

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA

C.A.R.I.D

(CENTRO DI ATENEIO PER LA RICERCA, L'INNOVAZIONE DIDATTICA E L'ISTRUZIONE A DISTANZA)

e

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE, ANESTESIOLOGICHE E RADIOLOGICHE

Master Universitario in

Terapia compressiva e metodiche di riparazione tissutale

Unità didattica

BIOLOGIA DELLA RIPARAZIONE TISSUTALE

di

Vincenzo Lanzara

Professore associato - Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare
Università degli Studi di Ferrara

Direzione del Master Paolo Frignani

Coordinamento scientifico Paolo Zamboni

Coordinamento didattico Mariasilvia Accardo, Francesca Pancaldi

Direzione del corso: Paolo Frignani
Autore: Vincenzo Lanzara, Docente del Master, Università degli Studi di Ferrara

L'edizione del presente volume costituisce parte integrante del Master in
"Terapia compressiva e metodiche di riparazione tissutale".
Non è pertanto destinata a circolazione commerciale.

Gennaio 2004 - C.A.R.I.D.©
Via Savonarola, 27 - 44100 Ferrara
Tel.: +39 0532 293439 - Fax: +39 0532 293412
E-mail: carid@unife.it
<http://carid.unife.it>

Obiettivi

QUESTA UNITÀ DIDATTICA AFFRONTERÀ:

- le fasi biologiche della riparazione tissutale;
- le citochine e i fattori di crescita;
- le metalloproteasi.

CITOCINE E FATTORI DI CRESCITA

La cute normalmente ha capacità di “self repair” o di autoripararsi allo scopo di limitare le perdite di liquidi e impedire la colonizzazione locale e la successiva possibile invasione sistemica di batteri. Questo si attua attraverso varie fasi che spesso si sovrappongono l’una all’altra interessando campi fra loro diversi come l’emostasi, l’infiammazione, l’angiogenesi, la deposizione di matrice extracellulare e la riepitelizzazione; processi tutti regolati da segnali molecolari mediati da citochine (CK), fattori di crescita (GF) e da espressione di molecole di adesione sulla superficie cellulare (1) (2) (3). In corso di alterazioni emodinamiche venose si hanno, a seconda della loro entità e in funzione del tempo in cui esse agiscono, varie alterazioni cutanee come edema, iperpigmentazione, lipodermatosclerosi e ulcere cutanee determinate da alterazione dei segnali molecolari fra i vari compartimenti: il cellulare (cellule endoteliali e cellule richiamate localmente da stimoli chemiotattici) e la matrice extracellulare.

ALTERAZIONI CUTANEE NELLA INSUFFICIENZA VENOSA CRONICA

La cute è normalmente soggetta a un continuo processo proliferativo e differenziativo sia per il suo normale rinnovamento sia per ripristinare lesioni dovute a insulti locali. In caso di pressione venosa elevata l’endotelio, stimolato da forze meccaniche trasmesse dai fluidi, diviene il punto iniziale e principale delle successive modificazioni assumendo un ruolo cardine fin dall’inizio della fase infiammatoria; prolungandosi la insufficienza venosa cronica si giunge a lipodermatosclerosi con capillari ridotti, circondati da microedema e depositi locali di proteine con conseguente ipossia che in associazione con varie CK, GF, molecole di adesione e alterazione della matrice extracellulare porta a rimodellamento vascolare con capillari dilatati e a spirale (4).

L’insufficienza venosa cronica con pressione venosa elevata, esprimendo una modificazione emodinamica, ha come conseguenza:

- 1) stimolazione endoteliale con inizio di infiammazione locale;
- 2) creazione di CK con richiamo di ulteriori cellule infiammatorie;
- 3) espressione di molecole di adesione per globuli bianchi;
- 4) localizzazione di macrofagi e cellule mesenchimali con conseguente neosintesi e rimodellamento della matrice extracellulare.

La risoluzione della flogosi tende a limitare il danno cellulare mentre un suo mantenimento conduce a ulcerazione cutanea; l’eventuale accumulo di materiale nella matrice tende invece a determinare sequele fibrotiche e sclerotiche.

◆ Fase infiammatoria

Inizia a seguito di una lesione cutanea nella zona a alta pressione venosa con emorragia locale e conseguente emostasi; le Plt reclutate in loco vanno incontro a adesione, aggregazione e degranolazione con rilascio di mediatori come PDGF. VEGF e TGF β contenuti negli α granuli e con attivazione dei fattori della coagulazione e formazione di fibrina; anche in assenza di emorragia si hanno fenomeni simili formandosi, per attivazione endoteliale, microtrombi locali che attivando la coagulazione e il complemento generano fattori vasoattivi e chemiotattici (5). I principali mediatori rilasciati hanno caratteristiche specifiche: PDGF: rilasciato da Plt, cellule endoteliali (CE) macrofagi e fibroblasti con potente azione vasocostrittrice, chemiotattica per macrofagi, fibroblasti e PMN e mitogenica per le cellule conettivali.

VEGF: simile al PDGF. Favorisce il passaggio del plasma all’esterno del vaso ed è inibito dalla angiopoietina 1 per limitare il *leakage* plasmatici.

TGF β : ritrovato in tutti i tessuti e consta di tre forme (TGF β 1 - 2 - 3).

TGF β 1: secreto da Plt degranulate. Stimola la espressione di recettori per il tipo 1 e 2 su PMN e monociti attivandone la chemiotassi e l'ulteriore secrezione di TGF β 1, TNF α , IL 1 β e PDGF, la proliferazione di fibroblasti e la deposizione di matrice extracellulare. Il contatto del TGF β e di altre CK con i rispettivi recettori determinano una trasmissione del segnale (II messaggero) all'interno della cellula che interessando NF-kB, EGR1 e MAP chinasi determina la sintesi sull'endotelio di molecole di adesione, fattori della coagulazione e CK.

Il meccanismo flogistico è quindi innestato da Plt localmente aggregate e degranulate e da attivazione endoteliale. A questo consegue il legame fra PMN e CE mediato da CAM (*cellular adhesion molecules*) (6) attraverso varie fasi:

- 1) rullaggio sotto l'azione di L Selectine dei PMN che legano il gruppo Sialil Lewis e E Selectine delle CE;
- 2) adesione con interazione CE tramite ICAM-1 e VCAM-1 della famiglia delle Ig e LFA-1 e VLA 1-4 del gruppo delle integrine poste sui PMN.

Le molecole di adesione endoteliali, poco espresse in condizioni normali, divengono altamente rappresentate sulla superficie cellulare dopo attivazione da stasi o stimoli batterici o virali. I PMN rilasciano localmente proteasi e iniziano la fagocitosi di detriti soprattutto dopo stimolo da TGF β , IL 1 α e TNF α .

Il richiamo dei macrofagi sotto l'azione chemiotattica dei fattori espressi localmente ne favorisce la fuoriuscita dai vasi verso la matrice extracellulare a cui si legano tramite integrine trasformandosi in macrofagi infiammatori o riparativi; questi producono ulteriori CK:

- TNF α , IL 1 e IL 6 che agiscono con meccanismo paracrino, iuxtacrino e endocrino stimolando le difese dell'ospite.
- MCP-1 (monocyte chemotactic protein) TGF β 1 -2 - 3 che richiamano mast cellule e stimolano la secrezione di istamina, proteoglicani, proteasi, PAF, A, arachidonico, TGF β IL 4 limitando la flogosi.

I macrofagi acquistano quindi ora un ruolo fondamentale nella transizione fra la fase infiammatoria e quella proliferativa (7).

◆ **Angiogenesi e fase proliferativa**

Alla iniziale fase infiammatoria consegue lentamente una fase proliferativa con angiogenesi e riepitelizzazione seguito della formazione locale di un tessuto di granulazione formato da cellule infiammatorie, fibroblasti, miofibroblasti, c. dendritiche e neovasi.

La neoangiogenesi (8) (9), all'inizio, è abbondante e regolata da.

- 1) Ipossia;
- 2) NO;
- 3) enzimi proteolitici;
- 4) CK e GF come VEGF, b FGF (basic fibroblast growth factor) MCP1 e MIP 1 α (macrophages inflammatory protein 1).

Nella realizzazione dei neovasi ha importanza (10) il VEGF rilasciato da CE, monociti e matrice extracellulare che stimola la NO sintetasi delle CE a formare NO la cui funzione è di agire sulle stesse cellule accentuando l'espressione dei recettori per VEGF, FGF. Questi inducono la produzione di FN, procollagenasi, TPA e u-PA e vengono attivate anche le MMP (1-2-3-13) rendendo possibile la formazione di plasmina e collagenasi.

Si determina quindi la digestione della membrana basale e le CE sono stimulate a formare nuovi vasi che invadono il tessuto di granulazione che diventa sede di abbondante neovascolarizzazione.

Parte di questi elementi cellulari possono poi andare incontro ad apoptosi sotto l'azione di altre molecole regolatorie come angiostatina 1, TSP (trombospondina) IFN γ , IL 1 β - 4 -10 -12, TNF α , TGF β 1 e TIMPS (inibitori delle metallo proteasi tessutali) per cui viene a limitarsi la notevole neoangiogenesi (11).

Importante è lo studio dello spazio perivascolare dei tessuti con ulcere cutanee in cui vi è fibrina, c. dendritiche con F XIII, $\alpha 2$ macroglobulina con funzione antiplasminica, laminina, FN, tenascina e collagene mentre il TGF $\beta 1$ è legato alla cuffia fibrinica. Nelle ulcere in fase di riparazione vi sono molte c. dendritiche ricche in F XIII mentre sono scarse in quelle senza segni di riparazione; sono ora in corso studi che dimostrerebbero la diversa attività sulla rigenerazione tissutale e sulla estensione della zona ulcerata a seconda dell'aplotipo di F XIII presente nel paziente. Se è presente un processo fibrotico molti fibroblasti si ritrovano nel contesto tissutale (12) (13).

Le CK e i GF che regolano la neoangiogenesi possono essere inibite da molecole provenienti dal circolo come la $\alpha 2$ macroglobulina o essere limitate nella loro diffusione da molecole come la fibrina con conseguente disposizione irregolare nella zona tissutale ulcerata e questo può rendere ragione della difficoltosa risoluzione della stessa (15).

◆ Riepitelizzazione

Inizia già dopo poche ore dal trauma; le cellule epidermiche rimuovono i tessuti danneggiati, il coagulo ematico e modificano anche le loro caratteristiche con retrazione dei filamenti intracellulari rendendo più labili i contatti con le cellule vicine e con la membrana basale mentre aderiscono alla matrice extracellulare. La degradazione di questa tramite lisi con enzimi proteici, plasmina e collagenasi attivate da metalloproteasi permette la separazione dell'escara dai tessuti vitali e la migrazione di cheratinociti immaturi che tendono a espandersi e poi a dividersi e proliferare sotto l'azione di stimoli ancora non ben chiari ma probabilmente tipo EGF, TGF α , KGF (*Keratinocyte growth factor*) e HBEGF (*heparin-binding epidermal growth factor*) (15).

Questi fattori sono secreti da cheratinociti in modo autocrino e da cellule mesenchimali in modo paracrino; i cheratinociti formano anche una proteina non glicosilata che inibisce le elastasi, la mast cells chinasi e l'attivazione di NF-kB e TGF $\beta 1$ (16).

Quando la riepitelizzazione è iniziata si riforma la membrana basale e le cellule epidermiche riprendono il loro normale fenotipo e tendono a riepitelizzare la lesione.

◆ Produzione della matrice e formazione della cicatrice

I fibroblasti posti alla periferia dell'ulcera proliferano e, dopo alcuni giorni, entrano e aderiscono alla matrice provvisoria che ha già subito una degradazione ad opera delle metalloproteasi iniziando un suo rimodellamento che si prolungherà poi per giorni o mesi (17).

Sia l'attività proliferativa che quella funzionale è regolata da TGF β che promuove la sintesi di collagene, proteoglicani, FN favorendo contemporaneamente l'accumulo nella matrice extracellulare inibendo, con meccanismo indiretto, l'attività di proteasi. È quindi implicato in meccanismi riparativi ma una sua disregolazione porta a stati patologici; infatti l'azione del TGF $\beta 3$ in combinazione con Activina A stimola l'arresto della matrice mentre l'espressione di BMP-6 inibisce la proliferazione epiteliale (18).

La proliferazione dei fibroblasti è regolata poi anche da altri GF come PDG, FGF, EGF, TNF α , IL 1 β , IL 6 e, proseguendo il processo riparativo attorno alla 2^o settimana, esprimono molecole di adesione per integrine, discoidina e GpIV assumendo fenotipo di miofibroblasti. Sono ora presenti numerosi filamenti di actina a livello della membrana citoplasmatica con cui si stabiliscono contatti fra le varie cellule e con la matrice; la contrazione dei filamenti porta a compattazione del tessuto connettivo a seguito di stimoli mediati da TGF $\beta 1$ $\beta 2$ e PDGF; viene continuamente sintetizzato collagene che è degradato da metalloproteasi secrete da CE, c. epidermiche e macrofagi.

Circa il 20% della superficie della ferita viene a essere ristrutturato nelle prime tre settimane con collagene che è continuamente accumulato e rimodellato tramite la contrazione del tessuto di granulazione attraverso la formazione di ampi punti di contatto tra le varie fibrille e tramite connessioni intermolecolari.

Vari meccanismi controllano localmente l'espressione del collagene come i loro recettori per i fibroblasti e le altre molecole della matrice, la presenza di proteasi ad attività litica. Le modificazioni che si attuano nel collagene sono regolate da un perfetto bilanciamento fra enzimi ad attività litica come le MMP, le elastasi e altre seriproteasi come SLPI (19) e i rispettivi inibitori come le TIMPs. Questo favorisce la contrazione della matrice extracellulare e la proliferazione dei fibroblasti che possono poi andare in apoptosi che è collagene tipo 1 dipendente e quindi mediata da segnali trasmessi tramite i recettori per il collagene.

Una coordinata regolazione degli enzimi e dei loro inibitori porta a un corretto controllo della attività proteolitica e, in condizioni normali, le connessioni molecolari limitano la degradazione tessutale e favoriscono l'accumulo della matrice e la riparazione della lesione cutanea.

◆ Conclusioni

Una ulcerazione cutanea in corso di stasi venosa si attua previa una alterazione dell'endotelio vascolare determinata da forze meccaniche trasmesse dal fluido ematico che può condurre a emorragia locale o solo ad attivazione delle CE. Fasi successive come l'infiammatoria, la neoangiogenesi e la proliferativa, la riepitelizzazione, la produzione di matrice extracellulare e la fase di rimodellamento della matrice conducono alla sua risoluzione. L'evoluzione della forma è quindi in funzione del perdurare dello stimolo e dei segnali che vengono trasmessi dai vari elementi cellulari sia giunti in sito attraverso il circolo generale sia facenti parte del connettivo perivascolare (PMN, monociti, macrofagi, cheratinociti, cellule epidermiche, fibroblasti). La normale evoluzione della forma dipende dalla possibilità degli elementi cellulari di riconoscerli attraverso la espressione in essi di recettori, la neosintesi di molecole di superficie a tipo "adesine" con conseguente produzione di GF e di CK che possono correttamente condurre fino alla riepitelizzazione della ulcera. Al contrario una disregolazione di esse o uno sbilanciamento nel rapporto fra enzimi litici e inibitori degli stessi impedisce l'evoluzione delle varie fasi e rende ragione delle difficoltà che si incontrano nella sua guarigione soprattutto se permangono le alterazioni del circolo con stasi venosa.

FATTORI AGENTI SULLA CICATRIZZAZIONE DI UNA FERITA

CK	Sorgente più importante	Cellula Target e più importante effetto
<i>Famiglia EGF</i>		
● EGF	Plt	proliferazione e motilità pleiotropica
● TGF α	macrofagi, C.epidermiche	proliferazione e motilità pleiotropica
● HBEGF	macrofagi	proliferazione e motilità pleiotropica
<i>Famiglia FGF</i>		
● b FGF	macrofagi, CE	angiogenesi e proliferazione fibroblasti
● a FGF	macrofagi,CE	angiogenesi e proliferazione fibroblasti
● KGF	fibroblasti	proliferazione e motilità fibroblasti
<i>Famiglia TGF β</i>		
● TGF $\beta 1 \beta 2$	Plt, macrofagi	motilità C. epidermiche ,chemiotassi macrofagi e fibroblasti,sintesi matrice extracellulare
● TGF $\beta 3$	macrofagi	effetto anticicatrizziale
<i>Altri</i>		
● PDGF	Plt, macrofagi	chemioattrazione e proliferazione fibroblasti, chemioattrazione e attivazione macrofagi

• VEGF	C.epidermiche	stimolo angiogenesi e permeabilità vascolare
• TNF α	PMN	effetto pleiotropico
• IL-1	PMN	effetto pleiotropico
• Insuline-like	fibroblasti,C.epidermiche	riepitelizzazione e formazione tessuto di granulazione
• CSF 1	Varie cellule	attivazione macrofagi e formazione di tessuto di granulazione

BIBLIOGRAFIA

- 1) Singer A.J., Clark RAF., *Cutaneous wound healing*. N Engl J Med 341: 738-746, 1999.
- 2) Clark RAF., *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York. Plenum Press 1996.
- 3) Quatresooz P., Henry F., Paquet P., Pierard-Franchimont c, Harding K, Pierard G., *Deciphering the impaired cytokine cascades in chronic leg ulcers* (Review). Int J Mol Med 11: 411-418. 2003.
- 4) Fagrell B., *Local microcirculation in chronic venous incompetence and leg ulcers*. Vasc Surg 13: 217-225, 1979.
- 5) Heldin C-H, Westermark B., *Role of Platelet - derived growth factor in vivo*. In Clark RAF ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York: Plenum press 1996: 249-73.
- 6) Weyl A., Vanscheidt, Veiss J.M. et al., *Expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin and their ligands VLA-4 and LFA-1 in Chronic venous leg ulcers*. J Am acad Dermatol 34: 418-423, 1996.
- 7) Riches DWH: *Macrophage involvement in wound repair, remodeling and fibrosis*. In: Clark RAF ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1996: 95-141.
- 8) Brooks PC, Clark RAF, Cheres DA: *Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis*. Science 1994; 264: 569-71.
- 9) Tomane K RJ, Shatteman GC, *Angiogenesis: New insights and therapeutic potential*. Anat Rec, 261: 126-135, 2000.
- 10) Liekens S, De Clerch E, Neyst J: *Angiogenesis: regulators and clinical implications*. Biochem Pharmacol, 61: 253-270, 2001.
- 11) Folkman J.: *Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview*. EXS 391-423, 1997.
- 12) Pintucci G, Bikfalvi A, Klein S, Rifkin DB.: *Angiogenesis and fibrinolytic system*. Semin Thromb Hemost. 22: 517-24, 1996.
- 13) Arrese Estrada J, Piérard GE: *Dendrocytes in verruga peruana and bacillary angiomatous*. Dermatology 184: 22-25, 1992.
- 14) Nissen NN, Piverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, Di Pietro LA.: *Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing*. Am J Pathol 152: 1445-52.
- 15) Falanga V, Eaglstein WH.: *The 'TRAP' hypothesis of venous ulceration*. Lancet 341: 1006-1008, 1993.
- 16) Ashcroft GS, Yang X, Glick AB et al.: *Mice lacking SMAD 3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response*. Nat Cell Biol 1: 260-66, 1999.
- 17) Ravanti L, Kahari V: *Matrix metalloproteinases in wound repair*. Int J Mol Med 6: 391-407, 2000.
- 18) Blessing M, Schirmarcher P, Kaiser S.: *Overexpression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in the epidermis of transgenic mice: inhibition or stimulation of proliferation depending on the pattern of transgene expression and formation of psoriatic lesions*. J Cell Biol 135: 227-239, 1996.
- 19) Ashcroft GS, Lei K, Jin W et al: *Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant function necessary for normal wound healing*. Nat Med 6: 1147-1153, 2000.

ENZIMI DEGRADANTI LA MATRICE

Il rimodellamento tessutale è un complesso processo multifasico frequentemente implicato sia in stati fisiologici che patologici legati ai meccanismi propri della guarigione delle ferite, dello sviluppo fetale, dei processi responsabili delle infiammazioni delle articolazioni, dell'invasione tumorale e delle metastasi. Una attività proteolitica generalmente controllata di differenti tipi cellulari è una delle caratteristiche peculiari di queste condizioni. I principali gruppi di enzimi degradanti la matrice extracellulare (ECM) sono le metalloproteasi (MMPs), le serin-proteasi e le cistein-proteasi, suddivise in sottogruppi a seconda delle caratteristiche biochimiche del loro sito attivo. Uno sbilanciato ed elevato turnover dell'ECM mediato da una sfrenata attività delle metalloproteasi sulla matrice extracellulare comporta la degradazione eccessiva del collagene e di altri componenti dell'ECM in vari tipi di patologie (1-3).

Le serin-proteasi implicate nei processi del rimodellamento tessutale, come l'attivatore tessutale del plasminogeno (tPA) e l'attivatore del plasminogeno tipo urochinasico (uPA), convertono il plasminogeno allo stato di zimogeno in plasmina, che può degradare importanti componenti della matrice extracellulare e attivare alcune pro-MMPs di matrice nella forma attiva. Nello specifico, l'uPA è in grado sia di degradare la fibronectina, un importante componente della ECM sia di attivare la gelatinasi A (4). Inoltre l' α 2-antiplasmina svolge un ruolo primario nel modulare l'attività delle MMPs bloccando la loro attivazione inibendo l'azione della plasmina prodotta dagli attivatori del plasminogeno (Fig. 1). Alcune cistein-proteasi come la catepsina B, D, G, H, L, e N sono di origine lisosomiale, vengono rilasciate nella matrice extracellulare in talune condizioni patologiche ed in particolare la catepsina G contribuisce al rimodellamento della matrice extracellulare attraverso l'attivazione della collagenasi-1 (5).

Tabella 1

ENZIMA	SUBSTRATO	ATTIVATO DA	ATTIVATORE DI
<i>Collagenases</i>			
Collagenase-1 (MMP-1)	Collagen I, II, III (III>I), VII, VIII, X, gelatin, L-selectin, tenascin, serpins, α 2-macroglobulin, TNF precursor	MMP-3,-10, plasmin, kallikrein	MMP-2
Collagenase-2 (MMP-8)	Collagen I, II,III, (I>III), VII, VIII, X, gelatin, fibronectin, serpins, α 2-macroglobulin	MMP-3, -10, plasmin	ND
Collagenase-3 (MMP-13)	Collagen I, II, III (II>I o III), IV, IX, X, XIV, gelatin, fibronectin, laminin, serpins, PAI	MMP-2, -3, -10, -14, -15, plasmin	MMP-2,-9
<i>Gelatinases</i>			
Gelatinase A (MMP-2)	Gelatin, collagen I,IV,V,VII, X, XI, XIV, fibronectin, laminin, tenascin, vitronectin, α 2-macroglobulin, TNF precursor, angiostatin	MMP-1, -7, -13, -14, -15, -16, -24	MMP-9, -13
Gelatinase B (MMP-9)	Gelatin, collagene IV,V,VII,X,XIV, elastin, vitronectin, α 1-antitrypsin, α 2-macroglobulin, TNF precursor, angiostatin	MMP-2, -3, -13, plasmin	ND

Stromelysins			
Stromelysin-1 (MMP-3)	Collagen III, IV,V, IX, X, gelatin, fibronectin, laminin, tenascin	Plasmin, kallikrein, elastase	MMP-1, -8, -9, -13
Stromelysin-2 (MMP-10)	Collagen III, IV,V, gelatin, fibronectin, elastin	Plasmin, kallikrein, elastase	MMP-1, -7, -8,-9,-13 (Nakamura et al,1998)
Stromelysin-3 (MMP-11)	α 1-proteinase inhibitor, fibronectin, laminin	Furin	ND
Matrilysin (MMP-7)	Collagen IV, gelatin, fibronectin, laminin, tenascin, elastina, vitronectin, angiostatin	MMP-3, plasmin	MMP-2
Metalloelastase (MMP-12)	Collagen IV, gelatin, fibronectin, laminin, elastin, vitronectin, α 1-antitrypsin, TNF precursor, angiostatin	ND	ND
Membrane-type MMPs			
MT-1MMP	Collagen I,II, gelatin, fibronectin, laminin, tenascin, vitronectin	Plasmin, furin	MMP-2, -13
MT2-MMP	Fibronectin, laminin, tenascin	ND	MMP-2,-13
MT3-MMP	Gelatin, casein	ND	MMP-2
MT4-MMP	Gelatin, TNF precursor	ND	MMP-2
MT5-MMP	ND	ND	MMP-2

ND : non determinato

METALLOPROTEASI DI MATRICE

Matrixine e MMPs appartengono ad una famiglia di endopeptidasi zinco-dipendenti. Il primo membro di questa famiglia fu descritto nel 1962, in seguito all'osservazione della degradazione della tripla elica di collagene nel processo di riassorbimento della coda del girino durante la metamorfosi (6). Fino ad oggi sono state descritte almeno 19 MMPs, implicate in numerosi processi fisiologici dalla riproduzione, allo sviluppo fetale alla guarigione delle ferite (7-12), e in altrettanto numerosi processi patologici, quali l'invasione di cellule tumorali e metastasi, la degradazione tessutale propria dei processi infiammatori di vari organi, alcune patologie polmonari, la sclerosi multipla, l'aterosclerosi e alcune patologie della cute (13-17). Gli enzimi proteolitici appartenenti alla famiglia delle MMPs sono in grado di degradare *in vitro* essenzialmente tutti i componenti della matrice extracellulare, comprendendo collagenasi, gelatinasi, stromalisine, *membrane-type*-MMPs (MT-MMPs), e altri enzimi suddivisi in base alla loro differente struttura e funzione (Tab. 1). Oltre alla degradazione dei numerosi substrati fisiologici le MMPs sono anche implicate in un importantissimo meccanismo di autoattivazione a cascata che ne potenzia azione ed efficacia (Fig. 1). Nonostante la vasta gamma di enzimi appartenenti a questa famiglia di proteasi, ci sono importanti caratteristiche strutturali comuni a tutte le MMPs. Infatti, tutti i membri della famiglia condividono il dominio propeptidico che viene perso dopo il processo di attivazione ed il dominio catalitico che contiene un sito di legame per lo zinco (Fig. 2) (18,19). Inoltre, il dominio COOH-terminale delle MMPs è probabilmente il responsabile della specificità per il riconoscimento del substrato ed è presente nella stragrande maggioranza delle MMPs ad eccezione della matrilisina che quindi è la più piccola della MMPs conosciute (19).

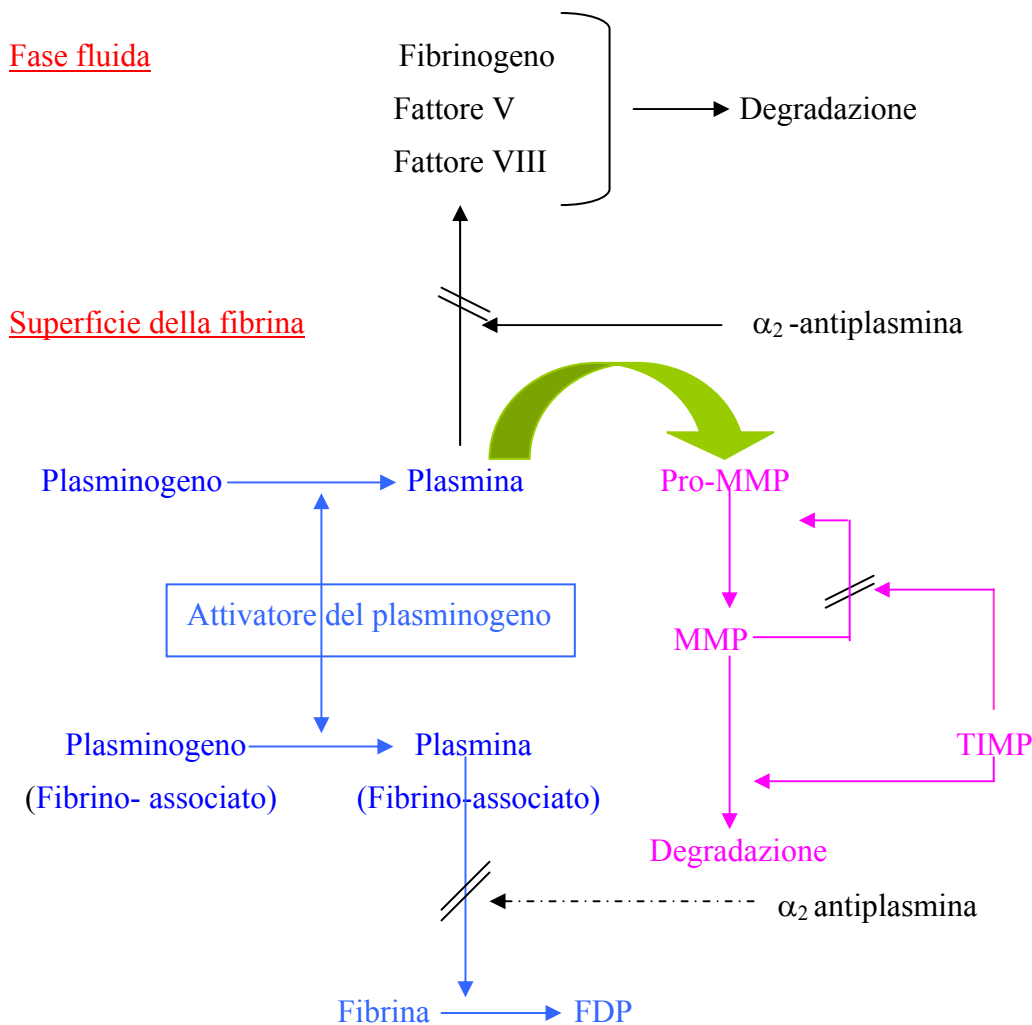


Figura 1: Rappresentazione schematica del sistema fibrinolitico del plasminogeno e delle interazioni molecolari determinanti la specificità per la fibrina degli attivatori de plasminogeno.

◆ Collagenasi

Le collagenasi -1, -2 e -3 (MMPs-1,-8 e -13) hanno la capacità di degradare il collagene fibrillare di tipo I, II, III, V e IX. In particolare, la collagenasi-1 degrada preferenzialmente il collagene di tipo III, mentre la collagenasi-2 ha preferenza per i collagene monometrici di tipo I e II (20, 21). La collagenasi-3 è dieci volte più efficace nella degradazione del collagene di tipo II, ha una più forte attività gelatinolitica rispetto alla collagenasi-1, ed una più ampia specificità di substrato rispetto ad altre collagenasi (22). Alcune collagenasi sono espresse in tessuti specifici mentre altre sono presenti in numerosi tipi cellulari sia in condizioni fisiologiche che in condizioni patologiche. Infatti, numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato che la collagenasi-1 è espressa in numerosi tipi cellulari normali quali cheratinociti, fibroblasti, cellule endoteliali, monociti, macrofagi, condrociti ed osteoblasti (19), al contrario dell'espressione della collagenasi-2 che è stata trovata solo nei neutrofili, nei condrociti in presenza di IL-1 β , in cellule endoteliali e nei fibroblasti sinoviali (23, 24). Infine, la collagenasi-3, originariamente clonata da tessuto tumorale mammario (25), è stata trovata nel midollo in sviluppo, nella cartilagine osteoartritica, nella membrana sinoviale reumatoide, in periodontiti, e in cellule tumorali di melanoma e del carcinoma a cellule squamose (26-29).

◆ **Gelatinasi**

Le gelatinasi A e B (MMPs-2 e -9) tagliano preferenzialmente l'elastina ed un numero di legami peptidici nel collagene denaturato di vari tipi (IV, V, VII e X) producendo piccoli peptidi di degradazione (30). Gelatinasi A e B sono presenti in differenti cellule e tessuti. La gelatinasi A è stata identificata in fibroblasti cutanei, cheratinociti, condrociti, cellule endoteliali, monociti, osteoblasti e in un numero di altre cellule normali e trasformate (19). Esperimenti *in vivo* su topi *knockout* per i geni delle gelatinasi hanno prodotto animali caratterizzati da ridotta angiogenesi e crescita tumorale primaria ed inoltre questi topi soffrono di un moderato ritardo nell'accrescimento (31, 32). La gelatinasi B è prodotta dai cheratinociti, monociti, macrofagi alveolari, leucociti polimorfonucleati e da numerose cellule tumorali ma non dai fibroblasti (19). Essa svolge inoltre un ruolo fondamentale nella crescita delle ossa infatti la condizione *knockout* per il gene della gelatinasi B nel topo induce ritardo nella vascolarizzazione ed ossificazione ed una anomala crescita delle ossa piatte dello scheletro (33).

◆ **Stromalisine**

Le stromalisine comprendono un gruppo di enzimi proteolitici tra cui la stromalisina -1 e -2 (MMP-3 e MMP-10), la matrilisina (MMP-7) e la metalloelastasi di matrice (MMP-12). Questi enzimi hanno un'ampia specificità di substrato e condividono la proprietà di essere capaci di attivare altre MMPs. La stromalisina-1 e la stromalisina-2 sono da un punto di vista strutturale strettamente relate ed hanno virtualmente un'identica specificità di substrato. *In vitro* sono capaci di degradare la gelatina, la fibronectina, il collagene di tipo IV e V, l'elastina e le proteine del *core* dei proteoglicani (16, 34, 35). In più, la stromelisina-1 processa il precursore del TNF- α , l' α -1proteinase-inibitor e le proteine mieliniche (16). La stromelisina-1 è espressa da una diversità di cellule e tessuti, come fibroblasti, cheratinociti, condrociti, cellule endoteliali e macrofagi. I trascritti della stromalisina-2 sono espressi generalmente da cellule normali o tumorali di origine epiteliale, a più bassi livelli rispetto la stromelisina-1, mentre non è stata trovata espressione sui fibroblasti cutanei *in vivo*. Topi deficienti in stromelisina-1 presentano ritardo nella guarigione di ferite da taglio, a causa di un anomalo processo di contrazione della ferita (36). Una particolare stromalisina, la stromalisina-3 (MMP-11), è lontanamente relata alle altre stromalisine, inizialmente clonata da tessuto tumorale mammario, differisce dalle altre MMPs nel fatto che non possiede attività proteolitica verso i componenti della matrice extracellulare (37, 38) ed il solo substrato fisiologico conosciuto è l' α 1-proteinase-inibitor (39).

La matrilisina (MMP-7), è spesso costitutivamente espressa in cellule epiteliali ghiandolari e in vari tipi di tessuti tumorali (40, 41). La matrilisina è capace inoltre di degradare proteoglicani, collagene di tipo IV e IX, laminina, fibronectina, elastina, decorina, tenascina, i domini globulari di procollagene I e III e la subunità dell'integrina β 4 (41). È anche capace di attivare la procollagenasi e processare il pro-TNF- α , similmente alla stromelisina-1 (42). La matrilisina può regolare la formazione di nuovi vasi sanguigni attraverso il taglio del plasminogeno con successiva generazione di molecole di angiostatina (43), inoltre è probabile che essa partecipi alla degradazione della ECM nei processi dell'osteoartrite (44). Importante segnalare che in topi *knockout* per il gene della matrilisina i processi di tumorigenesi dell'intestino sono soppressi (45).

◆ **Metalloproteasi tipo-membrana (MT-MMP)**

Le MT-MMPs-1,-2,-3,-4, -5 (MMPs -14,-15,-16,-17 -24) sono legate alla membrana cellulare dei tessuti dove sono espresse, ed oltre ad avere un'attività degradante la matrice extracellulare prendono parte all'attivazione di altre MMPs. Per quanto riguarda la MT1-1MMP, il suo processo di attivazione extracellulare è noto essere dipendente dalla plasmina (46). Fu clonata per la prima volta sotto forma di una progelatinase di 72kDa (47). La MT1-MMP è espressa dalle cellule stromali nel cancro del polmone, del seno, del colon e dello stomaco come riportato da numerosi lavori scienti-

fici (47-49). La MT1-MMP è capace di degradare il collagene fibrillare di tipo I, II e III, la gelatina, i proteoglicani, la fibronectina, la vitronectina e la laminina-1 (50). Topi deficienti di MT1-MMP sono caratterizzati da assenza di attività collagenolitica, che porta a warfismo, osteopenia, artrite e patologie del tessuto connettivo (51). Questi topi sono vitali ma la loro mortalità è significativamente aumentata. Così come la MT1-MMP, anche la MT2-MMP, è capace di processare la progelatinasi A nella forma attiva e dividerne la specificità di substrato (46, 52, 53). MT3- ed MT4-MMP, sono espresse in vari tessuti, e come le MT1- ed MT2-MMP, sono capaci di processare la progelatinasi A ed idrolizzare la gelatina. Specifici substrati per la MT3-MMP comprendono anche caseina, collagene di tipo III, fibronectina, vitronectina, laminina-1, e l' α -2 macroglobulina (54-56). La MT5-MMP è espressa almeno durante lo sviluppo fetale e in tessuto di cervello adulto sia nel topo che nell'uomo, oltre che in altri organi quali rene, pancreas e polmone. La MT5-MMP è capace di attivare la progelatinasi A, ed è overespressa nei tumori cerebrali dove ne facilita la progressione (57).

◆ Altre metalloproteasi di matrice

Altre MMPs tra cui MMP-18, -20, -21, -22, e -23, sono espresse in un'ampia varietà di tessuti normali quali il fegato, gli odontoblasti, i tessuti parodontali, l'ovaio e la prostata. Queste MMPs hanno domini catalitici strettamente correlati alla stromalisina-3 (MMP-11) e sono caratterizzate dalla espressione di mRNA multipli alcuni dei quali in modo tessuto specifico e con *splicing* alternativi generando così un maggior numero di trascritti e quindi differenti isoforme proteiche (58).

◆ Regolazione delle metalloproteasi di matrice

Nel tessuto normale, degradazione e sintesi dei componenti della ECM devono necessariamente essere in un mutuo equilibrio (Fig. 3). Un moderato livello di espressione di alcune MMPs con attività enzimatica strettamente controllata è un processo necessario per il mantenimento della condizione di equilibrio anche in risposta a stimoli endogeni od esogeni sia fisiologici che patologici. Citochine infiammatorie, ormoni, fattori di crescita e interazioni cellula-cellula e cellula-matrice modulano l'espressione di questi enzimi attraverso cambiamenti nei livelli di trascrizione. Inoltre la loro attività è regolata da attivatori locali, come la plasmina, e da specifici inibitori tissutali delle MMPs, i cosiddetti inibitori tissutali delle MMPs (TIMPs).

◆ Regolazione a livelli trascrizionale

Molti tipi cellulari non accumulano MMPs, tuttavia tali enzimi vengono espressi, in seguito a specifici segnali fisiologici o patologici. In linea del tutto generale l'espressione delle MMPs può essere stimolata da agenti esogeni come fattori di crescita e citochine ma ci sono alcune eccezioni. Ad esempio la gelatinasi A (MMP-2) è espressa in maniera costitutiva e risponde scarsamente ai comuni regolatori, così come la collagenasi-2 (MMP-8) è accumulata in alcuni granuli dei neutrofilo, dai quali è istantaneamente rilasciata senza precedente sintesi di proteina (19). Al contrario, l'espressione della collagenasi-2 da altri tipi cellulari quali condrociti, cellule endoteliali o fibroblasti sinoviali, può essere indotta da particolari stimoli (23, 24). Infatti IL-1, TNF- α , PDGF, e EGF stimolano l'espressione di molte MMPs tramite segnali che dipendono, almeno in parte, da una particolare proteina attivante (AP-1) legante un sito specifico della MMP. Quasi tutte le MMPs contengono questo sito, eccetto la gelatinasi-A e la stromelisina-3. La proteina AP-1 prende parte alla trascrizione basale ed indotta del promotore di tutte le MMPs. La trascrizione basale così come l'induzione delle MMPs si basa sull'interazione e cooperazione del sito AP-1 con altri elementi attivanti. Tali elementi sono altamente conservati e presenti in tutti i promotori delle MMPs ad eccezione della MMP-2. Le capacità attivanti sono regolate da proteine chinasi che mediano i segnali mediante recettori di membrana cellulari attraverso fattori di crescita, citochine, ormoni, e intera-

zioni cellula-cellula e cellula-matrice. Dette regolazioni sono altamente cellula-specifiche, infatti il TGF- β riduce l'espressione della collagenasi-1 e delle gelatinasi nei fibroblasti ma ne aumenta l'espressione nei cheratinociti (59, 60).

Nella riparazione delle ferite, nell'invasione tumorale, nelle metastasi e nell'infiammazione, la composizione e l'organizzazione della ECM è in costante cambiamento. Recettori per le integrine mediano l'informazione di questi cambiamenti alle cellule attraverso il legame di differenti componenti della matrice extracellulare. Il legame di certi componenti della ECM può risultare in un' aumentata espressione di particolari MMPs. Anticorpi diretti contro il recettore della fibronectina che bloccano l'adesione dei fibroblasti alla stessa, inducono la sintesi della collagenasi-1 e della stromelisina-1 (61), mentre anticorpi contro le subunità $\beta 1$ e $\beta 2$ delle integrine stimolano l'espressione della gelatinasi-B, ma non quella della gelatinasi-A (62), così come il contatto tridimensionale con il collagene induce l'espressione della collagenasi nei fibroblasti (63). Non solo cambiamenti nella ECM, ma anche nelle stesse cellule possono indurre l'espressione di alcune MMPs, infatti cambiamenti morfologici nei fibroblasti risultano in un' aumentata espressione di collagenasi-1 (64) oppure aumenti nella densità cellulare abbassano la sintesi collagenasi stromalisina (65), mentre al contrario un danno meccanico risulta in un' aumentata espressione degli stessi enzimi. Sono questi esempi di come la regolazione della sintesi delle MMPs dipenda anche dalla morfologia cellulare.

◆ Attivazione degli zimogeni

Gran parte delle MMP sono secrete sotto forma di un precursore inattivo che tramite attivazione proteolitica all'esterno della cellula si trasforma in MMP attiva ad eccezione della stromalisina-3 e della MT1-MMP che vengono attivate all'interno della cellula (44,66). L'attivazione delle MMPs dipende ed è regolata da un complesso meccanismo chiamato "*cystein-switch*", che è caratterizzato dall'interazione di una cisteina altamente conservata nel propeptide con lo zinco in un sito catalitico che blocca l'accesso del substrato al sito catalitico (67). Agenti, quali organomercuriali e caotropici, sono in grado di dissociare il legame covalente tra la cisteina e lo zinco catalitico. *In vivo* l'attivazione molto verosimilmente avviene mediante processi proteolitici in cui enzimi come tripsina, plasmina e callicreina processano il proenzima in una forma intermedia attiva che poi autocataliticamente taglia se stessa trasformandosi nella forma permanentemente attiva. Alcune MMPs del sottogruppo delle stromalisine sono capaci di "superattivare" altre MMPs direttamente nella forma totalmente attiva.

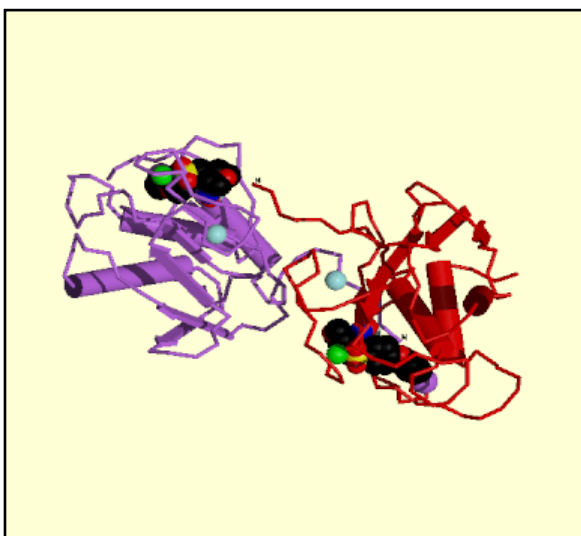


Figura 2: Metalloproteasi di matrice
Collagenasi-3 (MMP-13)
Origine: Homo sapiens, Human. Espressa in Escherichia Coli

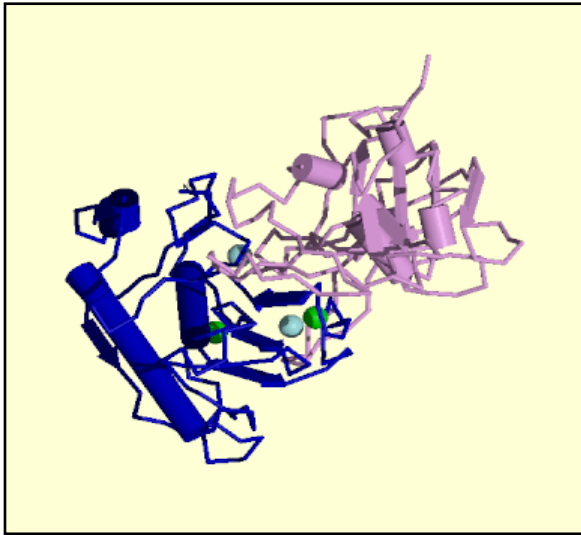


Figura 4: Metalloproteasi di matrice tipo membrana/inibitore

Struttura del complesso MT1-MMP-TIMP-2
Origine: Homo sapiens. Human. Espresso in Escherichia Coli

◆ **Inibizione dell'attività delle metalloproteasi**

L'attività delle MMP può essere inibita da inibitori sintetici o naturali. I primi includono agenti chelanti come EDTA, 1,10-fenantrolina o anticorpi inibitori, mentre gli ultimi includono specifici inibitori tissutali delle MMPs, i TIMPs, ed inibitori non specifici, come l' α 2-macroglobulina e l' α 1-antiproteasi. L' α 2-macroglobulina è una molecola presente in gran quantità in tutti i distretti dell'organismo e può essere importante per il controllo dell'attività proteolitica globale (19).

◆ **Inibitori tissutali delle metalloproteasi**

Gli inibitori tissutali delle MMPs (TIMPs) (Fig. 4) sono una famiglia di proteine capaci di inibire l'attività delle metalloproteasi di matrice attraverso legami non-covalenti diretti verso forme attive o pre-attive di MMPs in rapporto stechiometrico. I TIMPs possono influenzare processi MMP-mediati come il processamento delle citochine, la degradazione dei fattori di crescita leganti proteine, ed il rilascio di fattori di crescita legati ai componenti della ECM (68-71). Un totale di 4 TIMPs (TIMP-1,-2, -3 e -4) sono stati caratterizzati e trovati in molti tessuti umani e fluidi corporei, presenti in forma solubile (72, 73), ad eccezione del TIMP-3.

Il TIMP-1 preferenzialmente inibisce l'attività della collagenasi-1, mentre il TIMP-2 è capace di inibire tutte le metalloproteasi, in particolare è un forte inibitore della gelatinasi A e B (per la gelatinasi A è un attivatore quando presente a basse concentrazioni ed un inibitore alle alte concentrazioni) (74, 76). I TIMP-1 e -2 sono stati dimostrati inibire la crescita tumorale e le metastasi in animali ed in studi di colture cellulari (77). Sia l'espressione di TIMP-1 che TIMP-2 può essere indotta in varie linee cellulari e tessuti.

Diversamente dagli altri membri della famiglia dei TIMPs, il TIMP-3 si trova legato alla matrice (78), ed ha la capacità di inibire l'enzima convertente il TNF- α (79), la collagenasi-1, le gelatinasi A e B, e la stromelisin-1 tanto efficientemente quanto il TIMP-1. (80). Il TIMP-3 è espresso in vari tessuti normali adulti (80, 81) e durante lo sviluppo embrionale, nella pelle, e nel cancro mammario e del colon (82, 83).

Il quarto inibitore tissutale delle metalloproteasi, il TIMP-4 (84, 85) è un potente inibitore della matrilisina e della gelatinasi A similmente al TIMP-2, ma anche della collagenasi-1, della gelatinasi A e B, e della stromelisin-1 (86). Il TIMP-4 è espresso nel cuore dell'adulto, nel rene, nella placenta, nel colon e nei testicoli (84). Inoltre è stato dimostrato inibire *in vitro* il potenziale invasivo di cellule neoplastiche nel cancro mammario ed *in vivo* la crescita tumorale e le metastasi nel topo (87).

L'espressione del TIMP-1 è aumentata da vari fattori di crescita e dalle citochine, come il TGF- β e l'IL-1 β , mentre il TNF possiede nei confronti del TIMP-1 un effetto bifunzionale, basse concentrazioni ne stimolano la produzione ed alte concentrazioni la sopprimono (88). L'espressione di TIMP-

2 è largamente costitutiva (89) e l'espressione di TIMP-3 è controllata in modo ciclo cellulare dipendente in vari tipi cellulari.

Sebbene la funzione fisiologica meglio conosciuta per i TIMPs è la loro capacità di regolare la proteolisi della ECM mediata dalle MMPs, recentemente sono state riconosciute altre importanti mansioni attribuibili ai TIMPs. Infatti TIMP-1 e TIMP-2 hanno attività eritroide potenziante, (90-92) e sono capaci di stimolare la crescita di vari tipi di cellule, compresi cheratinociti e fibroblasti (93-96). L'aumentata espressione di TIMP-1 stimola l'espressione di collagene di tipo IV e di laminina in cellule di carcinoma mammario di ratto, ma non ha effetto sull'espressione della gelatinasi A, sulla stromalisina-1 e sulla gelatinasi B (97). L'elevata espressione di TIMP-1 riscontrata in cellule muscolari lisce vasali di ratto non ha effetti sulla proliferazione cellulare, mentre quella di TIMP-2 causa una riduzione in proliferazione dose-dipendente (11). Infine, l'aumentata espressione di TIMP-3 induce neo-sintesi di DNA e promuove la morte cellulare attraverso processi di apoptosi (98, 99) in cellule umane di carcinoma del colon. TIMP-1 e TIMP-3 sono inoltre capaci di inibire l'angiogenesi attraverso il blocco della risposta cellulare endoteliale ai più importanti fattori angiogenici.

LE METALLOPROTEASI DI MATRICE NELLA RIPARAZIONE DELLE FERITE CUTANEE

La degradazione proteolitica della matrice extracellulare è un processo necessario durante la riepitelizzazione e durante la migrazione delle cellule stromali, nonché durante la neoangiogenesi ed il finale rimodellamento del tessuto danneggiato. A causa della loro capacità degradante la matrice, le MMPs sono più probabilmente coinvolte in fasi distinte della guarigione della ferita. Possono essere necessarie nella rimozione del tessuto devitalizzato e nel rimodellamento del tessuto connettivo nuovamente formato, nella migrazione dei cheratinociti, nell'angiogenesi e nel processamento di alcuni fattori di crescita (30). Nel contesto di guarigione delle ferite è stato studiato non solo il contributo delle MMPs, ma anche di altre proteasi, come le serin-proteasi. Nello specifico, l'attivazione del plasminogeno a plasmina è stata dimostrata in ferite iatrogene umane, con conseguente rimozione di matrice provvisoria contenente fibrina (100). Il putativo effetto dannoso di un eccesso di attivazione di plasminogeno sulla guarigione della ferita fu dimostrato confrontando fluidi di ferite croniche con fluidi di ferite guarite (101). Da qui è stato suggerito un ruolo per l'attivazione del plasminogeno nei processi di riepitelizzazione poiché uPA, recettore per uPA ed inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1) sono espressi dai cheratinociti durante la fase di guarigione della ferita (102-104). Inoltre topi plasminogeno-deficienti soffrono di una sbilanciata guarigione delle ferite, con disturbata riepitelizzazione e risoluzione del coagulo di fibrina (105).

L'attività della collagenase-1 raggiunge il suo massimo nei primi giorni del processo di guarigione, e declina rapidamente dopo la riepitelizzazione di ferite acute (106). Questa attività è stimolata da fattori di crescita quali il TGF- β ed il TNF- α . L'espressione epidermica della collagenase-1 può essere necessaria per facilitare la migrazione dei cheratinociti attraverso la degradazione dei collagene fibrillari.

La collagenasi-1 non solo è espressa da cellule coinvolte nella riepitelizzazione, ma anche da cellule stromali. Le cellule responsabili dell'espressione della collagenase-1 possono essere i macrofagi, i fibroblasti e le cellule endoteliali. Dovuta alla sua abilità a tagliare i collagene fibrillari, la collagenase-1 indubbiamente partecipa al rimodellamento della matrice di collagene. La regolazione della collagenase-1 nel derma è verosimilmente differente da quella dei cheratinociti. Infatti il TGF- β aumenta l'espressione della collagenase-1 nei cheratinociti in coltura, ma ne diminuisce l'espressione nei fibroblasti (107). L'aumento dell'espressione della collagenase-1 nei fibroblasti può essere indotta anche da altri fattori di crescita come EGF e b-FGF.

Le gelatinasi sembrano avere ruoli distinti durante la guarigione delle ferite. La gelatinasi A partecipa al rimodellamento a lungo termine del derma, mentre la gelatinasi B è coinvolta nella riepitelizzazione. Infatti, fluidi d'ulcera cronica contengono elevati livelli di gelatinasi, che indicano che

un eccesso di questi enzimi possono disturbare la guarigione della ferita (105,106-108,109), gli elevati livelli di gelatinasi B possono, almeno in parte, originare dai leucociti polimorfonucleati di ulcere croniche infettate (19, 110, 111).

La stromalisina-2 sembra essere critica nella migrazione dei cheratinociti, mentre la stromelisina-1 può essere coinvolta nel rimodellamento della membrana basale neo-formata e della matrice della ferita. Inoltre grazie alla loro abilità ad attivare la procollagenasi (112), esse possono contribuire alla proteolisi collagenasi-mediata.

POLIMORFISMI NEI GENI DELLE MMPS

Variazioni nei livelli di espressione e di attivazione delle MMPs svolgono un ruolo chiave nei processi sopradescritti e variazioni spontanee nella sequenza del DNA dei promotori dei geni delle MMPs possono modularne l'attività trascrizionale. Dette varianti geniche, possono contribuire almeno in parte alle forti differenze inter-individuali osservate in numerose malattie croniche quali le patologie cardiovascolari e della cute ed il cancro. Alcune di queste varianti geniche sono state identificate e associate con la suscettibilità e/o la progressione di aterosclerosi, aneurisma e cancro (113). Quindi, questi geni potrebbero essere considerati ottimi candidati per lo studio sulla suscettibilità di patologie che coinvolgano una attiva degradazione/rimodellamento della matrice extracellulare. Sono qui di seguito rappresentate alcune tra le varianti più note delle MMPs.

Tabella 2

POLIMORFISMI NELLE REGIONI PROMOTRICI DEI GENI DELLE METALLOPROTEASI DI MATRICE					
GENE	POLYMORPHISM	POSITION	NATURE OF POLYMORPHISM	DISEASE STUDIED	REFERENCE
MMP-1	-1607 del/ ins	-1607	G	Ovarian cancer	Rutter et al.,1998 Kanamori et al.,1999
MMP-3	-1612 del/ ins (5A/6A polymorphism)	-1612	A	Coronary atherosclerosis Myocardial infarction Abdominal aortic aneurysm	Ye et al.,1995 De Maat et al.,1999 Humphries et al.,1998 Terashima et al.,1999 Yoon et al.,1999
MMP-9	C-1562T Microsatellite	-1562 -90	C > T (CA) _n	Coronary atherosclerosis Intracranial aneurysm Abdominal aortic aneurysm Multiple sclerosis	Zhang et al., 1999 Shimajiri et al.,1999 Peters et al.,1999 Yoon et AL.,1999 Nelissen et al.,2000
MMP-12	A-82G	-82	A >G	Coronary atherosclerosis	Jormsjo et al.,2000

BIBLIOGRAFIA

1. Coleridge Smith PD, Thomas P, Scurr JH, et al.. *Causes of venous ulceration: a new hypothesis*. Br.Med. J. 1988; 296: 1726-1727.
2. Heroy Y, Trefzer D, Zimpfer U, et al. *Matrix metalloproteinases and venous leg ulceration*. Eur. J. Dermatol. 2000 ; 10 : 173-180.
3. Heroy Y, May AE, Pornschlegel G, et al. *Lipodermatosclerosis is characterized by elevated expression and activation of matrix metalloproteinases: implication for venous ulcer formation*. J Invest Dermatol. 1998; 822-827.
4. Jones JL, Walker RA: *Control of matrix metalloproteinase activity in cancer*. J Pathol 1997, 183: 377-379.
5. Saarialho-Kere UK, Kerkelä E, Jeskanen L, Hasan T, Pierce R, Starcher B, Raudasoja R, Ranki A, Oikarinen A, Vaalamo M: *Accumulation of matrilysin (MMP-7) and macrophage metalloelastase (MMP-12) in actinic damage*. J Invest Dermatol, 1999, 113: 664-672.
6. Gross J, Lapiere CM: *Collagenolytic activity in amphibian tissue: A tissue culture assay*. Physiol 1962, 48: 1014-1022.
7. Stricklin GP, Li L, Jancic V, Wenczak BA, Nanney LB: *Localization of mRNAs representing collagenase and TIMP in sections of healing human burn wounds*. Am J Pathol 1993, 143: 1657-1666.
8. Stricklin GP, Nanney LB: *Immunolocalization of collagenase and TIMP in healing human burn wounds*. J Invest Dermatol 1994a, 103: 488-492.
9. Stricklin GP, Li L, Nanney LB: *Localization of mRNAs representing interstitial collagenase, 72 kDa gelatinase, and TIMP in healing porcine burn wounds*. J Invest Dermatol 1994b, 103: 352-358.
10. Vaalamo M, Weckroth M, Puolakkainen P, Kere J, Saarinen P, Lauharanta J, Saarialho-Kere UK. *Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression in chronic and normally healing human cutaneous wounds*. Br J Dermatol. 1996 Jul; 135 (1): 52-9.
11. Inoue M, Kratz G, Haegerstrand A, Stähle-Bäckdahl M: *Collagenase expression is rapidly induced in wound-edge keratinocytes after acute injury in human skin, persists during healing, and stops at reepithelialization*. J Invest Dermatol 1995, 104: 479-483.
12. Airola K, Ahonen M, Johansson N, Heikkilä P, Kere J, Kähäri V-M, Saarialho-Kere UK: *Human TIMP-3 is expressed during fetal hair development, hair growth cycle and cancer progression*. J Histochem Cytochem 1998, 46: 1-11.
13. O'Connor CM, FitzGerald MX: *Matrix metalloproteinases and lung disease*. Thorax 1994, 49: 602-609.
14. Cawston TE, Billington C: *Metalloproteinases in the rheumatic diseases*. J Pathol 1996, 180: 115-117.
15. Chandler S, Miller KM, Clements JM, Lury J, Corkill D, Anthony DCC, Adams SE, Gearing AJH: *Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: An overview*. J Neuroimmunol 72: 155-161, 1997.
16. Knox JB, Sukhova GK, Whittemore AD, Libby P: *Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases*. Circulation 1997, 95: 205-212.

17. Uitto V-J, Airola K, Vaalamo M, Johansson N, Putnins EE, Firth JD, Salonen J, López-Otín C, Saarialho-Kere U, Kähäri V-M: *Collagenase-3 (MMP-13) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation*. *Am J Pathol* 1998, 152: 1489-1499.
18. Woessner JF Jr: *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling*. *FASEB J* 1991, 5: 2145-2154.
19. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA: *Matrix metalloproteinases: A review*. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993, 934-6154.
20. Welgus HG, Jeffrey JJ, Eisen AZ: *The collagen substrate specificity of human skin fibroblast collagenase*. *J Biol Chem*. 1981, 256: 9511-9515.
21. Hasty KA, Jeffrey JJ, Hibbs MS, Welgus HG: *The collagen substrate specificity of human neutrophil collagenase*. *J Biol Chem* 1987, 262: 10048-10052.
22. Knäuper V, López-Otín C, Smith B, Knight G, Murphy G: *Biochemical characterization of human collagenase-3*. *J Biol Chem* 1996, 271: 10917-10923.
23. Cole AA, Chubinska S, Schumacher B, Huch K, Cs-Szabo G, Yao J, Mikecz K, Hasty KA, Kuettner KE: *Chondrocyte matrix metalloproteinase-8*. *J Biol Chem* 1996, 271: 11023-11026.
24. Hanemaaijer R, Sorsa T, Konttinen YT, Ding Y, Kylmäniemi M, Visser H, Hinsbergh VWM, Helaakoski T, Kainulainen T, Virkkunen J, Röntä H, Tschesche H, Salo T: *Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by TNF- α and doxycycline*. *J Biol Chem* 1997, 272: 31504-31509.
25. Freije JM, Diez Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, López-Otín C: *Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas*. *J Biol Chem* 1994, 269: 16766-16773.
26. Reboul P, Pelletier J-P, Tardif G, Cloutier J-M, Martel-Pelletier J: *The new collagenase, collagenase-3 is expressed and synthesized human chondrocytes and synoviocytes*. *J Clin Invest* 1996, 97: 2011-2019.
27. Johansson N, Saarialho-Kere UK, Airola K, Herva R, Nissinen L, Westermarck J, Vuorio E, Heino J, Kähäri VM: *Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during fetal bone development*. *Dev Dyn* 1997b, 208: 387-397.
28. Johansson N, Airola K, Grénman R, Kariniemi A-L, Saarialho-Kere UK, Kähäri V-M: *Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck*. *Am J Pathol* 1997c, 151: 499-508.
29. Airola K, Karonen T, Vaalamo M, Lehti K, Lohi J, Kariniemi A-L, Keski-Oja J, Saarialho-Kere UK: *Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion malignant melanomas*. *Br J Cancer* 1999, 80: 733-743.
30. Kahari VM, Saarialho-Kere U. *Matrix metalloproteinases in skin*. *Exp Dermatol*. 1997 Oct; 6 (5): 199-213.
31. Itoh T, Tanioka M, Yoshida T, Nishimoto H, Itohara S: *Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A deficient mice*. *Cancer Res* 1998, 58: 1048-1051.
32. Itoh T, Ikeda T, Gomi H, Nakao S, Suzuki T, Itohara S: *Unaltered secretion of β -amyloid precursor protein in gelatinase A (MMP-2) deficient mice*. *J Biol Chem* 1997, 272: 22389-22392.

33. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z: *MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes*. Cell 1998, 93: 411-422.
34. Wilhelm SM, Collier IE, Kronberger A, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Bauer EA, Goldberg GI: *Human skin fibroblast stromelysin: structure, glycosylation, substrate specificity, and differential expression in normal and tumorigenic cells*. Proc Natl Acad Sci USA 1987, 84: 6725-6729.
35. Murphy G, Cockett MI, Ward RV, Docherty AJP: *Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan: a quantitative comparison of activities of 95 kDa and 75 kDa gelatinases, stromelysin-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP)*. Biochem J 1991, 277: 277-279.
36. Bullard KM, Lund L, Mudgett JS, Mellin TN, Hunt TK, Murphy B, Ronan J, Werb Z, Banda MJ: *Impaired wound contraction in stromelysin-1 deficient mice*. Ann Surgery 1999, 230: 260-265.
37. Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Rio MC, Chambon P: *A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas*. Nature 1990, 348: 699-704.
38. Basset P, Wolf C, Chambon P: *Expression of the stromelysin-3 gene in fibroblastic cells of invasive carcinomas of the breast and other human tissues: a review*. Breast Cancer Res Treatment 1993, 24: 185-193.
39. Pei D, Majmudar G, Weiss SJ: *Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3*. J Biol Chem 1994, 269: 25849-25855.
40. Saarialho-Kere UK, Crouch EC, Parks WC: *Matrix metalloproteinase matrilysin is constitutively expressed in adult human exocrine epithelium*. J Invest Dermatol 1995, 105: 190-196.
41. Wilson CL, Matrisian LM: *Matrilysin*. In *Matrix metalloproteinases*. Eds. Parks WC, Mecham RP. Academic Press, Inc., San Diego 1998 pp. 149-184.
42. He Cs, Wilhelm SM, Pentland AP, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Goldberg GI: *Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase*. Proc Natl Acad Sci USA 1989, 86: 2632-2636.
43. Patterson BD, Sang QXA: *Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9)*. J Biol Chem 1997, 272: 28823-28825.
44. Ohta S, Imai K, Yamashita K, Matsumoto T, Azumono I, Okada Y: *Expression of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human osteoarthritic cartilage*. Lab Invest 1998, 78: 79-87.
45. Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BLM, Matrisian LM: *Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin*. Proc Natl Acad Sci USA 1997, 94: 1402-1407.
46. Pei D, Weiss SJ: *Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity*. J Biol Chem 1996, 271: 9135-9140.
47. Nomura H, Sato H, Seiki M, Mai M, Yasunori O: *Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas*. Cancer Res 1995, 55: 3263-3266.
48. Okada A, Bellocq J-P, Rouyer N, Chenard M-P, Rio M-C, Chambon P, Basset P: *Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas*. Proc Natl Acad Sci USA 1995, 92: 2730-2734.

49. Polette M, Nawrocki B, Gilles C, Sato H, Seiki M, Tournier J-M, Birembaut P: *MT-MMP expression and localization in human lung and breast cancers*. Virchows Arch 428: 29-35, 1996.
50. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y: *Membrane type 1 metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules*. J Biol Chem 1997, 272: 2446-2451.
51. Holmbeck K, Bianco P, Caterina C, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H: *MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover*. Cell 1999, 99: 81-92.
52. Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M: *Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library*. J Biol Chem 1995, 270: 23013-23020.
53. D'Ortho M-P, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, Smith B, Timpl R, Zardi L, Murphy G: *Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 (MT1-MMP and MT2-MMP) exhibit a broad spectrum proteolytic capacity comparable to many matrix metalloproteinases*. Eur J Biochem 1997, 1354:159-170.
54. Shofuda K, Yasumitsu H, Nishihashi A, Miki K, Miyazaki K: *Expression of three membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in rat vascular smooth muscle cells and characterization of MT3-MMP with and without transmembrane domain*. J Biol Chem 1997, 272: 9749-9754.
55. Sedlacek R, Mauch S, Kolb B, Schatzlein C, Eibel H, Peter HH, Schmitt J, Krawinkel U: *Matrix metalloproteinase MMP-19 (RASI-1) is expressed on the surface of activated peripheral blood cells and is detected as an autoantigen in rheumatoid arthritis*. Immunobiol 1998, 198: 408-423.
56. Shimada T, Nakamura H, Ohuchi E, Fujii Y, Murakami Y, Sato H, Seiki M, Okada Y: *Characterization of a truncated form of human membrane type 3 matrix metalloproteinase*. Eur J Biochem 1999, 262: 907-914.
57. Pei D: *Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP*. J. Biol Chem 1999, 274: 8925-8932 of a truncated form of human membrane type 3 matrix metalloproteinase. Eur J Biochem 1999, 262: 907-914.
58. Gururajan R, Grenet J, Lahti JM, Kidd VJ: *Isolation and characterization of two novel metalloproteinase genes linked to the Cdc2L locus on human chromosome 1p36.3*. Genomics 1998, 52: 101-106.
59. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJP, Angel P, Heath JK: *Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor*. EMBO J 1987, 6: 1899-1904
60. Mauviel A, Chung KY, Agarwal A, Tamai K, Uitto J: *Cell specific induction of distinct oncogenes of the jun family is responsible for differential regulation of collagenase gene expression by transforming growth factor-beta in fibroblasts and keratinocytes*. J Biol Chem 1996, 271: 10917-10923.
61. Werb Z, Tremble PM, Behrendtsen O, Crowley E, Damsky CH: *Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression*. J Cell Biol 1989, 109: 877-889.

62. Larjava H, Lyons G, Salo T, Mäkelä M, Koivisto L, Birkedal-Hansen H, Akiyama SK, Yamada KM, Heino J: *Anti-integrin antibodies induce type IV collagenase expression in keratinocytes*. J Cell Physiol 1993b, 157: 190-200.
63. Mauch C, Adelmann-Grill B, Hatamochi A, Krieg T: *Collagenase gene expression in fibroblasts is regulated by a three-dimensional contact with collagen*. FEBS Lett 1989, 250: 301-305.
64. Varedi M, Tredget EE, Scott PG, Shen YJ, Ghahary A: *Alteration in cell morphology triggers transforming growth factor- α 1, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 expression in normal and hypertrophic scar fibroblasts*. J Invest Dermatol 1995, 104: 118-123.
65. Colige AC, Lambert CA, Nusgens BV, Lapière CM: *Effect of cell-cell and cell-matrix interactions on the response of fibroblasts to epidermal growth factor in vitro*. Biochem J 1992, 285: 215-221.
66. Sato H, Kinoshita T, Takino T, Nakayama K, Seiki M: *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 1996, 393: 101-104.
67. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H: *The cysteine switch: A principle of regulation matrix metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family*. Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87: 5578-5582.
68. Gearing AJH, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL, Leber TM, Mangan M, Miller K, Nayee P, Owen K, Patel S, Thomas W, Wells G, Wood LM, Woolley K: *Processing of tumour necrosis factor- α precursor by metalloproteinases*. Nature 1994, 370: 555-557.
69. Chandler S, Cossins J, Lury J and Wells G: *Macrophage metalloelastase degrades matrix and myelin proteins and processes a tumour necrosis factor- α fusion protein*. Biochem Biophys Res Comm 1996, 228: 421-429.
70. Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA: *The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases*. J Biol Chem 1996, 271: 10079-86.
71. Martin DC, Fowlkes JL, Babic B, Khokha R: *Insulin-like growth factor II signaling in neoplastic proliferation is blocked by transgenic expression of the metalloproteinase inhibitor TIMP-1*. J Cell Biol 1999, 146: 881-892.
72. Edwards DR, Beaudry PP, Laing TD, Kowal V, Leco KJ, Leco PA, Lim MS: *The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodeling and cell growth*. Int J Obesity 1996, 20: Suppl. 3: 9-15.
73. Gomez DE, Alonso DF, Yoshij H, Thorgeirsson UP: *Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions*. Eur J Cell Biol 1997, 74: 111-122.
74. Howard EW, Bullen EC, Banda MJ: *Preferential inhibition of 72- and 92-kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2*. J Biol Chem 1991, 266: 13070-13075.
75. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI: *Mechanism of cell surface activation of 72 kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloproteinase*. J Biol Chem 1995, 270: 5331-5338.
76. Butler GS, Butler M, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, Schade van Westrum S, Crabbe TG, Clements J, d'Ortho M-P, Murphy G: *The TIMP-2 membrane type I metalloproteinase "re-*

ceptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem* 1997, 273: 871-880.

77. Gomez DE, Alonso DF, Yoshij H, Thorgeirsson UP: *Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions*. *Eur J Cell Biol* 1997, 74: 111-122.
78. Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes S, Edwards DR: *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* 1994, 269: 9352-9360.
79. Amour A, Slocombe PM, Webster A, Butler M, Knight CG, Smith BJ, Stephens PE, Shelley C, Hutton M, Knäuper V, Docherty AJP, Murphy G: *TNF- α converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3*. *FEBS Lett* 1998, 435: 39-44.
80. Apte SS, Olsen B, Murphy G: *The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family*. *J Biol Chem* 1995, 270: 14313-14318.
81. Uria JA, Ferrando AA, Velasco G, Freije JP and Lopez-Otin C: *Structure and expression in breast tumors of human TIMP-3, a new member of the metalloproteinase inhibitor family*. *Cancer Res* 1994, 54: 2091-2094.
82. Powe DG, Brough JI, Carter GI, Ravery V, Angulo J, Shamsa F, et al: *TIMP-3 mRNA expression is regionally increased in moderately and poorly differentiated colorectal adenocarcinoma*. *Br J Cancer* 1997, 75: 199-206.
83. Airola K, Ahonen M, Johansson N, Heikkilä P, Kere J, Kähäri V-M, Saarialho-Kere UK: *Human TIMP-3 is expressed during fetal hair development, hair growth cycle and cancer progression*. *J Histochem Cytochem* 1998, 46: 1-11.
84. Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE: *Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4*. *J Biol Chem* 1996, 271: 30375-30380.
85. Leco KJ, Apte SS, Taniguchi GT, Hawkes SP, Khokha R, Schultz GA, Edwards DR: *Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues*. *FEBS Lett* 1997, 401: 213-217.
86. Liu Ye, Wang M, Greene J, Su J, Ullrich S, Li H, Sheng S, Alexander P, Sang QA, Shi YE: *Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-4)*. *J Biol Chem* 1997, 272: 20479-20483.
87. Wang M, Liu YE, Greene J, Sheng S, Fuchs A, Rosen EM, Shi YE: *Inhibition of tumor growth and metastasis of human breast cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase-4*. *Oncogene* 1997, 14: 2767-2774.
88. Ito A, Sato T, Iga T, Mori Y: *Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production by human fibroblasts*. *FEBS Lett* 1990, 269: 93-95.
89. DeClerk YA, Darvill MI, Eeckhout Y, Rousseau GG: *Characterization of the promoter of the gene (TIMP) encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2)*. *Gene* 1994, 139: 185-191.
90. Gasson JC, Golde DW, Kaufman SE, Westbrook CA, Hewick RM, Kaufman RJ, Wong GG, Temple PA, Leary AC, Brown EL, Orr EC, Clark SC: *Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity*. *Nature* 1985, 315: 768-771.

91. Docherty AJP, Lyons A, Smith BJ, Wright Em, Stephens PE, Harris BJ: *Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity*. Nature 1985, 318: 66-69.
92. Stetler-Stevenson WG, Berch N, Golde DW: *Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-potentiating activity*. FEBS Lett 1992, 296: 231-234.
93. Bertaux B, Hornebeck W, Eisen AZ and Dubertret L: *Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases*. J Invest Dermatol 1991, 97: 679-685.
94. Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K: *Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells*. FEBS Lett 1992, 298: 29-32.
95. Nemeth JA, Goolsby CL: *TIMP-2, a growth-stimulatory protein from SV-40-transformed human fibroblasts*. Exp Cell Res 1993, 207: 376-382.
96. Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A: *Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2)*. J Cell Science 1994, 107: 2373-2379.
97. Yoshiji H, Buck TB, Harris SR, Ritter LM, Lindsay CK, Thorgeisson UP: *Stimulatory effect of endogenous tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) overexpression on type IV collagen and laminin gene expression in rat mammary carcinoma cells*. Biochem Biophys Res Comm 1998, 247: 605-609.
98. Ahonen M, Baker AH, Kähäri V-M: *Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells*. Cancer Res 1998, 58: 2310-2315.
99. Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC: *Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation and death in vitro*. J Clin Invest 1998, 101: 1478-1487.
100. Schäfer BM, Maier K, Eickhoff U, Todd RF, Kramer MD: *Plasminogen activation in healing human wounds*. Am J Pathol 1994, 144: 1269-1280.
101. Palolahti M, Lauharanta J, Stephens RW, Kuusela P, Vaheri A: *Proteolytic activity in leg ulcer exudate*. Exp Dermatol 1993, 2: 29-37.
102. Grøndal-Hansen J, Lund LR, Ralfkiær E, Ottevanger V, Danø K: *Urokinase and tissue-type plasminogen activators in keratinocytes during wound reepithelialization in vivo*. J Invest Dermatol 1988, 90: 790-795.
103. Rømer J, Lund LR, Eriksen J, Ralfkiær E, Zeheb R, Gelehrter TD, Danø K, Kristensen P: *Differential expression of urokinase-type plasminogen activator and its type-1 inhibitor during healing of mouse skin wounds*. J Invest Dermatol 1991, 97: 803-811.
104. Rømer J, Lund LR, Eriksen J, Pyke C, Kristensen P, Danø K: *The receptor for urokinase-type plasminogen activator is expressed by keratinocytes at the leading edge during reepithelialization of mouse skin wounds*. J Invest Dermatol 1994, 102: 519-522.
105. Rømer J, Bugge TH, Pyke C, Lund LR, Flick MJ, Degen JL, Danø K: *Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene*. Nature Medicine 1996, 2: 287-292.
106. Ågren MS, Taplin CJ, Woessner F Jr, Eaglstein WH, Mertz PM: *Collagenase in wound healing: Effect of wound age and type*. J Invest Dermatol 1992, 99: 709-714.
107. Mauviel A, Chung KY, Agarwal A, Tamai K, Uitto J: *Cell specific induction of distinct oncogenes of the jun family is responsible for differential regulation of collagenase gene expres-*

sion by transforming growth factor-beta in fibroblasts and keratinocytes. *J Biol Chem* 1996, 271: 10917-10923.

108. Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F: *Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9*. *J Invest Dermatol* 1993, 101: 64-68.
109. Bullen EC, Longaker MT, Updike DL, Benton R, Ladin D, Zizheng H, Howard EW: *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds*. *J Invest Dermatol* 1995, 104: 236-240.
110. Herrick SE, Sloan P, McGurk M, Freak L, McCollum CN, Ferguson MWJ: *Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers*. *Am J Pathol* 1992, 141: 1085-1095.
111. Brook I, Frazier EH: *Aerobic and anaerobic microbiology of chronic venous ulcers*. *Int J Dermatol* 1998, 37: 426-428.
112. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H: *Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1)*. *Biochemistry* 1990, 10261-10270.
113. Ye S., *Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases*. *Matrix Biol.* 2000 Dec; 19 (7): 623-9.