

BIOLOGIA MOLECULAR DEL COLAGENO. COLAGENO DEL INSECTO *CERATITIS CAPITATA*

José G. Gavilanes, María A. Lizarbe, Angel M. Municio,
Nieves Olmo y Mercedes Oñaderra

Recibido: 1 marzo 1982

Introducción

Los tejidos conectivos están constituidos por células que se hallan dispuestas en forma dispersa, alineadas entre sí y bañadas en abundante material intersticial compacto que recibe el nombre de matriz extracelular.

Las propiedades biomecánicas del tejido conectivo están reguladas por la organización macromolecular específica de su matriz extracelular, la cual contiene como principales constituyentes colágeno, elastina y proteoglicanos.

El colágeno sirve primariamente como una macromolécula estructural en diferentes tejidos del organismo. Todos los tejidos cuyas funciones primarias son soporte de peso (hueso, cartílago), transmisión de fuerzas (tendones, ligamentos), protección o compartimentalización (dermis), transmisión de luz (córnea, humor vítreo) o distribución de fluidos (vasos sanguíneos, conductos glandulares) contienen colágeno como principal componente.

Parece claro que la organización de los diferentes tipos de colágeno en tejidos diversos, y en algunos casos en el mismo tejido, está relacionada con los diferentes estados de desarrollo y maduración del organismo. Esta organización se revela por el grado de regularidad y tamaño de las fibras de colágeno unidas y refleja la función precisa de la proteína en ese tejido particular. La arquitectura del tejido parece estar determinada, en parte, por el tipo de colágeno predominante así como por la asociación del colágeno con otras macromoléculas estructurales, particularmente proteoglicanos.

TIPOS DE COLÁGENO

Todas las moléculas de colágeno están constituidas por largos conjuntos cilíndricos elaborados a base de disposiciones en triple hélice de las cadenas polipeptídicas. Estas tres cadenas polipeptídicas pueden ser iguales o diferentes; en este segundo caso la proporción puede ser variable en dependencia incluso de la naturaleza del tejido. Hechos éstos que contribuyen a una notable variabilidad en sus estructuras; variabilidad a la que hay que añadir confusión por la multiplicidad de la nomenclatura en uso, por la frecuente falta de rigor en la separación de las formas de colágeno y la deficiencia en las determinaciones analíticas.

En la actualidad, cinco tipos genéticamente distintos de colágeno han sido caracterizados. El tipo I fue el primero descubierto y es el colágeno mejor caracterizado; se encuentra en el hueso, cartílago y es el componente colagenoso mayoritario de la piel; contiene dos variedades diferentes de cadenas polipeptídicas con una fórmula molecular $(\alpha 1(I))_2 \alpha 2(I)$ [1-3].

El colágeno tipo II se encuentra en el cartílago hialino y humor vítreo; está formado por tres cadenas polipeptídicas idénticas, diferentes en estructura primaria a $\alpha 1(I)$ y $\alpha 2(I)$, con una fórmula molecular $(\alpha 1(II))_3$ [4].

El colágeno tipo III se ha encontrado en la piel, vasos sanguíneos, membranas fetales y reticulina y presenta una fórmula molecular de $(\alpha 1(III))_3$ [5-7].

El componente colagenoso de los basamentos membranosos se ha denominado colágeno tipo IV. Este tipo de colágeno no ha sido del todo caracterizado y se desconoce si existe un único colágeno de los basamentos membranosos o si se trata de una familia de diferentes moléculas de colágeno [8, 9].

La molécula de colágeno más recientemente descubierta fue, en primer lugar, aislada de placenta humana y membrana amniótica siendo posteriormente identificada en piel, membrana sinovial y embrión de pollo. Este tipo de colágeno se ha denominado tipo V y consta de dos cadenas polipeptídicas que se han denominado αA ($\alpha 1(V)$) y αB ($\alpha 2(V)$) [10]. La composición del tipo V es hoy un punto muy discutido. Basándose en la estabilidad de las cadenas A y B renaturalizadas se sugiere que la composición es $\alpha A(\alpha B)_2$.

[11] mientras que evidencias basadas en la separación cromatográfica sugieren que son dos moléculas $(\alpha A)_3$ y $(\alpha B)_3$ [12]. La composición de aminoácidos de las cadenas A y B del tipo V son bastante similares a la composición del colágeno de los basamentos membranosos; sin embargo, los pesos moleculares de las cadenas αA y αB y su resistencia a la digestión con pepsina son características de los colágenos intersticiales [13], de ahí que sea difícil situar al colágeno tipo V ya dentro de los colágenos intersticiales (tipos I, II y III) o de los colágenos de los basamentos membranosos (tipo IV).

El descubrimiento de una nueva cadena polipeptídica denominada αC ($\alpha 3$ (V)) [14, 15] en membranas sinoviales y placenta humana sugiere que los tipos A, B y C forman una subfamilia dentro del grupo de los colágenos de los basamentos membranosos.

Los colágenos intersticiales se aíslan mediante métodos no degradativos (extracción salina), extrayéndose principalmente colágeno tipo I, debido a que los tipos II y III son más insolubles. El tipo II puede ser extraído en medio ácido por digestión con pepsina o papaína [16, 17]. El colágeno tipo III ha sido extraído de la piel mediante digestión con pepsina [5, 6, 18].

La separación de los colágenos tipos I, II y III puede ser llevada a cabo por fraccionamiento salino. El colágeno tipo III precipita entre 1.5 y 1.7 M de NaCl [5, 6], el tipo I a 2.2 M de NaCl y el tipo II a 4.4 M de NaCl [19]. Después de la desnaturalización de la molécula de colágeno, el empleo de técnicas cromatográficas permite separar las cadenas $\alpha 1$ (I), $\alpha 1$ (II) y $\alpha 1$ (III) [19, 20]. La separación del colágeno extraído y fraccionado de los proteoglicanos se lleva a cabo mediante cromatografía en DEAE-celulosa [21].

La separación de los colágenos intersticiales también se puede llevar a cabo mediante métodos cromatográficos [22, 23]. Varias revisiones sobre la estructura y distribución de los colágenos intersticiales han sido publicadas [4, 13, 24].

Los colágenos tipo IV y V han sido extraídos mediante digestión con pepsina en medio ácido de los basamentos membranosos o de los tejidos que contienen estas estructuras (para revisión ver [13]).

ESTRUCTURA DEL COLÁGENO

a) *Colágenos intersticiales*

Las moléculas de los colágenos intersticiales presentan una estructura en forma de varilla de aproximadamente 3000 Å de longitud y 14 Å de diámetro.

La triple hélice está compuesta por tres cadenas polipeptídicas; cada una de ellas contiene alrededor de 1000 aminoácidos formando una hélice tipo poliprolina con aproximadamente tres residuos de aminoácidos por vuelta [25]. Las tres cadenas se arrollan entre sí alrededor de un eje común originándose una triple hélice levogira. En los extremos amino y carboxilo terminales de las cadenas existen cortas extensiones no helicoidales de 5 a 25 aminoácidos.

La hélice se estabiliza por la existencia de un puente de hidrógeno por triplete [26] y al menos una molécula de H_2O se une por triplete, lo que parece implicar a los residuos de hidroxiprolina [27]. Las interacciones iónicas e hidrofóbicas pueden también contribuir a la estabilización de la triple hélice pero este hecho no ha sido confirmado.

Gross y col. en 1954 [28] introdujeron el término «tropocolágeno» para denominar a la unidad básica de la fibra de colágeno. Este término hoy prácticamente no es utilizado, empleándose la denominación de molécula de colágeno o monómero.

La molécula de colágeno está constituida, como ya sabemos, por tres cadenas polipeptídicas del mismo tamaño. Estas cadenas polipeptídicas presentan una composición de aminoácidos y una secuencia poco frecuente en el resto de las proteínas. Constan de un triplete repetido a base de glicocola y otros dos aminoácidos, lo que puede representarse como $(Gly-X-Y)_n$. Un bajo contenido en Gly (menos de la tercera parte del contenido total de aminoácidos) puede reflejar la existencia de regiones de la molécula en una conformación no helicoidal, tales como cortos telopeptidos en la molécula de colágeno, extensiones amino y carboxilo terminal en el procolágeno o regiones ricas en Cys las cuales aparentemente se unen a las regiones $(Gly-X-Y)_n$ del colágeno de la cutícula del *Ascaris* [29, 30]. El bajo contenido en Gly de muestras de colágeno puede también reflejar la unión de proteínas no colagenosas que tengan capacidad de asociar o interaccionar con el colágeno.

En la molécula de colágeno, los iminoácidos prolina e hidroxiprolina constituyen alrededor del 20-25 por 100 de todos los residuos. Contenidos apreciables de hidroxiprolina han sido exclusivamente encontrados en el colágeno, por lo que su presencia ha sido usada como un criterio de identificación de este tipo de proteínas. Este aminoácido ha sido también identificado en la elastina, en el componente C_{1q} del complemento y en otro pequeño grupo de proteínas [31-34].

La hidroxilación de la prolina constituye una etapa de modificación postraduccional del procolágeno que es el precursor biosintético del colágeno. Esta hidroxilación requiere la existencia de enzimas tales como prolil-3-hidroxilasa y prolil-4-hidroxilasa, las cuales requieren un conjunto de efectores, oxígeno, Fe^{2+} , α -cetoglutárico y ascórbico (para revisión ver [35]).

La hidroxilación en la posición 3 de la prolina tiene lugar en el residuo X, en tanto que la hidroxilación en la posición 4 ocurre en el residuo Y del triplete que habíamos denominado (Gly-X-Y). La 4-hidroxiprolina predomina en todos los tipos de colágeno, en tanto que la 3-hidroxiprolina constituye un 10 por 100 del total de hidroxiprolina en el procolágeno de los basamentos membranosos [13].

La hidroxilisina es otro aminoácido inusual en otras proteínas que se encuentra presente en el colágeno. La hidroxilación de la lisina supone una etapa de modificación postraduccional del procolágeno. Esta hidroxilación requiere la actividad enzimática de la lisil hidroxilasa, la cual requiere Fe^{2+} , O_2 , α -cetoglutárico y ascórbico para llevar a cabo su actividad [36]. Algunos de estos residuos de hidroxilisina pueden estar glicosilados. Las reacciones de glicosilación constituyen, asimismo, etapas en la modificación postraduccional de las cadenas de procolágeno, en las que participan las enzimas responsables de la catálisis de la unión de los mosacáridos activados bajo la forma de UDP-hexosa [37, 38]. La cantidad de hidrato de carbono unido varía mucho, no sólo entre las diferentes especies sino también entre diferentes tejidos en el mismo animal.

La glucosa y galactosa son los principales hidratos de carbono componentes del colágeno pero hay evidencia de la unión de otros azúcares particularmente en colágeno de invertebrados [39-41].

Estudios de la unión de los hidratos de carbono en los colágenos de los basamentos membranosos [8, 41, 42] y colágenos intersticiales [43, 44] han demostrado que los enlaces existentes son 2-O- α -

D-glucosil-O- β -D-galactosilhidroxilisina y O- α -D-galactosilhidroxilisina. Mientras que la presencia de estos dos enlaces es aproximadamente la misma en los colágenos intersticiales, los disacáridos son 20 veces más frecuentes que los monosacáridos en los colágenos de los basamentos membranosos [8]. Asimismo se dan variaciones en el contenido de mono y disacáridos en los colágenos de diferentes tejidos [45].

No existen datos experimentales que demuestren cuál es la función de estos hidratos de carbono. Debido a que los residuos de hidroxilisina de la triple hélice implicados en entrecruzamientos aparecen glicosilados se ha sugerido que los hidratos de carbono puedan regular la formación de los entrecruzamientos así como la agregación de las moléculas de colágeno [46].

Todos estos aminoácidos, cuya presencia es casi exclusiva en las proteínas colagenosas, poseen un papel clave y fundamental en la determinación de la estructura y función de las moléculas de colágeno.

La repetición del triplete Gly-X-Y es un requerimiento absoluto para la formación de la triple hélice. La glicocola es el aminoácido más pequeño, lo que permite a las cadenas α formar una triple hélice rígida. De hecho, el interior de la superhélice es extraordinariamente pequeño, el único residuo que puede situarse en una posición interior es la glicocola, los dos residuos de aminoácidos a cada lado de la glicocola quedan en el exterior, donde los anillos voluminosos de los residuos de prolina e hidroxiprolina pueden ser acomodados fácilmente. A la estabilización de la triple hélice contribuye la presencia de hidroxiprolina mediante su participación en la unión de moléculas de H₂O [47]. Esta rigidez y estabilidad de la hélice es necesaria para la secreción normal del colágeno y su resistencia a la escisión por parte de la proteólisis tisular a excepción de la acción de las colagenasas.

Esta hélice rígida otorga, asimismo, a la molécula de colágeno una configuración tensa, estirada, esencial para la organización de las fibrillas.

El desenrollamiento de la triple hélice de la estructura de colágeno representa su desnaturalización. Este desenrollamiento puede ocurrir en focos restringidos en el seno de la molécula o, por el contrario tener lugar con implicaciones de la molécula entera. Si se calienta una solución de colágeno, se producen grandes cambios

en las propiedades físicas a una temperatura característica. La viscosidad de la solución disminuye súbitamente, indicando que las moléculas han perdido su forma de varilla. Las propiedades de di-croísmo alteradas revelan que la estructura helicoidal de las cadenas individuales se ha destruido [48]. El movimiento térmico puede superar las fuerzas que estabilizan la triple hélice, produciendo una estructura descompuesta que recibe el nombre de gelatina y que no es más que un arrollamiento al azar.

Se denomina temperatura de desnaturalización (T_m) a la temperatura correspondiente al punto medio de la transición colágeno a gelatina. La T_m para cada tipo de colágeno es un criterio de estabilidad de su estructura helicoidal. Los colágenos de especies diferentes poseen diferentes temperaturas de fusión. La diferencia de estabilidad térmica está relacionada con el contenido de iminoácidos en el colágeno; cuanto mayor es el contenido de iminoácidos, más estable es la hélice [47].

En ambos extremos amino y carboxilo-terminal de la triple hélice de la molécula de colágeno existen unas cortas secuencias que no responden a la fórmula general de $(\text{Gly-X-Y})_n$. Estas extensiones no helicoidales (telopéptidos) son relativamente ricas en aminoácidos hidrofóbicos y tienen una serie de características comunes. Todas ellas contienen un residuo de Lys el cual puede oxidarse enzimáticamente y sirve como grupo funcional para la formación de entrecruzamientos intra- e intermoleculares. La extensión NH_2 -terminal se caracteriza porque siempre empieza con ácido piroglutámico, el cual, probablemente, se forma durante la eliminación enzimática de los péptidos del procolágeno [49].

Los entrecruzamientos se forman por la interacción de aldehídos derivados de lisina y hidroxilisina con residuos de hidroxilisina en moléculas adyacentes (o fibras). Estos aldehídos fueron descritos inicialmente en la región no helicoidal NH_2 -terminal por Bornstein y Piez [50] y posteriormente en la región no helicoidal COOH -terminal [51]. No existe evidencia de la presencia de aldehídos derivados de lisina y hidroxilisina en la región en triple hélice aunque estudios indirectos parecen indicar que sí existen y que las interacciones hélice-hélice son importantes [52].

Los dos principales entrecruzamientos son la aldimina dehidrohidroxilisnonorleucina (dehidro-HLNL) y la cetoimina hidroxilisina-5-ceto-norleucina (HLONL). El enlace dehidro-HLNL se forma por

la condensación del aldehído derivado de lisina e hidroxilisina o el aldehído derivado de hidroxilisina con lisina [53]. En el último caso la aldimina se estabiliza mediante un reagrupamiento de Amadori a una cetoimina [54]. El enlace HLONL se forma por condensación del aldehído derivado de la hidroxilisina y hidroxilisina [55] para dar dehidro-DHNL la cual es entonces estabilizada «in vivo» por un reagrupamiento Amadori espontáneo para formar hidroxilisin-5-ceto-norleucina (HLONL) [54].

Un tercer tipo de entrecruzamiento histidino-hidroxi-merodesmosina (HHMD) puede ser aislado en cantidad apreciable del colágeno reducido con BH_4Na [56]. La estructura de este entrecruzamiento está formada a partir de hidroxilisina, el producto de condensación aldólica de dos aldehídos derivados de lisina e histidina [54].

Las cantidades relativas de los dos principales tipos de entrecruzamientos presentes en el colágeno de varios tejidos depende del grado de hidroxilación de los residuos de lisina en los telopéptidos [57].

La presencia de aldehídos derivados de lisina en el colágeno y la elastina sugirieron la existencia de una enzima capaz de desaminar oxidativamente grupos ϵ -aminos en estas macromoléculas. En 1968, Pinnell y Martin identificaron dicha actividad que denominaron lisil-oxidasa [58]. La lisiloxidasa requiere para ejercer su actividad la presencia de Cu^{2+} y O_2 . La enzima es inhibida por latirógenos (β -aminopropionitrilo) y por compuestos aminotiólicos [59].

La existencia y el tipo de enlaces cruzados varía con la función fisiológica y la edad del tejido. Estos enlaces intercatenarios virtualmente desaparecen con el envejecimiento del colágeno, observándose un incremento concomitante de entrecruzamiento de tipo tetrafuncional, residuos de histidín-hidroxi-merodesmosina y otros entrecruzamientos polifuncionales [57, 59].

b) *Colágenos de los basamentos membranosos*

La caracterización de moléculas intactas de colágeno nativo aislado de los basamentos membranosos no ha sido posible debido a que no son solubles en tampones no desnaturalizantes. Usualmente las membranas son solubilizadas usando enzimas proteolíticas tales como pepsina y pronasa. Parece ser que la molécula de colágeno tipo IV es susceptible de ataque proteolítico y sólo pueden ser cá-

racterizados fragmentos. Estudios sobre la síntesis del colágeno de los basamentos membranosos en la célula y en cultivo de tejidos indican que la molécula contiene cadenas α con pesos moleculares de 140.000 a 180.000 D [60]. Estas cadenas no son procesadas posteriormente, como en el caso de las cadenas de procolágeno intersticial, sino que son incorporadas inmediatamente a la matriz extracelular insoluble.

Datos acerca de la composición de aminoácidos de las cadenas α de diferentes fuentes indican que las características generales de la composición de los colágenos intersticiales se mantienen. Las mayores diferencias radican en el alto grado de hidroxilación de prolina y lisina y el alto contenido en hidratos de carbono (10 por 100; 80 por 100 del cual se encuentra bajo la forma de disacárido). A diferencia de los colágenos intersticiales alrededor del 20 por 100 de la hidroxiprolina es el isómero 3-hidroxiprolina que se encuentra preferentemente en la posición X del triplete. El contenido de aminoácidos hidrofóbicos Ile, Leu y Phe es altamente significativo en los colágenos de los basamentos membranosos mientras que el contenido en Ala es menor que en los colágenos tipo I y tipo III [13].

La composición de aminoácidos de las cadenas A y B ($\alpha 1(V)$ y $\alpha 2(V)$) del colágeno tipo V tienen también un bajo contenido en Ala y un alto contenido en hidroxilisina, Ile y Leu, siendo su composición bastante similar a la del colágeno tipo IV.

Además de estos dos tipos de colágeno se ha aislado un gran número de cadenas de tejidos ricos en basamentos membranosos [61-64]. La existencia de todos estos fragmentos no está del todo explicada y es posible que todos ellos deriven de la misma estructura de colágeno en los basamentos membranosos y que los fragmentos observados se produzcan durante el tratamiento con pepsina que se requiere para solubilizar las membranas.

La estructura de los colágenos de los basamentos membranosos no está del todo establecida. Las regiones en triple hélice resistentes a la pepsina parecen tener una región o dominio globular similar al de los procolágenos intersticiales y hay evidencia de que las regiones en triple hélice están interrumpidas por cortas regiones no helicoidales [65, 66].

ESTRUCTURA MACROMOLECULAR DEL COLÁGENO

Las propiedades biomecánicas del tejido conectivo están reguladas por la organización macromolecular específica de su matriz extracelular, la cual contiene como principales constituyentes colágeno y proteoglicanos. La formación de las fibras en el espacio extracelular es un proceso controlado por la secuencia de aminoácidos del colágeno y, en particular, por la distribución de los aminoácidos polares y hidrofóbicos. La interacción con constituyentes no colágenos del tejido conectivo tales como proteoglicanos puede también influir en el proceso.

La más pequeña estructura fibrilar formada es la microfibrilla, la cual puede observarse mediante microscopía electrónica como un filamento de 4 nm de diámetro.

Las moléculas de colágeno se asocian espontáneamente de forma específica para formar las microfibrillas. El diseño estructural fundamental de la microfibrilla es el de una formación escalonada de moléculas de colágeno, donde cada escalón está desplazado un cuarto de la longitud de la molécula [67]. La alineación alterna de las moléculas de colágeno es la responsable de las unidades repetidas cada 60-70 nm que se observan mediante microscopía electrónica en las microfibrillas [68, 69]. De estas investigaciones se concluyó que la agregación de las moléculas en microfibrillas es únicamente regulada por la secuencia de aminoácidos. La nueva etapa de ensamblaje se caracteriza por una alineación paralela de las microfibrillas para formar las fibras. El último nivel supone una agrupación de fibras, la cual puede ocurrir por diferentes caminos, así como la interacción de dichas fibras con los constituyentes no colágenos del tejido conectivo.

Los tipos I, II y III difieren en su secuencia de aminoácidos y podría esperarse que estas diferencias influenciaran la forma de agregación de las moléculas. Los experimentos realizados indican que los colágenos intersticiales pueden agregar para dar fibras las cuales exhiben el normal período de repetición de 64 nm [70]. Esto es consistente con el descubrimiento de la distribución de los aminoácidos cargados a lo largo de las cadenas α , lo cual regula el ensamblaje de las moléculas y es homólogo para estos tres tipos de colágeno.

La estructura macromolecular del colágeno tipo V no se conoce.

Tampoco hay información acerca de la organización macromolecular del colágeno tipo IV en los basamentos membranosos. La estructura amorfa de este tejido sugiere que el tipo IV no está organizado en forma de estructuras fibrilares. Sus moléculas parecen estar dispuestas de tal forma que dan lugar a una organización amorfa, de acuerdo con la especial función de este tejido membranoso [71].

BIOSÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DEL COLÁGENO

La existencia de un precursor biosintético del colágeno fue descrita por Schmitt en 1964 [72] y Speakman en 1971 [73]. A este precursor biosintético se le denominó procolágeno.

La biosíntesis y secreción del procolágeno son procesos complejos que implican numerosas enzimas, proteínas de membrana y ribosomales, elementos mecano-químicos normalmente asociados con la secreción de proteínas, así como un cierto número de reacciones especializadas [74-76].

Los procolágenos son sintetizados en la forma de cadenas pro- α [77-79]. Estas poco corrientes largas cadenas, tienen más de 1500 aminoácidos, contienen un dominio central semejante a la molécula de colágeno, el cual es el precursor de la cadena y dos largas extensiones NH_2 - y COOH -terminal. Se han determinado los pesos moleculares y la composición de aminoácidos de estas regiones para el procolágeno tipo I [75, 80-83], procolágeno tipo II [84-86] y procolágeno tipo III [87, 88].

De acuerdo con la teoría de Blobel y Dobberstein [77], las cadenas pro- α son sintetizadas llevando una secuencia amino-terminal (pre-pro- α) que sirve de señal. Mientras que las cadenas están aún unidas a los ribosomas tiene lugar la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina produciéndose a continuación la glicosilación de los residuos de hidroxilisina [75]. Hay una serie de revisiones sobre las propiedades de la prolil y lisilhidroxilasas y glicosiltransferasas y el papel de sus cofactores y cosustratos (ascórbico, α -cetoglutarato, O_2 , Fe^{2+} y Mn^{2+}) en estas reacciones [74-76, 89]. Cuando han sido hidroxilados suficiente número de residuos de prolina se forma la triple hélice; la formación de la triple hélice impide la posterior hidroxilación de prolina y lisina así como la glicosilación de hidroxilisina [75].

Posteriormente, la molécula de procolágeno va a ser transportada

desde el lumen del retículo endoplásmico rugoso al aparato de Golgi donde puede tener lugar una serie de glicosilaciones adicionales sobre las regiones no helicoidales [74, 89-91]. La exocitosis ocurre por fusión de las vesículas del aparato de Golgi con la membrana plasmática. La conversión de procolágeno a colágeno tiene lugar en el espacio extracelular e implica una proteólisis limitada del precursor por dos o más proteasas [75, 92, 93].

La vertiente catabólica del metabolismo del colágeno está poco estudiada o al menos está menos estudiada que su biosíntesis. No obstante, su importancia es obvia ya que en muchos tejidos la estructura y función de la matriz extracelular depende de la cantidad, tipo y distribución de colágeno, aspectos sobre los que inciden las vías degradativas de esta proteína.

En el medio extracelular sólo una enzima es capaz de degradar la triple hélice del colágeno. Se trata de la collagenasa que constituye el mecanismo primario por el que se degrada el colágeno extracelular ya maduro.

La dificultad de demostrar la existencia de esta actividad enzimática en diferentes estudios resulta no sólo del bajo nivel de la enzima en los diferentes tejidos sino también de la presencia de la enzima en forma latente, su tendencia a unir fibras de colágeno y su inhibición por un número de proteínas del suero. Algunos aspectos de las collagenasas de origen animal han sido revisados [94-97].

Las collagenasas tisulares difieren marcadamente en su especificidad por la molécula de colágeno de las collagenasas obtenidas del *Clostridium histolyticum* y otras fuentes microbianas. Las enzimas microbianas degradan la molécula de colágeno en sus formas nativa y desnaturalizada por más de doscientos sitios para dar péptidos de bajo Pm [98-100], mientras que las collagenasas tisulares limitan su especificidad a un único enlace de cada una de las tres cadenas de la molécula de colágeno:

Todas las collagenasas de vertebrados poseen una similar y sorprendente especificidad por el sitio de unión de la molécula de colágeno. El sitio de unión es un punto que se encuentra aproximadamente en las tres cuartas partes de la longitud de la molécula desde el extremo NH₂-terminal. Como resultado de esta rotura, el monómero de colágeno da lugar a dos fragmentos, un largo fragmento NH₂-terminal, TC^A, y un corto fragmento COOH-terminal, TC^B. Posteriormente tiene lugar un mecanismo secuencial de degradación

multienzimática que actúa sobre ambos productos de reacción para dar finalmente péptidos pequeños. Algunos autores sostienen que la proteólisis de TC^A y TC^B pudiera ser debida no a la collagenasa sino a la existencia de proteasas contaminantes [96, 97].

La tripsina y otras proteasas ejercen «in vitro» una acción similar a la collagenasa sobre algunos tipos de colágeno [13]; sin embargo, este efecto carece de sentido fisiológico al no existir tripsina en la matriz extracelular. Existe otro mecanismo propuesto para la degradación del colágeno; se trata de la fagocitosis por la que el colágeno extracelular se incorporaría en fagolisosomas y sería degradado por proteasas ácidas tipo cathepsina B1 [101, 102].

Finalmente, habría que comentar la posibilidad de un mecanismo de degradación que actuaría a nivel de colágeno recién sintetizado, distinto de los dos anteriores, según el cual el tejido sería capaz de modular la cantidad o tipo, o ambas cosas, del colágeno que está siendo secretado por la célula.

COLÁGENO DE INSECTOS

Las propiedades físicas y químicas de la molécula de colágeno han sido muy estudiadas en los vertebrados pero no así en los invertebrados [103-106].

El colágeno de algunas especies de invertebrados ha sido estudiado en detalle (Porifera, Coelenterata, Annelidos y Nematodos) pero para los otros grupos el estudio es muy incompleto. En el *phylum* de los artrópodos, el colágeno de los crustáceos ha sido objeto de una serie de estudios [107-111] mientras que el de los Chelicerata, Miriápodos e Insectos no ha sido prácticamente estudiado.

Puesto que el exoesqueleto quitinoso sirve como el principal soporte de la función en un insecto se pensó que los insectos poseerían poco o nada de colágeno [112]. Se comprobó posteriormente que esto no era cierto puesto que el colágeno, tanto en forma fibrosa como en los basamentos membranosos, se encuentra en los insectos donde proporciona el tejido de soporte alrededor de los órganos y bajo la epidermis [113].

Las fibras de colágeno de insecto son muy variables; así, en moscas y polillas son de diámetro muy pequeño e indistinguiblemente bandeadas [114, 155], mientras que en otros insectos tales

como langostas y cucarachas las fibras tienen un diámetro mucho mayor y presentan una periodicidad cada 62 nm [113, 116, 117]. La naturaleza colagenosa de estas fibras ha sido determinada mediante análisis de aminoácidos que indica la existencia de hidroxiprolina [118-120].

Los estudios rigurosos del colágeno de insectos han estado bastante dificultados por la pequeña cantidad de colágeno presente en los insectos. Se ha estudiado el colágeno de la *Leucophaea* [120] y más recientemente el de *Locusta migratoria* [121] y el de *Periplaneta americana* [122].

La *Locusta migratoria* posee dos tipos de colágeno. Las cadenas α del componente mayoritario son similares a las cadenas $\alpha 1$ (I) de mamíferos excepto en que el número de residuos de hidroxilisina es elevado y que el mapeo peptídico con CNBr es diferente. No presenta cadenas $\alpha 2$, por lo tanto la molécula de colágeno es un trímero ($\alpha 1$)₃. El sistema de entrecruzamiento de las fibras del colágeno de *Locusta* sigue el mismo mecanismo que el del colágeno de vertebrados. El entrecruzamiento predominante es la hidroxilisino-5-ceto-norleucina; la estabilidad de este entrecruzamiento da cuenta de la gran insolubilidad de este colágeno.

El segundo componente colagenoso, el cual está presente en cantidades mínimas, podría ser un colágeno semejante al tipo IV de los basamentos membranosos [121].

Las fibras reconstituidas del colágeno de *Locusta* presentan el mismo tipo de bandas SLS que el descrito para una gran variedad de insectos: cucarachas, langostas, pulgas de agua e insectos primitivos sin alas [113, 120, 123-125]. La periodicidad de estas bandas varía entre 50 y 70 nm pero esta variación parece ser artefactual. La ausencia de bandeo periódico a lo largo de las fibras delgadas de los Lepidópteros y dípteros [114] es debida probablemente a la inutilidad del sistema de teñido para proporcionar suficiente contraste en fibras de diámetro pequeño. Usando técnicas especiales de teñido [115], Locke y Huie detectaron una periodicidad de alrededor de 50 nm en las fibras de *Capodes ethlius*. Por todo ello, serán necesarios nuevos estudios con el fin de caracterizar las moléculas de colágeno de los dípteros y lepidópteros, aunque muy probablemente sean similares a las de los demás insectos.

Fibras de colágeno del adulto de *Pariplaneta americana* han sido extraídas por digestión enzimática con pepsina y posteriormente

purificadas. Estudios cromatográficos y de electroforesis en SDS revelan la presencia de una única cadena α ; la estructura de este colágeno podría representarse por la fórmula $(\alpha)_3$. La composición de aminoácidos es típica de colágeno y similar a la del tipo II. Presenta, como la mayoría de los colágenos de invertebrados, un elevado contenido en hidroxilisina. El contenido en hidratos de carbono es alto (8,8 por 100 y el mapeo peptídico con CNBr es diferente del de los colágenos conocidos. Las cadenas están unidas por un entrecruzamiento estable como dihidroxilisnonorleucina. El mapa peptídico SLS de las fibras reconstituidas es similar al del colágeno tipo I. Su peso molecular (280 000) y su longitud (285 nm) son normales; sin embargo, presenta una temperatura de desnaturalización alta (38.5° C) [122].

Materiales y métodos

MATERIAL BIOLÓGICO

El cultivo del díptero *Ceratitis capitata* (Wiedemann), utilizado a lo largo de toda la experimentación se ha realizado en el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (El Encín, Alcalá de Henares), bajo condiciones controladas de dieta, temperatura y humedad [126].

Los insectos se limpian cuidadosamente según su estado de desarrollo, antes de proceder a su utilización inmediata o a su conservación a — 70° C, hasta el momento de su empleo.

AISLAMIENTO

Extracción y solubilización del colágeno

500 g del díptero *Ceratitis capitata* se digieren con 500 mg de pepsina en ácido fórmico 0.5 M (1 g tejido/2 ml) a 4° C con agitación continua. Después de 24 horas de digestión se centrifuga a 37 000 g durante 60 minutos. Se desecha el precipitado, y al sobrenadante previamente filtrado por gasa se añade lentamente y bajo agitación constante cloruro sódico hasta alcanzar una concentración del 10 por 100 (peso/volumen). La adición del cloruro sódico se

realiza lentamente con agitación magnética a 4° C manteniéndose la agitación durante una noche, al cabo de la cual se centrifuga a 37 000 g durante 60 minutos a 4° C. El sobrenadante se desecha y el sedimento se redisuelve en Tris 0.03 M, NaCl 0.2 M, pH 7.4.

La disolución se ajusta a pH 7.4 y se dializa frente a Tris 0.03 M, NaCl 0.2 M, pH 7.4 para eliminar el cloruro sódico.

Fraccionamiento salino

La solución dializada se centrifuga a 37 000 g durante 60 minutos eliminándose el precipitado. Al sobrenadante (fracción colagenosa total) se le añade muy lentamente Tris 0.03 M, NaCl 5 M, pH 7.4, hasta alcanzar una concentración de cloruro sódico 1.8 M, dejándose agitando a 4° C durante una noche. Después se centrifuga a 37 000 g durante 60 minutos. El precipitado se redisuelve en acético 0.1 M, se dializa frente a acético 0.1 M para desalar y se liofiliza.

Al sobrenadante se añade muy lentamente cloruro sódico sólido con agitación magnética, a 4° C, hasta alcanzar una concentración de 4.5 M de cloruro sódico; se deja agitando durante una noche, al cabo de la cual se centrifuga a 37 000 g durante 60 minutos. El precipitado se redisuelve en acético 0.1 M, desalándose mediante diálisis frente a acético 0.1 M y liofilizándose a continuación.

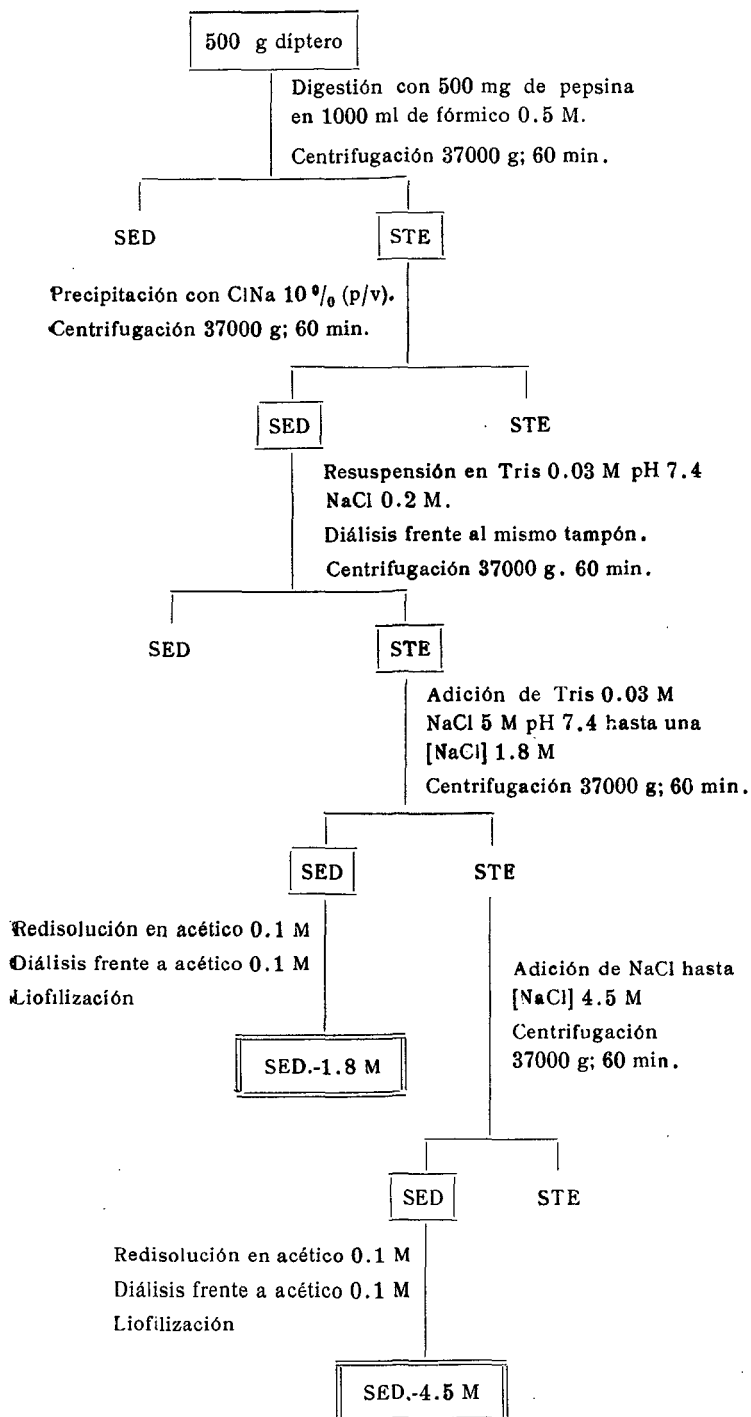
Todas las etapas del proceso de aislamiento se llevan a cabo entre 0-5° C y se resumen en el esquema 1.

Las centrifugaciones se llevan a cabo en una centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B equipada con rotor SS-34.

CARACTERIZACIÓN

Análisis de aminoácidos

Los análisis se llevan a cabo en un analizador automático Durrum, modelo D 500, equipado con un computador PDP-8M que automatiza todas las operaciones de acuerdo con un programa previamente seleccionado.



Esquema 1.—Aislamiento de los distintos tipos de colágeno.

- Hidrólisis.

La hidrólisis de la proteína (0.2 mg) se lleva a cabo en vacío con 0.5 ml de HCl tridestilado azeótropo, 5.7 N, conteniendo 0.1 por 100 (v/v) fenol, a 108° C durante 24 horas. Finalizado el proceso, las muestras se llevan a sequedad en rotavapor, con adición repetida de 0.2 ml de agua destilada y correspondiente secado.

- Análisis automático.

Las muestras secas se disuelven en 0.5 ml del tampón de aplicación que contiene: citrato sódico 19.61 g, 20.0 ml de tiodiglicol, 16.5 ml de HCl concentrado, 1.0 ml de fenol en un volumen final de 1 litro, pH 2.20 ± 0.01 . La muestra se pasa a un tubo de teflón (4 × 0.3 cm), y previa centrifugación se aplican a la columna del analizador entre 10 y 30 μ l de la muestra. La duración del análisis es de aproximadamente 100 minutos. Tanto el tampón de aplicación como los de elución son suministrados por Pierce Ch. y se esterilizan mediante filtro Millipore (0.45 micras). Finalizado el análisis, la resina se regenera con lavados de NaOH 0.3 M conteniendo 0.25 g/l de EDTA. La composición de aminoácidos en tanto por 100 molar se determina a partir de los datos de los análisis.

PURIFICACIÓN. ELIMINACIÓN DE PROTEOGLICANOS

Los diferentes liofilizados obtenidos se disuelven en Tris 0.03 M pH 8.8 conteniendo urea (desionizada) 2 M y NaCl 0.2 M.

Se equilibran unos 150 ml de DEAE-Celulosa en tampón Tris 0.03 M, NaCl 0.2 M, urea 2 M, pH 8.8, y se agitan lentamente durante una hora con la disolución correspondiente. Al cabo de este tiempo, se filtra la resina para recoger las proteínas no retenidas (colágeno). Después se lava la resina a 4° C, con agitación lenta durante una hora, con 100 ml del mismo tampón, juntándose este eluido con el anterior.

A continuación, se lava la resina, a 4° C y con agitación lenta durante una hora, con 100 ml de Tris 0.03 M, NaCl 1 M, urea 2 M, pH 8.8, para eliminar las proteínas que han quedado retenidas (proteoglicanos).

Ambos eluidos (correspondientes a colágeno y proteoglicanos respectivamente) se dializan frente a acético 0.1 M y se concentran mediante liofilización.

Resultados y discusión

AISLAMIENTO

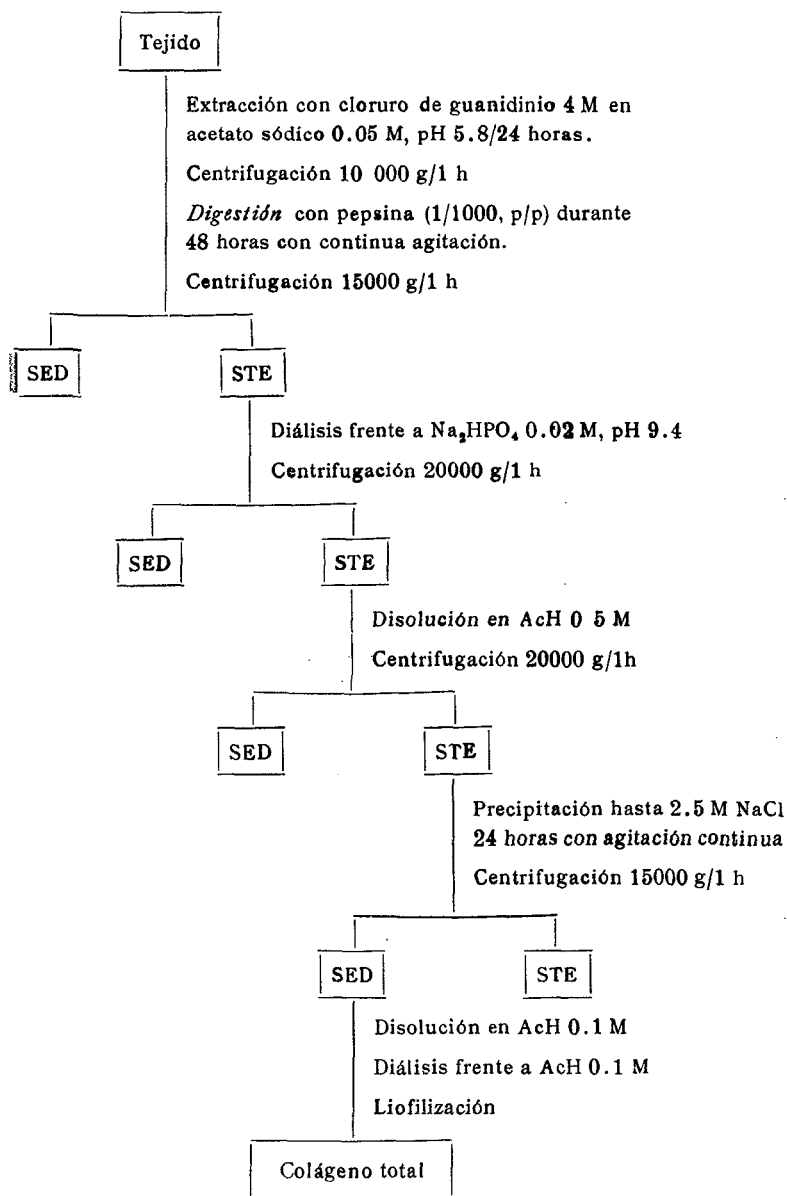
El aislamiento y caracterización del colágeno del insecto *Ceratitis capitata* se ha abordado desde toda una serie de aspectos diferentes.

El primer aspecto estudiado ha sido la elección del método de aislamiento idóneo con vistas a la obtención de moléculas de colágeno con el menor número de contaminantes y el máximo rendimiento posible.

El colágeno de insectos está poco estudiado pero en los pocos casos descritos [122] el esquema de aislamiento seguido (Método I) implica una digestión con pepsina en una relación 1/1000 (p/p), lo que permite la solubilización del material colágeno que se puede separar por centrifugación y posterior precipitación selectiva mediante diálisis frente a Na_2HPO_4 0.02 M, pH 9.4. El sedimento obtenido se disuelve en ácido acético 0.5 M y a la disolución se añade muy lentamente NaCl hasta alcanzar una concentración 2.5 M; concentración a la cual precipitarían en medio ácido todos los posibles tipos de colágeno presentes, lo que, por tanto, permite obtener una fracción colagenosa total que se disuelve en ácido acético 0.5 M, liofilizándose a continuación. Las distintas etapas del aislamiento se recogen en el esquema 2.

Con vistas a mejorar el bajo rendimiento obtenido (tabla I) con este esquema de aislamiento, se introdujo una nueva etapa en el esquema general planteado. Esta etapa supone una extracción con cloruro de guanidinio 4 M en acetato sódico 0.05 M (Método II). Mediante el empleo del cloruro de guanidinio se extrae toda una serie de proteínas de naturaleza no colagenosa, aumentando la cantidad de colágeno extraíble por acción de la pepsina. El resto de las etapas del esquema de aislamiento son similares a las empleadas en el método ya descrito (Método I).

Dependiendo del tipo de colágeno presente en el tejido, inter-



Esquema 2.—Esquema de aislamiento correspondiente a los métodos I y II.

atival o de basamento membranoso, el método de aislamiento empleado es diferente.

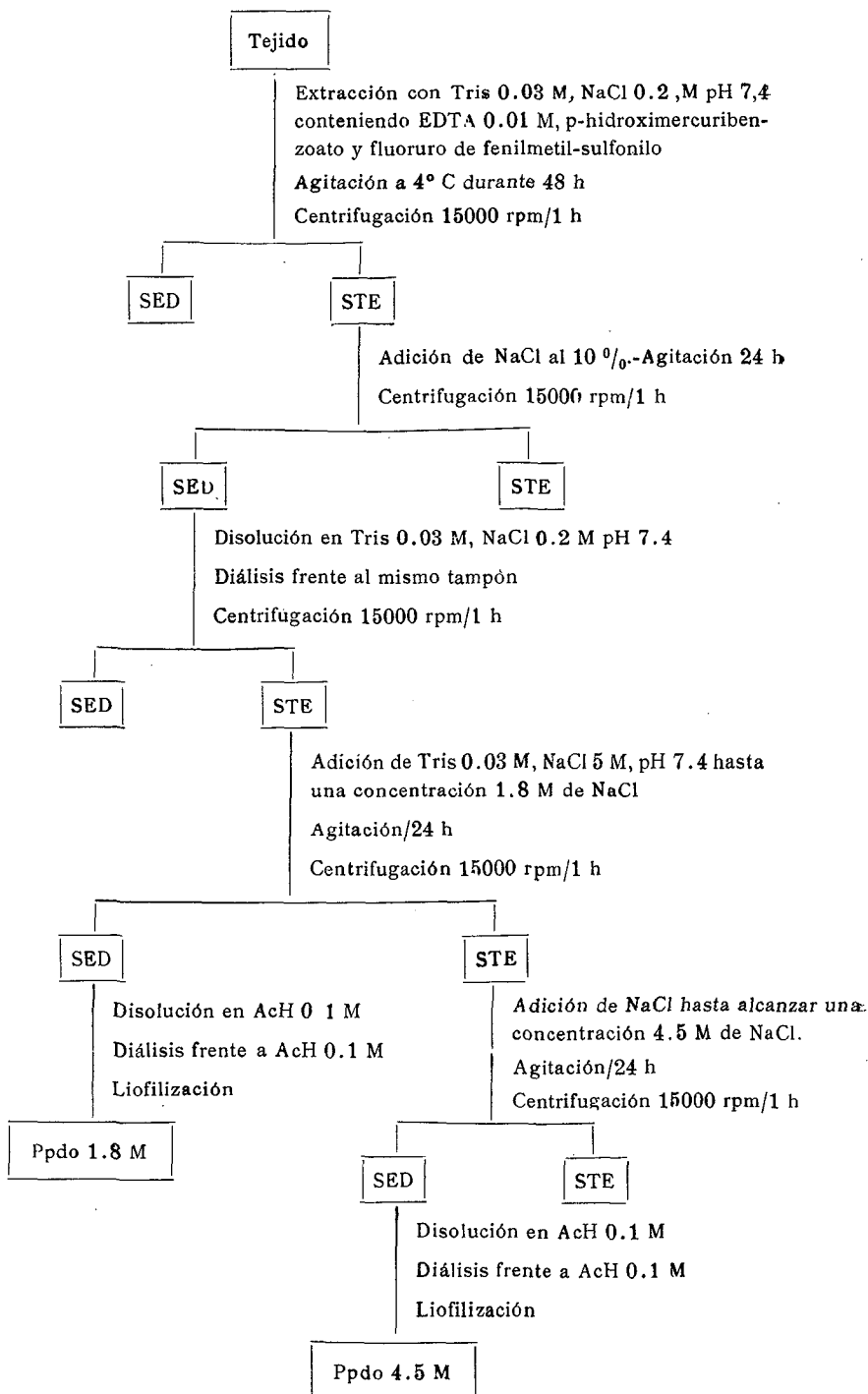
Para los colágenos de naturaleza intersticial (tipos I, II y III), el método de aislamiento empleado implica una extracción salina (Método III) para después realizar una precipitación a 2.5 M de NaCl, fuerza iónica a la que se obtendría la totalidad de la fracción colagenosa para después, por precipitación fraccionada, irse obteniendo los distintos tipos de colágeno [5, 6]. Estas precipitaciones se realizan a pH 7.4. La primera precipitación se realiza a 1.8 M de NaCl con una disolución de NaCl 5 M o con NaCl sólido, dependiendo del volumen de partida, pero siempre son precipitaciones muy lentas y con agitación fuerte y constante. El proceso se completa con diversas diálisis, redisoluciones y liofilización final tal como se indica en el esquema 3.

El método de aislamiento de colágeno de tipo membranoso (Método IV) supone una extracción del tejido en ácido fórmico 0.5 M y digestión con pepsina en proporción 1/1000 (p/p) durante 48 horas. A continuación se lleva a cabo una precipitación ácida al 10 por 100 de NaCl teniendo en cuenta los límites de precipitación de distintos tipos de colágeno de distintos orígenes. La redisolución del precipitado en tampón Tris 0.03 M, NaCl 0.2 M, pH 7.4 y ajuste a pH 7.4 va seguida de una diálisis frente a este mismo tampón y una posterior precipitación fraccionada con NaCl hasta 1.8 M (tipo II y IV) y 5 M (tipos I y V). Todos los pasos del proceso de aislamiento están resumidos en el esquema 1.

Como se observa en la tabla I, el mejor rendimiento, expresado como cantidad de colágeno (mg) total obtenida referida a 100 g de material biológico, se obtiene siguiendo el esquema de aislamiento propio de colágenos de tipo membranoso (Método IV).

Se ha determinado la composición de aminoácidos de las distintas fracciones colagenosas obtenidas según los diferentes métodos de aislamiento (tabla II). Como se observa, el porcentaje de glicocola es bastante más bajo de lo que era de esperar (≈ 30 por 100) lo que implicaría que o bien se trata de proteínas de naturaleza colagenosa o se trata de moléculas de colágeno contaminadas con otras proteínas de la matriz extracelular capaces de interaccionar con ellas, como por ejemplo los proteoglicanos.

La presencia de residuos de hidroxilisina estaría de acuerdo con que, efectivamente, se trata de moléculas de colágeno ya que su



Esquema 3.—Método III de aislamiento de colágeno. Corresponde al esquema típico de aislamiento de colágenos de naturaleza intersticial.

TABLA I

Cantidad de colágeno total obtenido en dependencia del método de aislamiento utilizado.

Método de aislamiento	Peso (mg) referido a 100 g de material biológico
I	7.2
II	20.1
III	23.2
IV	58.6

TABLA II

Composición en aminoácidos de las distintas fracciones colagenosas obtenidas según los distintos métodos de aislamiento. La composición de aminoácidos viene expresada en residuos por 1000 residuos de proteína.

Aminoácidos	MÉTODO DE AISLAMIENTO					
	I	II	III		IV	
	Colágeno total	Colágeno total	1.8 M	4.5 M	1.8 M	4.5 M
Asx	103	74	125	128	103	94
Thr	44	52	73	75	38	50
Ser	46	56	109	95	35	81
Glx	109	85	106	100	90	125
Pro	88	44	40	41	63	15
Gly	155	146	153	124	129	125
Ala	77	89	70	62	91	106
Cys	—	—	—	—	—	2
Val	50	77	60	70	47	64
Met	17	21	11	13	32	77
Ile	49	65	61	75	42	47
Leu	67	82	72	88	82	77
Tyr	32	36	36	51	77	44
Phe	34	48	34	44	62	28
His	16	19	12	7	19	32
OH-Lys... ..	13	8	6	6	3	6
Lys	49	50	14	10	40	52
Arg	51	48	18	11	47	45

presencia es extraña en otros tipos de proteínas. Por otro lado, el alto contenido en aminoácidos ácidos estaría de acuerdo con la presencia de proteoglicanos contaminando las distintas fracciones.

PURIFICACIÓN. ELIMINACIÓN DE PROTEOGLICANOS

Con objeto de purificar las distintas fracciones colagenosas y eliminar la posible presencia de proteoglicanos contaminantes, las distintas muestras se disuelven en Tris 0.03 M, NaCl 0.2 M, pH 8.4, conteniendo urea 2 M (desionizada) y se tratan con DEAE-celulosa como se describe en materiales y métodos.

El análisis de aminoácidos de las muestras, antes y después de la eliminación de proteoglicanos, se presentan en la tabla III.

Como se observa, el porcentaje de glicocola aumenta considerablemente tras la eliminación de los proteoglicanos; asimismo, la composición en aminoácidos de la fracción correspondiente a los proteoglicanos no presenta ningún residuo de hidroxilisina. Ambos hechos apuntan a un mayor grado de purificación de las distintas fracciones colagenosas.

Dado que la presencia de proteoglicanos contaminantes es independiente del método de aislamiento utilizado (tabla II) y que el máximo rendimiento o la máxima cantidad de colágeno se obtiene empleando el método IV, se ha empleado dicho esquema de aislamiento para llevar a cabo la obtención de colágeno del insecto *Ceratitis capitata* en sus diferentes estadios de desarrollo.

La cantidad de colágeno obtenida tras la eliminación de proteoglicanos siguiendo idéntico esquema de aislamiento en los estadios de larva, pupa y adulto se ve reflejada en la tabla IV.

Asimismo la tabla V refleja la composición en aminoácidos de los distintos tipos de colágeno obtenidos en dependencia del estadio del desarrollo del insecto.

En primer lugar se observa que la composición en aminoácidos es diferente en dependencia del estadio de desarrollo del insecto. En larva la composición de aminoácidos es bastante coincidente con las descritas para otros colágenos de invertebrados.

Sin embargo en el caso del adulto, aun después de la purificación por la eliminación de proteoglicanos, el contenido en glicocola sigue siendo bastante bajo y se observa un alto contenido en Glx. Esto parece indicar que o bien existen todavía otras proteínas contami-

TABLA III

Composición en aminoácidos (residuos por 1000 residuos) del colágeno de larva aislado según el método IV, antes y después de la eliminación de proteoglicanos.

Aminoácidos	FRACCIÓN COLAGENOSA			
	1.8 M		4.5 M	
	Proteoglicanos		Proteoglicanos	
	Con	Sin	Con	Sin
Asx	103	103	94	101
Thr	38	44	50	51
Ser	35	48	81	63
Glx	90	109	125	112
Pro	63	78	15	45
Gly	129	235	125	226
Ala	91	78	106	77
Cys	—	—	2	2
Val	47	47	64	55
Met	32	11	7	12
Ile	42	48	47	35
Leu	82	65	77	55
Tyr	77	23	44	33
Phe	62	14	28	28
His	19	17	32	19
OH-Lys... ..	3	8	6	8
Lys	40	23	52	32
Arg	47	49	45	46

nantes distintas de los proteoglicanos o se trata de una proteína de naturaleza colagenosa. También pudiera ocurrir que la estructura de este tipo de colágeno incluyera, como ocurre en el colágeno tipo IV, ciertas zonas que no se encuentran en estructura de triple hélice y que serían las responsables de esta anormal composición de aminoácidos.

La composición de aminoácidos de las fracciones colagenosas obtenidas de pupa se caracteriza por un elevado contenido en Pro y sobre todo un elevadísimo contenido en Val (25 por 100), sin embargo el contenido en Gly es muy bajo. Posiblemente se trate de

TABLA IV

Cantidad de colágeno obtenida antes y después de la eliminación de proteoglicanos en los diferentes estadios del desarrollo del insecto.

Insecto y extracción		Peso (mg) referido a 100 g material biológico	
		Con proteoglicanos	Sin proteoglicanos
Larva	1.8 M	10.9	9.0
	4.5 M	47.7	20.4
Adulto	1.8 M	7.2	6.0
	4.5 M	57.6	16.6
Pupa	1.8 M	8.2	3.0
	4.5 M	32.8	15.3

TABLA V

Composición en aminoácidos (residuos por 1000) de las fracciones colagenosas tras la eliminación de proteoglicanos de los distintos estadios de desarrollo del insecto. El esquema de aislamiento empleado corresponde al método IV.

Aminoácidos	LARVA		ADULTO		PUPA	
	1.8 M	4.5 M	1.8 M	4.5 M	1.8 M	4.5 M
Asx	103	101	80	90	38	51
Thr	44	51	34	38	21	31
Ser	48	63	44	67	27	32
Glx	109	112	108	121	90	96
Pro	78	45	90	72	168	166
Gly	235	226	173	169	71	75
Ala	78	77	90	82	58	71
Cys	—	2	—	—	—	—
Val	47	55	53	87	266	190
Met	11	12	19	11	2	6
Ile	48	35	44	36	37	41
Leu	65	55	68	55	17	43
Tyr	23	33	37	35	57	51
Phe	14	28	38	26	6	15
His	17	19	16	24	37	32
OH-Lys.. ...	8	8	3	—	—	1
Lys	23	32	52	44	69	58
Arg	49	46	51	43	36	41

una proteína de naturaleza colagenosa, punto que todavía se encuentra en estudio.

Bibliografía

- [1] BORNSTEIN, P., PIEZ, K. A. (1964). *J. Clin. Invest.*, **43**, 1818-1823.
- [2] CLICK, E. M., BORNSTEIN, P. (1970). *Biochemistry.*, **9**, 4699-4705.
- [3] VOLPIN, D., VEIS, A. (1973). *Biochemistry.*, **12**, 1452-1463.
- [4] MILLER, E. J. (1976). *Mol. Cell. Biochem.*, **13**, 165-192.
- [5] CHUNG, E., MILLER, E. J. (1974). *Science*, **183**, 1200-1201.
- [6] EPSTEIN, E. H. Jr. (1974). *J. Biol. Chem.*, **249**, 3225-3231.
- [7] CHUNG, E., KEELE, E. M., MILLER, E. J. (1974). *Biochemistry.*, **13**, 3459-3464.
- [8] KEFALIDES, N. A. (1973). *Int. Rev. Connect. Tissue. Res.*, **6**, 63-104.
- [9] GLANVILLE, R. W., RAUTER, A., FIETZEK, P. P. (1979). *Eur. J. Biochem.*, **95**, 383-389.
- [10] BURGESSON, R. E., EL ADLI, F. A., KAITILA, I. I., HOLLISTER, D. W. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2579-2583.
- [11] BENTZ, H., BACHINGER, H. P., GLANVILLE, R. W., KUHN, K. (1979). *Eur. J. Biochem.*, **92**, 563-567.
- [12] RHODES, R. K., MILLER, E. J. (1978). *Biochemistry.*, **17**, 3442-3448.
- [13] BORNSTEIN, P., SAGE, H. (1980). *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 957-1003.
- [14] BROWN, R. A., SHUTTLEWORTH, C. A., WEIS, J. B. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 866-872.
- [15] SAGE, H., BORNSTEIN, P. (1979). *Biochemistry.*, **18**, 3815-3822.
- [16] STRAWICH, E., NIMNI, M. E. (1971). *Biochemistry.*, **10**, 3905.
- [17] MILLER, E. J. (1972). *Biochemistry.*, **11**, 4903.
- [18] TRELSTAD, R. L. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 717.
- [19] TRELSTAD, R. L., KANG, A. H., TADE, B. P., GROSS, J. (1972). *J. Biol. Chem.*, **247**, 6469.
- [20] MILLER, E. J., HARRIS, E. D. Jr., CHUNG, E., FINCH, J. E. Jr., MC. CROSKERY, P. A., BUTLER, W. T. (1976). *Biochemistry.*, **15**, 787.
- [21] MILLER, E. J. (1971). *Biochemistry.*, **10**, 1652.
- [22] MEREDITH, S. C., KÉZDY, F. J. (1981). *Biochim. Biophys. Acta*, **668**, 357-369.
- [23] MACEK, K., DEYL, Z., COUPEK, J., SANITRAK, J. (1981). *Journal of Chromatography.*, **222**, 284-290.

- [24] PIEZ, K. A. (1976). In «Biochemistry of Collagen» (Ed. G. N. Ramachandran, A. H. Reddi), pp. 1-44. Plenum. New York and London.
- [25] COWAN, P. M., MC. GAVIN, S. (1975). *Nature* (London), **176**, 501-503.
- [26] TRAUB, W., YONATH, A., SEGAL, D. M. (1969). *Nature* (London), **221**, 914-917.
- [27] TRAUB, W. (1974). *Isr. J. Chem.*, **12**, 435-439.
- [28] GROSS, J., HIGHBERGER, J. H., SCHMITT, F. O. (1954). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **41**, 1.
- [29] MC. BRIDE, O. W., HARRINGTON, W. F. (1976). *Biochemistry*, **6**, 1484.
- [30] MC. BRIDE, O. W., HARRINGTON, W. F. (1976). *Biochemistry*, **6**, 1499.
- [31] REID, K. B. M. (1974). *Biochem. J.*, **141**, 189.
- [32] PRICE, P. A., POSER, J. W., RAMAN, N. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3374.
- [33] ANGLISTER, L., ROGOZNISKI, S., SILMAN, I. (1976). *FEBS Lett.*, **69**, 129.
- [34] SMITH, D. W., BROWN, D. M., CARNES, W. H. (1972). *J. Biol. Chem.*, **247**, 2427.
- [35] BORNSTEIN, P., TRAUB, W. (1979). The chemistry and biology of collagen. In «The proteins», 3rd Edition (Ed. H. Neurath and R. L. Hill). Vol. IV, pp. 143-156. Academic Press. New York and London.
- [36] BORNSTEIN, P., TRAUB, W. (1979). The chemistry and biology of collagen. In «The proteins», 3rd Edition (Ed. H. Neurath and R. L. Hill). Vol. IV, pp. 157-160. Academic Press. New York and London.
- [37] MYLLYLÄ, R., RISTELI, L., KIVIRIKKO, K. I. (1975). *Eur. J. Biochem.*, **52**, 401.
- [38] RISTELI, L., MYLLYLÄ, R., KIVIRIKKO, K. I. (1976). *Biochem. J.*, **155**, 145.
- [39] EASTOE, J. E. (1967). In «Treatise on Collagen» (G. N. Ramachandran, ed.). Vol. I, p. 1. Academic Press. New York.
- [40] KATZMAN, R. L., KANG, A. H. (1972). *J. Biol. Chem.*, **247**, 5486.
- [41] KEFALIDES, N. A. (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 1151.
- [42] SPIRO, R. G. (1967). *J. Biol. Chem.*, **242**, 1923.
- [43] CUNNINGHAM, L. W., FORD, J. D. (1968). *J. Biol. Chem.*, **243**, 2390.
- [44] SPIRO, R. G. (1969). *J. Biol. Chem.*, **244**, 602.
- [45] CINTRON, C. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 288.
- [46] LIGHT, N. D., BAILEY, A. J. (1979). In Fibrous Proteins: Scientific, Industrial and Medical Aspects (Parry, D. A. D.

- and Creamer, L. K., eds.). Vol. I, pp. 151-177. Academic Press. London.
- [47] BORNSTEIN, P., TRAUB, W. (1979). The chemistry and biology of collagen. In *The proteins*, 3rd Edition (Ed. H. Neurath and R. L. Hill). Vol. IV, pp. 102-117. Academic Press. New York and London.
- [48] CHIEN, J. C. W., WISE, W. B. (1975). *Biochemistry.*, **14**, 2786.
- [49] GLANVILLE, R. W.:
- [50] BORNSTEIN, P., PIEZ, K. A. (1966). *Biochemistry.*, **5**, 3460-3473.
- [51] RAUTERBERG, J., TIMPL, R., FURTHMAYR, H. (1972). *Eur. J. Biochem.*, **27**, 231-237.
- [52] SCOTT, P. G., VEIS, A., MECHANIC, G. (1976). *Biochemistry.*, **15**, 3191.
- [53] BAILEY, A. J., PEACH, C. M. (1968). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 812-819.
- [54] ROBINS, S. P., BAILEY, A. J. (1973). *Biochem. J.*, **135**, 657.
- [55] DAVIS, N. R., BAILEY, A. J. (1971). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1416-1422.
- [56] BAILEY, A. J., FOWLER, L. J. (1969). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 672-675.
- [57] LIGHT, N. D., BAILEY, A. J. (1979). The chemistry and biology of collagen. In *The proteins*, 3rd Edition (Ed. H. Neurath and R. L. Hill). Vol. IV, pp. 102-117. Academic Press. New York and London.
- [58] PINNELL, S. R., MARTIN, G. R. (1968). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 708.
- [59] BORNSTEIN, P., TRAUB, W. (1979). The chemistry and biology of collagen. In *The proteins*, 3rd Edition (Ed. H. Neurath and R. L. Hill). Vol. IV, pp. 87-96. Academic Press. New York and London.
- [60] HEATHCOTE, J. G., SEAR, C. H., GRANT, M. E. (1978). *Biochem. J.*, **16**, 283-294.
- [61] SEYER, T. M. (1978). *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, **37**, 1527.
- [62] KRESINA, T. F., RHODES, R. K., MILLER, E. J. (1978). *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, **37**, 1528.
- [63] CHUNG, E., RHODES, R. K., MILLER, E. J. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 1167-1174.
- [64] DIXIT, S. N. (1978). *FEBS Lett.*, **85**, 153-157.
- [65] TIMPL, R., MARTIN, G. R., BRUCKNER, P., WICK, G., WIEDEMANN, H. (1978). *Eur. J. Biochem.*, **84**, 43-52.
- [66] TIMPL, R., BRUCKNER, P., FIETZEK, P. P. (1978). *Eur. J. Biochem.*, **95**, 255-263.
- [67] SMITH, J. W. (1968). *Nature (London)*, **219**, 157-158.

- [68] MILLER, A. (1976). In *Biochemistry of Collagen* (Ed. G. N. Ramachandran and A. H. Reddi), pp. 85-136. Plenum New York and London.
- [69] HOFMANN, H., FIETZEK, P. P., KÜHN, K. (1978). *J. Mol. Biol.*, **125**, 137-165.
- [70] KÜHN, K., VON DER MARK, K. (1978). In «Collagen Platelet Interaction» (Ed. H. Gastpar), pp. 123-126. Schattaner, Stuttgart and New York.
- [71] KÜHN, K., GLANVILLE, R. W. (1979). The chemistry of collagen. In «The proteins», 3rd Edition (Ed. H. Neurath and R. L. Hill). Vol. IV, pp. 102-189. Academic Press. New York and London.
- [72] SCHMITT, F. O. (1964). *Fed. Proceed.*, **23**, 618.
- [73] SPEAKMAN, P. G. (1971). *Nature*, **229**, 241.
- [74] PROCKOP, D. J., BERG, R. A., KIVIRIKKO, K. I., UITTO, J. (1976). Intracellular steps in the biosynthesis of collagen. In *Biochemistry of Collagen* (Ed. G. N. Ramachandran and A. H. Reddi), pp. 163-273. Plenum Press. New York.
- [75] FESSLER, J. H., FESSLER, L. I. (1978). *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 129-162.
- [76] BORNSTEIN, P., TRAUB, W. (1979). The chemistry and biology of collagen. In *The proteins*, 3rd Edition (Ed. H. Neurath and R. L. Hill). Vol. IV, pp. 411-632. Academic Press. New York and London.
- [77] BLOBEL, G., DOBBERSTEIN, B. (1975). *J. Cell. Biol.*, **67**, 835-851.
- [78] STARK, M., LENAERS, A., LAPIÈRE, C., KÜHN, K. (1971). *FEBS Lett.*, **18**, 225.
- [79] BORNSTEIN, P., VON DER MARK, K., WYKE, A. W., EHRLICH, H. P., MOUSON, J. M. (1972). *J. Biol. Chem.*, **247**, 2808.
- [80] FURTHMAYR, H., TIMPL, R., STARK, M., LAPIÈRE, C. M., KÜHN, K. (1972). *FEBS Lett.*, **28**, 247.
- [81] VON DER MARK, K., BORNSTEIN, P. (1973). *J. Biol. Chem.*, **248**, 2885.
- [82] MURPHY, W. H., VON DER MARK, K., MC ENEANY, L. S. G., BORNSTEIN, P. (1975). *Biochemistry.*, **14**, 3243.
- [83] BYERS, P. H., CLICK, E. M., HARPER, E., BORNSTEIN, P. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3009.
- [84] DEHM, P., PROCKOP, D. J. (1973). *Eur. J. Biochem.*, **35**, 159.
- [85] UITTO, J., PROCKOP, D. J. (1974). *Biochemistry.*, **13**, 4586.
- [86] MÜLLER, P. K., JAMHAWI, O. (1974). *Biochim. Biophys. Acta*, **365**, 158.
- [87] BYERS, P. H., MCKENNEY, K. H., LICHTENSTEIN, J. R., MARTIN, G. R. (1974). *Biochemistry.*, **13**, 5243.
- [88] LENAERS, A., PAPIÈRE, C. M. (1975). *Biochim. Biophys. Acta*, **400**, 121.

- [89] BORNSTEIN, P. (1974). *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 567-603.
- [90] WEINSTOCK, M., LEBLOND, C. P. (1974). *J. Cell. Biol.*, **60**, 92-127.
- [91] GRANT, M. E., JACKSON, D. S. (1976). *Ess. Biochem.*, **12**, 77-113.
- [92] GOLDBERG, B. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3322-3325.
- [93] DUKSIN, D., BORNSTEIN, P. (1977). *J. Biol. Chem.*, **252**, 955-962.
- [94] HARRIS, E. D. Jr., KRANE, S. M. (1974). *New Eng. J. Med.*, **291**.
- [95] GROS, J. (1976). In *Biochemistry of Collagen* (G. N. Ramachandran and A. H. Reddi, eds.), pp. 275. Plenum Press. New York.
- [96] BORNSTEIN, P., TRAUB, W. (1979). The chemistry and biology of collagen. In *The proteins*, 3rd. Edition (Ed. H. Neurath and R. L. Hill). Vol. IV, pp. 167-187. Academic Press. New York and London.
- [97] HARPER, E. (1980). *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 1063-1078.
- [98] NORDWIG, A. (1971). *Adv. Enzymol.*, **34**, 155.
- [99] SEIFTER, S., HARPER, E. (1971). In *The Enzymes* (P. D. Boyer, ed.). Vol. III, pp. 649. Ecademic Press. New York.
- [100] WEISS, J. B. (1976). *Int. Rev. Conn. Tiss. Res.*, **7**, 101.
- [101] BURLEIGH, M. C., BARRET, A. J., LAZARUS, G. S. (1974). *Biochem. J.*, **131**, 387.
- [102] ETHERINGTON, D. J. (1976). *Biochem. J.*, **153**, 199.
- [103] MATHEWS, M. B. (1975). *Connective Tissue*, pp. 1-318. Springer-Verlag. Berlin, Heidelber. New York.
- [104] PIEZ, K. A., GROSS, J. (1959). *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 24-29.
- [105] ADAMS, E. (1978). *Science* (Wash DC), **202**, 591-598.
- [106] BORNSTEIN, P., TRAUB, W. (1979). The chemistry and biology of collagen. In *The proteins*, 3rd Edition (Ed. H. Neurath and R. L. Hill). Vol. IV, pp. 24-28. Academic Press. New York and London.
- [107] THOMPSON, H. C., THOMPSON, M. H. (1968). *Com. Biochem. Physiol.*, **27**, 127-132.
- [108] THOMPSON, H. C., THOMPSON, M. H. (1970). *Com. Biochem. Physiol.*, **35**, 743-748.
- [109] KIMURA, S., NAGAOKA, Y., KUBOTA, M. (1969). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **35**, 743-748.
- [110] KIMURA, S. (1972). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **38**, 1153-1161.
- [111] KIMURA, S., MATSUMURA, F. (1974). *J. Biochem.* (Tokyo), **75**, 1231-1240.
- [112] RUDALL, K. M. (1955). *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **9**, 49-71.
- [113] ASHHURST, D. E. (1968). *Annu. Rev. Entomol.*, **13**, 45-74.
- [114] DE BIASI, S., PILOTTO, F. (1976). *J. Submicrosc. Cytol.*, **8**, 337-345.

- [115] LOCKE, M., HUIE, P. (1972). *Tissue and Cell*, **4**, 601-612.
- [116] ASHHURST, D. E., COSTIN, N. M. (1974). *Tissue and Cell*, **6**, 279-300.
- [117] FRANÇOIS, J. (1975). In *Traité de Zoologie* (Grassé, P. P., ed.). Vol. 8, pp. 491-516. Masson. Paris.
- [118] ASHHURST, D. E. (1959). *Q. J. Microsc. Sci.*, **100**, 401-412.
- [119] ASHHURST, D. E., RICHARDS, A. G. (1964). *J. Morphol.*, **114**, 237-246.
- [120] HARPER, E., SEIFTER, S., SCHARRER, B. (1967). *J. Cell. Biol.*, **33**, 385-394.
- [121] ASHHURST, D. E., BAILEY, A. J. (1980). *Eur. J. Biochem.*, **103**, 75-83.
- [122] FRANÇOIS, J., HERBAGE, D., JUNQUA, S. (1980). *Eur. J. Biochem.*, **112**, 389-396.
- [123] BACCETTI, B. (1961). *Redia*, **46**, 1-7.
- [124] FRANÇOIS, J. (1972). *Arch. Anat. Microsc.*, **61**, 279-300.
- [125] SMITH, D. S., TREHERNE, J. E. (1963). *Adv. Insect. Physiol.*, **1**, 401-484.
- [126] FERNÁNDEZ-SOUSA, J. M., MUNICIO, A. M., RIBERA, A. (1971). *Biochim. Biophys. Acta*, **231**, 527-534.