

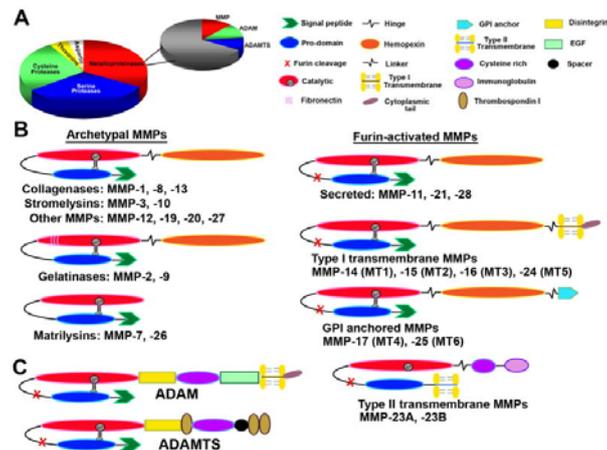
Matrice Extracellulare

Metalloproteasi della Matrice

(«Matrixins», clan di «Metzincins»)

«Le metalloproteinasi della matrice **non sono coinvolte soltanto nella degradazione della matrice**, ma giocano anche altri ruoli nella **regolazione del comportamento cellulare**, e nella **modulazione** di molte **molecola bioattive** sulla superficie cellulare; possono agire in concerto con altri enzimi per influenzare il comportamento delle cellule.»

- ❖ Le **proteasi** sono classificate in cinque principali classi catalitiche, che includono le metalloproteinasi e le serina, cisteina, treonina e aspartato proteinase; la classe più rappresentata è quella delle metalloproteinasi”.



Rivera S, Khrestchatsky M, Kaczmarek L, Rosenberg GA, Jaworski DM. **Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology?** J Neurosci. 2010 Nov 17;30(46):15337-57.

METALLOPROTEINASI DELLA MATRICE (MMPs) – [1]

- ✚ Sono **endopeptidasi zinco-dipendenti**.
- ✚ Complessivamente sono in grado non solo di **degradare** tutti i tipi delle **proteine della matrice**, ma anche di **processare un gran numero di molecole bioattive**.
- ✚ Inoltre sono coinvolte:
 - **Frammentazione di recettori** sulla superficie cellulare.
 - **Rilascio di ligandi** che inducono l'apoptosi (ad esempio il FAS ligand)
 - **Attivazione o inattivazione di chemochine/citochine**

METALLOPROTEINASI DELLA MATRICE (MMPs) – [2]

✚ Si pensa che le MMPs giochino un ruolo fondamentale in comportamenti cellulari quali:

- Proliferazione cellulare
- Migrazione (adesione/appiattimento)
- Differenziamento
- Angiogenesi
- Apoptosi
- Difesa dell'ospite.

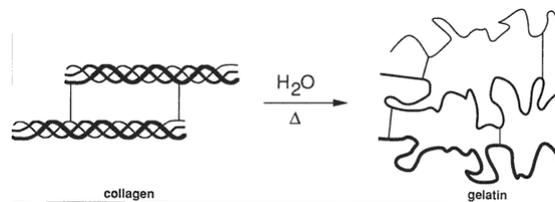
MMPs: Struttura – [1]

✚ Le MMPs condividono una struttura a **domini**. I tre domini più comuni sono:

- il **pro-peptide** N-terminale, che contiene un motivo **PRC**GXPD detto **interruttore a cisteina (C)**(«cysteine switch») in cui il residuo di cisteina coordina lo Zn^{2+} nel dominio catalitico, mantenendo la proMMP inattiva.
- il **dominio catalitico**, che contiene il motivo **H**EXX**H**XXGXX**H** di legame con lo Zn^{2+} , in cui l'ione Zinco è chelato a tre residui di istidina (**H**), e una metionina conservata, formando un «Met-turn», otto residui a valle, che sorregge la struttura del sito attivo attorno allo Zn^{2+} catalitico.
- il **dominio** C-terminale di tipo **emopexina** (proteina del plasma sanguigno) collegato al dominio catalitico da una **regione a cerniera** flessibile.

MMPs: Struttura – [2]

- ✚ Il **dominio emopexina** è importante per il legame a:
 - particolari substrati
 - inibitori endogeni
 - recettori di superficie
- ✚ Le gelatinasi hanno anche un **dominio aggiuntivo tipo fibronectina** coinvolto nel legame al collagene denaturato (gelatina).
- ✚ La presenza di un dominio O-glicosilato (OG) è una caratteristica particolare della MMP-9.

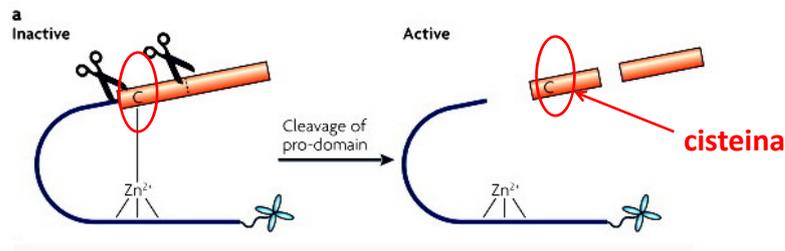


Classificazione classica in base al tipo di domini e preferenza di substrato

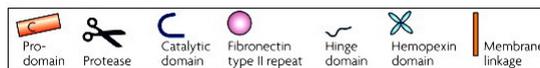
- ✚ Collagenasi
- ✚ Gelatinasi
- ✚ Stromalisine
- ✚ Matrilisine
- ✚ Tipo membranoso (MT-MMPs)
- ✚ Ecc.

Murphy G, Nagase H. *Progress in matrix metalloproteinase research*. Mol Aspects Med. 2008 Oct;29(5):290-308.

Struttura schematica delle MMPs - 1

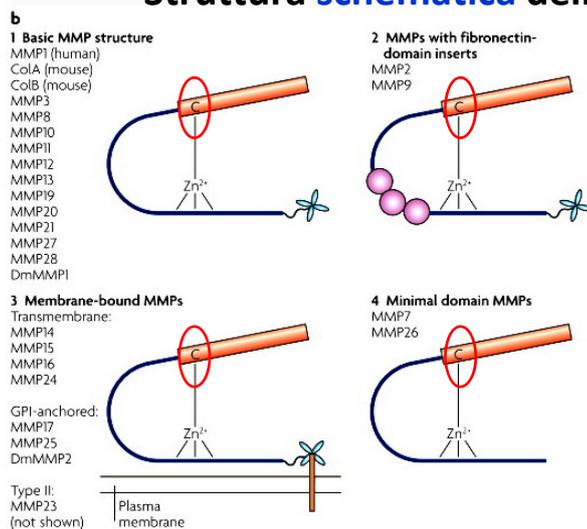


a | Le MMPs sono espresse come **pro-proteine**. Un dominio conservato di cisteina (**Cys**) nel pro-dominio **coordina l'ione Zinco**, che altrimenti sarebbe usato per la catalisi. **Il pro-dominio viene rimosso** da una combinazione fra scissione nel dominio e scissione fra il pro-dominio e il dominio catalitico.



Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. **Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling**. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Mar;8(3):221-33.

Struttura schematica delle MMPs - 2



(1) La maggior parte delle MMPs condivide una struttura a domini conservata con un **pro-dominio**, un **dominio catalitico**, una regione di **perno** e un **dominio emopexina**

(2) Tutte le MMPs sono sintetizzate con un peptide segnale che viene scisso durante il trasporto lungo la via secretoria. La MMP2 e la MMP9 hanno tre ripetizioni di tipo II di fibronectina nei loro domini catalitici

(3) Le **MMPs di tipo membranario** (MT-MMPs) sono collegate alla membrana plasmatica sia mediante un dominio transmembrana sia mediante un'ancora a glicosilfosfatidilinositolo (GPI) collegato al dominio emopexina.

(4) Le MMPs minimali mancano di domini perno e di emopexina. La MMP21 ha un dominio perno troncato. La DmMMP2 della *Drosophila melanogaster* ha un'inserzione di 214 aminoacidi nel dominio perno. La MMP23 (non illustrata) ha un dominio nonconservato N-terminale che consiste in un dominio immunoglobulinico IgC2 e un dominio ShKT; non è chiaro se la MMP23 contiene un dominio interruttore a Cys.

Page-McCaw et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 8:221-233, 2007

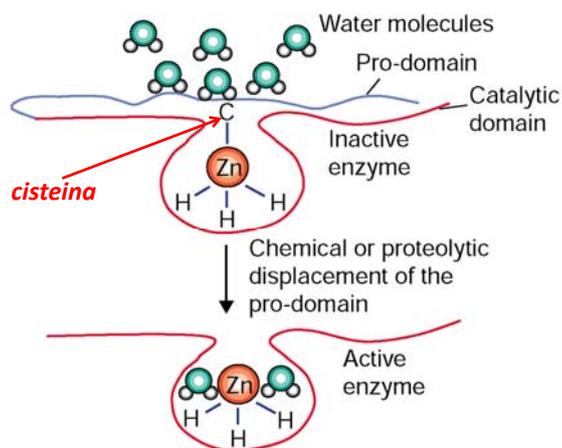
Il pro-peptide

Le MMPs sono inizialmente sintetizzate come **zimogeni inattivi** con un dominio pro-peptide N-terminale che deve essere rimosso prima che l'enzima sia attivato.

- Un **interruttore a cisteina** ("cysteine switch") fa parte del dominio pro-peptide
 - Questo contiene **un residuo di cisteina che interagisce con lo zinco del sito attivo ed impedisce il legame e la degradazione del substrato, mantenendo l'enzima in una forma inattiva.**
 - Nella maggior parte delle MMPs, il residuo di cisteina è contenuto nella sequenza conservata **PRCGxPD**.
 - Alcune MMPs hanno all'interno di questo dominio un sito di frammentazione simile a quello usato per la conversione di pro-ormoni in ormoni attivi (detto di tipo Furina*) che, quando scisso, attiva l'enzima. Le MMP-23A e MMP-23B includono un segmento transmembrana in questo dominio.

(*Furina: proteasi attiva nell'apparato di Golgi che serve per convertire pro-proteine nelle forme attive;
<http://en.wikipedia.org/wiki/Furin>)

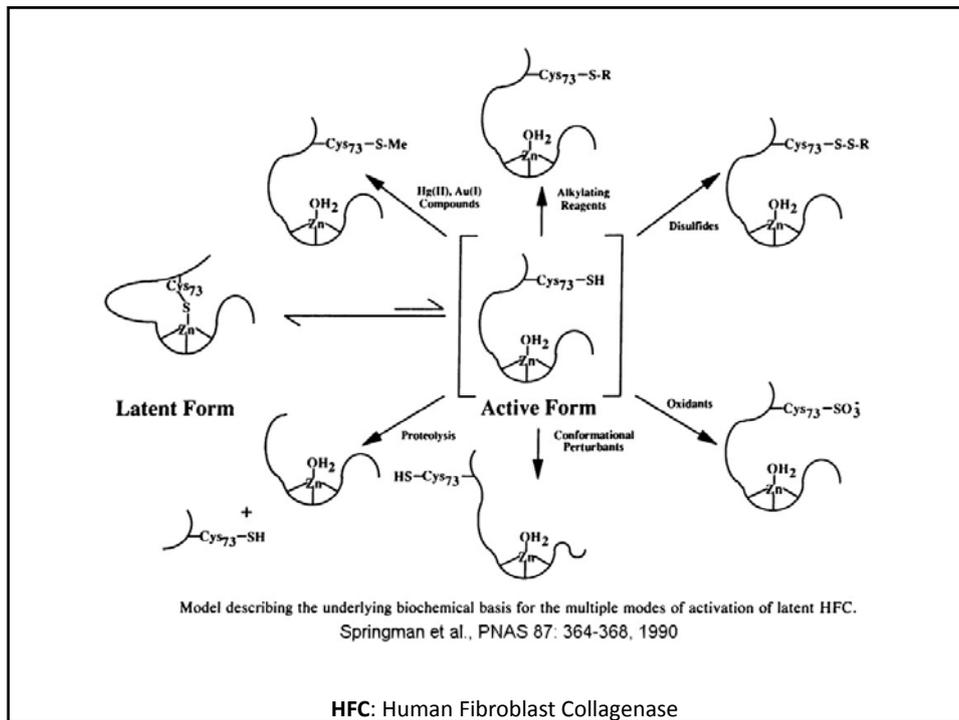
Il meccanismo a interruttore a cisteina che regola lo zimogeno delle MMPs



Il **gruppo tiolico** di una **cisteina** conservata (**C**) nel terminale carbossilico del pro-dominio funge da **4° ligando inattivatore per l'atomo di Zinco catalitico del sito attivo**; ciò provoca **l'esclusione di acqua e mantiene l'enzima latente**.

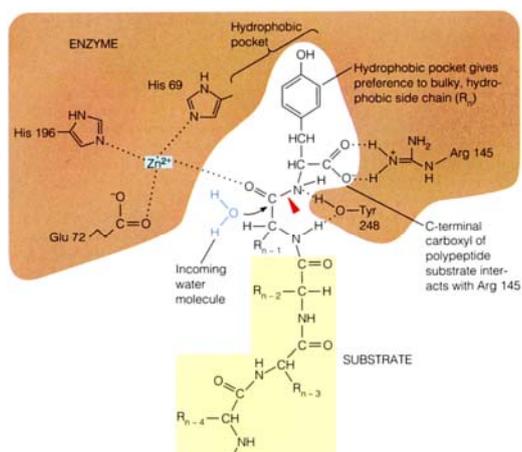
Lo **spostamento del pro-dominio** mediante alterazione conformazionale o per proteolisi disturba l'appaiamento cisteina-zinco e **il gruppo tiolico è sostituito dall'acqua**. A questo punto **l'enzima può scindere il legame peptidico dei suoi substrati**.

<http://genomebiology.com/2003/4/6/216/figure/F2?highres=y>



Il dominio catalitico

- Studi con cristallografia a raggi X hanno rivelato che questo dominio è uno sferoide di 35 x 30 x 30 Å (3.5 x 3 x 3 nm).
- Il sito attivo è una fessura di 20 Å (2 nm) che scorre lungo il dominio catalitico.
- Nella parte del dominio catalitico che forma il sito attivo vi è un **ione Zn²⁺** cataliticamente importante, che è legato a **tre residui di istidina** che si trovano nella sequenza conservata HExxHxxGxxH.
- Quindi, questa sequenza è un motivo di legame per lo zinco.
- Le gelatinasi, come la MMP-2, incorporano **moduli di fibronectina di tipo II** inseriti immediatamente prima del motivo di legame con lo zinco del dominio catalitico.



Dominio catalitico, segue

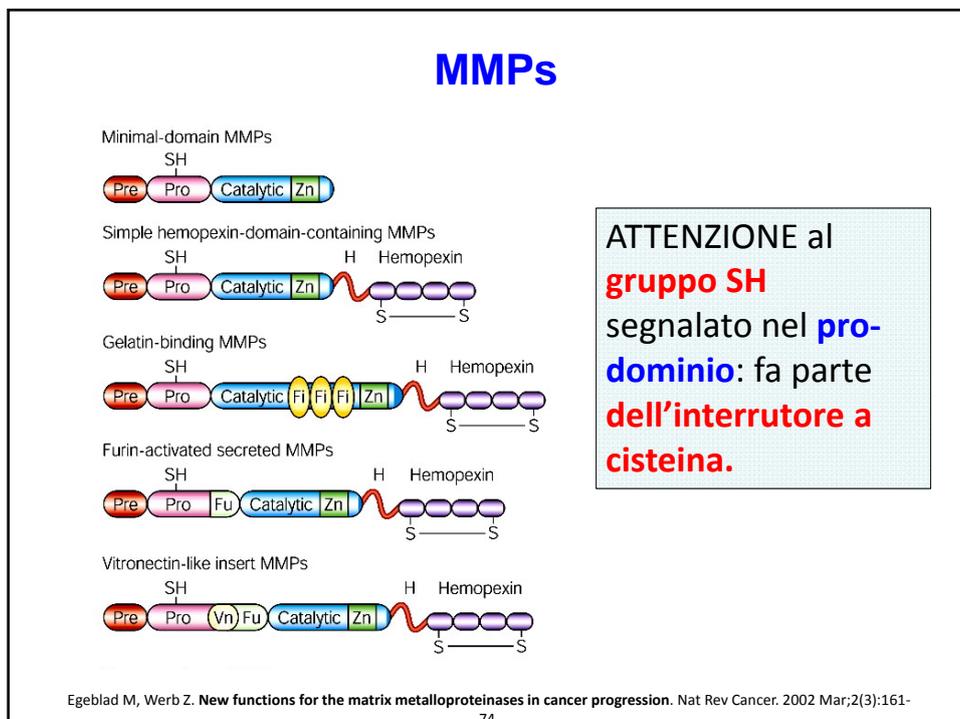
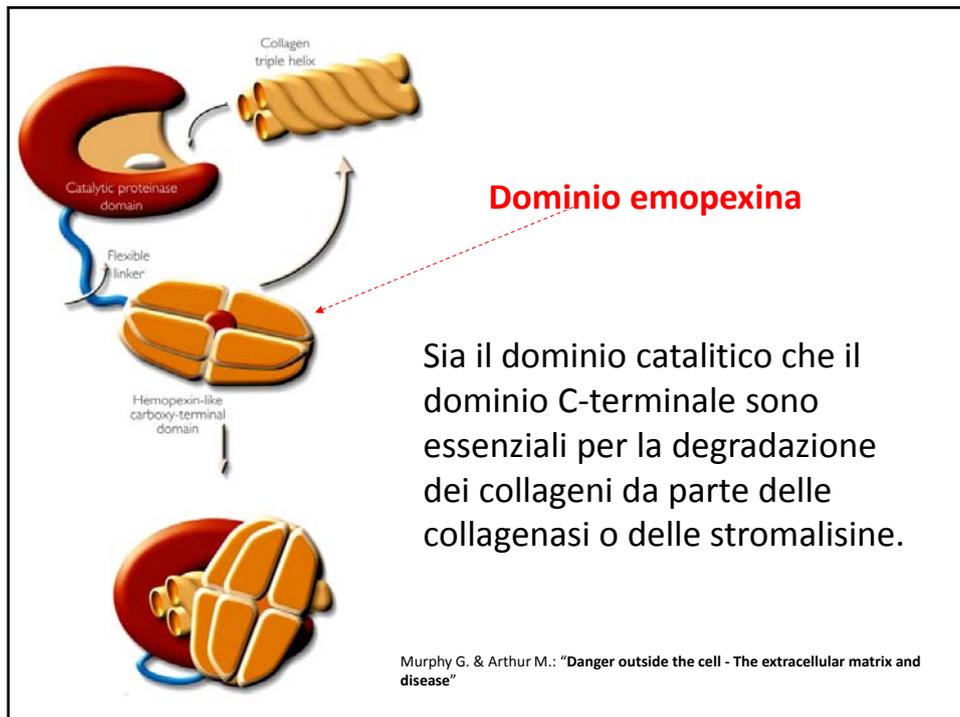
- ✚ Contiene circa 160-170 residui che includono i siti di legame per ioni metallici con ruoli strutturali (Calcio e Zinco) e catalitici (Zinco).
- ✚ I 50-54 residui siti al C-terminale del dominio catalitico contengono una sequenza altamente conservata HEXXHXXH (dove X denota qualsiasi aminoacido) che include un **residuo di acido glutamico (E) che fornisce l'agente nucleofilo che rompe il legame peptidico** e **residui di istidina che coordinano gli ioni di zinco.**

✚ La regione di cerniera ("hinge")

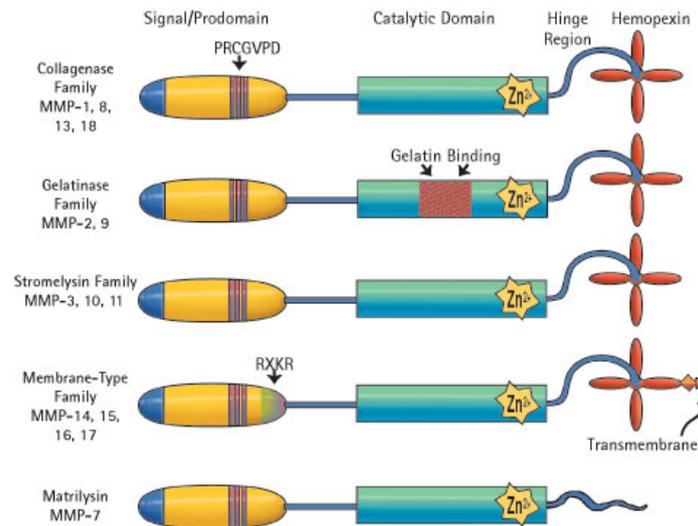
- Il dominio catalitico è collegato al dominio C-terminale mediante una regione di perno flessibile, detta regione "linker". Questa è lunga 75 residui di aminoacidi e non ha una struttura caratteristica.

✚ Il dominio C-terminale di tipo emopexina

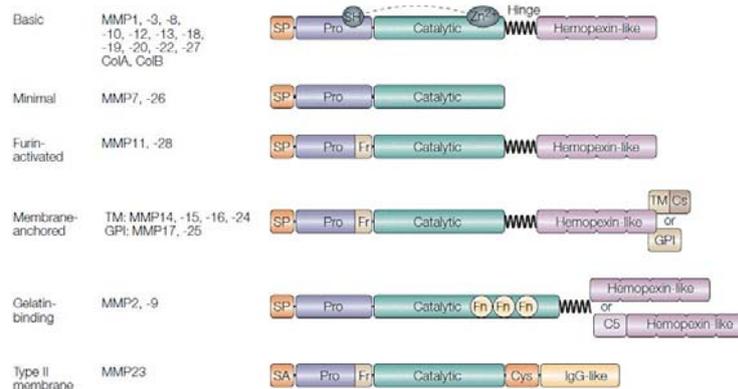
- Il dominio emopexina ha una struttura ad elica con 4 pale di tipo β che mediano le interazioni proteina-proteina.
- Questo dominio contribuisce inoltre:
 - al corretto riconoscimento del substrato
 - all'attivazione dell'enzima
 - alla localizzazione, internalizzazione e degradazione della proteasi.



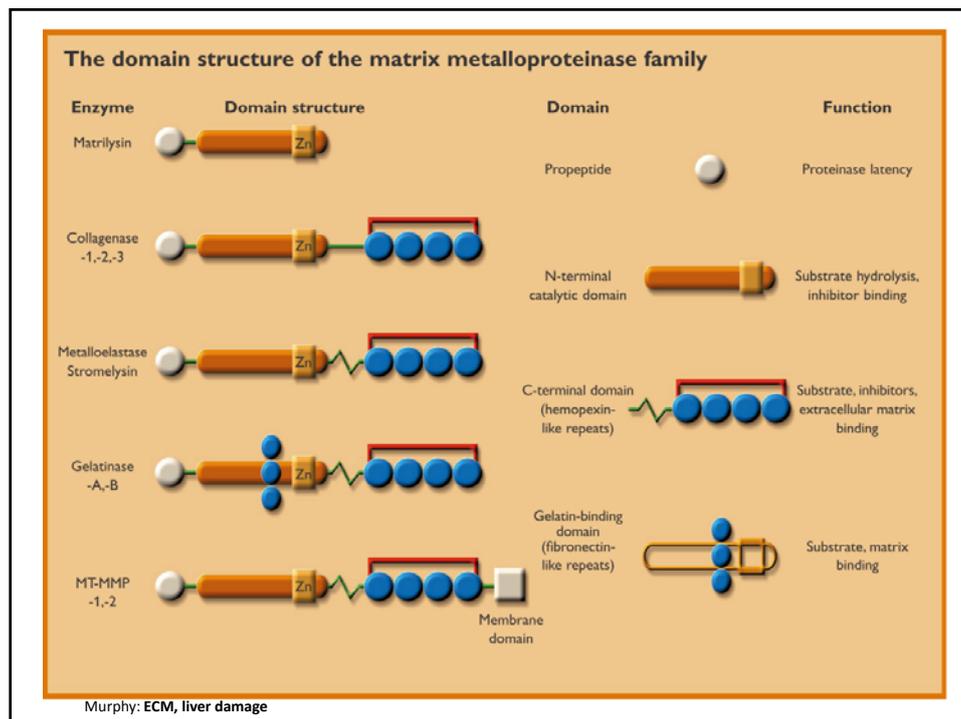
METALLOPROTEASI



Struttura a domini della MMPs umane



Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. Nat Rev Immunol. 2004 Aug;4(8):617-29.



Classificazione bioinformatica delle MMPs

✚ Sei sottogruppi evolutivi:

- MMP-19, -26 e -28
- MMP-11, -21 e -23
- MMP-17 e -25
- MMP-1, -3, -8, -10, -12 e -27
- MMP-14, -15, -16, e -24
- MMP-2, -7, -9 e -20.

Murphy G, Nagase H. *Progress in matrix metalloproteinase research*. Mol Aspects Med. 2008 Oct;29(5):290-308.

Table 1 | **The matrix metalloproteinase family**

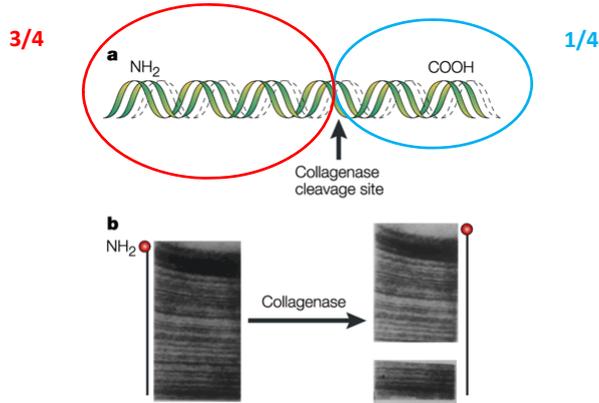
MMP designation ^a	Structural class	Common name(s)
MMP-1	Simple hemopexin domain	Collagenase-1, interstitial collagenase, fibroblast collagenase, tissue collagenase
MMP-2	Gelatin-binding	Gelatinase A, 72-kDa gelatinase, 72-kDa type IV collagenase, neutrophil gelatinase
MMP-3	Simple hemopexin domain	Stromelysin-1, transin-1, proteoglycanase, procollagenase-activating protein
MMP-7	Minimal domain	Matrilysin, matrin, PUMP1, small uterine metalloproteinase
MMP-8	Simple hemopexin domain	Collagenase-2, neutrophil collagenase, PMN collagenase, granulocyte collagenase
MMP-9	Gelatin-binding	Gelatinase B, 92-kDa gelatinase, 92-kDa type IV collagenase
MMP-10	Simple hemopexin domain	Stromelysin-2, transin-2
MMP-11	Furin-activated and secreted	Stromelysin-3
MMP-12	Simple hemopexin domain	Metalloelastase, macrophage elastase, macrophage metalloelastase
MMP-13	Simple hemopexin domain	Collagenase-3
MMP-14	Transmembrane	MT1-MMP, MT-MMP1
MMP-15	Transmembrane	MT2-MMP, MT-MMP2
MMP-16	Transmembrane	MT3-MMP, MT-MMP3
MMP-17	GPI-linked	MT4-MMP, MT-MMP4
MMP-18	Simple hemopexin domain	Collagenase-4 (<i>Xenopus</i> ; no human homologue known)
MMP-19	Simple hemopexin domain	RASI-1, MMP-18 ^b
MMP-20	Simple hemopexin domain	Enamelysin

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer. 2002 Mar;2(3):161-74.

Classificazione funzionale delle MMPs: 1 - Collagenasi

- ✚ Ci sono tre COLLAGENASI: collagenasi 1 (MMP-1), collagenasi 2 (nota anche come la collagenasi dei neutrofili, MMP-8) e collagenasi-3 (MMP-13).
- ✚ Contengono domini pro-peptide, catalitico ed emopexina.
- ✚ Giocano un importante ruolo nella **scissione dei collagene fibrillari** di tipo I, II e III, dando **frammenti distinti di ¾ e di ¼ di frammento**.
- ✚ Hanno inoltre attività contro altre molecole della MEC e proteine solubili.
- ✚ Di per se i domini catalitici delle collagenasi possono scindere substrati non collagenosi, ma non sono in grado di scindere i collagene fibrillari in assenza dei domini tipo emopexina.
- ✚ La collaborazione tra i due domini è importante per l'espressione dell'attività collagenolitica.

Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. Mol Aspects Med. 2008 Oct;29(5):290-308.



3/4 **1/4**

a NH₂ COOH

Collagenase cleavage site

b NH₂

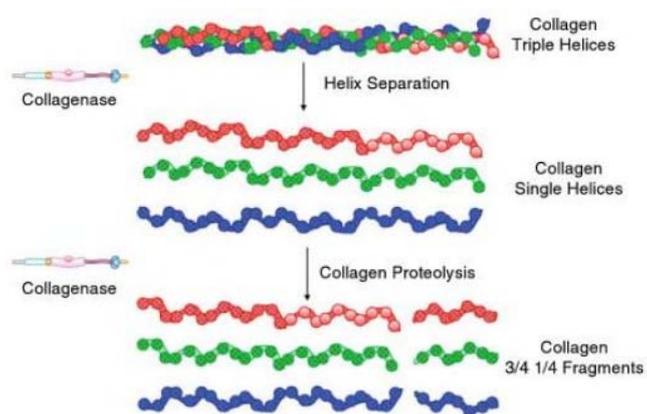
Collagenase

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Degradazione del collagene interstiziale mediante collagenasi.

a. Un monomero di collagene interstiziale di tipo I, II o III che mostra la posizione del legame che viene scisso dalla MMP-1 tra glicina 775 – leucina/isoleucina 776

Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Mar;3(3):207-14.



Collagen Triple Helices

Collagenase

Helix Separation

Collagen Single Helices

Collagenase

Collagen Proteolysis

Collagen 3/4 1/4 Fragments

Attività collagenolitica delle MMPs. Le collagenasi svolgono il collagene a triplice elica prima di idrolizzare i legami peptidici, rompendo il collagene in frammenti di $\frac{3}{4}$ e $\frac{1}{4}$. I domini emopexina delle MMPs sono essenziali per la scissione dei collagenei nativi.

M.M. Benjamin & R.A.Khalil: Matrix metalloproteinase inhibitors as Investigative Tools. In: Matrix Metalloproteinase inhibitors. Specificity of Binding and Structure-Activity Relationships (S.P. Gupta ed., Springer, 2012)
http://books.google.it/books?id=gcNe-D_KvG8C&pg=PA216&lpg=PA216&dq=procrptidins&source=bl&ots=deHNshx4E6&sig=A2t7wPniGG08j9lBXAbmwr1w&hl=en&sa=X&ei=4KVWU9fxBORU0QX85oHgBQ&ved=0CC0Q6AEwAQ#v=onepage&q=procrptidins&f=false

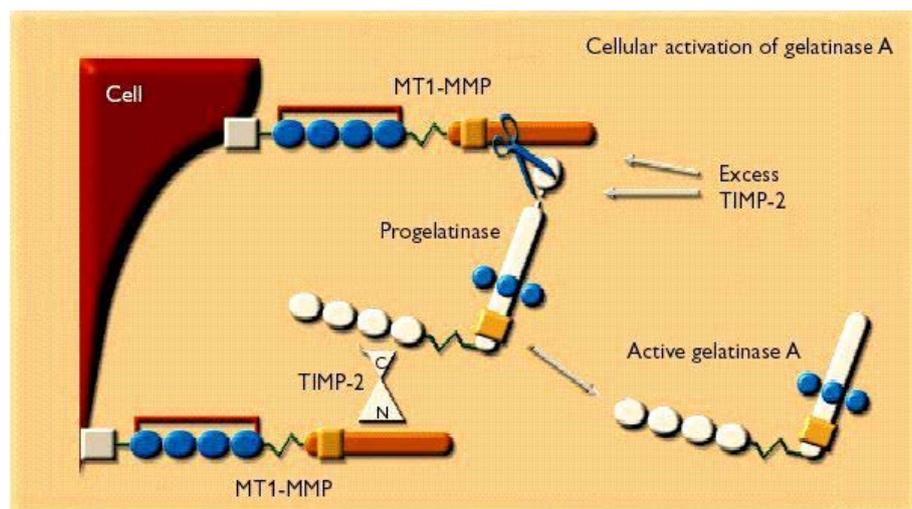
Classificazione funzionale delle MMPs: 2 - Gelatinasi-a

- ✦ Comprendono la gelatinasi A (MMP-2) e la gelatinasi B (MMP-9).
- ✦ Entrambi gli enzimi hanno **tre ripetizioni di un motivo di tipo II della fibronectina inseriti nel dominio catalitico**.
- ✦ Hanno attività proteolitica simile e degradano **collageni denaturati**, gelatine e **un gran numero di molecole della MEC incluso collageni nativi di tipo IV, V e XI, laminina e la proteina centrale dell'aggregano**.
- ✦ La MMP-2 digerisce i collageni nativi di tipo I, II e III in modo simile a quello delle collagenasi, anche se con attività molto più debole di quella delle collagenasi, ma la MMP-9 non lo fa.
- ✦ Dato che la proMMP-2 viene reclutata sulla superficie cellulare e viene attivata da MMPs di tipo membranoso (MT-MMPs) essa può accumularsi nella regione pericellulare ed esprimere un ragionevole grado di attività collagenolitica locale. [vedi figura Murphy]

Murphy G, Nagase H. *Progress in matrix metalloproteinase research*. Mol Aspects Med. 2008 Oct;29(5):290-308.

Attivazione della gelatinasi A sulla superficie cellulare

(didascalia slide seguente)



Murphy & Arhtur: *Danger outside the cell. The extracellular matrix and disease*.

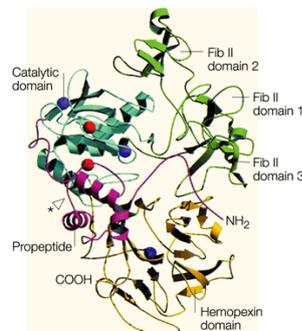
Didascalia della figura di Murphy Attivazione della gelatinasi A

- ✚ **L'attivazione della pro-gelatinasi A** si basa su un suo **sequestro sulla superficie cellulare**.
- ✚ Ciò si realizza mediante formazione di una sorta di recettore che richiede **l'interazione fra TIMP-2** (che svolge anche la funzione di inibitore tissutale delle metalloproteinasi; vd. avanti) con uno dei tre tipi di metalloproteinasi di membrana (**MT-MMPs**) (MT1-3 MMP) che sono ancorate alla superficie cellulare.
- ✚ **La gelatinasi ancorata viene allora scissa da una MT-MMP adiacente libera**.
- ✚ Ciò significa che il **TIMP-2** è un **regolatore** critico del processo di **attivazione**: è necessario per il legame della gelatinasi che inizia l'attivazione, ma se è presente in eccesso inibirà tutte le forme di metalloproteinasi.

Murphy & Arhrtur: *Danger outside the cell. The extracellular matrix and disease.*

Classificazione funzionale delle MMPs: 2 - Gelatinasi-b

- ✚ La MMP-2 può inoltre agire come attività collaborativa, dato che **digerisce il collagene già frammentato dalle collagenasi** dando **frammenti più piccoli**, dato che questi frammenti si denaturano alla temperatura corporea di 37°C.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 5 | **Structure of proMMP-2.** The pro-domain, catalytic domain, fibronectin (Fib) domains and hemopexin domain are shown in red, turquoise, green and yellow, respectively. Zn^{2+} ions are indicated in red, and Ca^{2+} ions are magenta. The asterisk indicates the cleavage site for MT1-MMP. MMP, matrix metalloproteinase; MT-MMP, membrane-type matrix metalloproteinase. Reproduced with permission from REF. 29 © (1999) American Association for the Advancement of Science.

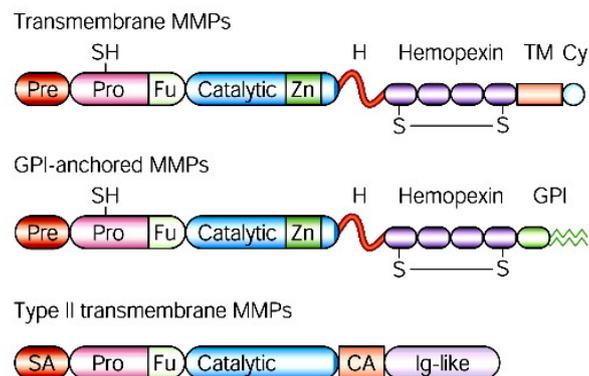
Brinckerhoff CE, Matrisian LM. **Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Mar;3(3):207-14.

MMPs di membrana (MT-MMPs) -1

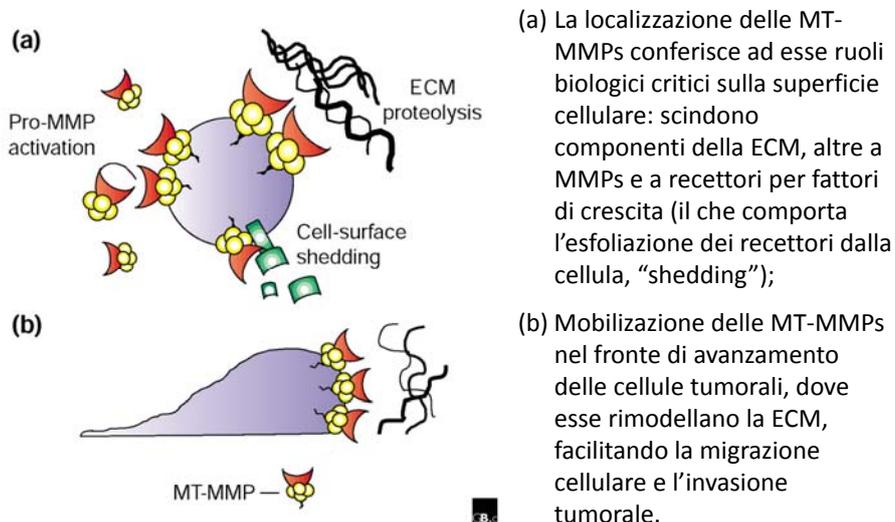
✚ Le MT-MMPs includono

- MMPs che hanno nell'estremità C-terminale un dominio transmembrana singolo (**TM**) e un dominio citoplasmatico molto corto (**Cy**)
- MMPs ancorate a glicosilfosfatidilinositolo (**GPI**)
- la MMP-23 ha nell'estremità N-terminale un'ancora segnale (**SA**) che l'indirizza alla membrana cellulare – MMP transmembrana di tipo II; ha inoltre un insieme ("array") caratteristico di cisteine (**CA**) e domini di tipo immunoglobulinico (**Ig**).

MMPs di membrana (MT-MMPs) -2



Localizzazioni delle MT-MMPs



Somerville RP, Oblander SA, Apte SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. Genome Biol. 2003;4(6):216.

Funzioni delle MMPs

Le MMPs giocano un ruolo importante nel **rimodellamento dei tessuti** associato a diversi processi fisiologici e patologici. Es:

- **Morfogenesi**
- **Angiogenesi**
- **Riparo tissutale**
- **Cirrosi**
- **Enfisema**
- **Ictus**
- **Infarto** di miocardio
- **Artrite**
- **Metastasi.**

Si ritiene che la MMP-2 e la MMP-9 siano importanti per la metastatizzazione e che la MMP-1 sia importante nell'artrite reumatoide e nell'osteoartrite.

Substrati delle MMPs - 1

- ✚ **Componenti strutturali della MEC**, degradazione proteine usurate, facilitazione della migrazione.
- ✚ Dato che le cellule hanno recettori (es. Integrine) per componenti strutturali della MEC, la scissione di queste proteine può influenzare:
 - **Segnalamento** cellulare
 - **Funzioni** cellulari.
- ✚ La scissione può dare origine a **frammenti con nuove funzioni**. Es.:
 - La degradazione della laminina 5 e del collagene di tipo IV provoca **l'esposizione di siti criptici** che promuovono la migrazione.
 - La scissione della «Insulin Growth Factor Binding Protein» (IGF-BP) rilascia IGFs.
 - La scissione del perlecano rilascia Fibroblasts Growth Factors (FGFs).

Egeblad & Werb, 2002

Substrati delle MMPs - 2

- ✚ Oltre a frammentare le componenti strutturali della ECM le **MMPs** e le proteinasi correlate, le **ADAMs**, partecipano al **rilascio da forme precursore**, legate alla membrana, di molti fattori di crescita. Es:
 - **Transforming Growth Factor- α** (TGF- α).

[La **biodisponibilità del TGF- β** è regolata in modo diverso: viene rilasciato mediante MMP-2 e MMP-9 a partire di un complesso extracellulare inattivo]

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer. 2002 Mar;2(3):161-74.

Substrati delle MMPs - 3

✚ Anche i **recettori per i fattori di crescita** sono substrati delle MMPs.
Es:

- Il FGF receptor 1 viene scisso dalla MMP2.
- Due membri della famiglia di recettori per l'Epidermal Growth Factor (EGFR) (HER2/neu (noto anche come ERBB2) e HER4 (ERBB4), e il recettore per l'Hepatocyte Growth Factor (HGF), c-met, sono substrati per MMPs o ADAMS ancora non identificate.
- In tutti i casi **vengono rilasciati i domini extracellulari dei recettori**, e questi possono fungere da **recettori esca** («decoy») **per i rispettivi ligandi**.



Egeblad M, Werb Z. **New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression**. Nat Rev Cancer. 2002 Mar;2(3):161-74.

Substrati delle MMPs - 4

✚ **Molecole di adesione**. Es:

- La scissione delle E-caderine e del CD44 provoca il rilascio di frammenti dei domini extracellulari e un aumento del comportamento invasivo.
 - La scissione del precursore della subunità α_v delle integrine da parte della MMP-14 aumenta la migrazione delle cellule tumorali.
- ✚ Le MMPs scindono e attivano le loro **stesse forme zimogeno** e, inoltre, frammentano altre MMPs e inibitori delle proteinasi quali le Serpine.

[**CD44**: proteina transmembrana, monomerica, altamente **glicosilata** la cui funzione è quella di legare l'**acido ialuronico** ed altre **glicoproteine** della **matrice extracellulare**. È principalmente una molecola di adesione intercellulare espressa sui linfociti].

Regolazione dell'attività delle MMPs -1

- ✚ Le MMPs sono sintetizzate sotto forma di **Zimogeni inattivi** (pro-MMPs).
- ✚ Essi sono mantenuti inattivi mediante un'interazione tra un gruppo sulfidrilico di una cisteina del dominio propeptidico e l'ione zinco legato al dominio catalitico (interruttore a cisteina»)
 - L'attivazione richiede una rimozione proteolitica del dominio pro-peptidico.
- ✚ La maggior parte delle MMPs è **attivata fuori dalle cellule** da altre MMPs attivate o da serina proteasi.
- ✚ Tuttavia, MMP-11, MMP-28 e le MT-MMPs possono essere **attivate** anche **da serina proteasi intracellulari tipo-furina** prima che raggiungano la superficie cellulare.

Egeblad M, Werb Z. **New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.** Nat Rev Cancer. 2002 Mar;2(3):161-

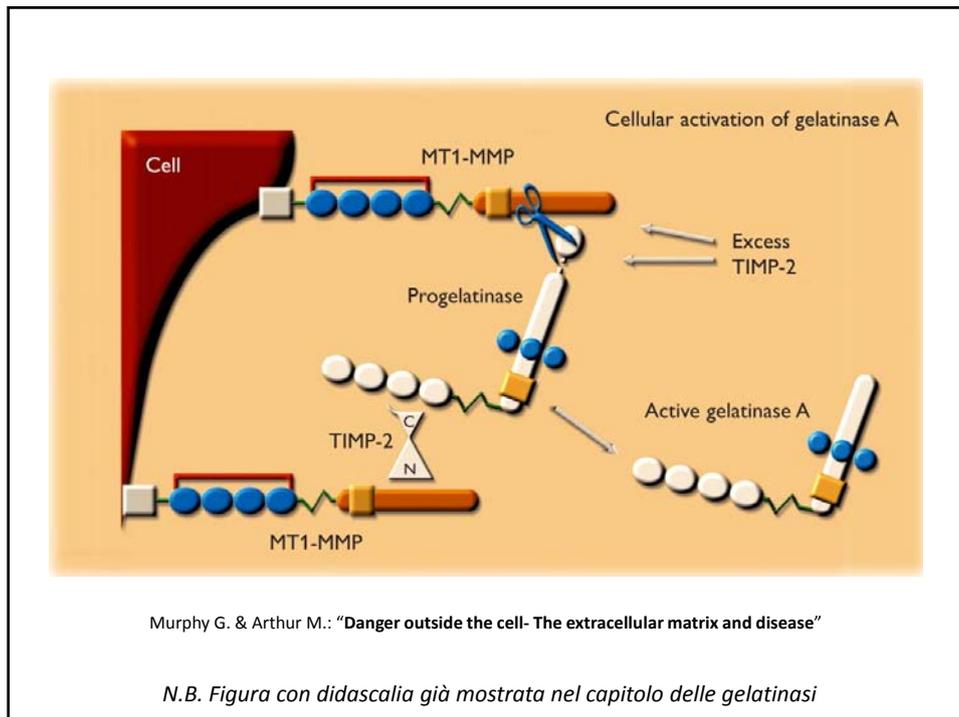
74.

Regolazione dell'attività delle MMPs -2

- ✚ La MMP-2 è attivata sulla superficie cellulare mediante una via particolare multicomponenti che coinvolge la MMP-14 (MT1-MMP) e l'inibitore delle metalloproteinasi di tipo 2 (TIMP-2):
 - Il TIMP-2 si lega alla MMP14 con il suo N-terminale e alla pro-MMP-2 con il suo C-terminale; ciò permette ad una molecola vicina, non inibita di MMP-14 di scindere la pro-MMP-2 legata.
 - La MMP-14 non attiva totalmente la MMP-2 ed è necessaria un'altra molecola di MMP-2 già attivata per rimuovere una porzione residua del propeptide della MMP-2.
 - La Pro-MMP-2 potrebbe anche essere attivata mediante un meccanismo che non richieda TIMP-2.

Egeblad M, Werb Z. **New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.** Nat Rev Cancer. 2002 Mar;2(3):161-

74.



Regolazione dell'attività delle MMPs -3

- ✚ L'attività delle MMPs è altamente controllata dagli **inibitori endogeni**.
 - Il principale inibitore delle MMPs nei liquidi corporei è la **α 2-Macroglobulina**, un'abbondante proteina plasmatica.
 - La α 2-Macroglobulina si lega alle MMPs e il complesso α 2-Macroglobulina-MMP si lega allora ad un "Scavenger Receptor" e viene irreversibilmente degradato per endocitosi.
 - In un modo simile a quello che avviene per l' α 2-Macroglobulina, anche la trombospondina-2 forma un complesso con la MMP-2 e facilita l'endocitosi mediata dal "Scavenger Receptor" e la "clearance".
 - Viceversa, la trombospondina-1 si lega alla pro-MMP-2 e -9 ed inibisce direttamente la loro attivazione.
 - Curiosamente, vi sono lavori in cui si riporta che la trombospondina-1 aumenti l'attivazione di MMP-2 e -9.

Regolazione dell'attività delle MMPs -4

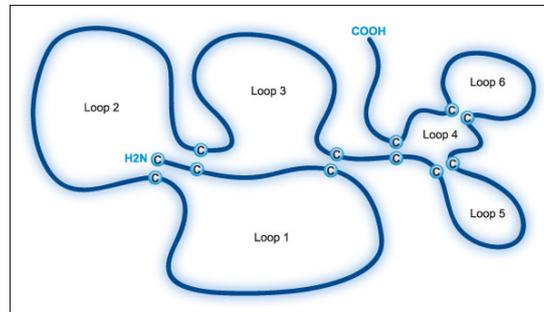
- ✦ Gli inibitori endogeni delle MMPs più studiati sono i **TIMPs** 1, -2, -3 e -4, che inibiscono reversibilmente le MMPs in modo stechiometrico 1:1.
 - Essi si differenziano dall'**espressione tessuto-specifica** e dalla **capacità di inibire varie MMPs**.
 - Studi con topo deficitari in TIMP-2 indicano che la funzione fisiologica dominante del TIMP-2 sia l'attivazione della MMP-2.
- ✦ Esistono anche inibitori delle MMPs che contengono **sottodomini con somiglianze strutturali con gli TIMPs** e questi includono il frammento C-terminale della "procollagen C-terminal proteinase enhancer protein 18" e il dominio NC1 del collagene del tipo IV.
- ✦ Infine, l'unico inibitore noto per le MMP legate alla membrana è RECK ("REversion-inducing Cysteine-Rich protein with Kazal motifs").

INIBITORI TISSUTALI DELLE METALLOPROTEINASI (TIMPs) - 1

- ✦ Gli **inibitori tissutali delle metalloproteinasi** comprendono una famiglia con quattro membri di inibitori delle MMPs omologhi (TIMP1, 2, 3, and 4).
- ✦ **Le concentrazioni di TIMPs eccedono di molto la concentrazione di MMPs** nei tessuti e nei fluidi extracellulari, così **concentrando la loro attività proteolitica in particolari siti pericellulari**.
- ✦ Contrastando con il loro consueto ruolo inibitorio, basse concentrazioni di TIMP-2 aumentano l'attivazione della MMP-2 da parte della MMP14, formando un complesso ternario con quelle proteine alla superficie cellulare.

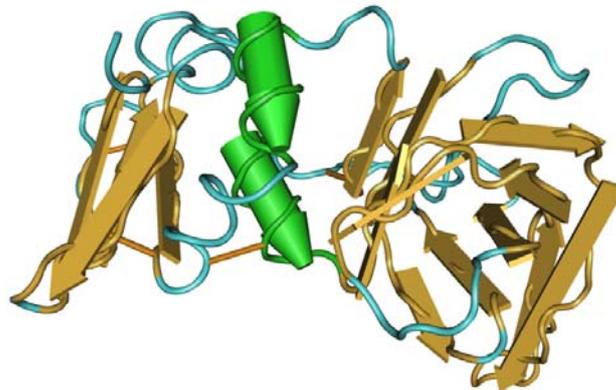
<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11034>

INIBITORI TISSUTALI DELLE METALLOPROTEINASI (TIMPs) - 2



Rappresentazione schematica della struttura del TIMP-1. Il TIMP1 contiene 12 residui di cisteina che formano 6 loops mediante ponti disolfuro. I domini N-terminali degli TIMPs 1-4 si legano al dominio catalitico della maggior parte delle MMPs attivate inibendo la loro funzione. Il domini C-terminale di TIMP-1 e TIMP-2 si legano al dominio emopexina di proMMP2 e proMMP9, rispettivamente; questo legame regola la funzione della MMP.

Human Tissue Inhibitor of Metalloproteinase - 2



http://commons.wikimedia.org/wiki/File:1BR9_HumanTissueInhibitorOfMetalloproteinase-2.png

INIBITORI TISSUTALI DELLE METALLOPROTEINASI (TIMPs) - 3

✚ Inoltre, gli TIMPs hanno dimostrato di avere:

- **Attività promotrici della proliferazione (in particolare delle cellule eritroidi) (TIMP-1, TIMP-2)** che è **indipendente dalla loro capacità inibitoria delle MMPs**.
- **Proprietà induttrici dell'apoptosi** in cellule tumorali e cellule muscolari lisce (TIMP-3). Si pensa che questa attività sia dovuta all'inibizione di TACE che impedisce l'esfoliazione di «death receptors» quali Fas, «TNF-receptor 1» e «TNF-related apoptosis inducing ligand receptor-1».
- Il TIMP-3 si può anche legare al recettore 2 per il «vascular endothelial growth factor» (VEGF) e inibire il segnalamento a valle del VEGF e l'angiogenesi.

<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11034>

Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med.* 2005 Oct;29(5):290-308.

INIBITORI TISSUTALI DELLE METALLOPROTEINASI (TIMPs) - 4

- ✚ La **trascrizione** degli TIMPs è **regolata da citochine e da fattori di crescita** simili a quelli che controllano l'espressione delle MMPs (es. TGF β , TNF α , IL-1, IL-6) nonostante spesso lo facciano in modo diverso.
- ✚ Altri inibitori endogeni includono la proteina plasmatica α 2-macroglobulina e un inibitore di superficie delle MMP, l'inibitore RECK.

<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11034>

Inibitori sintetici

✚ Gli **inibitori sintetici** di solito **contengono un gruppo chelante che si lega fortemente allo zinco catalitico nel sito attivo delle MMP.**

- I gruppi chelanti più comuni includono idrossamati, carbossilati, tioli e fosfinili.
 - Gli idrossamati sono inibitori particolarmente potenti delle MMPs e di altri enzimi zinco-dipendenti perchè hanno il potere di chelare doppiamente l'atomo di zinco.
 - Altri sostituti di questi inibitori vengono di solito concepiti per interagire con le varie tasche di legame della MMP in questione, rendendo l'inibitore più o meno specifico per una data MMP.

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer. 2002 Mar;2(3):161-74.

Conseguenze biologiche della proteolisi mediata dalle MMPs - 1

1. Conversione di proteine strutturali della matrice in molecole di segnalamento: [approfondito lezione «Matrichine»]

- a. Collagene di tipo II: un frammento è un antagonista della "bone morphogenetic protein" (BMP)
- b. I domini 1– 6 non-collagenosi del Collagene di tipo IV (NC1) sono anti-angiogenetici dopo la frammentazione.
- c. Il collagene 18 ha un dominio NC1 (**endostatina**), che è anti-angiogenico

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 8:221-233, 2007.

Conseguenze biologiche della proteolisi mediata dalle MMPs - 2

✚ Cambiamenti strutturali nella proteine della matrice:

- Frammentazione del perlecano.
- Frammentazione della laminina-5 e laminina-10.
- Processamento da pro-collagene a collagene per l'assemblamento.

✚ Cambiamenti nell'architettura tissutale

- Frammentazione della E-caderina.
- Frammentazione delle desmogleine.
- Transizione epitelio-mesenchimale (EMT).
- Vasocostrizione.

Page-McCaw *et al.* Nat Rev Mol Cell Biol. 8:221-233, 2007

Conseguenze biologiche della proteolisi mediata dalle MMPs - 3

✚ Chemoattrazione

- Aumento dell'attività di chemochine in seguito a frammentazione: interleuchina-8 (IL8, anche nota come "CXCL8" nel topo: LIX)
- Diminuzione di attività di chemochine in seguito alla frammentazione: "monocyte chemotactic protein-1; MCP1; anche nota come CCL2 o JE)
- Alterazione delle chemotassi: si formano gradienti mediante rilascio di sindecano.

✚ Proliferazione:

- I ligandi dell'"Epidermal-growth-factor receptor; EGFR" debbono essere processati per funzionare.

Page-McCaw *et al.* Nat Rev Mol Cell Biol. 8:221-233, 2007

Conseguenze biologiche della proteolisi mediata dalle MMPs - 4

✚ Sopravvivenza cellulare:

- Fattore di sopravvivenza neuronale: “stromal-cell derived factor-1; SDF1”, anche noto come CXCL12; dementia da HIV.
- E-caderina e desmosomi.

✚ Attivazione di molecole di segnalamento latenti:

- Frammentazione dell’“insulin-growth-factor (IGF)-binding protein; IGFBP” per rilasciare IGF attivo.
- “Latent transforming growth factor- β ; TGF β) a to active TGF β .
- Versamento di “Tumour necrosis factor- α ; TNF α)
- Versamento di Ninjurin A per segnalare il rilascio da adesione cellulare.

Page-McCaw *et al.* Nat Rev Mol Cell Biol. 8:221-233, 2007

Conseguenze biologiche della proteolisi mediata dalle MMPs - 5

✚ Alterazione del raggio di azione di una molecola di segnalamento:

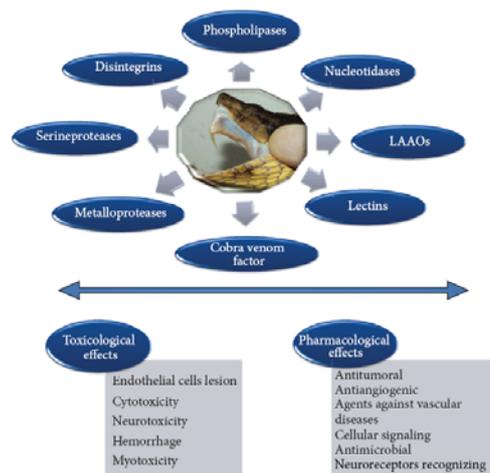
- “Vascular endothelial growth factor; VEGF”: alterazione del raggio di diffusione mediante modulazione del legame con l’eparina.
- TNF α legato alla membrana verso TNF α solubile.

✚ Differenziamento:

- Animali con mutazioni double-knockout per *Mmp2* e *Mmp14* sono sinteticamente letali e il difetto è dovuto al mancato differenziamento del muscolo.
- La maturazione degli adipociti richiede la sostituzione della matrice interstiziale circostante con una membrana basale.

Page-McCaw *et al.* Nat Rev Mol Cell Biol. 8:221-233, 2007

De-adesione



L'ampio spettro di azione e recenti applicazioni delle tossine del veleno dei serpenti. La figura illustra i paradigmi tra gli effetti tossicologici e farmacologici delle tossine isolate. I diversi bersagli cellulari sono correlati a diversi tipi di meccanismi.

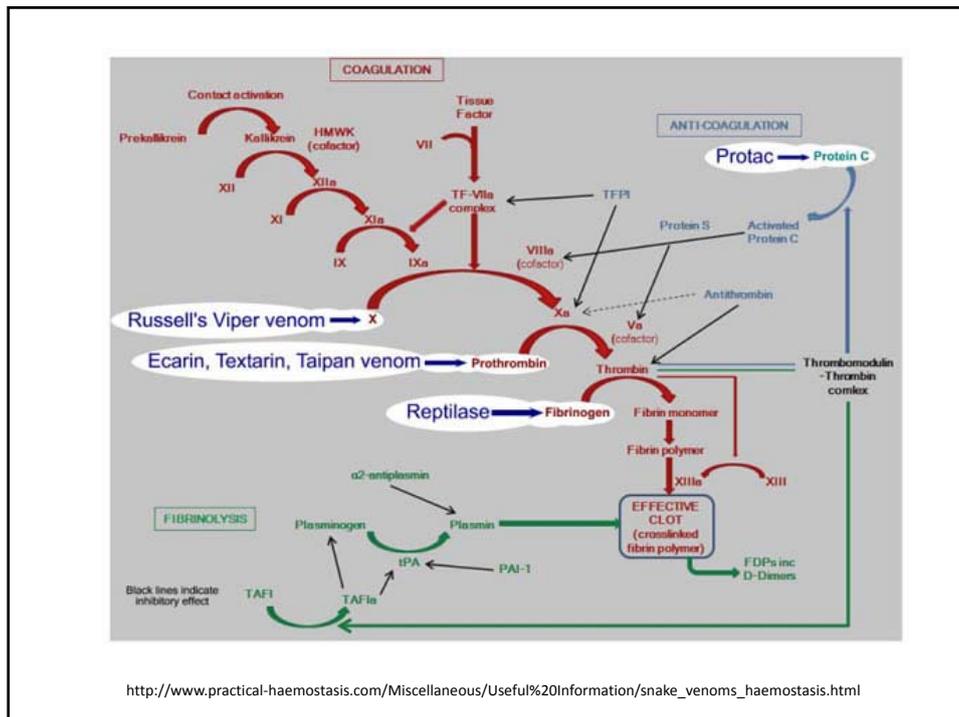
Calderon et al., Biomed Res International vol. 2014, Article ID 203639.

Fattori de-adesivi promuovono la migrazione cellulare e possono rimodellare la superficie cellulare - 1

- ✚ Una forte adesione delle cellule alla matrice extracellulare (ad es. alla membrana basale) impedisce alla cellule di migrare.
- ✚ In alcuni casi, però, **cellule** normalmente immobili **debbono** rapidamente **diventare mobili**:
 - Una ferita dalla pelle viene chiusa dalla rapida migrazione dei cheratinociti circostanti verso l'area lesionata.
 - La transizione verso lo stato di mobilità richiede la **de-adesione delle cellule** dalla MEC mediante:
 - l'inibizione delle interazioni cellula-matrice
 - distruzione di alcuni componenti della matrice.

Fattori de-adesivi promuovono la migrazione cellulare e possono rimodellare la superficie cellulare - 2

- ✚ Una classe di fattori de-adesivi comprende piccoli peptidi detti **disintegrine** che **contengono la sequenza RGD** di legame con le integrine, presenti in molte molecole della MEC
- ✚ **Legandosi alle integrine sulla superficie delle cellule, le disintegrine inibiscono** in modo competitivo il legame delle cellule alla matrice.
- ✚ Le **disintegrine presenti nel veleno dei serpenti, che impediscono alle piastrine di aggregarsi** sono parzialmente responsabili delle **proprietà anticoagulanti dei veleni**.



Fattori de-adesivi promuovono la migrazione cellulare e possono rimodellare la superficie cellulare - 3

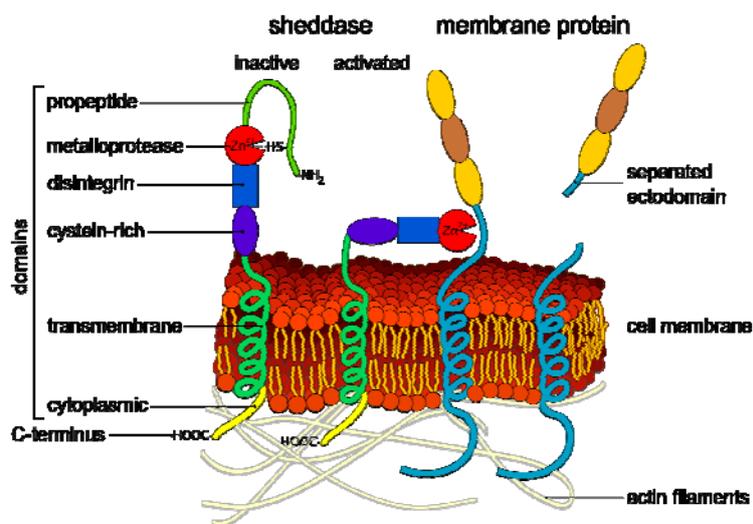
- ✚ Al contrario delle disintegrine dei veleni dei serpenti, una seconda classe di fattori de-adesivi contengono **due tipi di proteasi**:
 - Metalloproteinas **specifiche per il fibrinogeno**
 - Metalloproteinas **specifiche per la matrice (MMPs)**
- ✚ Queste proteinas degradano i componenti della matrice, permettendo in questo modo la migrazione delle cellule.

A DISINTEGRIN AND A METALLOPROTEINASE (FAMIGLIA ADAM)

La famiglia ADDAMS



Proteasi della famiglia ADAMs: «SHEDDASES»



http://en.wikipedia.org/wiki/A_disintegrin_and_metalloproteinase

ADAMs - 1

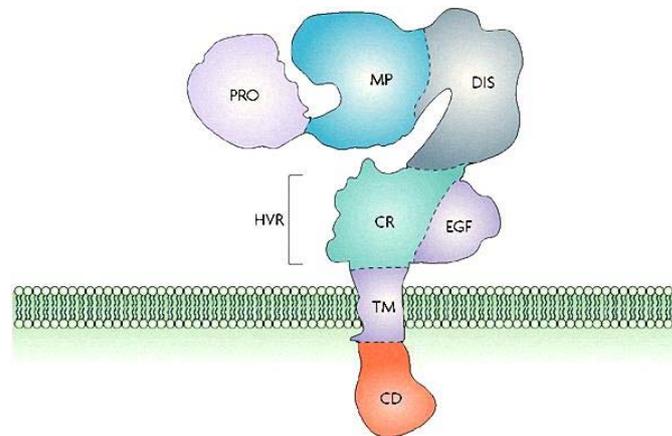
- ✚ La famiglia di glicoproteine **ADAMs**, ancorata alla membrana da una singola sequenza transmembrana, contiene un dominio "**A Disintegrin and a Metalloprotease**" e partecipa ad un gran numero di processi che dipendono dal rimodellamento della superficie cellulare:
 - Determinazione del destino delle cellule durante l'embriogenesi;
 - Fusione dello spermatozoo con la cellula uovo durante la **fecondazione**;
 - Nel caso della fusione spermatozoo-cellula uovo, la proteasi viene scissa dall'ADAM, lasciando la disintegrina sullo spermatozoo per mediare il legame ad una integrina sulla cellula uovo.
 - Un tale processamento proteolitico del dominio extracellulare, designato "**ectodomain shedding**" (rilascio dell'ectodominio), permette alla cellula di **inattivare i recettori di membrana** o di **rilasciare proteine solubili attive**, come le citochine, dalla superficie cellulare.

ADAMs – 1a

- ✚ Comprendono circa 35 tipi di proteasi.
- ✚ Come le altre metalloproteinasi sono inibite da TIMPs.
- ✚ «**SHEDDASES**»: Le ADAMs **scindono e rilasciano domini extracellulari di proteine della superficie cellulare**, alcune delle quali sono **importanti molecole informazionali**: es. Tumor Necrosis Factor $-\alpha$, Transforming Growth Factor $-\alpha$.
- ✚ Mutazioni nulle nelle ADAM-17 sono letali durante l'embriogenesi dovuto a carenza di TGF- α e di altri ligandi per i recettori dell'EGF.
- ✚ Un polimorfismo del gene ADAM-33 è fortemente associato all'asma umana, anche se il meccanismo è ancora ignoto.

Pollard & Earnshaw: **Cell Biology**, Saunders, 2008

Diagramma schematico della struttura a domini della famiglia ADAM («A Disintegrin And a Metalloproteinase»)



Nature Reviews | Cancer

Murphy G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. Nat Rev Cancer. 2008 Dec;8(12):929-41.

Didascalia Figura di Murphy sulla struttura di una ADAM

- ✚ Un grande propeptide nel N-terminale (PRO), che gioca un ruolo nel processo iniziale di ripiegamento della proteina, blocca inoltre l'attività catalitica durante il traffico intracellulare.
- ✚ Nonostante la scissione del propeptide mediante enzimi tipo-furina abbia luogo nel Golgi o ulteriormente nel percorso secretorio, sembra che il propeptide possa rimanere legato all'interno della tasca catalitica (dominio di metalloproteinasi, MP) richiedendo che venga spostato e creando un ulteriore livello di regolazione.
- ✚ Tre regioni distinte a valle del dominio catalitico [dominio disintegrina (DIS), legato mediante un ponte S-S ad una regione ricca di cisteine (CR) spesso contenenti una ripetizione tipo Epidermal growth Factor (EGF)] costituiscono il rimanente ectodominio di una ADAM

Murphy G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. Nat Rev Cancer. 2008 Dec;8(12):929-41.

ADAMs - 3

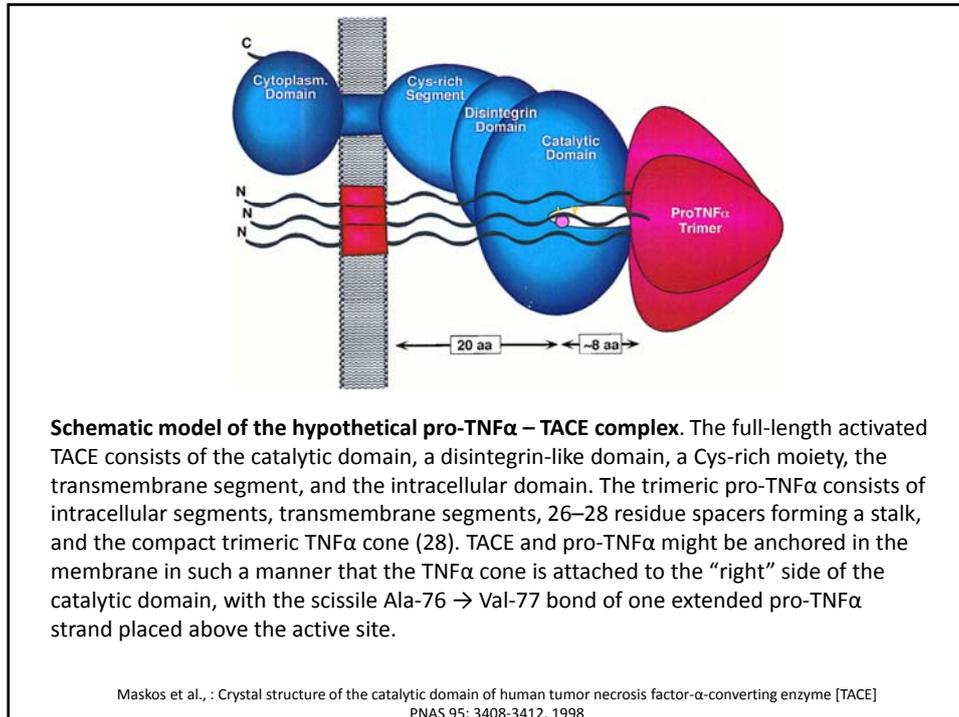
- ✚ Coinvolte nella fusione dei mioblasti durante la miogenesi
- ✚ **Rilascio di Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) in forma solubile.**
 - La forma legata del TNF- α viene rilasciata dalla superficie cellulare mediante un enzima di conversione ancorato alla superficie che contiene un dominio metalloproteinasi [TACE].
 - Il TNF- α a sua volta **attiva la risposta infiammatoria.**

ADAM 17

(TACE: tumor necrosis factor- α -converting enzyme)

- ✚ Molte molecole legate alla membrane sono scisse sulla superficie cellulare, in questo modo rilasciando i loro domini extracellulari. Questo processo, "**ectodomain shedding**" (esfoliazione degli ectodomini), è emerso come un meccanismo critico post-traduzionale per diversi ligandi, recettori e molecole di adesione legate alla membrana.
- ✚ Il "**Tumor necrosis factor α (TNF α)-converting enzyme (TACE/ADAM17)**" è stata originariamente identificato come un enzima responsabile per il rilascio del precursore del TNF α legato alla membrana. Tuttavia, studi successivi hanno riscontrato un numero eccezionalmente elevato di molecole bersaglio di TACE, incluso i ligandi per il recettore per il "epidermal growth factor", la L-selettina, il CD44 e il recettore 2 per il Vascular Endothelial Growth Factor. Inoltre, studi in vivo con topi knockout per TACE hanno dimostrato il suo ruolo cruciale nel "ectodomain shedding" in condizioni sia fisiologiche che patologiche. Tuttavia, la potenziale applicazione clinica della manipolazione dell'attività TACE rimane da essere investigata.

Horiuchi K. A brief history of tumor necrosis factor α -converting enzyme: an overview of ectodomain shedding. Keio J Med. 2013;62(1):29-36.



Proteasi Zn-dipendenti

**FAMIGLIA ADAMT: ADAM COM
DOMINIO TROMBOSPONDINA**

ADAMTs - 1

- ✚ Queste ADAMs con un dominio trombospondina sono **proteasi secrete** che **scindono substrati specifici della matrice, quali il proteoglicano** aggregano della cartilagine.
- ✚ Esperimenti con topi hanno dimostrato che l'inattivazione del dominio proteasico delle ADAMTs riduce lo sviluppo di malattie comuni delle articolazioni come l'osteoartrite.

Pollard & Earnshaw: Cell Biology, Saunders, 2008

ADAMTs - 2

- ✚ Al contrario delle ADAMs, le ADAMTs non hanno un dominio ricco di cisteina, un dominio tipo «epidermal growth factor» o una coda citoplasmatica.
- ✚ Hanno invece una ripetizione di tipo I della trombospondina (TSP-1), un dominio ricco in cisteina, e una o più ripetizioni di TSP-1 aggiuntive.
- ✚ Mentre le **ADAMs** sono spesso coinvolte nel **processamento di citochine e nel versamento di recettori per i fattori di crescita**, le **ADAMTs** sono soprattutto responsabili della **degradazione di componenti della matrice, soprattutto proteoglicani**.
- ✚ Infatti, le ADAMTs-1, -4, -5, -8, -9, -15, -16 e -18 sono considerate **proteoglicanasi**, dato che degradano l'aggregano, il versicano, il brevicano e altri proteoglicani.
- ✚ Viceversa, il ADAMTs-2 partecipa alla rimozione del prodominio aminico del procollagene 1 nel derma.

Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Dec 1;3(12).

