

Matrice Extracellulare

Metalloproteasi della Matrice

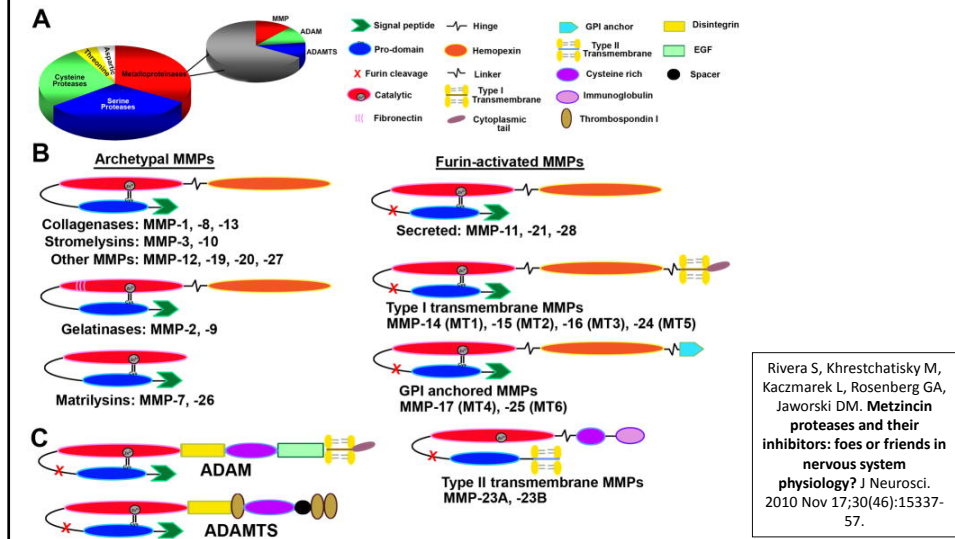
(«Matrixins», clan di «Metzincins»)

<https://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb2/part1/protease.htm>
BO ZHANG, PhD Thesis, University of New Hampshire Jeffrey Thomas, PhD Thesis, Wayne University (2001)

«Le metalloproteinasì 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.»

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

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



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:

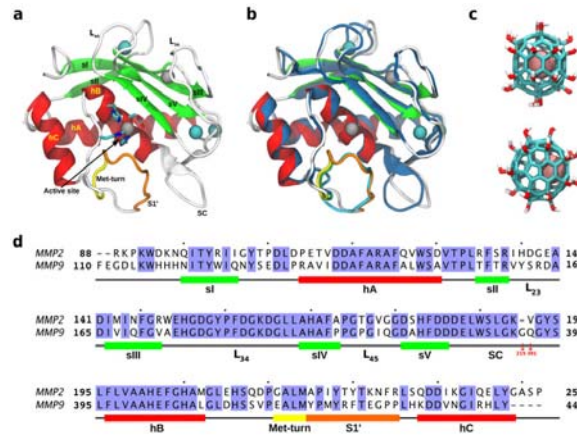
- Proliferazione cellulare
- Migrazione (adesione/appiattimento)
- Differenziamento
- Angiogenesi
- Apoptosi
- Difesa dell'ospite.

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 **PRCGXPD** detto **interruttore a cisteina (C)** («cysteine switch») in cui il **residuo di cisteina coordina lo Zn^{2+}** del **dominio catalitico**, mantenendo **inattiva** la pro-MMP.
- il **dominio catalitico**, che contiene un motivo **HEXXHXXGXXH** di legame con lo Zn^{2+} , in cui l'ione Zinco è chelato a tre residui di istidina (**H**), e una metionina (**M**) 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.

Molecular system (MMP-2 and Gd@C82(OH)22) and sequence alignment between MMP-2 and MMP-9.

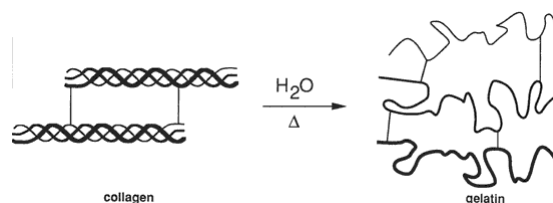


Kang SG, Araya-Secchi R, Wang D, Wang B, Huynh T, Zhou R. Dual inhibitory pathways of metallofullerenol Gd@C₈₂(OH)₂₂ on matrix metalloproteinase-2: molecular insight into drug-like nanomedicine. Sci Rep. 2014 Apr 24;4:4775.

(a) Catalytic domain of MMP-2: two Zn²⁺ and three Ca²⁺ are depicted in gray and cyan, respectively, and **Met-turn and the ligand specificity loop S1'** is highlighted with yellow and orange, respectively. (b) MMP-2 is superimposed on the catalytic domain of MMP-9 marked in blue with RMSD of 0.97 Å. (c) Structure of metallofullerenol Gd@C₈₂(OH)₂₂, where Gd³⁺ is colored in pink. (d) Sequence alignment between MMP-2 and MMP-9 with 64.3% sequence identity.

MMPs: Struttura - [2]

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

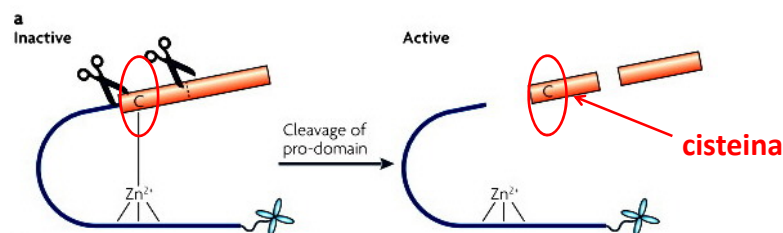


Classificazione classica in base al tipo di domini e preferenza di substrato

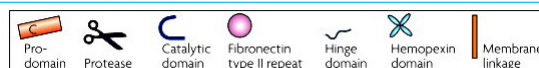
- ✚ Collagenasi
- ✚ Gelatinasi
- ✚ Stromalisine
- ✚ Matrilisine
- ✚ Tipo membranoso (MT-MMPs)
- ✚ Ecc.

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

Struttura schematica delle MMPs – [1]

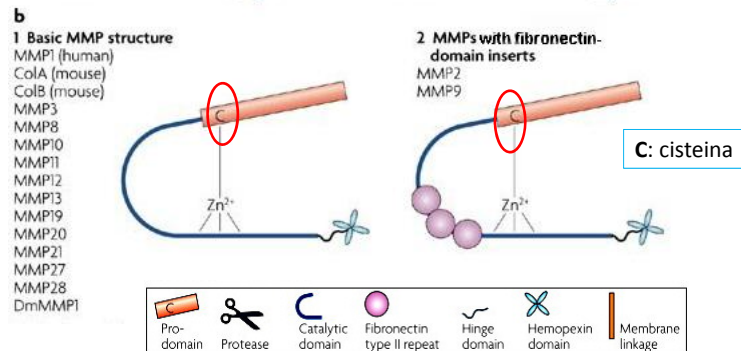


a | Le MMPs sono espresse come **pro-proteine**. Un residuo conservato di cisteina (**Cys**) nel pro-dominio **coordina** l'ione **Zinco**, che altrimenti sarebbe usato per la catalisi. **Il pro-dominio viene rimosso** da una combinazione fra scissione nel dominio e scissione fra il pro-dominio e il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

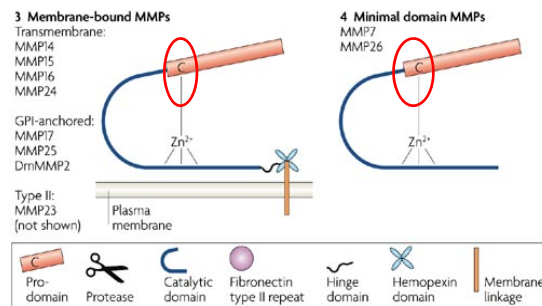
Struttura schematica delle MMPs – [2]



- 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.

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 – [3]



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

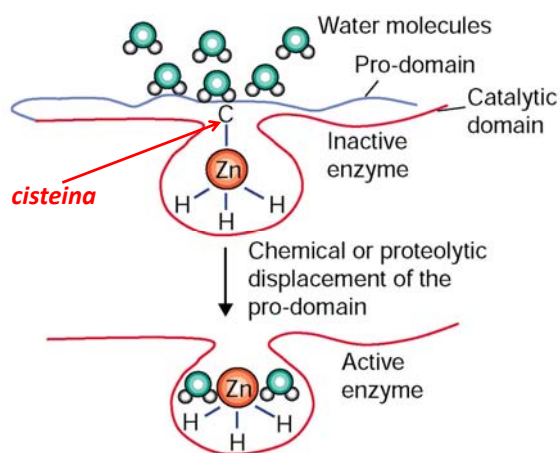
Il pro-peptide

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

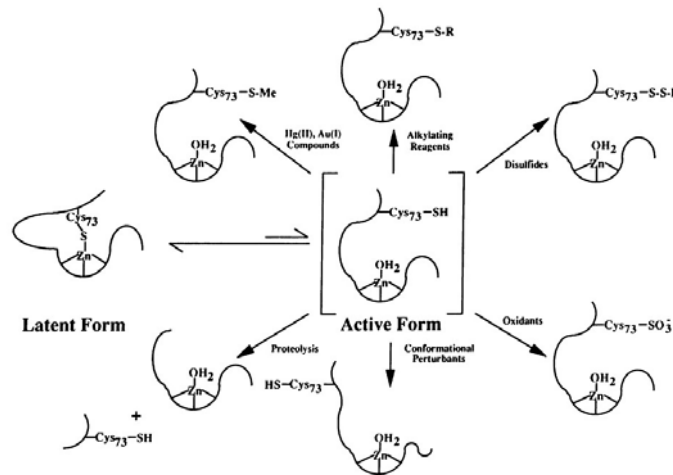


Il **gruppo tiolico** di una **cisteina** conservata (C) nel terminale carbossilico del pro-dominio funge da **4° ligando inattivatore per l'atomo di Zinco catalitico del sito attivo**; ciò provoca **l'esclusione di acqua e mantiene l'enzima latente.**

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>

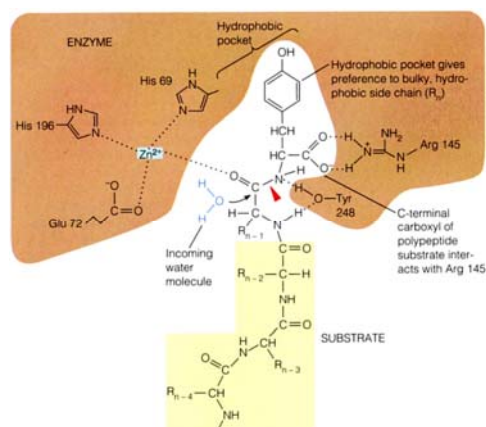
Modello che descrive le basi biochimiche per le molteplici modalità di attivazione della "Human Fibroblast Collagenase, HFC" latente



Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jan;87(1):364-8.

Il dominio catalitico - [1]

- Studi con cristallografia a raggi X hanno rivelato che questo dominio è uno sferoide di $35 \times 30 \times 30 \text{ \AA}$ ($3.5 \times 3 \times 3 \text{ nm}$).
- Il sito attivo è una fessura di 20 \AA (2 nm) che scorre lungo il dominio catalitico.
- Nella parte del dominio catalitico che forma il sito attivo vi è un **ione Zn^{2+}** 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.



Il dominio catalitico – [2]

- ✚ 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 (H) 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

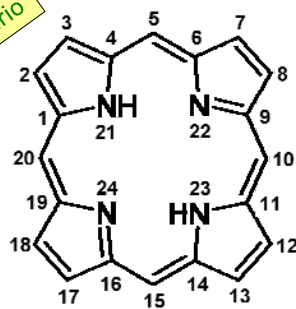
- Il dominio emopexina ha una struttura ad elica con 4 pale di tipo β che mediano le interazioni proteina-proteina.
- Questo dominio contribuisce inoltre:
 - al corretto riconoscimento del substrato
 - all'attivazione dell'enzima
 - alla localizzazione, internalizzazione e degradazione della proteasi.

Seminario

Emopexina

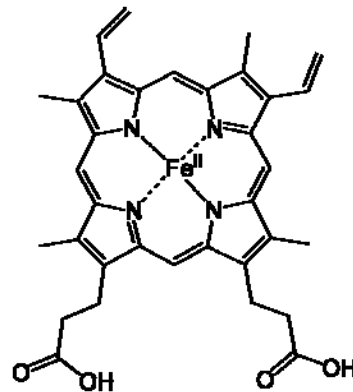
- ✚ Proteina serica che fa parte della frazione beta-globulinica e che ha come funzione il **legame con il gruppo eme e con le porfirine**.
- ✚ E' la proteina nota con maggiore affinità per l'eme.
- ✚ La sua funzione di "scavenger" (detossificante) per l'eme rilasciato o perso durante il turnover di eme-proteine come l'emoglobina protegge l'organismo dallo stress ossidativo che l'eme libero può provocare.
- ✚ Inoltre, l'emopexina rilascia il suo ligando per l'internalizzazione mediante interazione con un recettore specifico situato sulla superficie degli epatociti. Questa funzione serve per preservare il ferro nell'organismo.

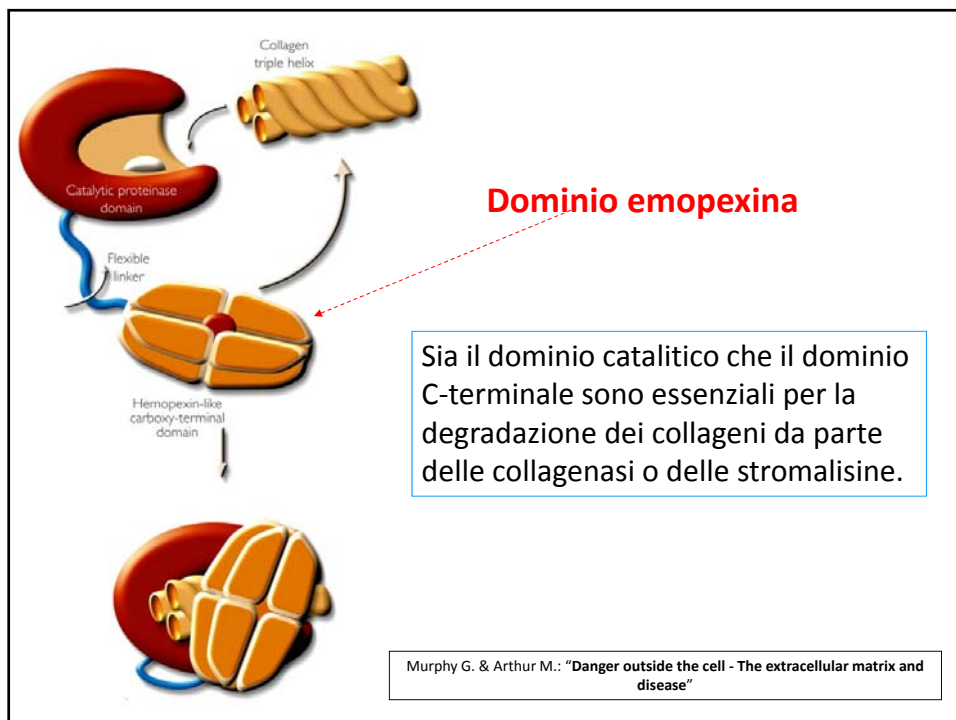
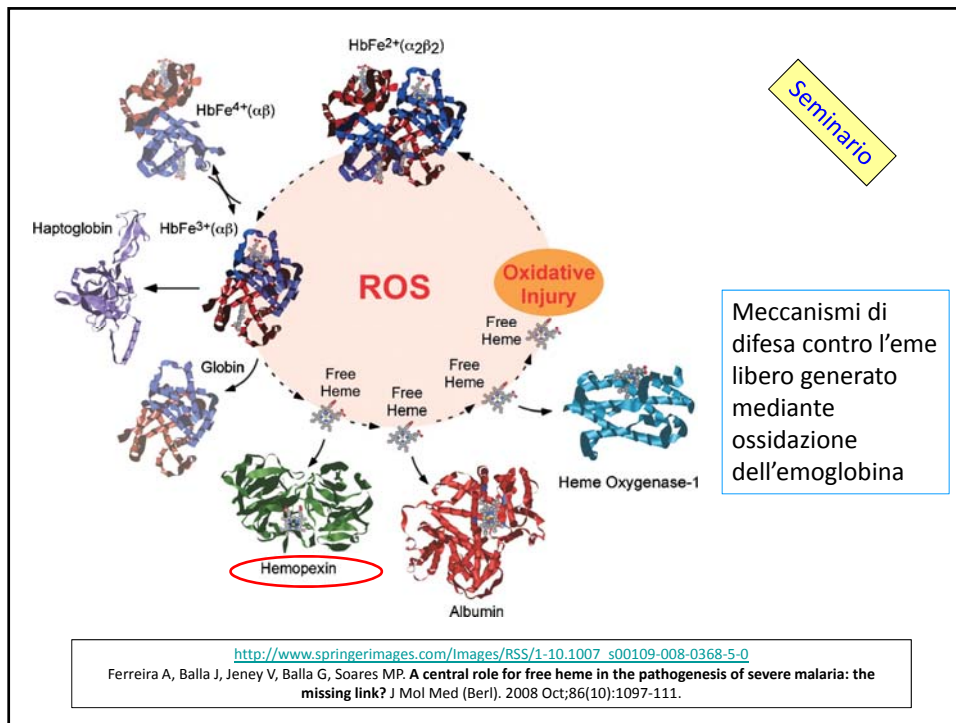
Seminario



Protoporfirina IX

Gruppo eme





MMPs

Minimal domain MMPs

Simple hemopexin-domain-containing MMPs

Gelatin-binding MMPs

Furin-activated secreted MMPs

Vitronectin-like insert MMPs

ATTENZIONE al **gruppo SH** segnalato nel **pro-dominio**: fa parte **dell'interruttore a cisteina**.

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

The domain structure of the matrix metalloproteinase family

Enzyme	Domain structure	Domain	Function
Matrilysin		Propeptide	Proteinase latency
Collagenase -1,-2,-3		N-terminal catalytic domain	Substrate hydrolysis, inhibitor binding
Metalloelastase Stromelysin		C-terminal domain (hemopexin-like repeats)	Substrate, inhibitors, extracellular matrix binding
Gelatinase -A,-B		Gelatin-binding domain (fibronectin-like repeats)	Substrate, matrix binding
MT-MMP -1,-2		Membrane domain	

Murphy: ECM, liver damage

Seminar

Classificazione bioinformatica delle MMPs

✚ Sei sottogruppi evolutivi:

- A. MMP-19, -26 e -28
- B. MMP-11, -21 e -23
- C. MMP-17 e -25
- D. MMP-1, -3, -8, -10, -12 e -27
- E. MMP-14, -15, -16, e -24
- F. 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	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 [†]
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.

Seminario

Classificazione funzionale delle MMPs: 1 - Collagenasi

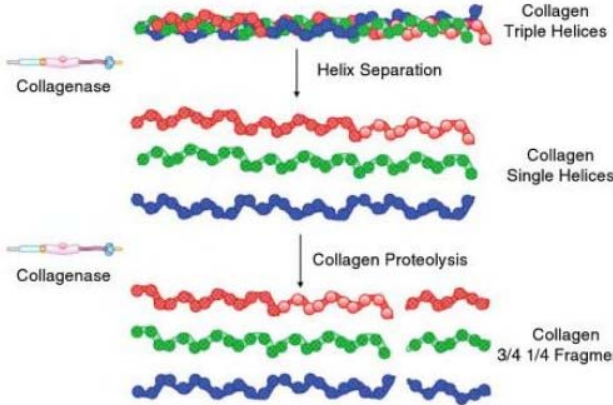
- ✚ Ci sono tre COLLAGENASI: collagenasi 1 (MMP-1), collagenasi 2 (nota anche come la collagenasi dei neutrofili, MMP-8) e collagenasi-3 (MMP-13).
- ✚ Contengono domini pro-peptide, catalitico ed emopexina.
- ✚ Giocano un importante ruolo nella **scissione dei collagene fibrillari** di tipo I, II e III, dando **frammenti distinti di $\frac{3}{4}$ e di $\frac{1}{4}$ di frammento**.
- ✚ Hanno inoltre attività contro altre molecole della MEC e proteine solubili.
- ✚ Di per sé 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.

Degradazione del collagene interstiziale mediante collagenasi.

- Monomero di collagene interstiziale di tipo I, II o III che mostra la posizione del legame tra glicina 775 e leucine/isoleucine 776 vhr viene scisso dalla MMP-1.
- Scissione del collagene mediante collagenasi di rana in frammenti di $\frac{3}{4}$ e $\frac{1}{4}$ di lunghezza, così come viene osservata mediante ricostituzione di questi frammenti in strutture che sono osservati con un microscopio elettronico.

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.



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&lpq=PA216&dq=procrptidins&source=bl&ots=deHNshx4E6&sig=A2t7wPniGG08j9IBXAbmwr1w&hl=en&sa=X&ei=4KVWU9fxB0rU0QX85oHgBQ&ved=0CC0Q6AEwAQ#v=onepage&q=procrptidins&f=false

Seminario

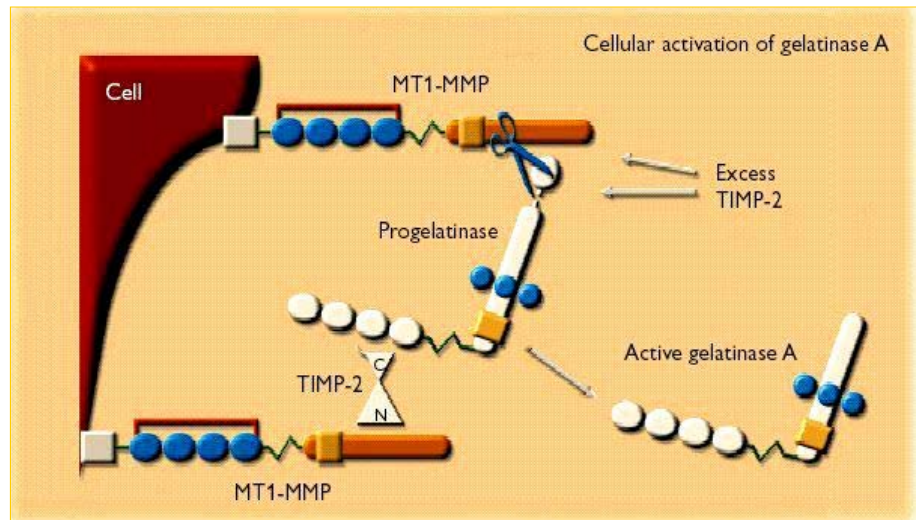
Classificazione funzionale delle MMPs: 2 – Gelatinasi – [a]

- ✚ 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'aggregato**.
- ✚ 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 pro-MMP-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 (MMP-2) sulla superficie cellulare

(vedi didascalia)



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

Seminario

Classificazione funzionale delle MMPs: 2 - Gelatinasi – [b]

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

Seminario

Classificazione funzionale delle MMPs: 3 - Stromalisine

- ✚ La MMP-3, MMP-10 e MMP-11 sono chiamate rispettivamente stromalisine 1, 2 e 3.
- ✚ Hanno la stessa disposizione di domini delle collagenasi, ma non sono in grado di scindere i collageni interstiziali.
- ✚ La MMP-3 e MMP-10 hanno struttura e specificità di substrati simili, la MMP-11 (stromalisina-3) è solo correlata distantemente.
- ✚ La MMP-3 e MMP-10 **digeriscono un gran numero di molecole della MEC** e partecipano all'attivazione delle pro-MMPs, ma la MMP-11 ha un'attività contro le molecole della MEC molto bassa.
- ✚ Un'altra differenza è che sia la MMP-3 che **la MMP-10 sono secrete dalle cellule in forma inattiva**, mentre **la MMP-11 è attivata intracellularmente dalla furina e secreta dalla cellula già come enzima attivo**.
- ✚ Gene MMP-11: cromosoma 22; MMP-3 e MMP-11 mappano nel cromosoma 11 (insieme a MMP-1, -7, -8, -12, -20, -26 e -27)

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

Seminario

Classificazione funzionale delle MMPs: 4 - Matrilisine

- ✚ Appartengono a questa categoria la MMP-7 e MMP-26.
- ✚ La loro caratteristica strutturale è che **mancano di dominio emopexina**.
- ✚ La MMP-7 è sintetizzata dalle cellule epiteliali e secreta dal dominio apicale.
- ✚ Nell'intestino funziona intracellularmente per processare procriptidine [precursori di battericidi prodotti dalle cellule di Paneth del topo] dando la forma battericida.
- ✚ La MMP-7 degrada componenti della MEC, ma è anche in grado di **degradare molecole della superficie cellulare** quali il **Fas-ligand**, **pro-TNF- α** , **sindecano-1**, e **E-caderina**, generando forme solubili, fungendo così come una «shedde» (enzima che porta all'esfoliazione di molecole).
- ✚ La MMP-26 è espressa da cellule normali come quelle dell'endometrio e in alcuni carcinomi e digerisce diverse molecole della MEC.

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

Seminario

Classificazione funzionale delle MMPs: 5 - MMPs legate alle membrane (MT-MMPs)

- ✚ Vi sono due tipi di MT-MMPs che includono quattro proteine transmembrana di tipo I (MMP-14, -15, -16 e -24) e due proteine ancorate da ancore di glicosilfosfatidilinositolo (GPI).
- ✚ Hanno una sequenza di riconoscimento RX[R/K]R pro-proteina convertasi tipo furina nel C-terminale del pro-peptide. Perciò sono **attivate intracellularmente** ed è probabile che gli enzimi attivi siano già espressi sulla superficie cellulare.
- ✚ Tutte le MT-MMPs, tranne MT4-MMP (MMP-17) possono attivare la pro-MMP-2.
- ✚ La MT1-MMP (MMP-14) può attivare la pro-MMP-13 sulla superficie cellulare.
- ✚ Tuttavia, la MT1-MMP stessa ha attività collagenolitica contro i collagene di tipo I, II e III.

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

Seminario

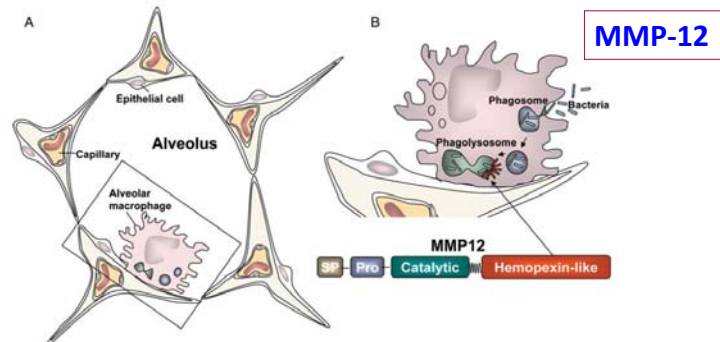
Classificazione funzionale delle MMPs:

6 - Altre MMPs - a

- Ci sono sette matrixine non catalogate nei sotto-gruppi precedenti. Fra di esse le MMP-12, MMP-20 e MMP-27 hanno un'organizzazione a domini e localizzazione cromosomiale simili a quelle delle stromalisine. Si pensa che sia appropriato includerle tra le stromalisine.
- La **metalloelastasi** (MMP-12) è stata all'origine **identificata nei macrofagi**, ma si trova anche nei condrociti ipertrofici e negli osteoclasti. **Degrada l'elastina e diverse altre molecole della MEC ed è essenziale per la migrazione dei macrofagi.**
- La MMP-19 è un potente **enzima in grado di degradare la membrana basale**, ma digerisce anche altre molecole della MEC. E' ampiamente espresso nei tessuti umani e si pensa giochi un ruolo nel **rimodellamento tissutale, guarigione delle ferite e migrazione** di cellule epiteliali, mediante **scissione della catena $\gamma 2$ della laminina 5.**

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

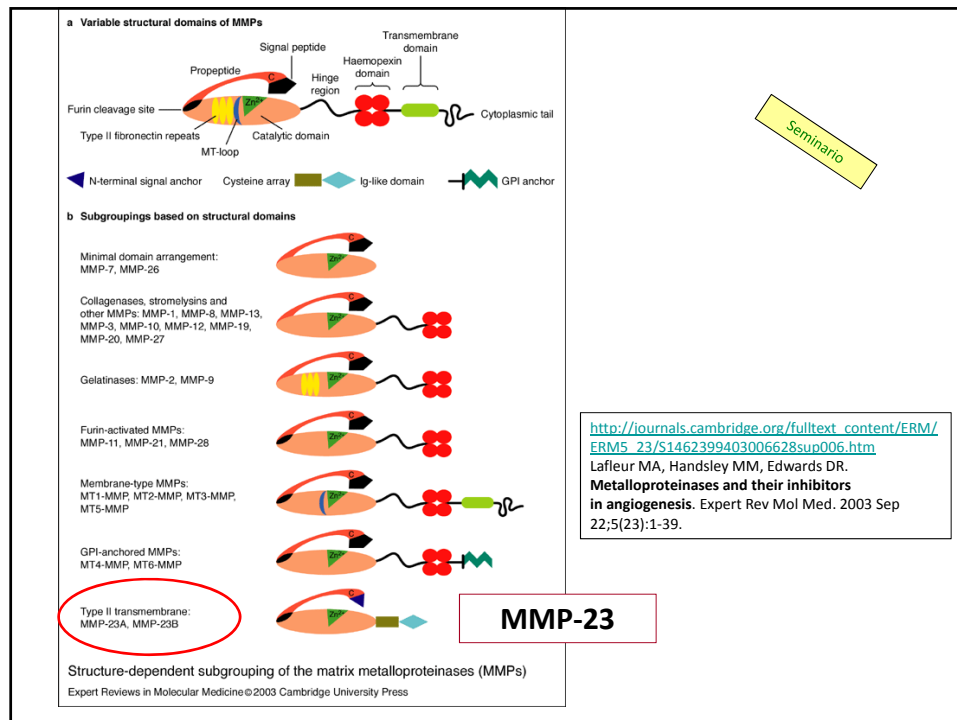
Seminario



Durante l'infezione la metalloelastasi MMP12 è abbondantemente espressa dai **macrofagi alveolari**, un sotto-insieme di macrofagi tissutali che serve da prima linea di protezione contro i patogeni inalati.

- I macrofagi alveolari risiedono nell'interfaccia aria-tessuto dell'alveolo.
- Dopo l'incontro con batteri nell'alveolo, i macrofagi fagocitano efficacemente il patogeno. E' stato proposto che la **MMP-12 sia reclutata al fagolisosoma per distruggere i batteri.** E' illustrata la struttura a domini minimale della MMP12. SP: peptide segnale. Pro: pro-dominio.

<http://imcb.oxfordjournals.org/content/early/2009/08/13/imcb.mjp015/F1.expansion>
He JQ, van Lookeren Campagne M. Macrophage metalloelastase: stretching therapeutic opportunities. J Mol Cell Biol. 2009 Dec;1(2):55-7.



Seminario

Classificazione funzionale delle MMPs:

6 - Altre MMPs - c

- La **MMP-27** è stata clonata per la prima volta in **fibroblasti di embrione** di pollo. Nel pollo digerisce la gelatina e la caseina e provoca l'autolisi dell'enzima, ma si sa poco sulla sua attività nei mammiferi. E' espressa nei **linfociti B** e i suoi livelli aumentano quando trattati con anticorpi anti-(IgC/IgM) in coltura.
- L'epilisina (**MMP-28**) è stata clonata per prima nei cheratinociti e testicolo umani ed è espressa da molti tessuti quali il polmone, placenta, cuore, tratto gastroenterico e testicolo. E' espressa dai cheratinociti basali della pelle e si pensa funzioni nel riparo delle ferite. E' inoltre elevata nella cartilagine di pazienti con osteoartrite e artrite reumatoide. La **sovraespressione di MMP-28** ricombinante in cellule di adenocarcinoma del polmone **induce la transizione epitelio-mesenchimale** irreversibile, accompagnata da perdita di E-caderina dalla superficie cellulare, processamento del complesso latente di TGF- β con aumentati livelli di TGF- β insieme a sovra-regolazione di MT1-MMP, MMP-9 e attività invasiva del collagene.

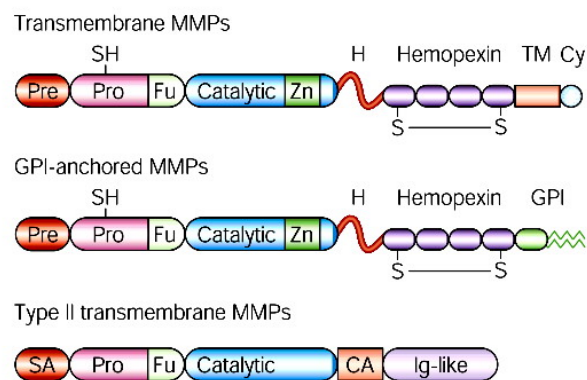
Murphy G, Nagase H. **Progress in matrix metalloproteinase research.** Mol Aspects Med. 2008 Oct;29(5):290-308.

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]



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

Localizzazioni delle MT-MMPs

(a) La **localizzazione delle MT-MMPs** conferisce ad esse ruoli biologici di fondamentale importanza sulla superficie cellulare: scindono componenti della ECM, oltre a MMPs e a recettori per fattori di crescita (il che comporta **l'esfoliazione dei recettori dalla cellula**, "shedding");

(b) Mobilizzazione delle MT-MMPs nel fronte di avanzamento delle cellule tumorali, dove esse rimodellano la ECM, facilitando la migrazione cellulare e l'invasione tumorale.

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

Substrati delle MMPs – [2]

- ✚ Oltre a frammentare le componenti strutturali della ECM le **MMPs** e le proteinasi correlate, le **ADAMs**, partecipano al **rilascio a partire 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.

Seminario

Transforming growth factors- TGFs

- ✚ Descrive due classi di fattori di crescita polipeptidici: **TGF α** e **TGF β** .
- ✚ Il nome "Transforming Growth Factor" è alquanto arbitrario, poichè le due classi di **TGFs non sono strutturalmente o geneticamente correlate una all'altra**, e agiscono mediante meccanismi recettoriali differenti. Inoltre, **non sempre inducono la trasformazione cellulare**, e **non sono gli unici fattori di crescita che inducono trasformazione cellulare**.
- ✚ **Tipi**
 - Il **TGF α** è sovraregolato in alcuni tumori umani. E' prodotto dai macrofagi, cellule del cervello e dai cheratinociti e induce lo sviluppo dell'epitelio.
 - Il **TGF β** esiste in tre noti sottotipi nell'uomo, TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3. Questi sono sovraregolati nella sindrome di Marfan e in alcuni tumori umani, e giocano ruoli cruciali nella rigenerazione tissutale, differenziamento cellulare e sviluppo embrionale. Si presume che delle isoforme del "transforming growth factor-beta" (TGF- β 1) siano coinvolte nella patogenesi della pre-eclampsia. I recettori per il TGF β sono serina/treonina chinasi a singolo passo.

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

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 c-met per l'Hepatocyte Growth Factor (HGF), sono substrati per MMPs o ADAMS ancora non identificati.
 - In tutti i casi **vengono rilasciati i domini extracellulari dei recettori**, che 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, monomeric, **altamente glicosilata** la cui funzione è quella di legare **l'acido ialuronico** ed altre glicoproteine della MEC. 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 a 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 – [2]

- ✚ L'attività delle MMPs è altamente controllata da **inibitori endogeni**.
 - Il principale inibitore delle MMPs nei liquidi corporei è la **α 2-Macroglobulina**, un'abbondante proteina plasmatica, sintetizzata dal fegato.
 - 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.

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 – [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 **K**azal motifs").

Seminario

SERINA PROTEASI INTRACELLULARI DI TIPO FURINA

Famiglia di proteinasi intracellulari, che include la furina, localizzate nella rete trans del Golgi dove svolgono un ruolo importante nel processamento intracellulare delle proteine di secrezione.

"SCAVENGER RECEPTORS" (recettori di smaltimento)

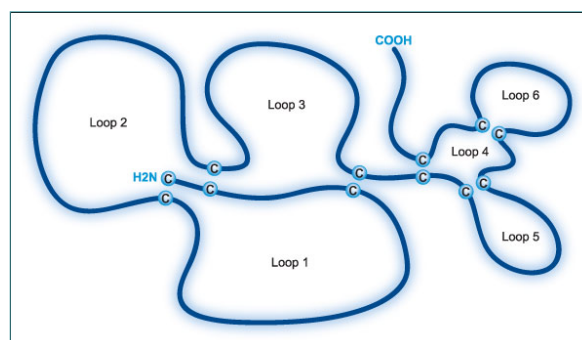
Un'ampia classe di recettori che "scavenge" (smaltisce) i detriti cellulari: i ligandi sono endocitati e in seguito degradati. I recettori "scavenger" hanno anche altre attività quali l'adesione

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.
- ✚ Tuttavia, e in contrasto 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 sulla superficie cellulare.

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

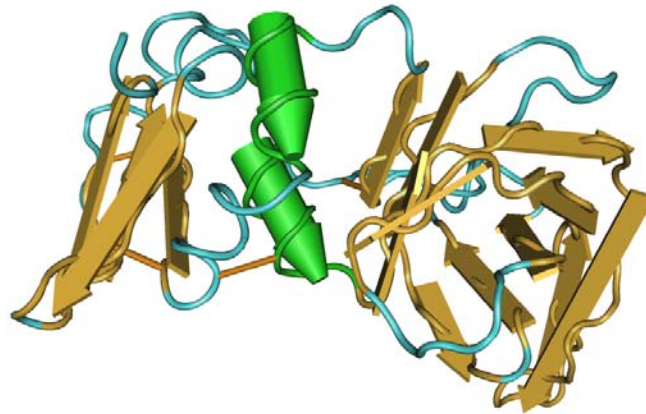
INIBITORI TISSUTALI DELLE METALLOPROTEINASI (TIMPs) – [2]



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

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

Human Tissue Inhibitor of Metalloproteinase – 2 (TIMP-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 del «Tumor necrosis factor α (TNF α)-converting enzyme» (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 «**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor», (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. 2008 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 XVIII 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 della 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 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 - 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 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 – [4]

✚ Sopravvivenza cellulare:

- Fattore di sopravvivenza neuronale: "stromal-cell derived factor-1; SDF1", anche noto come CXCL12; demenza 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 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 – [5]

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

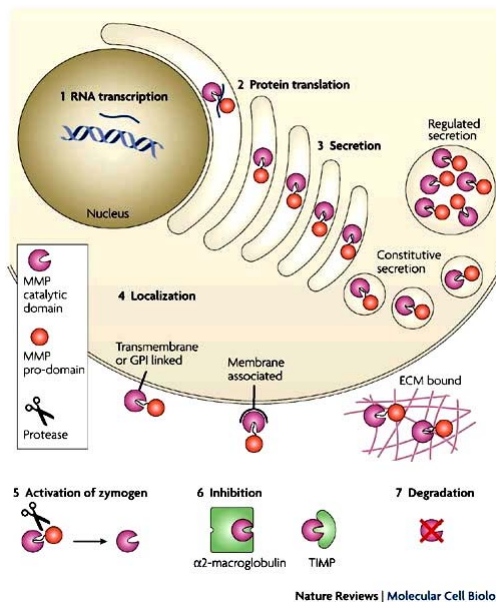
- “Vascular endothelial growth factor; VEGF”: alterazione del raggio di diffusione mediante modulazione del legame con l’eparina.
- TNF α legato alla membrana verso TNF α solubile.

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

MMPs e regolazione della proteolisi extracellulare



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

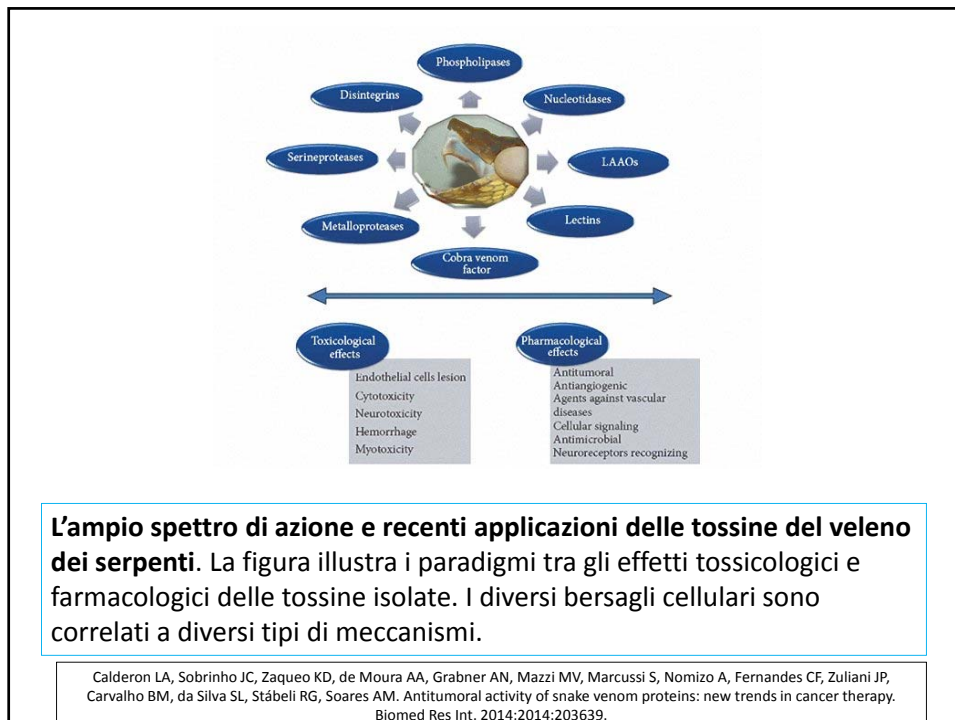
Didascalia figura page-Mccaw

- ✚ E' più facile valutare la presenza o assenza dei RNA trascritti delle metalloproteinasi della matrice (MMP) che l'abbondanza della proteina o i livelli di attività enzimatica.
- ✚ Tuttavia, la **funzione** delle MMPs può essere **regolata** a diversi livelli. Oltre alla (1) **trascrizione del RNA** e (2) la **sintesi proteica**, la funzione delle MMP può essere regolata ai livelli della (3) **secrezione** e traffico intracellulare, (4) **localizzazione subcellulare o extracellulare**, (5) **attivazione della forma zimogeno**, (6) espressione dei loro **inibitori** endogeni, quali i "tissue inhibitors of metalloproteinases" (TIMPs) e α 2-macroglobulina, e (7) **degradazione** mediante proteasi. Inoltre, la **disponibilità e l'accessibilità dei substrati** determinano il grado di attività delle MMPs.
- ✚ Questa complessità regolatoria ha reso estremamente difficile ricavare i dettagli spaziali e temporali dell'attività MMP a partire dai di espressione dell'RNA.

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

De-adesione



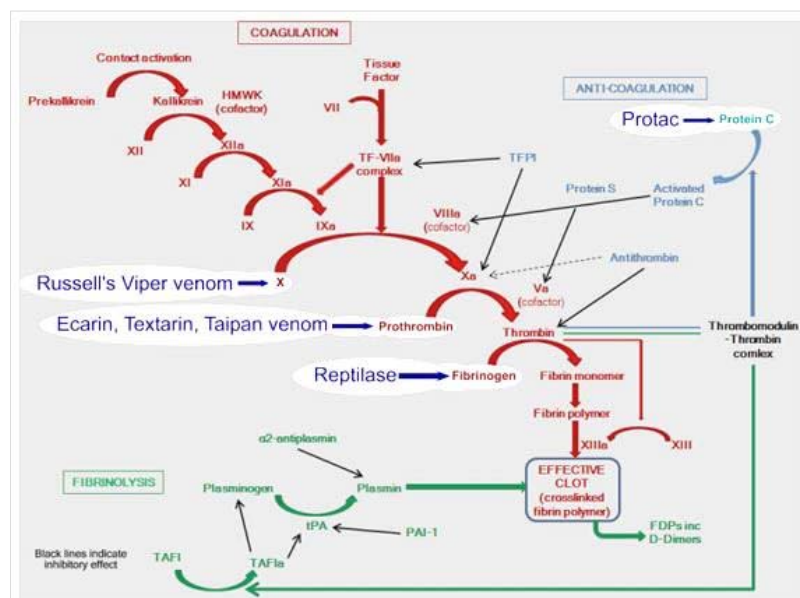


Fattori de-adesivi promuovono la migrazione cellulare e possono rimodellare la superficie cellulare – [1]

- ✚ 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**.



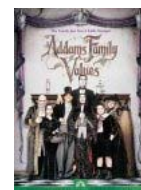
http://www.practical-haemostasis.com/Miscellaneous/Useful%20Information/snake_venoms_haemostasis.html

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

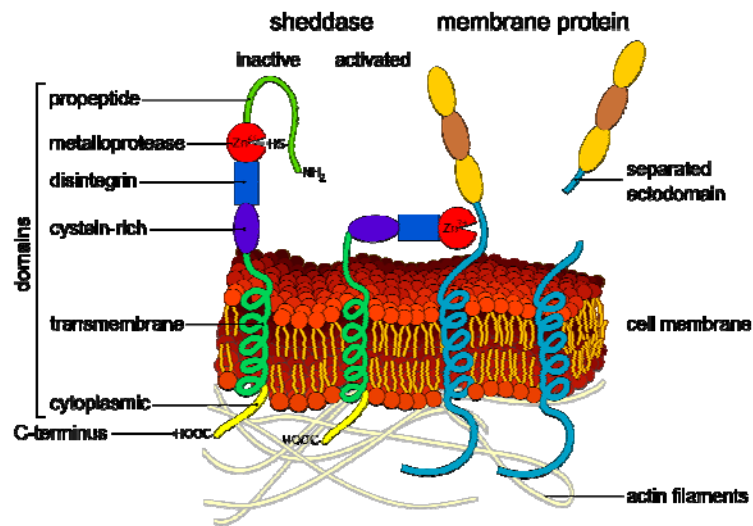
- ✚ Al contrario delle disintegrine dei veleni dei serpenti, una seconda classe di fattori de-adesivi contengono **due tipi di metalloproteinasi**:
 - Metalloproteinasi **specifiche per il fibrinogeno**
 - Metalloproteinasi **specifiche per la matrice (MMPs)**
- ✚ Queste proteinasi degradano i componenti 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_metalloprotease

ADAMs – [1]

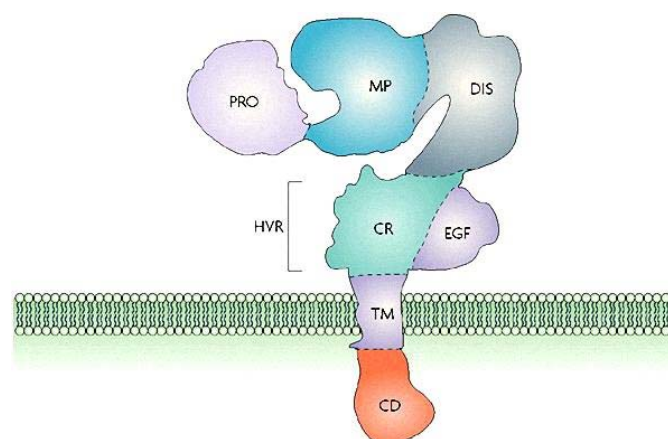
- ✚ La famiglia di glicoproteine **ADAMs**, ancorata alla membrana da una singola sequenza transmembrana, contiene un dominio “**A Disintegrin And a Metalloprotease**” e partecipa ad un gran numero di processi che dipendono dal rimodellamento della superficie cellulare:
 - Determinazione del destino 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** dalla superficie cellulare **proteine solubili attive**, come le citochine.

ADAMs – [2]

- ✚ 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 informative**: es. Tumor Necrosis Factor- α , Transforming Growth Factor- α .
- ✚ 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 l'attività catalitica durante il traffico intracellulare.
- ✚ Nonostante la scissione del propeptide abbia luogo nel Golgi mediante enzimi tipo-furina 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]

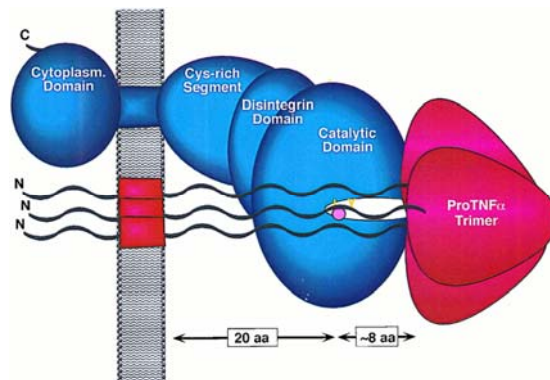
- ✚ Coinvolte nella fusione dei mioblasti durante la miogenesi
- ✚ **Rilascio di Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) in forma solubile.**
 - La forma legata del TNF- α viene rilasciata dalla superficie cellulare mediante un enzima di conversione ancorato alla superficie che contiene un dominio metalloproteinasi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



Modello schematico dell’ipotetico complesso pro-TNF α – TACE . Il TACE completo attivato consiste in un dominio catalitico, un dominio tipo disintegrina, una porzione ricca in Cisteine, un segmento transmembrana e un dominio intracellulare. Il pro-TNF α trimerico consiste in segmenti intracellulari, segmenti transmembrana, 26–28 residui spaziatori che formano un peduncolo e il cono compatto trimerico TNF α . TACE e pro-TNF α potrebbero essere ancorati alla membrana in un modo tale che il cono TNF α sia legato al lato “destro” del dominio catalitico, con il legame scindibile Ala-76 \rightarrow Val-77 di un filamento esteso pro-TNF α collocato sopra il sito attivo.

Maskos et al.,: Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor- α -converting enzyme [TACE] PNAS 95: 3408-3412, 1998

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.

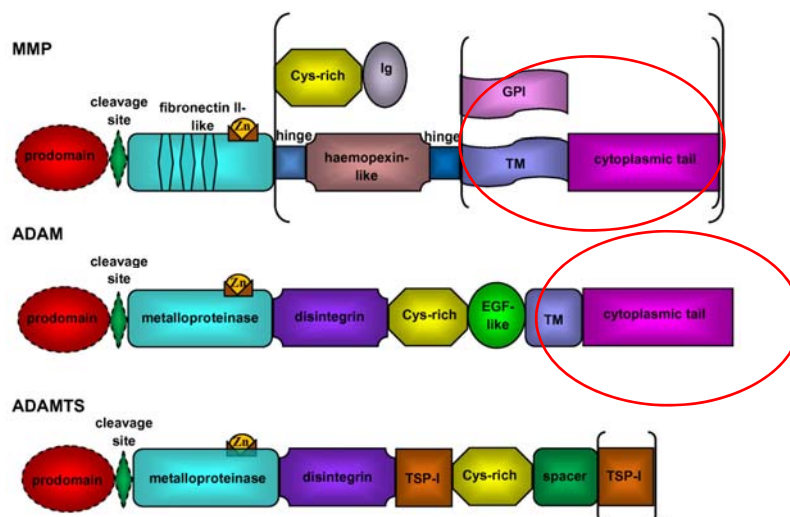
Pollard & Earnshaw: [Cell Biology](#), Saunders, 2008

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'aggregato, il versicano, il brevican 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).

Organizzazione strutturale di MMPs, ADAMs e ADAMTs



<http://respiratory-research.com/content/10/1/127/figure/F1?highres=y>
Paulissen G, Rocks N, Gueders MM, Crahay C, Quesada-Calvo F, Bekaert S, Hacha J, El Hour M, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. *Role of ADAM and ADAMTs metalloproteinases in airway diseases*. Respir Res. 2009 Dec 24;10:127.