P. A. McCroskery, and W. T. Butler. 1976. Cleavage of type II and III collagens with mammalian collagenase: Site of cleavage and primary structure of the NH2 terminal portion of the smaller fragment released from both collagens. *Biochemistry.* 15:787-792.
53. Miyazaki, K., F. Umenishi, K. Funahashi, N. Koshikawa, H. Yasumitsu, and M. Umeda. 1992. Activation of TIMP-2/progelatinase A complex by stromelysin. *Biochem Biophys Res Commun.* 185:852-859.
54. Murphy, A. N., E. J. Unsworth, and W. G. Stetler-Stevenson. 1993. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol.* 157:351-358.
55. Murphy, G., J. A. Allan, F. Willenbrock, M. L. Cockett, J. O'Connell, and A. J. P. Docherty. 1992. The role of the c terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *J Biol Chem.* 267:9612-9618.
56. Murphy, G., J. P. Segain, M. O'Shea, M. Cockett, C. Ioannou, O. Lefebvre, and P. Chambon. 1993. The 28 kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. *J Biol Chem.* 268:15435-15441.
57. Murphy, G., Q. Nguyen, M. I. Cockett, S. J. Atkinson, J. A. Allan, C. G. Knight, F. Willenbrock, and A. J. Docherty. 1994. Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J Biol Chem.* 269:6632-6636.
58. Nagase, H., Y. Ogata, K. Suzuki, Enghid Jy, and G. Salvesen. 1991. Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem Soc Trans.* 19:715-718.
59. Nagase, H. 1994. Matrix metalloproteinases. A mini-review. *Contrib. Nephrol.* 107:85-93.

60. Nagase, H., K. Suzuki, T. E. Cawston, and K. Brew. 1997. 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.* 325:163-167.
61. Nakatsukasa, H., K. Ashida, T. Higashi, S. Ohguchi, S. Tsuboi, N. Hino, K. Nouse, Y. Urabe, N. Kinugasa, K. Yoshida, S. Uematsu, M. Ishizaki, Y. Kobayashi, and T. Tsuji. 1996. Cellular distribution of transcripts for tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology.* 24:82-88.
62. Negro, A., M. Onisto, L. Masiero, and S. Garbisa. 1995. Synthesis and refolding of human TIMP-2 from *E. coli*, with specific activity for MMP-2. *FEBS lett.* 360:52-56.
63. Nemeth, J. A., A. Rafe, M. Steiner, and C. L. Goolsby. 1996. TIMP-2 growth-stimulatory activity: a concentration- and cell type- specific response in the presence of insulin. *Exp Cell Res.* 224:110-115.
64. Nguyen, O., G. Murphy, C. E. Hughes, J. S. Mort, and P. J. Roughley. 1993. Matrix metalloproteinases cleave at two distinct sites on human cartilage link protein. *Biochem J.* 295:595-598.
65. Nothnick, W. B., and T. E. J. Curry. 1996. Divergent effects of interleukin-1 beta on steroidogenesis and matrix metalloproteinase inhibitor expression and activity in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 137:3784-3790.
66. Nothnick, W. B., P. Soloway, and T. E. J. Curry. 1997. Assessment of the role of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) during the periovulatory period in female mice lacking a functional TIMP-1 gene. *Biol Reprod.* 56:1181-1188.
67. Ohba, Y., Y. Goto, Y. Kimura, F. Suzuki, T. Hisa, K. Takahashi, and M. Takigawa. 1995. Purification of an angiogenesis inhibitor from culture medium conditioned by a human chondrosarcoma-derived chondrocytic cell line, HCS-2/8. *Biochim Biophys Acta.* 1245:1-8.
68. Okada, Y., H. Konomi, T. Yada, K. Kimata, and H. Nagase. 1989. Degradation of type IX collagen by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) from human rheumatoid synovial cells. *FEBS lett.* 244:473-476.
69. Pardo A, N., m. Ramirez R, _ Gutierrez-Kobeh L, m. Mendoza F, m. Bauer E, and Selman M . 1991. Purification of a procollagenase-activator present in medium of cultured guinea pig carrageenin granuloma. *Connect. Tissue Res.* 26:259-269.
70. Pardo, A., R. Barrios, V. Maldonado, J. Melendez, J. Perez, V. Ruiz, L. Segura-Valdez, J. I. Sznajder, and M. Selman. 1998. Gelatinases A and B are up-regulated in rat lungs by subacute hyperoxia: pathogenetic implications. *Am J Pathol.* 153:833-844.
71. Ritter, L. M., S. H. Garfield, and U. P. Thorgeirsson. 1999. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) binds to the cell surface and translocates to the nucleus of human MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 257:494-499.
72. Roeb, E., S. Rose-John, A. Erren, D. R. Edwards, S. Matern, L. Graeve, and P. C. Heinrich. 1995. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in rat liver cells is increased by lipopolysaccharide and prostaglandin E2. *FEBS lett.* 357:33-36.
73. Saika, S., Y. Kawashima, Y. Okada, S. I. Tanaka, O. Yamanaka, Y. Ohnishi, and A. Ooshima. 1998. Recombinant TIMP-1 and -2 enhance the proliferation of rabbit corneal epithelial cells in vitro and the spreading of rabbit corneal epithelium in situ. *Curr Eye Res.* 17:47-52.
74. Sanchez-Lopez, R., R. Nicholson, M. C. Gesnel, L. M. Matrisian, and R. Breathnach. 1988. Structure-function relationship in the collagenase family member transin. *J Biol Chem.* 263:11892-11899.

75. Sang, Q. X., H. Birkedal Hansen, and H. E. Van Wart. 1995. Proteolytic and non-proteolytic activation of human neutrophil progelatinase B. *Biochim Biophys Acta*. 1251:99-108.
76. Sato, H., T. Kinoshita, T. Takino, K. Nakayama, and M. Seiki. 1996. Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett.* 393:101-104.
77. Schnaper, H. W., J. B. Kopp, A. C. Poncelet, S. C. Hubchak, W. G. Stetler-Stevenson, P. E. Klotman, and H. K. Kleinman. 1996. Increased expression of extracellular matrix proteins and decreased expression of matrix proteases after serial passage of glomerular mesangial cells. *J Cell Sci.* 109:(Pt 10):2521-8.
78. Seltzer, J. L., A. Z. Eisen, E. A. Bauer, N. P. Morris, R. W. Glanville, and R. E. Burgeson. 1989. Cleavage of type VII collagen by interstitial collagenase and type IV collagenase (gelatinase) derived from human skin. *J Biol Chem.* 264:3822-3826.
79. Shofuda Kik. Moriyama, A. Nishihashi, S. Higashi, H. Mizushima, H. Yasumitsu, K. Miki, H. Sato, M. Seiki, and K. Miyazaki. 1998. Role of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in regulation of pro-gelatinase A activation catalyzed by membrane-type matrix metalloproteinase-I (MT1-MMP) in human cancer cells. *J Biochem (Tokyo)*. 124:462-470.
80. Sires, U. I., G. L. Griffin, T. J. Brockelmann, Mecham RP, G. Murphy, A. E. Chung, H. G. Welgus, and R. M. Senior. 1993. Degradation of entactin by matrix metalloproteinases. Susceptibility to matrilysin and identification of cleavage sites. *J Biol Chem.* 268:2069-2074.
81. Smith, M. R., H. Kung, S. K. Durum, N. H. Colburn, and Y. Sun. 1997. TIMP-3 induces cell death by stabilizing TNF-alpha receptors on the surface of human colon carcinoma cells. *Cytokine.* 9:770-780.
82. Stetler-Stevenson, W. G., H. C. Krutzsch, and L. A. Liotta. 1989. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem.* 264:17374-17378.
83. Stetler-Stevenson, W. G., P. D. Brown, M. Onisto, A. T. Levy, and L. A. Liotta. 1990. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. *J Biol Chem.* 265:13933-13938.
84. Stetler-Stevenson, W. G., N. Bersch, and D. W. Golde. 1992. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-potentiating activity. *FEBS Lett.* 296:231-234.
85. Strongin, A. Y., I. Collier, G. Bannikov, B. L. Marmer, G. A. Grant, and G. I. Goldberg. 1995. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem.* 270:5331-5338.
86. Thorgeirsson, U. P., C. K. Lindsay, D. W. Cottam, and D. E. Gomez. 1993. Tumor invasion, proteolysis, and angiogenesis. *J Neurooncol.* 18:89-103.
87. Tolley, S., G. Murphy, M. O'Shea, R. Ward, A. Docherty, M. Cockett, A. Rawas, and G. Davies. 1993. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a truncated tissue metalloproteinase inhibitor delta 128-194 TIMP-2. *J Mol Biol.* 229:1163-1164.
88. Umenishi, F., M. Umeda, and K. Miyazaki. 1991. Efficient purification of TIMP-2 from culture medium conditioned by human hepatoma cell line, and its inhibitory effects on metalloproteinases and in vitro tumor invasion. *J Biochem (Tokyo)*. 110:189-195.
89. Valente, P., G. Fassina, A. Melchiori, L. Masiello, M. Cilli, A. Vacca, M. Onisto, L. Santi, W. G. Stetler-Stevenson, and A. Albini. 1998. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer.* 75:246-253.

90. van der Zee, E., I. Jansen, K. Hoeben, W. Beertsen, and V. Everts. 1998. EGF and IL-1 alpha modulate the release of collagenase, gelatinase and TIMP-1 as well as the release of calcium by rabbit calvarial bone explants. *J Periodontal Res.* 33:65-72.
91. Varghese, S., M. L. Ramsby, J. J. Jeffrey, and E. Canalis. 1995. Basic fibroblast growth factor stimulates expression of interstitial collagenase and inhibitors of metalloproteinases in rat bone cells. *Endocrinology.* 136:2156-2162.
92. Vincenti MP, White LA, Schroen DJ, Benbow U, and Brinckerhoff CE. 1996. Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 6:391-411.
93. Welgus, H. G., C. J. Fliszar, J. L. Seltzer, T. M. Schmid, and J. J. Jeffrey. 1990. Differential susceptibility of type X collagen to cleavage by two mammalian interstitial collagenases and 72 kDa type IV collagenase. *J Bio Chem.* 265:13521-13527.
94. Wick, M., C. Burger, S. Brusselbach, F. C. Lucibello, and R. Muller. 1994. A novel member of human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family is regulated during G1 progression, mitogenic stimulation, differentiation, and senescence. *J Biol Chem.* 269:18953-18960.
95. Wilhelm, S. M., I. E. Collier, B. L. Marmer, A. Z. Eisen, G. A. Grant, and G. I. Goldberg. 1989. SV40 transformed human lung fibroblasts secrete a 92 kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem.* 264:17213-17221.
96. Wu, I., and M. A. Moses. 1998. Molecular cloning and expression analysis of the cDNA encoding rat tissue inhibitor of metalloproteinase-4. *Matrix Biol.* 16:339-342.
97. Yang, M., K. Hayashi, M. Hayashi, J. T. Fujii, and M. Kurkinen. 1996. Cloning and developmental expression of a membrane-type matrix metalloproteinase from chicken. *J Biol Chem.* 271:25548-25554.
98. Zafarullah, M., S. Su, J. Martel-Pelletier, J. A. DiBattista, B. G. Costello, W. G. Stetler-Stevenson, and J. P. Pelletier. 1996. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) mRNA is constitutively expressed in bovine, human normal, and osteoarthritic articular chondrocytes. *J Cell Biochem.* 60:211-217.
99. Zeigler, M. E., N. T. Dutchshen, D. F. Gibbs, and J. Varani. 1996. Growth factor-induced epidermal invasion of the dermis in human skin organ culture: expression and role of matrix metalloproteinases. *Invasion Metastasis.* 16:11-18.
100. Zhao, W. Q., H. Li, K. Yamashita, X. K. Guo, T. Hoshino, S. Yoshida, T. Shinya, and T. Hayakawa. 1998. Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. *J Cell Sci.* 111:(Pt 9):1147-53.
101. Zucker, S., M. Drews, C. Conner, H. D. Foda, Y. A. DeClerck, K. E. Langley, W. F. Bahou, A. J. Docherty, and J. Cao. 1998. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *J Biol Chem.* 273:1216-1222.
102. Uria, J.A., Jimenez, M.G., Balbin, M., Freije, J.M.P., and Lopez-Otin, C. 1998. Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem* 273, 9769-9777.

NOTAS:

Parte de los resultados de este trabajo han sido aceptados para publicación en la revista *American Journal of Physiology*.