

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

**RIMODELLAMENTO DELLA ECM
E GLI ENZIMI DEGRADANTI LA MATRICE**

di

Donato Gemmati

Ricercatore - 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: Donato Gemmati, 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 metalloproteasi nel rimodellamento fisiologico della matrice;
- le metalloproteasi e la loro iperattività nei processi di degradazione delle ferite croniche.

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 dell'infiammazione delle articolazioni, dell'invasione tumorale e delle metastasi. Una attività proteolitica generalmente controllata propria 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 una degradazione eccessiva del collagene e di altri componenti della matrice in vari tipi di patologie (1-3). Le serin-proteasi implicate nei processi del rimodellamento tessutale, tra cui l'attivatore tessutale del plasminogeno (tPA) e l'attivatore del plasminogeno tipo urochinasico (uPA), convertono il plasminogeno dallo stato di zimogeno in plasmina, che può degradare importanti componenti della matrice extracellulare e attivare alcune pro-MMPs 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 la plasmina prodotta dagli attivatori del plasminogeno (Fig. 1). Alcune cistein-proteasi (cathepsina B, D, G, H, L, N) sono di origine lisosomiale e vengono rilasciate nella matrice extracellulare in particolari condizioni patologiche. Inoltre, la cathepsina G contribuisce al rimodellamento della matrice extracellulare attraverso l'attivazione della collagenasi-1 (MMP-1) (5).

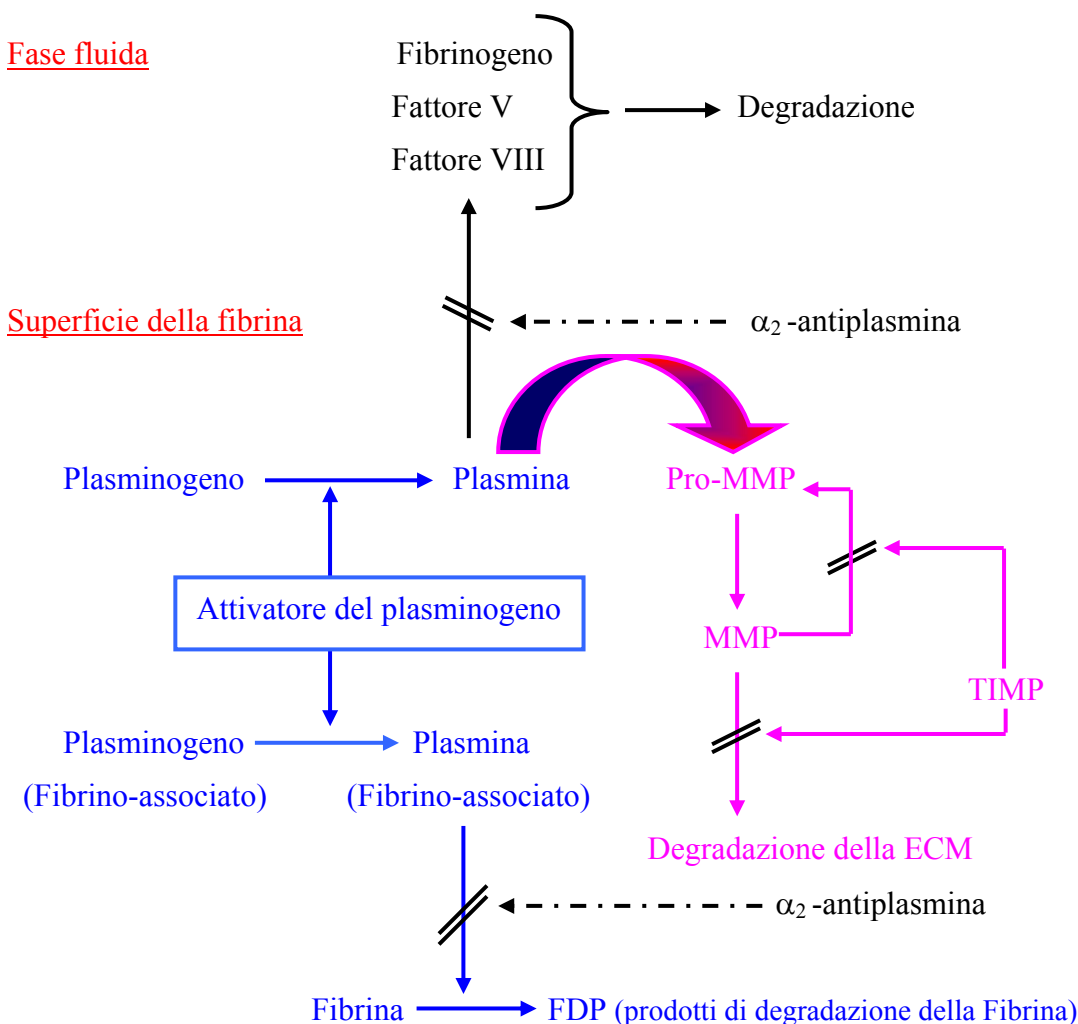


Figura 1. Rappresentazione schematica del sistema del plasminogeno.

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 tra i quali la riproduzione, lo sviluppo fetale e la guarigione delle ferite (7-12), e in altrettanto numerosi processi patologici, tra cui 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 (Tabella 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 (Fig. 3) (19).

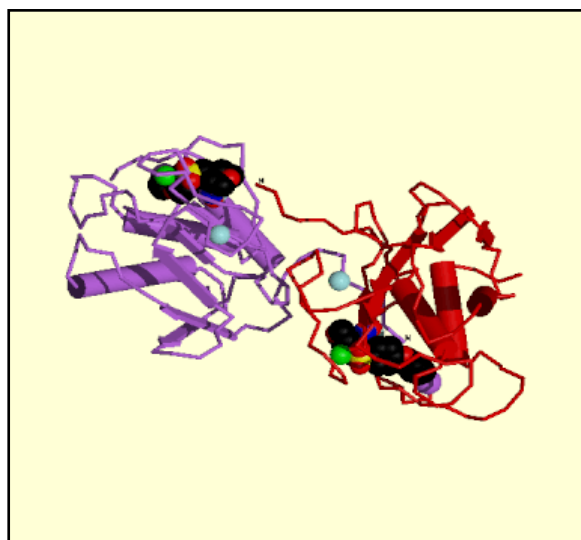


Figura 2. Metalloproteasi di matrice. Collagenasi-3 (MMP-13).

Tabella 1. Metalloproteasi di matrice, loro substrati, attivatori esogeni e capacità attivante.

ENZIMA	SUBSTRATO	ATTIVATO DA	ATTIVATORE DI
Collagenases			
Collagenase-1 (MMP-1)	Collagen I, II, II (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
Gelatinases			
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, collagen 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
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, 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 ancora determinato.

◆ 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 collagenei monomerici 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 patologiche. Infatti, numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato che la collagenasi-1 è espressa in numerosi tipi cellulari normali quali chera-

tinociti, fibroblasti, cellule endoteliali, monociti, macrofagi, condrociti ed osteoblasti (19), al contrario dell'espressione della collagenasi-2 che è stata ritrovata 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). Le 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 capacità angio-genetica e ridotta crescita tumorale primaria e con un moderato ritardo nell'accrescimento (31, 32). La gelatinasi B è prodotta dai cheratinociti, monociti, macrofagi alveolari, leucociti polimorfo-nucleati 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 stromalisina-1 processa il precursore del TNF- α , l' α 1-proteinase-inibitor e le proteine mieliniche (16). La stromalisina-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 stromalisina-1, mentre non è stata trovata espressione sui fibroblasti cutanei *in vivo*. Topi deficienti in stromalisina-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 β 4 dell'integrina (41). È anche capace di attivare la procollagenasi e processare il pro-TNF- α , similmente alla stromalisina-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). È importante segnalare che in topi *knockout* per il gene della matrilisina i processi di tumorigenesi sono soppressi (45).

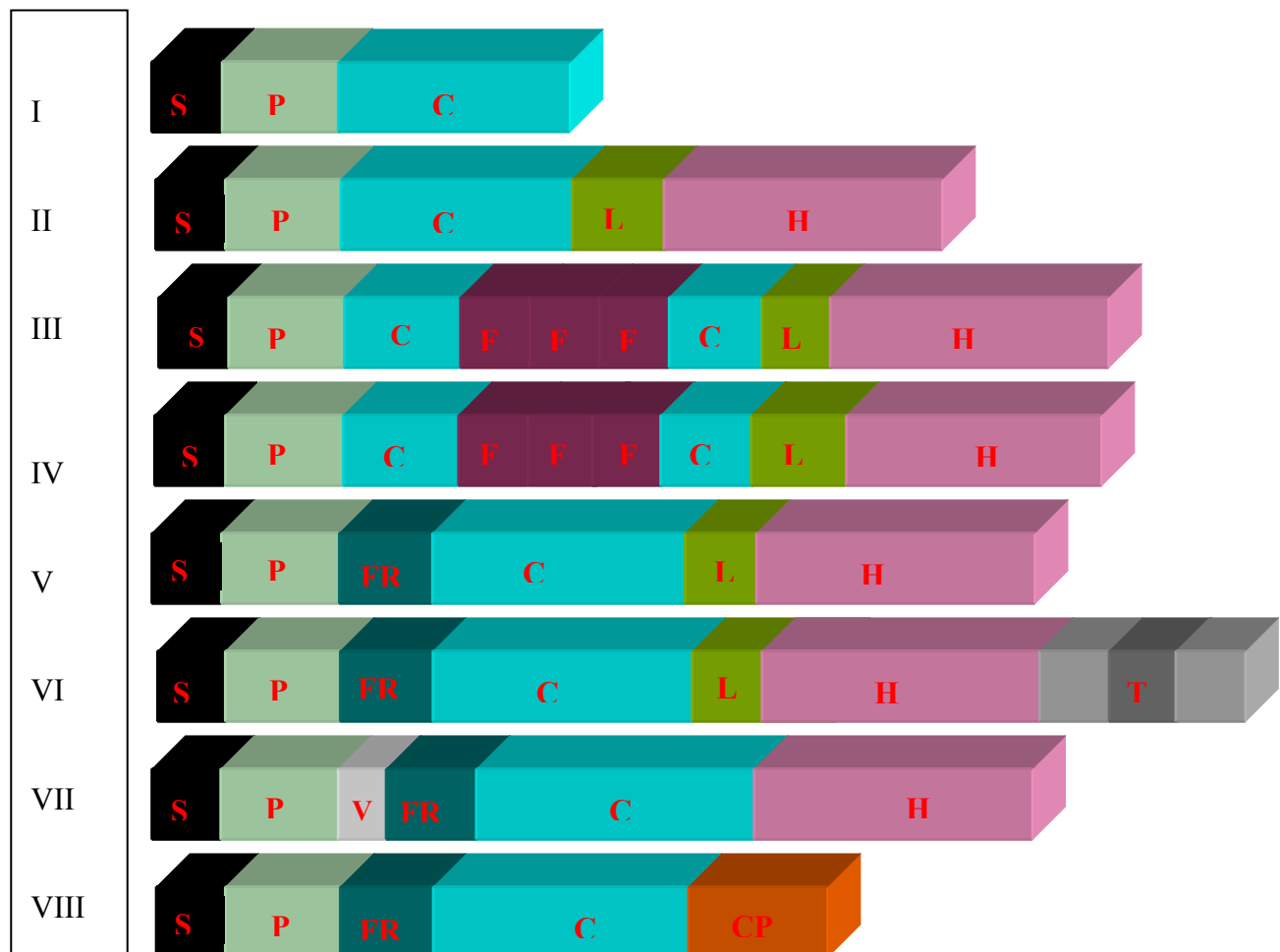


Figura 3. Rappresentazione schematica della struttura dei domini delle MMPs. S, peptide segnale; P, propeptide; C, dominio catalitico; F, dominio di tipo II per la fibronectina; CP, dominio ricco di cisteina e prolina; L, dominio linker; H, dominio hemopexin-like; FR, sito di riconoscimento furinico; T, dominio transmembrana, V, dominio vitronectin-like.

◆ Metalloproteasi tipo-membrana (MT-MMP)

Le MT-MMPs-1, -2, -3, -4 e -5 (MMPs -14, -15, -16, -17 e -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-MMP, il suo processo di attivazione extracellulare è noto essere dipendente dalla plasmina (46). Fu clonata per la prima volta sotto forma di una progelatinasi di 72 kDa (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 scientifici (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 nanismo, 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 condividerne 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 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* alternativo generando così un maggior numero di trascritti e quindi differenti isoforme proteiche (58).

◆ Metalloproteasi di matrice

Nel tessuto normale, degradazione e sintesi dei componenti della ECM devono necessariamente essere in un mutuo equilibrio (Fig. 4). 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 queste molecole 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).

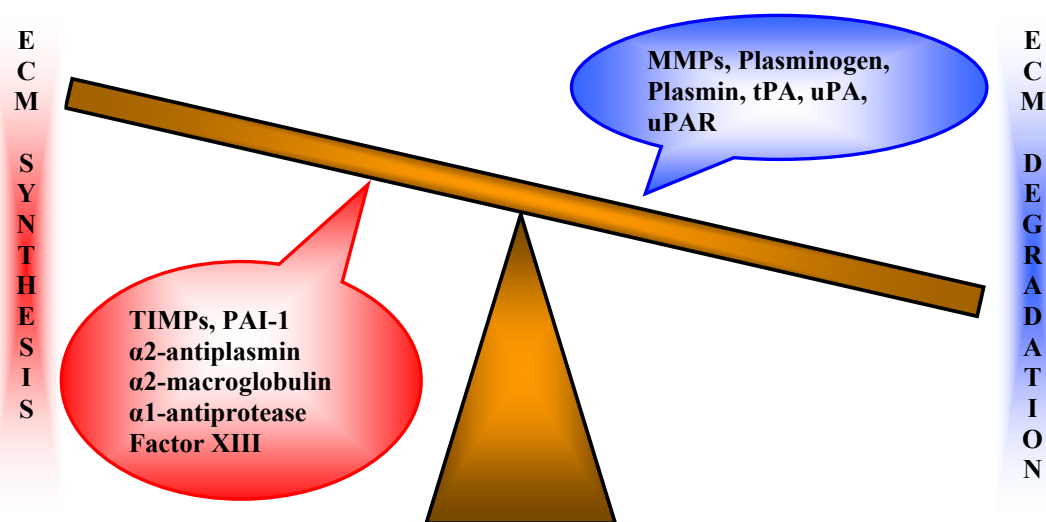


Figura 4. Degradazione e sintesi dei componenti della matrice.

◆ Regolazione a livello 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 con 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 neutrofilii, dai quali è istantaneamente rilasciata senza precedente sintesi (19). Al contrario, l'espressione della collagenasi-2 in 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 stromalisina-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 protein-chinasi che mediano i segnali mediante recettori di membrana cellulare attraverso fattori di crescita, citochine, ormoni, e interazioni 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 attraverso il legame di differenti componenti della matrice extracellulare risultando in un'aumentata espressione di particolari MMPs. Anticorpi diretti contro il recettore per la fibronectina che bloccano l'adesione dei fibroblasti, inducono la sintesi della collagenasi-1 e della stromalisina-1 (61), mentre anticorpi contro le subunità β 1 e β 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 sia la sintesi di collagenasi che di stromalisina (65). Al contrario un danno meccanico risulta in un'aumentata espressione degli stessi enzimi. Questi sono esempi di come la regolazione della sintesi delle MMPs dipenda anche dalla morfologia cellulare.

◆ **Attivazione degli zimogeni**

Gran parte delle MMPs 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". Esso è caratterizzato dall'interazione di una cisteina altamente conservata nel propeptide con lo zinco in un sito catalitico che blocca l'accesso del substrato allo stesso (67). Agenti, quali organomercuriali e caotropici, sono in grado di dissociare il legame covalente tra la cisteina e lo zinco catalitico. Molto verosimilmente, *in vivo* l'attivazione avviene mediante processi proteolitici in cui enzimi come tripsina, plasmina e callicreina trasformano il proenzima in una forma intermedia attiva che poi autocataliticamente taglia se stesso trasformandosi nella forma permanentemente attiva. Alcune MMPs del sottogruppo delle stromalisine sono capaci di "superattivare" altre MMPs direttamente nella forma totalmente attiva.

◆ **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. 5) 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 di 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 stromalisina-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 stromalisina-1 (86). Il TIMP-4 è espresso nel cuore dell'adulto, nel rene, nella placenta, nel colon e nei testicoli (84). È stato dimostrato inoltre, 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.

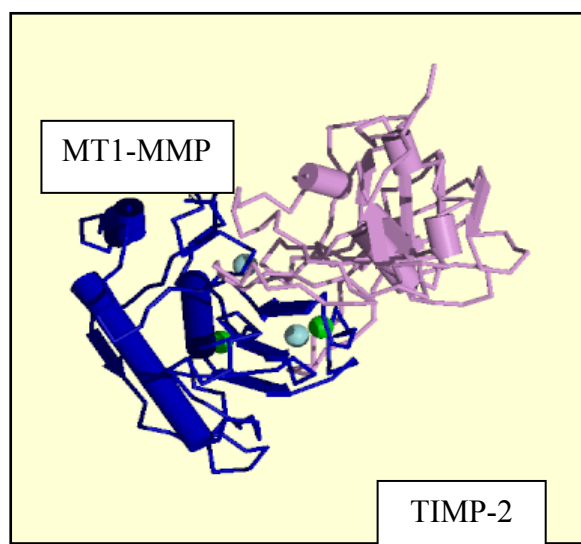


Figura 5. Struttura tridimensionale del complesso metalloproteasi/inibitore.

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. Infatti 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 è stato 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 (uPAR) 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 collagenasi-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 collagenasi-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 collagenasi-1 possono essere i macrofagi, i fibroblasti e le cellule endoteliali. Dovuta alla sua abilità a tagliare i collagene fibrillari, la collagenasi-1 indubbiamente partecipa al rimodellamento della matrice di collagene. La regolazione della collagenasi-1 nel derma è verosimilmente differente da quella dei cheratinociti. Infatti il TGF- β aumenta l'espressione della collagenasi-1 nei cheratinociti in coltura, ma ne diminuisce l'espressione nei fibroblasti (107). L'aumento dell'espressione della collagenasi-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 può disturbare la guarigione della ferita (105, 106-108, 109) e che 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 stromalisina-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.

◆ Varianti geniche (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 studi sulla suscettibilità

di patologie che coinvolgano una attiva degradazione/rimodellamento della matrice extracellulare. Sono qui di seguito rappresentate (Tabella 2) alcune tra le varianti più note delle MMPs.

Tabella 2.

POLIMORFISMI DEL DNA NELLA REGIONE DEL PROMOTORE DEI GENI DELLE MMPs					
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., Pornschnegler 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-Otin 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- 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 GL.: *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., Belloq 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 warfism, 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 periferal 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., Adelman-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., Woollery K.: *Processing of tumour necrosis factor-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 "receptor" 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 JL., 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 C.L.: *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 J., 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 expression 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; 19 (7): 623-9.