www.medicalsystems.it

ISSN 0394 3291

Caleidoscopio
Italiano

Angelina Di Carlo, Angela Mariano,
Vincenzo Macchia

Struttura e Funzioni delle Matrix Metallo-Proteinasi (MMPs)

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

224

... il futuro ha il cuore antico

MEDICAL SYSTEMS SpA

Tariffa R.O.C.: "Poste Italiane S.p.a. - Sped. in A.P. - D.L. 353/2003, (conv. in L. 27/02/2004 n. 46) art. 1 comma 1, DCB Genova" - n° 224- Settembre 2009 - Dir. resp.: Sergio Rassu - Editore: Medical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: Nuova ATA - Genova

Società verificata e risultata
conforme alla Norma UNI EN ISO 9001:2000

Il Sistema di Gestione per la Qualità è applicato alla:
Progettazione ed erogazione di corsi
di formazione in campo sanitario.
Settore EA: 37

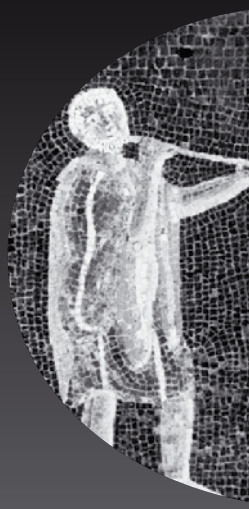
Restless Architect of Human Possibilities s.a.s. (R.A.H.P. sas)

..... dalla Pedagogia all'Andragogia

Educazione Continua in Medicina

Restless Architect of Human Possibilities s.a.s. (R.A.H.P.) Sede Legale Via Pietro Nenni, 6 – 07100 Sassari
Segreteria: Via Leonardo Alagon, 9 - 07100 Sassari; Tel/Fax 079 5907759;
Aula formazione: Viale Caprera1/C Sassari; e-mail: rahp80@yahoo.it http://rahp80.googlepages.com/
Sede Regione Lombardia: Via Mauro Macchi, 73 - 20124 Milano - Tel e Fax: 02 45486464
P. IVA 01991360908 - C.F. 01991360908

Caleidoscopio
Italiano



Angelina Di Carlo[1], Angela Mariano,
Vincenzo Macchia

[1]Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Roma "La Sapienza"
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano", Università di Napoli "Federico II"

Struttura e Funzioni delle Matrix Metallo-Proteinasi (MMPs)

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

224

... il futuro ha il cuore antico
MEDICAL SYSTEMS SpA

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

INFORMAZIONI GENERALI. Caleidoscopio pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'International Committee of Medical Journal Editors. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

TESTO. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte ovvero 100-130.000 caratteri (spazi inclusi). Si invita a dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. J. Nucl. Med. Allied. Sci 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi.

TABELLE E FIGURE. Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse. Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

UNITÀ DI MISURA. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. Riporre il dattiloscritto, le fotografie, una copia del testo in formato .doc oppure .rtf, ed copia di grafici e figure in formato Tiff con una risoluzione di almeno 240 dpi, archiviati su CD in buste separate.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista Caleidoscopio rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41).

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al seguente indirizzo:

Restless Architect of Human Possibilities sas
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Editoriale

Le metalloproteinasi della matrice (MMPs) sono chiamate matrixine e sono una famiglia di enzimi coinvolti nel turnover della matrice extracellulare. Questi enzimi sono normalmente presenti negli individui sani ed hanno un ruolo importante in molti processi fisiologici come lo sviluppo dell'embrione, la morfogenesi, l'angiogenesi, la guarigione delle ferite ed il rimodellamento tissutale. Questi stessi enzimi sono però importanti anche in numerosi processi patologici come l'insorgenza del cancro, la sua diffusione e le metastasi (tanto che per oltre trenta anni le MMPs sono state considerate un promettente bersaglio per la terapia, l'aterosclerosi, il glaucoma, la cardiopatia ischemica, l'insufficienza cardiaca e l'artrite reumatoide.

L'argomento di questa monografia è quindi uno di quelli che, trasversali a molte competenze e settori, richiede una cultura particolare che gli Autori di questa monografia esprimono in maniera compiuta. La presentazione degli Autori, e del Prof. Macchia in particolare cui mi lega un rapporto di stima che dura oltre venti anni, è quindi un momento di piacere.

Il Prof. Vincenzo Macchia, dopo aver conseguito la laurea in Medicina e Chirurgia presso l'Università degli Studi di Napoli, è stato chiamato a ricoprire il ruolo di assistente ordinario e successivamente di Aiuto presso la Cattedra di Patologia generale della stessa Facoltà. E' stato professore incaricato dell'insegnamento di Patologia generale presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Napoli "Federico II" e quindi professore Ordinario di Patologia generale e successivamente di Patologia clinica presso la stessa Facoltà. E' stato Direttore della Scuola di Specializzazione di Patologia clinica. Attualmente il Prof. Vincenzo Macchia è Direttore del Dipartimento Assistenziale di Patologia clinica dell'Università "Federico II" ed è Presidente del Collegio dei Patologi clinici. Nel corso della sua lunga carriera universitaria il Prof. Macchia ha mostrato un costante impegno, una straordinaria passione per la ricerca ed un elevato rigore scientifico affiancato all'attività clinica come testimoniano le oltre 300 pubblicazioni nel campo della fisiopatologia e della diagnostica endocrinologica ed oncologica apparse in riviste nazionali ed internazionali altamente qualificate.

La Prof.ssa Angela Mariano, dopo aver conseguito la Laurea in Scienze Biologiche presso l'Università degli Studi di Napoli, ha iniziato a frequentare la cattedra di Patologia generale e successivamente è stata chiamata dapprima a ricoprire il ruolo di Professore associato di Patologia clinica presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" e quindi il ruolo di Professore ordinario di Patologia clinica presso la stessa Facoltà. La Prof.ssa Angela Mariano è incaricata dell'insegnamento di Patologia clinica oltre che nel corso di Laurea in Medicina e Chirurgia anche nel Corso di Laurea in Tecnici di laboratorio e in varie Scuole di Specializzazione. La Prof.ssa Mariano è Direttore della Scuola di Specializzazione in Patologia clinica presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" e primario dell'Area funzionale di Diagnostica oncologica presso il Dipartimento assistenziale di Patologia clinica della stessa Università. La Prof.ssa Mariano ha svolto attività di ricerca nel campo della diagnostica endocrinologica ed oncologica testimoniata da oltre 200 pubblicazioni apparse su riviste nazionali ed internazionali altamente qualificate.

La Prof.ssa Angelina Di Carlo, dopo essersi laureata in Scienze Biologiche ed aver conseguito le specializzazioni in Microbiologia ed in Patologia generale, ha iniziato a svolgere attività di ricerca presso la Cattedra di Patologia generale della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II". Nell'anno 1998, dopo Concorso Nazionale, è stata chiamata a ricoprire il ruolo di Professore Associato di Patologia clinica presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Pisa dove ha ricoperto anche il ruolo di Vice-Direttore della Scuola di Specializzazione in Patologia clinica. Attualmente è Professore ordinario di Patologia clinica presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza" ed è Presidente del Corso di Laurea in Infermieristica "W" presso la stessa Facoltà. Inoltre la Prof.ssa Di Carlo è stata responsabile dell'Unità Operativa Complessa (U.O.C.) Universitaria di Patologia clinica presso l'ospedale "A. Fiorini", Terracina (LT). Il campo di ricerca della Prof. ssa Di Carlo ha riguardato importanti tematiche nel campo della fisiopatologia e diagnostica endocrinologica e nel campo della oncologia sperimentale testimoniata da oltre 150 pubblicazioni apparse su riviste nazionali ed internazionali altamente qualificate.

Sergio Rassu

Introduzione

I tessuti animali sono formati dalle cellule e dalla matrice extra-cellulare (MEC) in cui si trovano, in varie proporzioni, proteine, polisaccaridi e componenti fibrotici. Tali componenti sono organizzati in rete e sono responsabili delle diversità morfologiche e fisio-patologiche dei tessuti. Inoltre, forniscono l'appropriato substrato per la crescita e la differenziazione cellulare (1). La matrice extra-cellulare mantiene l'adesione fra le cellule ed attraverso i recettori di adesione sulla superficie cellulare trasmette i segnali. Nella MEC distinguiamo la matrice interstiziale e la membrana basale. La matrice interstiziale occupa tutto lo spazio tra le cellule mesenchimali e la membrana basale. La membrana basale separa le cellule epiteliali dallo stroma sottostante, è costituita da matrice extra-cellulare organizzata in forma laminare e rappresenta la prima barriera contro l'invasione tumorale (2). L'interazione fra complesso proteico-fibroso, proteine solubili e recettori di membrana influenza la migrazione, la proliferazione, lo stadio di differenziazione e l'apoptosi delle cellule (1).

La MEC è costituita da collageni, glicoproteine non collagenose e proteoglicani. I collageni rappresentano una caratteristica famiglia di molecole (>20 tipi) geneticamente distinti con una tipica configurazione a tripla elica costituita da tre sub-unità α; sono presenti in tutti gli animali pluricellulari e sono i più abbondanti componenti della matrice-extra-cellulare. Tra questi i cosidetti collageni fibrillari (tipo I, II, III, V e XI) formano le fibrille ed influenzano le funzioni cellulari attraverso le interazioni con le integrine (proteine leganti l'esterno della cellula con l'interno). Il collageno tipo IV è il principale componente della membrana basale. Le glicoproteine non collagenose sono costituite principalmente da laminine e fibronectine. Le laminine sono eterodimeri glicoproteici costituite da catene α, β e γ. Sono localizzate principalmente nella membrana basale formando un reticolo con il collageno tipo IV. Influenzano le funzioni cellulari legandosi ai recettori di superficie (integrine e non integrine). Le fibronectine sono dimeri glicoproteici presenti sia nella MEC che nel sangue, formano fibrille ed influenzano morfologia, adesione, migrazione e differenziazione cellulare legandosi alle integrine. I proteoglicani sono mucopolissacaridi legati covalentemente a molecole proteiche (3).

La degradazione controllata della matrice extra-cellulare è una importante caratteristica in diversi processi biologici come embriogenesi, riparazione e rimodellamento tissutale. In condizioni fisiologiche tale processo è finemente regolato. Le alterazioni nella degradazione della MEC sono fra le cause di molte malattie come artrite, nefriti, cancro, encefalomielite, ulcere croniche, fibrosi ecc. Il rimodellamento incontrollato della MEC del miocardio e dei

vasi sanguigni è concausa di disordini cardiovascolari come aterosclerosi, stenosi, ipertrofia ventricolare sinistra, collasso cardiaco ed aneurisma (4). D'altro canto la degradazione controllata della MEC è una tappa fondamentale della crescita, invasione e metastasi dei tumori maligni (5). Nel processo di degradazione della MEC sono coinvolti vari enzimi proteolitici. Infatti il sistema proteolitico operante nei tessuti umani è estremamente complesso e nel genoma umano sono presenti più di 500 geni codificanti per proteasi o proteine proteasi-like. Fra tutti gli enzimi proteolitici, i componenti della famiglia delle matrix metallo-proteinasi (MMPs) o matrixine sono di vitale importanza grazie alla loro abilità di tagliare virtualmente tutti i componenti della MEC e della membrana basale. Attualmente è stato inequivocabilmente dimostrato che le MMPs sono direttamente coinvolte in una grande varietà di malattie ed in numerose condizioni fisiopatologiche in cui vi è aberrante rimodellamento dei tessuti. Le evidenze sperimentali suggeriscono che i singoli componenti della famiglia delle MMPs svolgono un ruolo preciso e ben definito nella proteolisi fisiopatologia della MEC e conseguente rimodellamento tissutale ma non necessariamente primario. Inoltre le MMPs sono in grado di modulare l'attività dei fattori di crescita, delle citochine e dei loro recettori. Nelle neoplasie l'elevata espressione delle MMPs è frequentemente associata all'invasione delle cellule maligne, alla formazione di metastasi ed alla neovascolarizzazione del tumore. La famiglia delle MMPs è un complesso di proteasi esclusivo, multifunzionale in grado di promuovere la mobilità cellulare, di usurpare il controllo tumorale ed agisce sotto il rigido controllo di meccanismi regolatori multidimensionali.

Key words: matrix metalloproteinasi, zimografia, tumori umani

La famiglia delle Matrix Metallo-Proteinasi (MMPs)

Le proteinasi della matrice extracellulare (MMPs) sono una famiglia di endopeptidasi zinco-dipendenti secrete o legate alla membrana cellulare, funzionano a pH neutro e per la loro attività richiedono ioni Ca^{++}. Sono sintetizzate sotto forma di pre-pro-peptide e richiedono l'attivazione proteolitica che può essere extra-cellulare o intra-cellulare. L'attivazione proteolitica determina il rilascio del pro-peptide N-terminale ed espone il sito attivo dell'enzima creando la forma enzimatica con piena attività funzionale. La conversione alla forma attiva necessita dell'intervento di altri enzimi proteolitici compreso quello di altre MMPs. Una volta attivate le MMPs possono essere inibite dagli inibitori tissutali.

In base al substrato su cui agiscono le MMPs sono state suddivise in 5 gruppi: matrilisine, collagenasi, stromelisine, gelatinasi ed MMPs di membrama. Il sequenziamento completo del genoma umano ha permesso di identificare il set completo delle MMPs prodotte dalle cellule umane. Sono stati identificati 24 geni distinti che codificano per le MMPs (6). Tali enzimi sono stati quindi rinominati e classificati in base alla loro struttura in 8 classi di cui 5 sono secrete (Tab. 1 e 2) e tre sono legate alla membrana cellulare (MT-MMPs) (Tab. 3 e 4).

La struttura base (minimal-domain) delle MMPs contiene: a) un pre-peptide (peptide segnale) amino-terminale di 17-29 aminoacidi che dirige l'enzima nel reticolo endoplasmatico; b) un pro-peptide di 77-87 aminoacidi contenente un gruppo thiol (SH) che interagisce con lo zinco e mantiene l'enzima nella forma inattiva di zimogeno; c) un dominio catalitico di circa 170 amino-acidi con un sito legante lo zinco. Le matrilisine 1 e 2, ridenominate MMP-7 ed MMP-26 rispettivamente, sono costituite solo dal minimal-domain (7) (Fig. 1). Le altre MMPs, in aggiunta al minimal-domain, contengono un dominio hemopexin-like (Hpx) di circa 200 aminoacidi, legato da un ponte al dominio catalitico. La hemopexin è una β-globulina di 57 kDa, contenente circa il 22% di carboidrati, costituita da quattro repeats di cui il primo e l'ultimo sono legati da un ponte solfuro (S-S). Essa media le interazioni con gli inibitori tissutali, le molecole della superficie cellulare ed i substrati proteolitici. Questa è la struttura della maggior parte delle metallo-proteinasi ed è nota come simple hemopexin-domain o struttura archetipo (8). Tale disegno archetipo è nelle MMP-1, -8, -13, -18 (collagenasi 1, 2, 3, 4), MMP-3, -10 (stromelisine 1, 2), MMP-12 (metalloelastase), MMP-19 (da *Xenopus laevis*) MMP-20 (enamelisina), MMP-27 (Fig. 2). Le due gelatinasi A e B (MMP-2 ed

	MMPs secrete	
Struttura	**Pseudonimo**	**Nome**
Dominio minimo	Matrilisina-1	MMP-7
	Matrilisina-2	MMP-26
Dominio hemopexin semplice	Collagenasi-1	MMP-1
(Archetipo)	Collagenasi-2	MMP-8
	Collagenasi-3	MMP-13
	Collagenasi-4	MMP-18 (*Xenopus*)
	Stromelisina-1	MMP-3
	Stromelisina-2	MMP-10
	Metallo-elastase	MMP-12
		MMP-19 (*Xenopus*)
	Enamelisina	MMP-20
	MMP-27	
Gelatina-binding	Gelatinasi-A	MMP-2
	Gelatinasi-B	MMP-9
Inserto Furina	Stromelisina-3	MMP-11
	Epilesina	MMP-28
Inserto Vitronectina-like		MMP-21

Tabella 1. Struttura e nomenclatura della famiglia delle MMPs.

MMP-9) alla struttura archetipo incorporano, nel dominio catalitico, 3 moduli di fibronectina tipo II, che forniscono un dominio legante il collageno (9) (Fig. 3). Un gruppo di MMPs sono secrete in forma attivata. In tale gruppo, il simple hemopexin domain contiene, tra il pro-dominio e il dominio catalitico, un residuo di furina (Fu). La furina appartiene alla famiglia delle proteinasi intracellulari presenti nell'apparato del Golgi e consente l'attivazione intracellulare delle proteine secrete. Pertanto, tale struttura (detta Furin activable) consente l'attivazione intracellulare delle MMPs. Appartengono a tale gruppo la MMP-11 (stromelisina 3), MMP-28 (epilisina) (10) (Fig. 4). La furina si trova anche nelle MMPs con inserto di Vitronectin. A tale gruppo appartiene la MMP-21 omologo della X-MMP (da *Xenopus laevis*) (Fig. 5). Un frammento parziale della MMP-21 umana è stato clonato; tuttavia la sequenza non è stata inviata alla GeneBank e l'enzima umano non è stato caratterizzato.

Le MMPs di membrana (MT-MMPs) sono legate alla membrana cellulare. La struttura è costituita dal simlpe hemopexin domain con l'inserto di furina tra il propeptide ed il dominio catalitico, quindi sono tutte caratterizzate dall'attivazione intra-cellulare. Sulla base dell'ancoraggio alla membrana

Enzima	MMP	Cromosoma umano	Peso Molecolare (Latente/Attiva)	Substrati Collageni	Substrati addizionali
Matrilisine					
Matrilisina 1	MMP-7	11q21-q22	28.000/19.000	IV, X	Aggrecan, Elastina, Fibronectina, Gelatina, Laminina, MMP-1, -2, -9
Matrilisina 2 (endometasi)	MMP-26	11p15	28.000/19.000	IV	Fibrinogeno, Fibronectina, Gelatina
Collagenasi					
Collagenasi 1 (interstiziale)	MMP-1	11q22-q23	55.000/45.000	I, II, III,VII,VIII, X	Aggrecan, Gelatina, MMP-2, -9
Collagenasi 2 (neutrofila)	MMP-8	11q21-q22	75.000/58.000	I, II, III,V, VII,VIII, X	Aggrecan, Elastina, Fibronectina, Gelatina, Laminina
Collagenasi 3	MMP-13	11q22.3	60.000/48.000	I, II, III, IV, IX, X, XIV	Aggregan, Gelatina
Collagenasi 4 (*Xenopus*)	MMP-18	No Umano	70.000/53.000		
Stromelisina					
Stromelisina 1	MMP-3	11q23	57.000/45.000	II, III, IV, IX, X, XI	Aggrecan, Elastina, Fibronectina, Gelatina, Laminina, MMP-7, -8, -13
Stromelisina 2	MMP-10	11q22.3-q23	57.000/44.000	III, IV, V	Aggrecan, Elastina, Fibronectina, Gelatina, Laminina, MMP-1, -8
Stromelisina 3	MMP-11	22q11.2	51.000/44.000	IV	Aggrecan, Fibronectina, Laminina
Gelatinasi					
Gelatinasi A	MMP-2	16q13	72.000/66.000	I, II, III, IV, V, VII, X, XI	Aggrecan, Elastina, Fibronectina, Gelatina, Laminina, MMP-9, -13
Gelatinasi B	MMP-9	20q11.2-q13.1	92.000/86.000	IV, V, VII, X, XIV	Aggrecan, Elastina, Fibronectina, Gelatina
Altre					
Macrofagi elastasi (metalloelastatsi)	MMP-12	11q22.2-q22.3	54.000/45.000	IV	Elastina, Fibronectina, Gelatina, Laminina
---	MMP-19	12q14	54.000/45.000	IV	Aggrecan, Fibronectina, Gelatina, Laminina
Enamelisina	MMP-20	11q22.3	54.000/22.000		Aggrecan, Amelogenina
	MMP-27	11q24			----
Epilesina	MMP-28	17q21.1			------

Tabella 2. Componenti della famiglia delle MMPs secrete.

MMPs Trans-membrana (MT-MMPs)		
Struttura	**Pseudonimo**	**Nome**
Tipo I	MMP-14	MT1-MMP
	MMP-15	MT2-MMP
	MMP-16	MT3-MMP
	MMP-24	MT5-MMP
Glicosil-Fosfatidil-Inositolo	MMP-17	MT4-MMP
(GPI-anchored)	MMP-25	MT6-MMP
Tipo II	CA-MMP	MMP-23A
		MMP-23B

Tabella 3. Struttura e nomenclatura della famiglia delle MMPs.

cellulare le MT-MMPs sono state suddivise in tre gruppi. Il primo gruppo è caratterizzato dalla presenza di un dominio transmembrana a singola catena dalla parte C-terminale ed un piccolo dominio citoplasmatico. A tale gruppo appartengono le: MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP e MT5-MMP (11) (Fig. 6). Il secondo gruppo, a cui appartengono la MT4-MMP e la MT6-MMP, è legato alla membrana citoplasmatica dal glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI) (12) (Fig. 7). Il terzo gruppo manca del dominio hemopexin ed è legato alla membrana citoplasmatica da una àncora segnale dalla parte N-terminale a cui segue un piccolo peptide citoplasmatico. Inoltre presenta dal lato C-terminale un peculiare schieramento di cisteina (cisteina array) a cui segue un dominio Ig-like

Enzima	**MMP**	**Cromosoma umano**	**Peso Molecolare (Latente/Attiva)**	**Substrati Collageni**	**Substrati addizionali**
Trans-membrana tipo I					
MT1-MMP	MMP-14	14q11-q12	66.000/56.000	I, II, III	Aggrecan, Elastina, Fibronectina, Gelatina, Laminina, MMP-2, -13
MT2-MMP	MMP-15	15q13-q21	72.000/60.000		Fibronectina, Gelatina, Laminina, MMP-2
MT3-MMP	MMP-16	8q21	64.000/52.000		MMP-2
MT5-MMP	MMP-24	20q11.2	-/62.000		Fibronectina, Gelatina, Laminina
GPI ancorata					
MT4-MMP	MMP-17	12q24.3	57.000/53.000		Fibrina, Gelatina
MT6-MMP	MMP-25	16p13.3		IV	Fibronectina, Gelatina, Laminina
Trans-membrana tipo II					
CA-MMP	MMP-23	1p36.3			------

Tabella 4. Componenti della famiglia delle MMPs legate alla membrana cellulare.

(Fig. 8). A tale gruppo appartiene solo la MMP-23 distinta in MMP-23A ed MMP-23B codificate da 2 geni distinti ma con stessa sequenza aminoacidica (13, 14) (Tab. 1, 2, 3 e 4).

Matrilisine 1 e 2 (MMP-7 e MMP-26)

Le matrilisine 1 (MMP-7) e 2 (MMP-26) mancano del dominio di hemopexin sono quindi costituite solo dal dominio minino e sono chiamate anche endometasi. La matrilisina 1 (MMP-7) è sintetizzata dalle cellule epiteliali ed è secreta apicalmente. Agisce sui componenti della MEC e alcune molecole della superficie cellulare come la pro α-defensin, Fas-Ligand, pro-tumor necrosis factor (TNFα) ed E-cadherin.

La matrilisina 2 (MMP-26) è stata scoperta recentemente ed il 40% della sequenza amimoacidica è identica a quella della MMP-7. E' espressa da alcuni tipi di cellule normali come quelle dell'endometrio ed in diversi tipi di carcinoma. E' in grado di digerire diversi componenti della MEC ed a differenza di molte altre MMPs è immagazzinata in grande quantità all'interno delle cellule. Svolge un ruolo fondamentale nell'infiammazione ed è espressa in grande quantità nei macrofagi e nei leucociti polimorfonucleati (Fig. 1).

Collagenasi 1,-2,-3 (MMP-1, MMP-8, MMP-13), collagenasi 4 (MMP-18 da Xenopus laevis)

La collagenasi 1 (MMP-1), il primo componente della famiglia delle MMP, è stata purificata dalla coda del girino in cui la collagenolisi è richiesta per

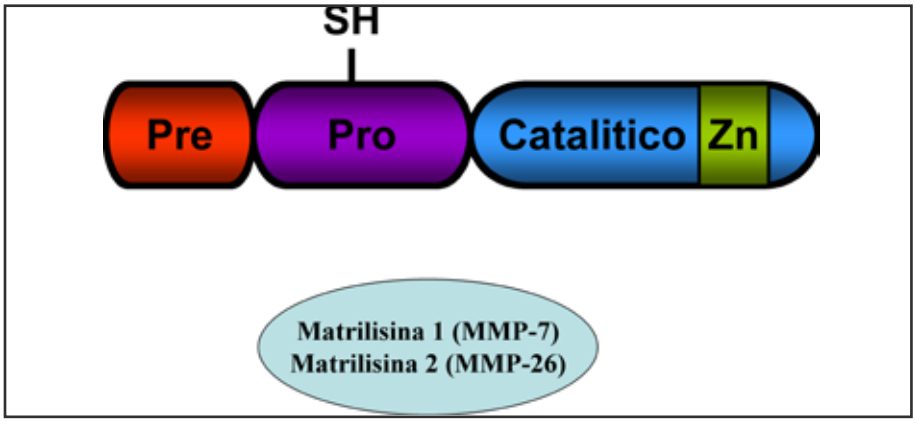


Figura 1. Struttura base delle metallo proteinasi (dominio minino), adattata dalla Ref. 24.

digerire il collageno della coda durante la metamorfosi dell'anfibio. Il cDNA della MMP-1 umana clonato e sequenziato è stato ottenuto da fibroblasti della pelle. La MMP-1 umana è prodotta come due differenti pro-enzimi glicosilati di 52 kDa e 57 kDa dai quali dopo il taglio proteolitico del pro-peptide si formano due proteinasi attive di 42 e 47 kDa rispettivamente. E' espressa in molti tipi di cellule normali in coltura (cheratinociti, fibroblasti, cellule endoteliali, monociti, macrofagi, epatociti, condrociti) ed in molti tipi di cellule tumorali. Taglia molti componenti della MEC (collageni tipo I, II, III, VII, VIII e X, aggrecan, inibitori delle serine proteasi, e della α2 macroglobulina) ma non i principali componenti della membrana basale. L'espressione della MMP-1 è stata evidenziata in molti processi fisiologici (sviluppo embrionale, rimarginazione delle ferite) e patologici (ulcere cutanee croniche) e in diversi tipi di tumori (carcinoma mammario, colorettale, gastrico, ovarico, esofageo, melanoma maligno, adenocarcinoma del pancreas) (15, 16).

La collagenasi 2 (MMP-8), nota anche come collagenasi neutrofila è sintetizzata dai neutrofili durante la loro maturazione nel midollo osseo, è immagazzinata nei granuli intracellulari ed è rilasciata in risposta a stimoli extra-cellulari (17). La MMP-8 è caratterizzata da sei potenziali siti di N-glicosilazione, viene secreta sia come forma non glicosilata di 55 kDa che come forma glicosilata di 75 kDa. E' espressa dai condrociti nella cartilagine articolare, dalle cellule mononucleari fibroblasti-like nella sinovia reumatoide, dalle cellule epiteliali bronchiali e dai monociti durante le bronchiti (18). E' presente in molti tipi di cellule normali in coltura (condrociti, fibroblasti della sinovia reumatoide, fibroblasti gengivali, cheratinociti della mucosa orale) e cellule del melanoma. I substarti principali della MMP-8 sono i collageni fibrillari; taglia il collageno tipo I in modo significativamente più efficiente rispetto al collageno tipo III. Può regolare l'infiammazione tagliando ed attivando le chemiochine. La MMP-8 è coinvolta in molti processi sia fisiologici (cartilagine articolare, maturazione dei neutrofili), che patologici (sinovia reumatoide, bronchiti) e nel carcinoma ovarico (19).

La collagenasi 3 (MMP-13) è stata clonata da cellule di carcinoma umano della mammella (20). E' secreta come una glicoproteina di 60 kDa ed è attivata ad una forma di 48 kDa (attraverso una forma intermedia di 50 kDa) da plasmina, stromelisina, MMP-2 ed MT1-MMP. Rispetto alle altre MMPs ha un pattern di espressione piuttosto ristretto ed una specificità di substrato molto vasta. Agisce sui collageni fibrillari (tipo I, II, III), gelatina, collageni tipo IV, IX, X e XIV, tenascina C, fibronectina, aggrecan, versican, fibrillina-1 ed osteonectina. Inoltre, la MMP-13 può inattivare alcune chemiochine come i monociti chemoattractant protein 3 (MCP-3) ed il fattore-1 derivato della cellule stromali (SDF-1) ed infine sembra essere coinvolta nell'attivazione del pro-TGFβ3. La sua azione si manifesta in poche situazioni fisiologiche in cui è coinvolto il rapido ed effettivo rimodellamento dei collageni della matrice

extra-cellulare e.g. sviluppo delle ossa fetali, rimodellamento osseo dopo la nascita, riparazione delle ferite della pelle fetale e delle gengive. Agisce in situazioni patologiche caratterizzate dalla distruzione dell'architettura del collageno tissutale (cartilagine osteoartritica, sinovia reumatoide, ulcere cutanee croniche, ulcerazioni intestinali, periodontiti croniche, aterosclerosi ed aneurisma dell'aorta). La enorme capacità proteolitica della MMP-13 (collagenasi 3) suggerisce che si tratta di una proteinasi potente e potenzialmente distruttiva, pertanto la sua espressione, in situazioni fisiologiche, è rigidamente controllata.

La collagenasi 4 (MMP-18 da *Xenopus laevis*) non è stata identificata nell'uomo (Fig. 2).

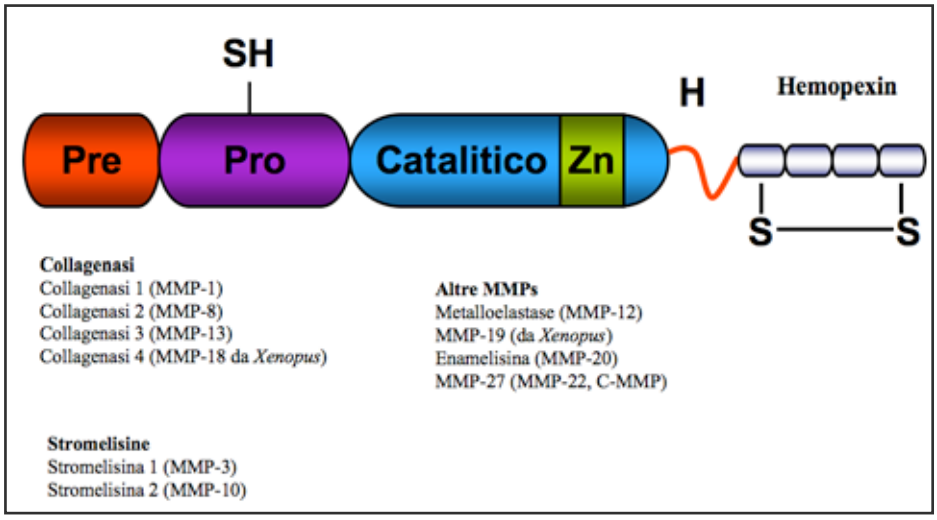


Figura 2. Struttura archetipo delle metalloproteinasi, adattata dalla Ref. 24.

Stromelisine 1, -2, -3 (MMP-3, MMP-10, MMP-11)

La stromelisina 1 (MMP-3**)** e la stromelisina 2 (MMP-10) hanno una specificità di substrato simile. Tuttavia la MMP-3 presenta efficienza proteolitica migliore della MMP-10, ed oltre che sui componenti della MEC, agisce su diverse proMMPs. In particolare l'azione litica della MMP3 sulla MMP-1 è critica per la formazione della MMP-1 completamente attivata (Fig. 2). La stromelisina 3 (MMP-11) è caratterizzata da attività litica molto debole verso i componenti della MEC ed è secreta dalle cellule in forma attiva (Fig. 4).

Gelatinasi A e B (MMP-2 e MMP-9)

Le gelatinasi o collagenasi tipo IV, MMP-2 (gelatinasi A) e MMP-9 (gelatinasi B) sono caratterizzate dalla presenza di tre moduli di fibronectina tipo II che permettono lo svolgimento e la completa degradazione della tripla elica del collageno. I geni che codificano per le gelatinasi e la sequenza dei rispettivi promotori sono stati caratterizzati, e tali enzimi possono essere purificati mediante gelatina affinity cromatografia. Pur essendo molto simili le due gelatinasi presentano sostanziali differenze nella regolazione dell'espressione, della glicosilazione, dell' attivazione del pro-enzima e della specificità per i substrati. La MMP-2 è una proteina di 72 kDa non glicosilata; è espressa nei fibroblasti, nelle cellule endoteliali, nelle cellule epiteliali e nelle cellule trasformate. Nel siero circola come monomero. La MMP-9 ha peso molecolare di 92 kDa, contiene 2 siti N-glicosilati nel pro-peptide e nel dominio catalitico ed alcuni glicani O-linked. E' espressa nei leucociti, nei periciti (cellule mesenchima-like di forma allungata, situate vicino alla parete esterna delle venule, relativamente indifferenziate), nelle cellule endoteliali e nelle cellule trasformate. Nel plasma circola come monomero o complessata con lipocalin neutrofila e può formare dimeri e/o multidimeri. La caratteristica peculiare delle MMP-2 e -9 è che sono in grado di digerire rapidamente la gelatina (collageni denaturati) con l'aiuto dei tre repeats di fibronectina che si legano alla gelatina/collageno. Digeriscono l'elastina, i collageni tipo IV, V, laminina, aggrecan, core proteine ed altri componenti della matrice extra-cellulare e della membrana basale. I substrati delle gelatinasi, inoltre, comprendono anche proteinasi, proteinasi inibitori, fattori della coagulazione, molecole chemotattiche, fattori di crescita latenti, proteine leganti i fattori di crescita, recettori di membrana, molecole di adesione ed anche substrati intra-cellulari. La specificità dei substrati delle MMP-2 e -9 è simile ma non identica. La differenza principale è la capacità della MMP-2 di degradare il collageno nativo tipo I. Alcuni substrati mostrano una selettività verso MMP-2 di circa 200 volte maggiore rispetto alla MMP-9. La differenza nella specificità dei substrati è stata attribuita al subsito S2 del sito catalitico, dove la MMP-9 contiene acido aspartico e la MMP-2 contiene acido glutammico (21). La MMP-2, ma non la MMP-9, digerisce il collageno tipo I, II e III allo stesso modo delle collagenasi. L'attività della MMP-2 in soluzione è molto più debole di quella della MMP-1 (collagenasi 1), tuttavia, siccome la pro-MMP-2 è reclutata alla superficie cellulare ed è attivata dalle metalloproteinasi di membrana, è probabile che la MMP-2 possa esprimere una ragionevole attività litica sulla/o vicino alla superficie cellulare. La MMP-2 intracellulare dei cardiomiociti digerisce la troponina I, la catena leggera della miosina e la poly(ADP-ribose) polimerasi. La regolazione della espressione delle due gelatinasi è diversa (22). La MMP-2 è costituzionalmente espressa con pochi e modesti meccanismi di down and-up regulation nelle varie condizioni. La MMP-9 è

altamente inducibile ed è sotto il controllo dei fattori crescita, chemiochine ed altri segnali stimolatori. Entrambe le gelatinasi sono coinvolte in molti processi fisiologici e patologici. Sono richieste nei processi invasivi durante la riproduzione, crescita, sviluppo, mobilitazione dei leucociti, infiammazione, rimarginazione delle ferite, angiogenesi. Aumento dell'attività delle gelatinasi è stata osservata nelle infiammazioni, nelle malattie infettive, nei processi degenerativi del cervello, nelle malattie vascolari. Recenti studi hanno dimostrato che: a) la MMP-2 è coinvolta nelle disfunzioni cardiache e b) la MMP-9 ha un ruolo protettivo nei processi di aterosclerosi infatti limita la crescita delle placche e ne aumenta la stabilità (23). La MMP-2 e la MMP-9 sono coinvolte in molte tappe dello sviluppo e della progressione tumorale: crescita del tumore primario, angiogenesi, extravasione ed intravasione delle cellule neoplastiche, migrazione, invasione delle cellule metastatiche nell'organo secondario, inizio e mantenimento della crescita tumorale nel sito metastatico. Inoltre, possono anche sopprimere la progressione tumorale agendo, con taglio proteolitico, su molti substrati bioattivi. L'effetto finale, quindi, dipende in larga misura dal contesto generale del microambiente che promuove la trasformazione maligna. Sono generalmente associate a fenotipo maligno, invasione, progressione e bassa sopravvivenza (24-26). Sono sintetizzate dalle cellule tumorali ma anche dallo stroma. Si ritiene che le cellule tumorali possano stimolare le cellule stromali della neoplasia a sintetizzare le gelatinasi in modo paracrino attraverso la secrezione di interleuchine, interferone e fattori di crescita. Dopo la secrezione locale possono raggiungere il torrente circolatorio e ritrovarsi nei vari liquidi biologici (Fig 3).

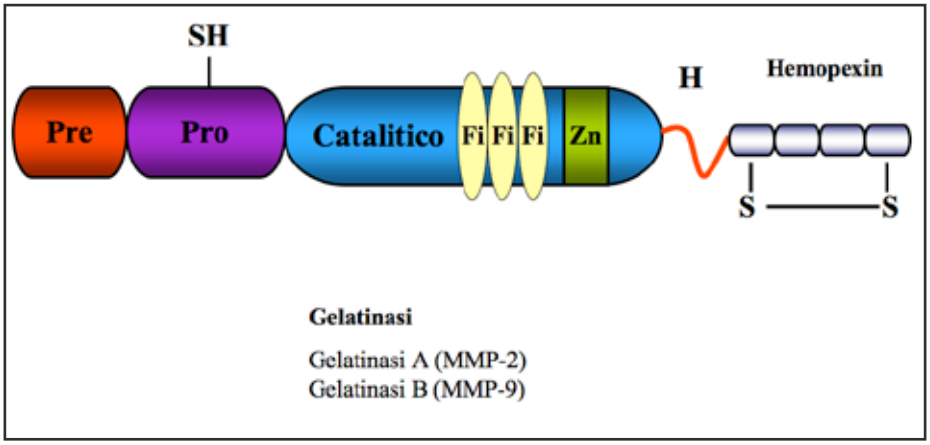


Figura 3. Struttura delle metalloproteinase leganti la gelatina, adattata dalla Ref. 24.

MMPs Transmembrana (MT-MMPs)

Le MT-MMPs di tipo I sono le MMP-14, -15, -16, e -24 (ridenominate MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP e MT5-MMP rispettivamente), attivano la proMMP-2 e digeriscono diverse proteine della matrice extra-cellulare. In particolare la MT1-MMP (MMP-14) presenta attività gelatinolitica sui collageni tipo I, II e III. I topi MT1-MMP *null* mostrano, dopo la nascita, anomalie dello sviluppo scheletrico dovute molto probabilmente alla mancanza dell' attività collagenolitica (27). Inoltre la MT1-MMP svolge un importante ruolo nella angiogenesi (28). La MT5-MMP è specifica del cervello ed è espressa prevalentemente nel cervelletto (29). Le MT-MMPs ancorate alla membra-

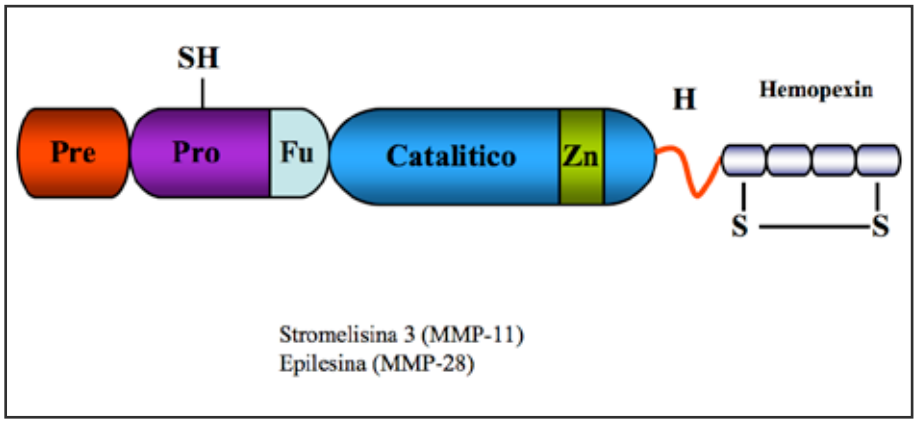


Figura 4. Struttura delle MMPs secrete con inserto di furina, adattata dalla Ref. 24.

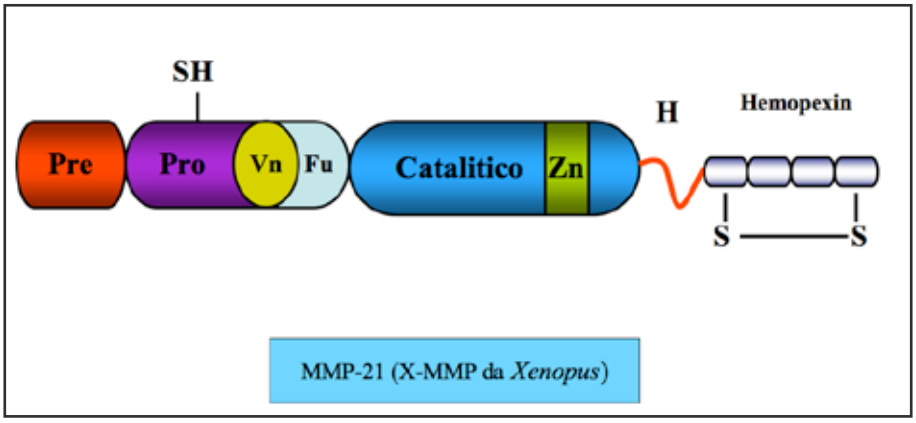


Figura 5. Struttura delle MMPs con inserto di Vitronectina, adattata dalla Ref. 24.

na cellulare dal glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI-anchored) sono la MMP-17 e la MMP-25 (ridenominate MT4-MMP ed MT6-MMP). La MT4-MMP è l'unica metalloproteinasi legata alla membrana cellulare che non attiva la proMMP-2. La MT6-MMP (MMP-25) è espressa quasi esclusivamente nei leucociti circolanti, nell'astrocitoma anaplastico e nel glioblastoma, ma è assente nei meningiomi (30).

Il tipo II delle MT-MMPs include solo una metalloproteinasi la CA-MMP nota anche come MMP-23. La MMP-23, detta anche cisteina array MMP, è espressa prevalentemente nei tessuti riproduttivi (14). L'enzima manca della cisteina nel predominio, e del dominio hemopexin. (Fig. 8).

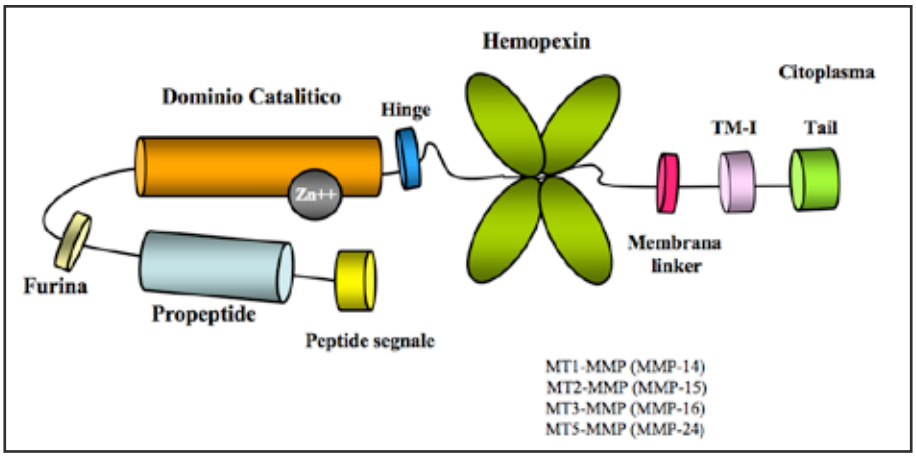


Figura 6. Struttura delle MMPs trans-membrana (MT-MMPs) Tipo I, adattata dalla Ref. 25.

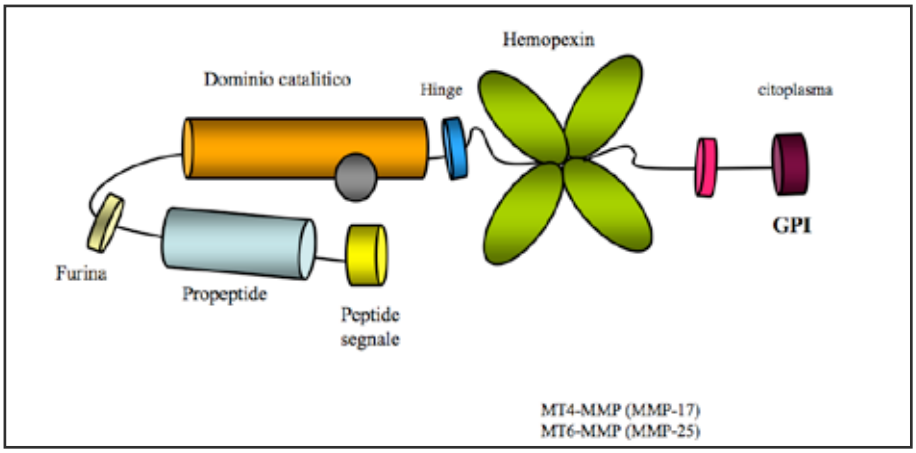


Figura 7. Struttura delle MMPs trans-membrana legate con Glicosil-Fosfatidil-Inositolo (GPI), adattata dalla Ref. 25.

Altre MMPs

Cinque metalloproteinasi vengono generalmente classificate come altre MMPs. Di queste, quattro hanno la struttura archetipo ed una è caratterizzata dall'inserto di Furina ed è nota come epilisina (MMP-28) (Tab. 2 e Fig. 4). La epilisina (MMP-28) è espressa prevalentemente nei cheratinociti. Presumibilmente ha un ruolo primario nella emostasi tissutale e nella rimarginazione delle ferite (31). Le quattro MMPs con struttura archetipo sono le macrofagi elastasi (MMP-12 e MMP-19), la MMP-20 e la MMP-27 (Tab. 2 e Fig. 2). La MMP-12 (metalloelastase) è espressa principalmente nei macrofagi ed è indispensabile per la loro migrazione (32); digerisce l'elastina e molte altre proteine. La MMP-19 è stata scoperta nello *Xenopus laevis*. Recentemente, è stata identificata la MMP-19 umana dal cDNA clonato del fegato e come un autoantigene derivato dalle cellule T di pazienti con artrite reumatoide (33). La MMP-20 (enamelisina) digerisce la amelogenina ed è prevalentemente localizzata a livello dello smalto dentale di nuova formazione. La amelogenina imperfetta, un disordine genetico causato dalla formazione anomala dello smalto dentale, è dovuta a mutazioni sui cleavage siti della MMP-20 (34). La MMP-22 è stata clonata da fibroblasti di pollo (C-MMP) (35); l'omologo umano è stato identificato sulla base delle sequenze EST ed è nota anche come MMP-27. La funzione di questo enzima è ancora sconosciuta.

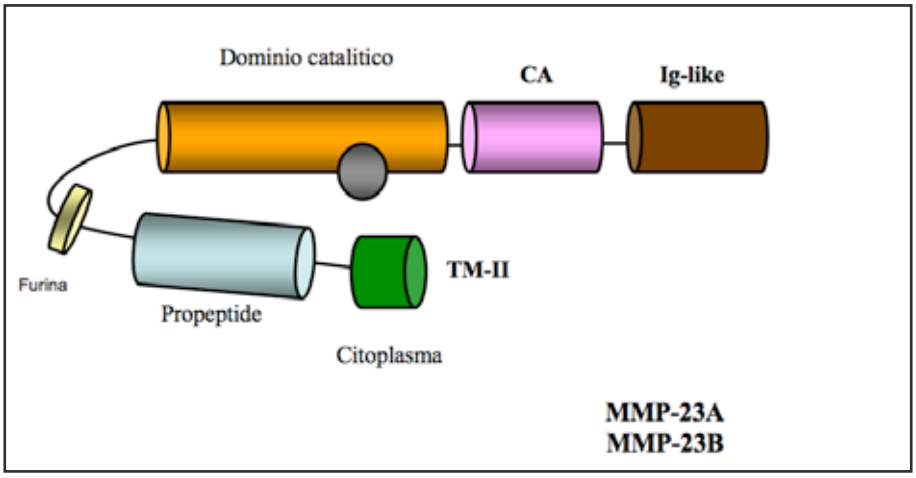


Figura 8. Struttura delle MMPs trans-membrana Tipo II (cisteina array), adattata dalla Ref. 25.

Attivazione delle MMPs

Le MMPs sono sintetizzate come pre-pro-enzima. Il pre-peptide (peptide segnale) viene rimosso dopo la traslazione e si forma il pro-enzima (zimogeno) inattivo la cui attivazione è una tappa importante nella regolazione delle attività delle MMPs. I componenti della famiglia delle MMPs mantengono l'enzima nella forma latente con un meccanismo noto come "cysteine switch". La cisteina spaiata della sequenza altamente conservata "Pro-Arg-Cys-Gly-X-Pro-Asp" nel pro-dominio forma un ponte con lo zinco del sito catalitico e impedisce l'attività enzimatica. L'attivazione avviene quando questo legame è rotto chimicamente per es. con acido amino-fenil-mercurio (APMA) oppure quando il pro-peptide è rimosso con taglio proteolitico. Le MMPs, secrete come proMMPs, sono caratterizzate dalla presenza di una regione esca nel dominio catalitico contenente zinco e vengono attivate con meccanismo simile a quello della coagulazione e chiamato "stepwise activation" (36). Questo tipo di attivazione è un sistema di regolazione molto sofisticato che consente di controllare perfettamente l'attività distruttiva di tali enzimi. L'attivazione delle MMPs inizia con il taglio della regione esca da parte delle proteinasi tissutali o plasmatiche o batteriche (da batteri opportunistici) che reagiscono con il gruppo thiol (SH) della cisteina switch. Tale taglio rimuove una parte del pro-peptide attivando solo parzialmente le MMPs. L'attivazione completa avviene con la rimozione completa del pro-peptide successiva a processi intermolecolari che richiedono l'intervento di altri enzimi tra cui alcune MMPs attivate. Infatti, il taglio della ragione esca, determinato da specifiche sequenze trovate in ogni MMP, destabilizza il resto del pro-peptide (incluso l'interazione cisteina-switch zinco) e permette il processo intermolecolare da parte di alcune MMPs intermedie (parzialmente attivate) o da parte di altre MMPs completamente attivate. Quindi la tappa finale dell'attivazione è condotta da un'altra metalloproteinasi. Dieci MMPs contengono una proteina convertasi furina-like che riconosce la sequenza RX[K/R]R alla fine del propeptide e consente l'attivazione intracellulare. Dopo l'attivazione, tali proteinasi sono secrete oppure rimangono legate alla superficie cellulare come enzimi attivi la cui attività è regolata da inibitori endogeni. Un interessante pathway di attivazione *in vivo* è quello che avviene mediante l'azione della plasmina. La plasmina si forma dal plasminogeno grazie all'azione di due attivatori: l'attivatore del plasminogeno legato alla fibrina e l'attivatore della urochinasi plasminogeno legato ad uno specifico recettore sulla superficie cellulare. Entrambi gli attivatori sono associati alla membrana e probabilmente determinano attivazione locale delle proMMPs e seguente turnover della matrice extracellulare. La plasmina attiva proMMP-1, proMMP-3, proMMP-7,

proMMP-9, proMMP-10 e proMMP-13. Infine alcuni inibitori specifici delle MMPs (TIMPs) interferiscono con l'attivazione interagendo con gli attivatori intermedi prima che l'enzima sia completamente attivato.

Attivazione delle collagenasi

L' attivazione completa delle collagenasi richiede la interazione dell'urochinasi attivatore del plasminogeno e della stromelisina 1 (MMP-3). L'urochinasi converte il plasminogeno in plasmina (serina proteasi attivata) che attiva parzialmente la pro-collagenasi e converte la proMMP-3 in MMP-3 (stromelisina); quest'ultima agisce sulla collagenasi parzialmente attivata trasformandola nella forma completamente attivata (37) (Fig.9).

Attivazione della proMMP-2 sulla superficie cellulare

La proMMP-2 non è prontamente attivata ma segue dei percorsi particolari ben conosciuti. La proMMP-2 viene attivata principalmente sulla superficie cellulare con un meccanismo mediato dalle MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP e MT6-MMP. La MT4-MMP non attiva la proMMP-2.

Il meccanismo di attivazione della proMMP-2 mediato dalla MT1-MMP è ben conosciuto e richiede la presenza di TIMP-2 (38). Sulla superficie cellulare la MT1-MMP attivata lega una molecola di TIMP-2 e quindi risulta inibita.

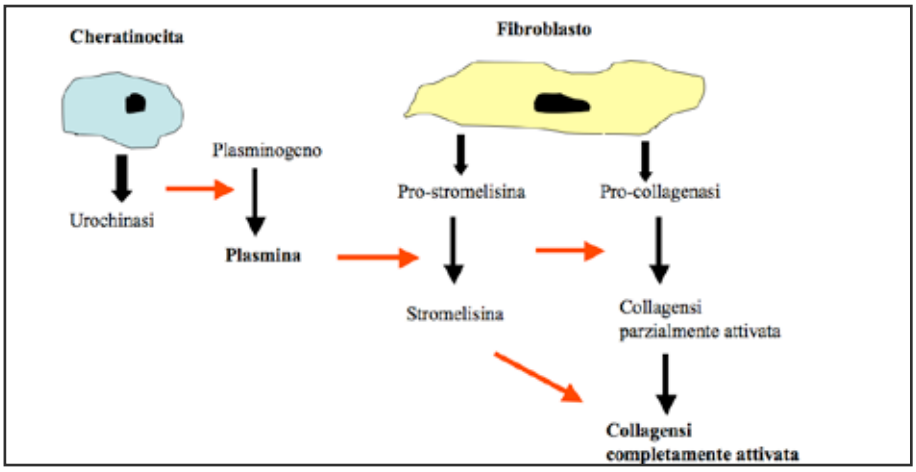


Figura 9. Meccanismo di attivazione delle collagenasi. La plasmina e la stromelisina cooperano nella produzione della collagenasi completamente attivata. La urochinasi prodotta dai cheratinociti converte il plasminogeno in plasmina (una serina proteasi attivata). La plasmina converte la pro-stromelisina in stromelisina e la pro-collagenasi in collagenasi parzialmente attivata grazie al taglio del pro-peptide. La stromelisina può convertire la collagenasi parzialmente attivata nella forma completamente attivata (adattata dalla Ref. 37).

Le MT1-MMP possono formare dimeri o multimeri attraverso l'interazione con il dominio hemopexin. La hemopexin della proMMP-2 si lega al dominio C-terminale della TIMP-2. La MT1-MMP attivata del dimero taglia la regione esca della proMMP-2 che si dissocia dalla membrana e viene attivata completamente dal processo intermolecolare (39-40) (Fig.10).

L'attivazione della proMMP-2 da parte della MT2-MMP è diretta ed è indipendente dalla presenza del TIMP-2. Osservazione interessante è che il TIMP-4 lega il dominio hemopexin della proMMP-2 ed inibisce la MT1-MMP ma non determina attivazione della proMMP-2. La ragione non è stata ancora completamente elucidata si presume che la mancanza di attivazione possa essere dovuta ad assemblaggio non corretto con la TIMP-4 (41). Anche TIMP-3 è in grado di formare complessi con proMMP-2 ma a tutt'oggi il significato biologico del complesso proMMP-2-TIMP-3 non è noto.

Anche il dominio hemopexin della proMMP-9 può formare stretti complessi con la parte C-terminale di TIMP-1 e TIMP-3. Nei neutrofili la proMMP-9 si lega parzialmente alla molecola lipocalin-like (NGAL) attraver-

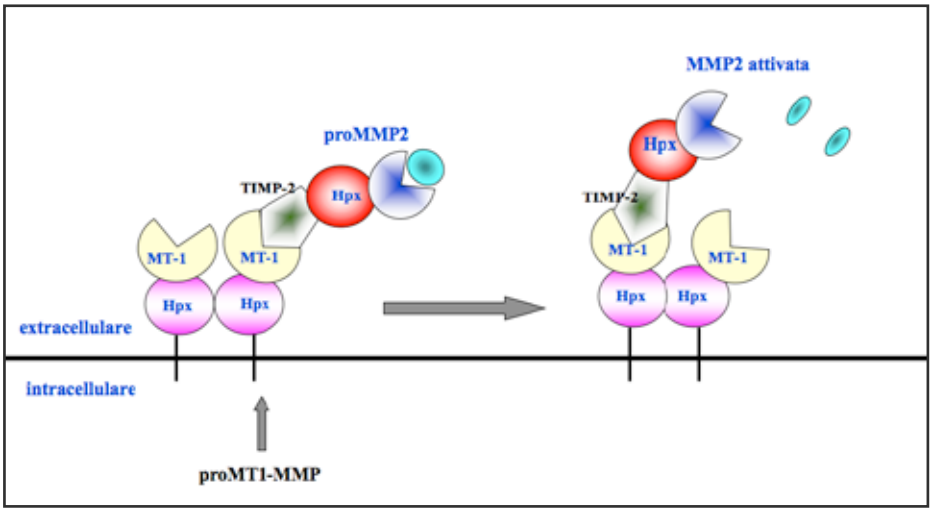


Figura 10. Meccanismo di attivazione della proMMP-2 sulla superficie cellulare. Attivazione della gelatinasi A (MMP-2) dalla MT1-MMP. La MT1-MMP è attivata all'interno della cellula dalla furina e si localizza sulla superficie cellulare attraverso il dominio transmembrana. La MT1-MMP, attraverso l'interazione con il dominio hemopexin (Hpx) forma dei dimeri. Il dominio N-terminale del TIMP-2 si lega al sito catalitico della MT1-MMP (giallo). Il complesso MT1-MMP-TIMP-2 recluta la proMMP-2 attraverso l'interazione del dominio carbossil-terminale del TIMP-2 con il dominio hemopexin della proMMP-2. Il "recettore" MT1-MMP forse trasporta la proMMP-2 chiusa al sito "catalitico" della MT1-MMP, che taglia il pro-dominio della MMP-2 ed attiva l'enzima.
(basata sulla Ref. 40)

so un legame disolfuro intermolecolare. Il significato biologico di questi complessi non è noto, si sa solo che i complessi proMMP-9-TIMP sono potenziali inibitori delle metalloproteinasi.

Le MMPs possono essere attivate anche da agenti chimici come: agenti modificanti il thiol (4-aminofenilmercurio acetato, $HgCl_2$, N-etilmaldeide), glutatione ossidato, SDS, agenti caotropici e ossigeno reattivo. L'azione di tali agenti avviene presumibilmente disturbando la interazione cisteina-zino nella regione "cisteina switch". Questa proprietà è utilizzata per attivare le proMMPs in laboratorio. Infine le MMPs sono attivate da pH basso e dalle alte temperature. Tuttavia reazioni troppo estese possono inattivare l'enzima.

Substrato specificità

La specificità del substrato delle metalloproteinasi è stata stabilita identificando i siti del taglio utilizzando come substrati diversi peptidici sintetici. Più recentemente sono state utilizzate metodiche più sofisticate come i sistemi phage display e lo screening proteomico (42). In generale le MMPs tagliano un peptide legato prima di un residuo (riferito come residuo P1') con una catena laterale idrofobica come Leu, Ile, Met, Phe o Thr. Il residuo idrofobico si adatta alla tasca di specificità S1' dell'enzima la cui grandezza e forma differisce considerevolmente tra le varie MMPs (43). In aggiunta alla tasca S1', altri subsiti partecipano alla specificità del substrato. In particolare Pro nel sito P3 (il terzo residuo prima del sito di taglio) è generalmente preferito da molte MMPs (44).

I domini ancillari non-catalitici di alcune matrixine svolgono, per alcune MMPs, un ruolo chiave nel riconoscimento dei substrati naturali della matrice extra-cellulare. I tre domini di fibronectina tipo II delle gelatinasi sono importanti per il taglio del collageno tipo IV, elastina e gelatina, ma non influenzano l'idrolisi dei piccoli peptidi (45). Infatti la loro interazione con specifiche molecole della MEC consente al dominio catalitico di orientarsi allo scissile del peptide legato. Per il taglio della tripla elica dei collageni è essenziale il dominio di hemopexin delle collagenasi. E' stato dimostrato che le collagenasi localmente srotolano la tripla elica del collageno prima di tagliare i peptidi legati. Si è supposto che la scalanatura legante il collageno è costituita dal dominio catalitico e dalla hemopexin. Nel caso della proMMP-1, il predominio interagisce sia con il dominio catalitico che con il dominio hemopexin trasformandolo in una configurazione "closed" in cui il pro-peptide blocca parzialmente i putativi siti leganti il collageno. La rimozione del pro-peptide apre la scalanatura ("open" form) e consente alle collagenasi di legare i collageni. Questo spiega le iniziali affermazioni secondo cui la pro-MMP-1 non lega il collageno-1, mentre lo fanno le collagenasi attivate. Ciononostante, non è ancora noto il meccanismo con cui le collagenasi srotolano i fili della tripla elica. Lo srotolamento efficace potrebbe richiedere la interazione coperativa tra collagenasi e tripla elica substrato.

Inibitori delle MMPs

In tutti gli esseri viventi, l'attività proteolitica è sotto rigido ed accuratissimo controllo allo scopo di evitare danni all'organismo. Per tale motivo, l'azione proteolitica è tipicamente regolata a molti livelli comprendenti trascrizione, secrezione, attivazione ed inibizione degli enzimi. I principali inibitori delle metalloproteinasi sono la α2 macroglobulina e gli inibitori tissutali delle matrix-metalloproteinasi (TIMPs). La α2 macroglobulina è un glicoproteina di 725 kDa costituita da 4 subunità identiche di 180 kDa prodotta dal fegato presente nel siero e negli altri liquidi biologici. E' un inibitore non specifico di molte endopeptidasi indipendentemente dalla loro classe (46). Agisce intrappolando l'enzima e formando un complesso che viene rapidamente escreto con un meccanismo di endocitosi mediato dalla proteina-1 collegata al recettore per le proteine a bassa densità (47). Dopo il taglio da parte di una proteinasi, la α2 macroglobulina subisce dei cambiamenti conformazionali, intrappola l'enzima e blocca stericamente l'accesso al substrato specifico. La grandezza della α2 macroglobulina può diminuire la penetrazione tissutale e quindi ne limita l'efficacia come inibitore fuori del compartimento intravascolare. Le attività delle MMPs nella fase fluida sono regolate principalmente dalla α2 macroglobulina e da proteine ad essa correlate.

Gli inibitori tissutali delle metalloproteinasi (TIMPs) sono proteine che specificamente, nello spazio extra-cellulare, inibiscono l'attività di tutti i componenti della famiglia delle matrix metalloproteinasi in modo equimolare (48); inoltre possono anche inibire l'attivazione di diverse MMPs. Nei vertebrati sono stati identificati 4 TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4) e la loro espressione è regolata durante lo sviluppo ed il rimodellamento tissutale (49). I TIMP-1, -2 e -4 sono secreti mentre il TIMP-3 è ancorato alla MEC. I quattro TIMPs presentano alta omologia nella sequenza degli aminoacidi ed elevata identità strutturale nell'espressione proteica. Sono costituiti da due domini: il dominio N-terminale ed il dominio C-terminale. Ciascun dominio contiene sei residui di cisteina che formano tre ponti disolfuro. Il dominio N-terminale da solo inibisce efficacemente le MMPs attraverso l'interazione con il sito legante lo zinco della MMP attivata. Il dominio C-terminale ha almeno due siti leganti: uno per la gelatinasi A ed uno per la stromelisina 1. Nelle condizioni patologiche associate a variazioni dell'attività delle MMPs, le concentrazioni di TIMPs sono considerate molto importanti in quanto tali inibitori controllano direttamente l'attività delle metalloproteinasi.

Il TIMP-1 è una glicoproteina di 28,5 kDa è il più ubiquitario di tutti i TIMPs. Studi preclinici hanno dimostrato che *in vitro* l'inavasione tumorale e la formazione di metastasi possono essere inibite trasfettando le cellule

maligne con TIMP-1. In sistemi sperimentali è stato osservato che il TIMP-1 inibisce la migrazione delle cellule endoteliali e la neoangiogenesi tumorale bloccando la risposta delle cellule endoteliali ai fattori angiogenici. Blocca la formazione di metastasi polmonari per via ematica. La sovraespressione di TIMP-1 inibisce direttamente il potenziale tumorale e metastatico delle cellule B16-F10 nei topi, suggerendo un ruolo di TIMP-1 nel controllare la malignità. Nel cancro della vescica, l'aumentata espressione di TIMP-1 e -2 si correla con aumento dell'invasività e formazione di metastasi. Nel cancro della prostata elevati livelli sierici di TIMP-1 e di collagenasi hanno la stessa sensibilità del PSA nel predire la formazione di metastasi.

Il TIMP-2 non è glicosilato, ha M_r di 21 kDa ed il 40% della sequenza è identica a quella del TIMP-1. Regola l'attività di MMP-1, MMP-2 e MMP-9. Riduce significativamente la crescita subcutanea del melanoma nei topi immunodeficienti ma non previene le metastasi polmonari e linfonodali. La sovraespressione di TIMP-2 in alcune linee cellulari tumorali causa un effetto citostatico dovuto probabilmente all'occlusione delle cellule tumorali con il collageno interstiziale. Variando l'equilibrio tra MMPs e TIMP-2 mediante manipolazione genetica che modifica la produzione TIMP-2 si è osservato che si hanno alterazioni: a) della proteolisi della MEC, b) dell'adesione cellulare alla MEC e c) della mobilità cellulare attraverso i componenti della MEC (50). TIMP-2 è presente nello stroma peritumorale e la sua aumentata espressione potrebbe indurre risposta stromale all'invasività tumorale conferendo particolare aggressività ad alcuni tipi di tumore (es. carcinoma della mammella) (51).

Il TIMP-3 ha peso molecolare di 24-25 kDa (intermedio tra TIMP-1 e TIMP-2) è molto simile al TIMP di pollo (chIMP-3), è riconosciuto da antisiero purificato contro chIMP-3 ma non da anticorpi anti-TIMP-1 ed anti-TIMP-2. TIMP-3 mostra un caratteristico pattern di espressione nei tessuti adulti, è molto abbondante nel rene normale, polmone e cervello, mentre è presente a basse concentrazioni nell'osso. Si presume che TIMP-3 agisca in modo tessuto specifico come parte della risposta acuta allo stimolo di rimodellamento. Il TIMP-4 non contiene carboidrati. E' espresso principalmente nel cuore e nel cervello ed in piccole quantità nel muscolo e nell'ovaio.

Sebbene i TIMPs siano spesso usati per valutare il ruolo dell'attività delle MMPs nei sistemi biologici complessi, è chiaro che sono multifunzionali. Molti degli effetti determinati dai TIMPs nei sistemi biologici non possono essere spiegati dalla sola attività inibitoria sulle matrixine, e le funzioni non inibitorie dei TIMPs sono un fenomeno complesso non ancora completamente chiarito.

Metodi per la determinazione delle MMPs

Le MMPs possono essere determinate nei vari liquidi biologici (siero, urine, liquido pleurico, liquido pericardico, liquido peritoneale ecc.) e nei tessuti. Le metodiche disponibili sono molte ed a tutt'oggi non è ancora ben chiaro quale sia la migliore tecnica. Sono disponibili in commercio vari kits per il dosaggio quantitativo che utilizzano anticorpi nella metodica enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), ed anticorpi per la rilevazione degli enzimi nella tecnica del Western blot. Per quanto concerne la metodica del Western blot è abbastanza difficile trovare anticorpi anti-MMPs altamente sensibili in grado di rilevare piccole quantità dell'enzima. Una tecnica ampiamente utilizzata è la substrato zimografia che identifica le MMPs dalla degradazione del loro substrato preferito e dal peso molecolare. Inoltre consente la rilevazione sia della forma latente che della forma attiva (52, 53).

La determinazione delle MMPs nei liquidi biologici e nel mezzo ottenuto dalle cellule in coltura è relativamente facile. Viceversa, attualmente è abbastanza indaginoso determinare l'attività tissutale delle MMPs. Infatti la concentrazione delle MMPs nei tessuti è circa 50 volte inferiore rispetto a quella trovata nei mezzi di coltura, alcune MMPs sono localizzate in una piccola parte del tessuto e non possono essere dosate a causa della diluizione dell'estratto tissutale totale. Inoltre la procedura di estrazione è abbastanza difficoltosa, può attivare le MMPs, non si è mai sicuri di aver estratto tutte le MMPs ed infine non è possibile la localizzazione cellulare dell'enzima. Per la localizzazione tissutale delle MMPs è raccomandato l'uso della zimografia *in situ* su sezioni di tessuto congelato e non fissato, oppure la immunoistochimica. Gli inibitori delle MMPs (TIMPs) possono essere misurati con la reverse zimografia che si basa sulla loro capacità di inibire le metallo-proteinasi.

Substrato zimografia

La zimografia e la reverse zimografia sono metodiche semplici, sensibili, quantitative e funzionali per la determinazione delle MMPs e TIMPs nei liquidi biologici. Tutti i tipi di substrato zimografia derivano dalla gelatina zimografia. Le tecniche sono le stesse cambia solo il substrato usato in base al tipo di MMP e/o TIMP che si vuole analizzare. Nella tecnica della zimografia le proteine sono separate mediante elettroforesi in condizioni denaturanti [(sodio dodesil fosfato (SDS)] ma non riducenti. La separazione viene ese-

guita con gel di poliacrilamide co-polimerizzato con uno specifico substrato. Durante l'elettroforesi l'SDS denatura le MMPs che diventano inattive. Si ritiene che l'inattivazione sia dovuta allo spostamento dei residui di cisteina, in quanto l'SDS causa la dissociazione della cisteina dallo zinco. Dopo la migrazione elettroforetica, il gel viene incubato in detergente non ionico (Triton® X-100) per eliminare l'SDS. Successivamente il gel è incubato in appropriato refolding buffer che consente alle MMPs di recuperare struttura e funzioni. Durante l'incubazione, le gelatinasi attivate digeriscono la gelatina che è convertita in peptidi a basso peso molecolare che vengono eliminati dal gel mediante lavaggi. Il gel viene quindi colorato con Coomassie® blue e le gelatinasi evidenziate come bande bianche contro lo sfondo blu del substrato non degradato ed identificate in base al peso molecolare, paragonando le bande con uno standard di proteine pre-colorato e con gli enzimi purificati. Successivamente l'entità della gelatina digerita può essere quantificata usando un software per analisi delle immagini ed espressa come intensità integrata (volume) di tutti i pixels sopra il background di ogni banda. La tecnica della zimografia si basa sui seguenti principi: 1) durante la migrazione la gelatina è trattenuta nel gel; 2) l'attività enzimatica è reversibilmente inibita dall'SDS durante l'elettroforesi; 3) l'SDS determina la separazione del complesso enzima-inibitore permettendo la individuazione delle gelatinasi indipendentemente dalla presenza dell'inibitore (TIMP). Per la esecuzione della substrato zimografia la preparazione dei campioni è una tappa molto importante. I campioni non vanno bolliti perché le MMPs perdono la loro attività. Non bisogna aggiunger β-mercaptoetanolo al sample buffer perché rompe i legami disolfuro e dopo l'SDS-PAGE non è possibile il refolding e questo riduce drasticamente l'attività litica.

Gelatina zimografia

La gelatina zimografia è usata principalmente per la determinazione delle gelatinasi (MMP-2 ed MMP-9). Tale tecnica è estremamente sensibile, infatti riesce ad evidenziare livelli di 10 pg di MMP-2. Le limitazioni della gelatina-zimografia sono: a) nelle condizioni di non riduzione le caratteristiche di migrazione sono leggermente alterate; b) poiché la tecnica dissocia le gelatinasi dagli inibitori, l'attività litica osservata potrebbe essere più alta di quella *in vivo*; c) il refolding, dopo la separazione elettroforetica, recupera solo parte dell'attività originale; d) la digestione della gelatina da parte del pro-enzima è qualche volta ridotta in quanto la forma latente conserva il propeptide. Bisogna anche considerare che le MMPs possono formare complessi che rendono complicata la loro determinazione. Infatti la MMP-9 può essere associata con una proteina di 25 kDa (microglobulina) dando una banda di

~ 125 kDa e può formare dimeri o multidimeri con bande litiche a 215 e 240 kDa formando complessi che non sono dissociati nella zimografia (54). Inoltre alcune MMPs possono associarsi fra loro e formare complessi identificabili solo con specifici anticorpi utilizzando la tecnica del Western blot. Tuttavia, essendo la zimografia molto più sensibile del Western blot, è estremamente difficile trovare anticorpi abbastanza sensibili in grado di rivelare piccole concentrazioni di MMPs. Infine, si dovrebbe comunque tenere presente che altre MMPs come le collagenasi (MMP-1, MMP-8 ed MMP-13) possono digerire anche la gelatina, anche se il segnale è molto debole in quanto la gelatina non è il loro substrato preferito. In tali casi, si possono fare delle modifiche alla tecnica incorporando nell'acrilamide un substrato più appropriato come ad esempio caseina o collageno oppure aumentando il segnale aggiungendo eparina ai campioni. In ogni caso, la gelatina zimografia mostra alcuni vantaggi rispetto ai dosaggi immonologici: 1) basso costo, 2) rapidità e facilità di esecuzione, 3) elevata sensibilità, 4) consente la determinazione simultanea di entrambe le gelatinasi e la rilevazione delle diverse forme dello stesso enzima. Pertanto, nonostante le limitazioni, la gelatina zimografia è la tecnica più adatta per la determinazione delle MMPs.

Caseina zimografia

La caseina è il substrato preferito delle stromelisine (MMP-3, MMP-10, MMP-11), anche se la forma nativa della MMP-11 non presenta attività caseinolitica. Oltre alle stromelisine la caseina zimografia è utilizzabile per la determinazione delle MMP-1, MMP-,7, MMP-12 e MMP-13; ed è in grado di rilevare la MMP-9 quando nel campione è presente ad alte concentrazioni. Gli svantaggi della caseina zimografia sono: a) sensibilità molto inferiore rispetto alla gelatina zimografia; b) la caseina (PM 23 kDa), durante l'elettroforesi migra nel gel determinando la comparsa di due bande litiche: la banda più bassa contiene ancora eccesso di caseina mentre la banda più alta ne contiene poca. La migrazione anodica della caseina è un problema specialmente per le determinazioni delle MMPs che migrano vicino alla banda della caseina come ad esempio la forma latente della MMP-7 (PM 29 kDa) e la forma attivata della MMP-7 (PM 20 kDa). Tale problema può essere risolto con la premigrazione della caseina nel gel. Nella seconda migrazione del gel, la caseina non migra eliminando quindi l'interferenza con le bande delle MMPs.

La caseina zimografia rivela 1 ng di MMP-7 ricombinante pura, anche se concentrazioni $\geq$ 8 ng danno bande molto più chiare (55).

Collageno zimografia

La collageno zimografia è usata principalmente per determinare le MMP-1 ed MMP-13, anche se può rivelare la presenza di MMP-2 ed MMP-9. Come substrato si usano fibre di collageno nativo. La presenza di SDS nel gel determina la rottura della maggior parte delle fibrille del collageno e permette la migrazione delle proteine. Dopo la separazione elettroforetica, lo scambio di SDS e Triton® X-100, durante l'incubazione ripristina parte della conformazione della tripla elica del collageno permettendo quindi la degradazione da parte delle collagenasi. La collageno zimografia rivela concentrazioni di 10 pg di pro-MMP-1 e di 0,1 pg di MMP-1 attivata. L'intensità della banda di 1 pg di MMP-1 attivata equivale a 22 pg di pro-MMP-1. Pertanto, per una determinazione accurata, è necessario calibrare il segnale della forma latente e della forma attiva dell'enzima (56).

Eparina-aumentata substrato zimografia

La matrilisina 1 (MMP-7) e le collagenasi, a basse concentrazioni, sono difficilmente evidenziabili con la caseina o gelatina zimografia. E' possibile dosare la MMP-7 con la transferrina carbossimetilata zimografia, tuttavia anche con questo substrato il segnale è spesso molto basso. E' ben noto che l'attività litica aumenta in presenza di eparina. In particolare, l'aggiunta di eparina ai campioni nella substrato zimografia aumenta il segnale della forma attivata di MMP-7 di 5 volte e quello della pro-MMP-7 di 20 volte. Infatti l'eparina induce cambiamenti conformazionali, facilita il refolding, riduce l'autolisi ed aumenta l'ancoraggio della MMPs nel gel. Nel caso della pro-MMP-7 la transferrina carbossimetilata zimografia con eparina rivela 30 pg /lane di enzima rispetto ai 750 pg/lane in assenza di eparina. L'aggiunta di eparina nella gelatina zimografia aumenta di circa 5 volte l'attività della MMP-1 e della MMP-13.

Reverse zimografia

La reverse zimografia è una tecnica modificata della zimografia che consente la determinazione degli inibitori tissutali specifici (TIMPs) delle matrixine (57). Oltre alla gelatina, nella zimografia può essere incorporata anche una metalloproteinasi. Di solito, per la reverse zimografia, nel gel viene incorporata la MMP-2 poiché tale metalloproteinasi è efficacemente inibita dai quattro TIMPs. Dopo l'elettroforesi, durante la fase di attivazione la gelatina può essere digerita solo dalla MMP-2 nella zona dove è assente

l'inibitore in quanto il TIMP forma con la MMP-2 un complesso equimolare (1:1) che inibisce l'azione litica dell'enzima e la gelatina non viene digerita. Dopo colorazione con Coomassie® Blue, il gel si presenta incolore con bande blu corrispondenti ai TIMPs. La presenza di SDS nel gel dissocia tutti i TIMPs legati alle MMPs e pertanto la tecnica dosa la quantità totale di tutti i TIMPs presenti nel campione. Per l'analisi della reverse zimografia è necessario discriminare tra le bande dei TIMPs e le proteine presenti nel campione che vengono colorate con il Coomassie® Blue. Allo scopo di evitare interferenze con le proteine endogene, i campioni dovrebbero essere sottoposti all'elettroforesi diluiti a concentrazioni che non permettano la rivelazione di tali proteine. Pertanto, è necessario usare come controllo un normale SDS-PAGE gel eseguito nelle identiche condizioni, le bande che compaiono nella reverse zimografia, ma che non sono visibili nel SDS-PAGE devono essere TIMPs. Inoltre, per ottenere una reverse zimografia attendibile è necessario ottimizzare la concentrazione della gelatina e della gelatinasi perché queste aumentano significativamente la sensibilità del dosaggio. Recentemente, utilizzando un substrato marcato con fluorosceina isotiocianato (FITC) è stata sviluppata la metodica della real-time zimografia e reverse zimografia. Con tali metodiche è possibile monitorare la degradazione del substrato in cinetica con un trans-illuminatore e la sensibilità è molto più alta.

In situ zimografia

La *in situ* zimografia permette la localizzazione tissutale delle MMPs. E' un adattamento della substrato zimografia eseguibile su sezioni di tessuto congelato e non fissato (58). Nella *in situ* zimografia il substrato deposto sotto o sopra la sezione di tessuto viene digerito dalle MMPs attivate in modo tempo e dose dipendente. La degradazione del substrato è rilevata con il microscopio ottico oppure con il microscopio a fluorescenza in base al tipo di substrato utilizzato. Ad esempio, per rilevare l'attività gelatinolitica viene usata una emulsione fotografica contenente gelatina e il buffer di attivazione delle MMPs, durante l'incubazione la mistura viene esposta alla luce e successivamente a procedimento fotografico. L'emulsione fotografica contiene cristalli di argento alogenuro che vengono dispersi uniformemente dalla gelatina. I reagenti chimici possono raggiungere i cristalli quando la gelatina non è degradata dalle MMPs. Questo determina un cambiamento chimico dei cristalli che formano una immagine nera. Nel caso in cui la gelatina è degradata i reagenti chimici non sono in grado di penetrare l'emulsione sullo spot e la macchia appare bianca. Quindi l'attività delle MMPs può essere osservata al microscopio ottico come una macchia bianca sul fondo nero del substrato non degradato. Quando si usa un substrato fluorescente la degradazione del

substrato determina perdita della fluoresecenza e le MMPs sono evidenziate come macchie scure su un background fluorescente. Una modificazione più sensibile di questo metodo è quella che utilizza un substrato fluorescente raffreddato. L'azione litica delle MMPs su tale substrato determina la formazione di macchie fortemente fluorescenti su background nero.

Funzioni fisiopatologiche delle MMPs

Le ricerche sulle MMPs sono iniziate dalla scoperta che l'attività gelatinolitica è responsabile del riassorbimento della coda durante la metamorfosi del girino (59). Storicamente la principale funzione delle MMPs è la degradazione dei componenti strutturali della MEC e della membrana basale favorendo in tal modo la migrazione cellulare. Va tuttavia osservato che le cellule presentano recettori per i componenti strutturali della MEC (es. integrine) per cui il taglio proteolitico della MEC produce anche effetti sui segnali e sulle funzioni cellulari (1, 60). Infatti, il taglio dei componenti della MEC può generare frammenti con nuove funzioni: ad esempio il taglio del perlecan aumenta la disponibilità del fibroblast growth factor 2 (FGF-2) che stimola la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali mentre il taglio del plasminogeno e del collageno XVIII determina la formazione di due fattori anti-angiogenici (angiostatina ed endostatina rispettivamente). Inoltre, le MMPs sono coinvolte nei meccanismi di rilascio di precursori dei fattori di crescita tra cui il transformig growth factor α e β (TGFα e TGFβ); agiscono su diversi tipi di substrato tra cui molecole di adesione cellulare, proteine leganti i fattori di crescita, recettori per i fattori di crescita, chemiochine, interleuchine, ligandi apoptotici, fattori angiogenici ecc. La diversità strutturale dei componenti della famiglia delle MMPs, la identificazione di nuovi substrati e lo sviluppo di modelli animali geneticamente modificati con aumento o perdita delle matrixine hanno dimostrato la rilevante importanza di queste proteasi in molti processi fisiopatologici (61).

L'espressione delle MMPs è stata ben documentata in molte tappe dello sviluppo dei mammiferi, dall'impianto dell'embrione alla morfogenesi dei vari tessuti, (polmone, osso, ghiandola mammaria ecc.). Mediano l'ovulazione e sono espresse in modo coordinato durante il ciclo mestruale, partecipano nel normale continuo modellamento e rimodellamento dei tessuti connettivi. Altri processi fisiopatologici che coinvolgono l'espressione di abbondanti quantità di MMPs secondo specifiche locazioni spaziali e temporali includono la crescita e la rimarginazione delle ferite. Allo stesso modo molti processi patologici (come cancro, malattie cardiovascolari, artriti ecc.) mostrano uno specifico pattern dell'espressione delle MMPs.

Sono stati sviluppati molti modelli animali di malattia e studiati per quanto concerne il ruolo delle MMPs nella progressione della malattia. Questi studi hanno reiterato che l'importanza dei profili di espressione delle MMPs varia con la natura delle cellule, lo stadio della malattia ed il patrimonio genetico dell'animale. L'inattivazione di specifici geni nei topi ha presentato

quadri piuttosto differenti. I topi con deficit di MMP-9 presentano lieve ritardo nella crescita delle ossa e dello sviluppo; quelli con genotipo MT1-MMP *null* manifestano fenotipo con gravi alterazioni (nanismo, osteoporosi, artrite, sinovite fibrotica) e bassa sopravvivenza (27). Viceversa, l'embriogenesi e la conseguente crescita sono relativamente normali in assenza di MMP-2, MMP-7, MMP-11, MMP-12, indicando che le MMPs hanno un ruolo minore nell'embriogenesi sebbene sia possibile che la ridondanza delle funzioni delle MMPs possa compensare l'assenza del gene e che vi sia un adattamento allo sviluppo.

Le MMPs svolgono un ruolo di primaria importanza nell'angiogenesi ed agiscono con meccanismi abbastanza complessi (28). Molte metallo-proteinasi sono prodotte dalle cellule endoteliali e sono fondamentali nella formazione di nuovi vasi sia in condizioni fisiologiche che patologiche. In particolare, molte MMPs agiscono come fibrinolisine pericellulari ed hanno un duplice effetto di attivazione ed inattivazione (mobilitano ed attivano oppure inattivano i fattori angiogenici). La MMP-2 associata alla integrina $\alpha v\beta 3$ è essenziale per la localizzazione dell'enzima sui nuovi vasi. I topi MMP-2 *null,* rispetto ai topi wild-type, mostrano ridotta vascolarizzazione. La MMP-2 agisce in sinergia con la MMP-9 nel processo di neoangiogenesi. Le MMPs promuovono l'angiogenesi aumentando la biodisponibilità dei fattori di crescita pro-angiogenici, [fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), fibroblast growth factor 2 (FGF-2), fattore di crescita trasformante β (TGF-β)] che stimolano la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali. In aggiunta, le MMPs promuovono l'invasione delle cellule endoteliali agendo con taglio proteolitico su alcuni componenti strutturali del MEC come il collageno tipo I (Col-I), il collageno tipo IV (Col-IV) e la fibrina. Il Col-IV tagliato promuove la neoangiogensei legandosi alla integrina $\alpha v\beta 3$. D'altro canto le MMPs inibiscono la formazione di nuovi vasi in quanto attraverso il taglio proteolitico del plasminogeno e del collageno XVIII determinano la formazione di angiostatina e endostatina (due inibitori endogeni dell'angiogenesi). L'endostatina agisce bloccando l'attivazione del sito catalitico di MMP-2, MMP-9, MMP-13 e MT1-MMP. Inoltre, le MMPs potrebbero essere coinvolte nella generazione della tumstatina, un frammento del Col-IV, avente azione inibente sull'angiogenesi. Un altro substrato delle MMPs è il recettore attivatore della urochinasi tipo plasminogeno (uPAR) sulla superficie delle cellule endoteliali. Tale recettore è richiesto per l' invasione delle cellule epiteliali *in vitro* e pertanto potrebbe essere un fattore responsabile della inibizione dell'angiogenesi

MMPs e malattie vascolari

Le MMPs svolgono un ruolo chiave in molte malattie vascolari (4): sono coinvolte nell'ispessimento della tonica intima nella risposta riparatrice al danno della parete delle grandi arterie, nell'aterosclerosi umana come pure

nella conseguente rottura delle placche. Quindi, il concetto di "buono" e di "cattivo" per le MMPs può essere evocato nelle malattie cardiovascolari come nel cancro. Esperimenti *in vivo* con gene knockout mice hanno dimostrato che la MMP-2 e la MMP-9 svolgono un ruolo chiave nella rottura cardiaca dopo infarto del miocardio. La MT1-MMP (MMP14) è aumentata dopo riperfusione ischemica. Nei topi con deficit di TIMP-3 si osservano alterazioni dell'omeostasi della matrice, spontanea dilatazione del ventricolo sinistro, ipertrofia dei cardiomiociti, e disfunzione contrattile. La MMP-2 e la MMP-9 sono coinvolte nello sviluppo dell'aneurisma dell'aorta addominale. La MMP-3 e la MMP-9 limitano la crescita delle placche aterosclerotiche e ne aumentando la stabilità svolgendo quindi un ruolo protettivo. Viceversa la MMP-12 promuove l'espansione e la destabilizzazione delle placche. Attualmente, per le patologie vascolari, l'opinione più accreditata è che vi sia induzione multi-steps dei geni delle MMPs. Un ampio spettro di metalloproteinasi, incominciando da MMP-2 e -9, passando per MMP-1, -12 e -14 seguito da MMP-3, -11, e -13, alla fine portano alla transizione dal turnover alla distruzione della matrice extracellulare.

MMPs ed artrite

L'espressione delle MMPs nella membrana della sinovia, cartilagine, tendini ed ossa delle giunture sinoviali sia nella artrite reumatoide che nella osteoartrite è ben documentata e spesso si correla con la distruzione dei tessuti (33). In entrambe le malattie, i mediatori dell'infiammazione stimolano la produzione delle MMPs che degradano molti componenti della MEC. Le collagenasi, MMP-1 ed MMP-13, sono prodotte dai fibroblasti sinoviali ed i macrofagi ed i condrociti hanno importante ruolo nell'artrite reumatoide e nella osteoartrite in quanto limitano la velocità nel processo di degradazione del collageno (62). L'utilizzo di anticorpi che riconoscono gli aminoacidi N-terminali generati dalla proteolisi al sito specifico del collageno tipo II è stato prezioso per identificare le proteinasi responsabili della rottura della cartilagine sia *in vitro* che *in vivo*. Studi preliminari con saggi quantitativi del collageno tipo II neo-epitopo suggeriscono che possono essere utili biomarcatori delle malattie articolari umane. Le MMP-8 e -14 sono collagenasi espresse dalle cellule all'interno dell'articolazione sinovia, ma il loro preciso contributo alla degradazione del collageno non è stato ancora bene stabilito. La MMP-13 degrada le molecole del proteoglicano e dell'aggrecan, conferendo un duplice ruolo alla distruzione della matrice. Le MMP-2, -3, -9, -10 e -19 sono elevate nell'artrite ed insieme con la MMP-13 degradano i componenti non collageni della matrice extracellulare delle articolazioni. Molte MMPs sono state associate con il turnover della matrice dell'osso, coinvolgendo virtualmente tutti i tipi di cellule presenti. Le MMPs collagenolitiche svolgono un ruolo importante nelle funzioni degli osteoblasti. Viceversa negli osteoclasti

la principale proteinasi collagenolitica sembra essere la catepsina K (proteinasi cisteina) che può funzionare nella zona di riassorbimento fagolisosomiale acido degli osteoclasti. Infine, le MMP-1, -2, -3, -9, -12, 13 sono coinvolte nel riassorbimento osteoclastico in situazioni patologiche in quanto degradano varie proteine non collagenose della matrice dell'osso e chiaramente svolgono azioni che vanno oltre il semplice taglio proteolitico della MEC.

Ruolo delle MMPs nella progressione neoplastica

Per molti anni le ricerche di base sulla patogenesi tumorale sono state rivolte alla identificazione di mutazioni delle cellule cancerose che determinano acquisizioni e/o perdita di alcune funzioni cellulari. Più recentemente, è stato osservato che la MEC dei tumori e le cellule stromali all'interno del tumore hanno un ruolo importante nella progressione tumorale. Infatti è stato dimostrato che lo stroma tumorale è direttamente collegato con il comportamento biologico della neoplasia (5). La capacità delle cellule maligne di distruggere la membrana basale e gli altri componenti della MEC è associata al potenziale invasivo della neoplasia. La MEC influenza il comportamento delle cellule neoplastiche attraverso molti meccanismi correlati alla proliferazione cellulare, progressione ed invasione. Inoltre, tale struttura può avere un ulteriore ruolo attivo durante la carcinogensi inducendo l'angiogenesi (28). Durante il processo di invasione tumorale, le cellule neoplastiche attraversano due tipi di matrici (la membrana basale e lo stroma interstiziale) e le reazioni biochimiche tra cellule normali e MEC influenzano il processo dell'invasione tumorale nelle neoplasie. I componenti della MEC contribuiscono direttamente o indirettamente al processo tumorale, grazie al fatto che la struttura ha potenzialmente componenti anti-adesione, modulatori dell'adesione, della proliferazione e della migrazione cellulare. Inoltre la MEC può regolare il comportamento cellulare attraverso diversi meccanismi: a) attraverso la composizione delle proteine in uno specifico tessuto, b) mediante l'interazione sinergica tra fattori di crescita e molecole di adesione o mediante recettori cellulari che mediano l'adesione dei componenti. Pertanto molto dipende dal microambiente tumorale che può essere regolato da enzimi che agiscono sui componenti della MEC. Tra i moltissimi enzimi proteolitici presenti nei tessuti umani e potenzialmente associati all'invasione tumorale, i componenti della famiglia delle matrix-metalloproteinasi hanno interessato molti studiosi grazie alla loro capacità di tagliare potenzialmente tutti i componenti della matrice interstiziale e della membrana basale, permettendo alle cellule di penetrare ed infiltrare i tessuti circostanti. Inoltre diversi studi hanno dimostrato che il ruolo delle MMPs nello sviluppo e nella progressione tumorale è molto più complesso della semplice azione di degradazione della matrice extra-cellulare (5). Infatti i substrati su cui agiscono le MMPs sono molto numerosi e comprendono recettori dei fattori di crescita, molecole di adesione cellulare, chemochine, citochine, ligandi apoptotici, fattori angiogenici. Pertanto tali enzimi sono coinvolti in molte

tappe dello sviluppo neoplastico. La progressione tumorale maligna è un processo multi-tappe in cui le cellule normali subiscono alterazioni genetiche, perdono il normale controllo proliferativo, invadono e colonizzano il tessuto circostante e gli organi bersaglio distanti. I tumori intra-epiteliali benigni e maligni hanno la membrana basale, che separa l'epitelio neoplastico dal tessuto connettivo stromale, intatta. Viceversa, i tumori epiteliali maligni hanno dissolto la membrana basale e quindi le cellule neoplastiche possono invadere lo stroma sottostante. La tappa iniziale dell'invasione tumorale è la mancanza della membrana basale intatta. In generale, l'invasione delle cellule tumorali attraverso la membrana basale avviene in tre tappe: 1) le cellule neoplastiche aderiscono alla superficie interna della membrana basale, 2) producono enzimi proteolitici che dissolvono la membrana basale, 3) attraversano la membrana basale e diffondono nel tessuto connettivo stromale adiacente. Le tappe di adesione, degradazione ed invasione sono ripetute nella MEC durante la crescita e la diffusione tumorale. Un tumore maligno per diffondere in altre parti del corpo deve per prima cosa invadere la parete dei vasi sanguigni e linfatici. Le cellule tumorali sono quindi trasportate nel circolo sanguigno e linfatico, si attaccano in un sito distante e degradano la membrana basale e la MEC al sito della metastasi. In generale, la localizzazione anatomica del tumore primario determina il sito delle metastasi. Inoltre, per continuare la crescita di un tumore è richiesta la formazione di nuovi vasi e quindi i fattori inducenti linfo-angiogenesi hanno un ruolo importante nella formazione delle metastasi. Per l'invasione delle cellule maligne è essenziale la degradazione dei collageni della MEC da parte delle MMPs, in particolare le collagenasi che hanno un importante ruolo nel taglio dei collageni fibrillari interstiziali tipo I, II e III. E' evidente che non solo le cellule maligne ma anche i fibroblasti stromali e le cellule infiammatorie producono MMPs in risposta a diversi fattori esogeni, come citochine e promotori tumorali. Tutto questo potrebbe contribuire al rimodellamento proteolitico della MEC peritumorale. Numerosi studi hanno dimostrato che le collagenasi sono sovraespresse nei tumori maligni rispetto ai tessuti normali, suggerendo un ruolo nella invasione neoplastica. (63). La MMP-1 (collagenasi 1) è espressa dalle cellule tumorali e dai fibroblasti dello stroma adiacente al tumore in risposta a fattori stimolanti prodotti dalle cellule tumorali. E' espressa al sito invasivo del tumore, è sovraespressa in diversi tipi di cancro ed è associata a prognosi sfavorevole nei carcinomi del tratto gastro-intestinale (esofago, stomaco, colonretto), nel melanoma metastatico e nell'adenocarcinoma del pancreas. Inoltre, elevati livelli dell'espressione della MMP-1 sono stati trovati nelle cellule tumorali della mammella con elevata capacità metastatica all'osso (64). La MMP-8 (collagenasi 2) è principalmente espressa dai neutrofili nelle reazioni infiammatorie per aiutare i neutrofili a migrare attraverso la membrana basale ed il tessuto connettivo e nei tumori maligni del capo-collo e dell'ovaio.

La sua espressione si correla con il grado e lo stadio dei tumori ovarici ed è aumentata dalle citochine infiammatorie. E' la più efficiente collagenasi nella degradazione del tessuto connettivo e pertanto potrebbe essere importante nelle proteolisi del tessuto connettivo associata con la invasione e diffusione dei carcinomi a cellule squamose. Tuttavia, il ruolo della MMP-8 nella progressione tumorale è duplice (aumento ma anche diminuzione); infatti nei topi con deficit di MMP-8 si osserva aumento dell'incidenza dei tumori della pelle indotti da agenti chimici (65). Questo potrebbe essere dovuto al fatto che la MMP-8 è un mediatore della risposta (processo proteolitico) infiammatoria e quindi contribuisce alla difesa antitumorale del soggetto. La MMP-13 (collagenasi 3) è espressa in molte neoplasie invasive [carcinoma mammario, carcinoma a cellule squamose (SCC) di testa-collo, vulva, esofago, condrosarcoma, melanoma primario e metastatico]. Nei carcinomi a SCC, la MMP-13 è espressa dalle cellule neoplastiche situate al margine invasivo e dai fibroblasti dello stroma tumorale. Tuttavia non è espressa nelle lesioni epidermiche premaligne, nei cheratinociti normali in coltura, nell'epidermide intatta *in vivo*, né durante la riparazione delle ferite. Pertanto, la MMP-13 sembra essere un marcatore di trasformazione delle cellule epiteliali squamose. Infine non è espressa in molti tessuti normali e pertanto la sua inibizione sembra essere una strategia anticancro sicura ed importante.

Diversi studi sperimentali hanno mostrato che l'espressione delle gelatinasi A e B (MMP-2 ed MMP-9) è aumentata in molti tipi di tumori tra cui le neoplasie della mammella, polmone, ovaio, prostata, vescica, colon-retto, melanoma ecc. Pertanto, la determinazione delle gelatinasi nel sangue o nelle urine è stata raccomandata come utile strumento per la caratterizzazione dei processi neoplastici (66) ed è stato proposto il loro utilizzo come marcatori tumorali. In particolare, la correlazione tra il contenuto urinario di gelatinasi e cancro della vescica è attendibile poiché lo stesso tumore è in diretto contatto con le urine. Studi condotti nel nostro laboratorio, hanno dimostrato che le gelatinasi, dosate con la metodica della gelatina-zimografia, sono presenti nelle urine di molti soggetti con cancro della vescica (Fig. 11), mentre l'attività gelatinolitica è minima nelle urine degli individui sani e che la gelatinasi B (MMP-9) è presente nella maggior parte dei campioni patologici, mentre la gelatinasi A (MMP-2) è espressa solo in pochi campioni. Inoltre, il contenuto di MMP-9, espresso come la densità integrata di tutti i pixels di ogni banda, è aumentato nelle urine dei soggetti con cancro della vescica scarsamente differenziato (grado G3) e con alto numero di cellule maligne (67). In cellule tumorali in coltura (da cancro della vescica), il fattore di crescita epidermico (EGF) induce l'espressione della MMP-9 ma non della MMP-2. L'aumento, *in vivo*, della attività gelatinolitica della MMP-9 si correla con lo stadio avanzato del tumore ma non con l'aumento dell'EGF (68). Viceversa, l'aumento della MMP-9 si correla con l'aumento della telomerasi urinaria e la determinazione

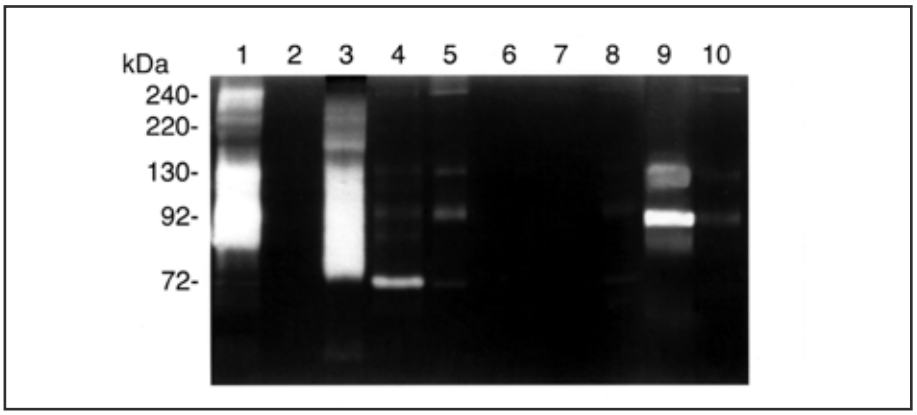


Figura 11. Gelatina-zimografia di urine di soggetti con cancro della vescica. I pesi molecolari sono indicati a sinistra. Linea 1, cancro della vescica T4 G3; linea 2, cancro della vescica T4 G3 in presenza di 20 mM EDTA (selettivo inibitore delle MMPs); linea 3, cancro della vescica T1 G3; linea 4, cancro della vescica Ta G1; linea 5, cancro della vescica Ta G2; linea 6, cancro della vescica T4 G3 in presenza di 1.10 fenatroline 10 mM (selettivo inibitore delle MMPs); linea 7, cancro della vescica T1 G3 in presenza di 1.10 fenatroline 10 mM (selettivo inibitore delle MMPs); linea 8, cancro della vescica T1 G2; linea 9, cancro della vescica T3 G3; linea 10, cancro della vescica Ta G1. Linee 1, 2 e 6 stesso paziente. Linee 3 e 7 stesso paziente).
Preparazione delle urine. Sulle urine della prima minzione mattutina è stato eseguito l'esame chimico fisico ed i campioni positivi per leucociti e con evidente ematuria sono stati esclusi. Una aliquota (15 ml) è stata centrifugata a 3200 rpm per 10 min a 4°C. Sul supernatante è stata determinata la creatinuria. Un'aliquota del sopranatante (2 ml) è stata dializzata over night contro H20 distillata in tubo da dialisi con cut-off di peso molecolare di Mr 3500. Dopo la dialisi le urine sono state centrifugate a 3200 rpm per 10 min a 4°C, il supernatante raccolto e usato per la determinazione delle gelatinasi.
Gelatina zimografia. La zimografia è stata eseguita utilizzando gel di poliacrilamide (7,5%) contenente 0,1% di gelatina. La quantità di urine caricata sul gel era compresa tra 2 e 12 µl in base al contenuto di creatinuria. Il peso molecolare delle bande litiche è stato stabilito mediante comparazione con standards di proteine precolorato e con gelatinasi A e B purificate.

di entrambi questi due indicatori è risultata più efficace (maggiore sensibilità) della citologia nella rilevazione delle neoplasie della vescica (69). Altri autori hanno osservato che le gelatinasi urinarie possono essere associate con altri tumori solidi (70, 71) comprendenti carcinoma prostatico, renale e mammario e che spesso l'aumento dell'attività gelatinolitica si associa alla presenza di metastasi. In particolare, Fernandez et al. hanno riportato che in circa il

90% delle urine di donne con cancro della mammella è presente il complesso MMP-9/lipocalin e che la lipocalin potrebbe giocare un importante ruolo *in vivo*, proteggendo la MMP-9 dalla degradazione, aumentando l'attività enzimatica e favorendo la crescita tumorale e l'angiogenesi (72). Inoltre, è stato riportato che la determinazione della MMP-2 ed MMP-9 nelle urine non è una indagine adeguata per lo screening delle neoplasie ginecologiche (cervice, endometrio, ovaio, vulva) (73).

Dopo la secrezione locale le gelatinasi raggiungono il siero con un meccanismo non ancora completamente elucidato ed i livelli sierici sono aumentati in diversi tipi di cancro. A differenza della maggior parte degli indicatori biochimici di neoplasia, i livelli sierici delle gelatinasi non sono indice della grandezza del tumore, ma sembrano essere correlati ad altre caratteristiche del tumore come ad esempio la invasività oppure alla presenza di cellule neoplastiche ad alto potenziale maligno. Il nostro gruppo ha osservato che la maggior parte dei sieri di soggetti con cancro presenta attività gelatinolitica corrispondente alla MMP-9 di più forte intensità rispetto ai sieri controllo (Fig. 12, 13, 14) e che la ratio MMP-9/MMP-2 è aumentata nei soggetti con cancro del polmone e della mammella rispetto ai soggetti controllo (74). In molti tipi di cancro, l'aumento dei livelli sierici delle gelatinasi è stato correlato positivamente con elevata incidenza di metastasi, e pertanto sono state considerate un affidabile indice prognostico (26, 75, 76). Alti livelli sierici di MMP-9 sono legati a rapida progressione, bassa sopravvivenza e formazione di mestastasi nei pazienti con melanoma. L'attività sierica della MMP-9 è aumentata nei carcinomi a cellule squamose (77) e ne è stato suggerito l'utilizzo per il monitoraggio di tali neoplasie. In un modello sperimentale per metastasi spontanee da carcinoma mammario dei ratti, i livelli plasmatici di MMP-9 sono associati con lo sviluppo e la crescita di metastasi nel polmone e nei linfonodi (78). I livelli sierici della MMP-2, nel cancro della prostata, sembrano essere correlati con l'estensione della massa tumorale (79). Queste caratteristiche implicherebbero la presenza di forme attive dell'enzima e/o di attività enzimatica delle gelatinasi plasmatiche. Comunque, le MMPs solubili sono state trovate principalmente nella forma di pro-enzima (76) o complessate con gli inibitori naturali delle metalloproteinasi come TIMPs o α2-macroglobulina (80). Pertanto il preciso e definitivo contributo funzionale delle gelatinasi plasmatiche nella progressione neoplastica rimane tuttora oscuro. Inoltre, la sovraespressione delle singole MMPs è spesso accompagnata dall'aumento dello specifico inibitore. Quindi, è fondamentale identificare l'esatto ruolo fisio-patologico delle gelatinasi circolanti per poterne chiarire il potenziale utilizzo come marcatori tumorali. Per quanto concerne le neoplasie epatiche, Hayasaka et al. hanno determinato, con saggio immunoenzimatico, i livelli sierici di MMP-9 in soggetti con epatocarcinoma (HCC) e li hanno comparati con le caratteristiche cliniche della neoplasia. In tale studio, nei soggetti con

HCC, i livelli plasmatici della MMP-9 sono risultati più alti rispetto a quelli dei soggetti con malattie epatiche non tumorali (epatite cronica, cirrosi epatica). In particolare, le concentrazioni della MMP-9 sono particolarmente alte nei pazienti con HCC con invasione macroscopica della vena porta rispetto ai pazienti con HCC ma senza invasioni. Tuttavia, i livelli plasmatici della MMP-9 non si correlano né con la grandezza del tumore né con le concentrazioni sieriche della α feto-proteina (AFP). Pertanto tali dati potrebbero indicare la MMP-9 come un indicatore biochimico nuovo ed indipendente per l'epatocarcinoma in grado di evidenziare alcune caratteristiche biologiche della neoplasia e precisamente il potenziale invasivo e le capacità neoangiogeniche (81). Per quanto concerne le metastasi, Ishida et al. hanno riportato che le concentrazioni della MMP-9 nel sangue periferico sono aumentate nei soggetti con adenocarcinoma del colon rispetto a quelle dei soggetti controllo, ma tale aumento non si correla né con il grado istologico né con lo stadio di Dukes. Viceversa, nel sangue portale, i livelli della MMP-9 si correlano con gravi fattori patologici della neoplasia tra cui caratteristiche infiltrative del tumore primario, avanzato stadio di Dukes, presenza di metastasi epatiche e linfonodali (82) suggerendo che la MMP-9 potrebbe aiutare a selezionare i soggetti ad alto rischio di metastasi epatiche. Per quanto concerne il contenuto tissutale delle MMPs, in uno studio quantitativo è stato riportato che la proMMP-2 e la proMMP-9 (forme inattive) e la MMP-2 ed MMP-9 (forme attive) sono presenti sia nel tessuto epatico metastatico che nel tessuto epatico normale, ma i livelli di entrambe le forme (attive e latenti) sono più alti nei tessuti metastatici rispetto al fegato normale. Inoltre l'aumento dell'attività enzimatica nel tessuto metastatico sembra essere parallela all'aumento dei rispettivi mRNA ed entrambe le gelatinasi sono sfavorevolmente associate a ricorrenza precoce della malattia (83).

Le MMPs sono dosabili anche in altri liquidi biologici come liquido pericardico, liquido ascitico, liquido pleurico, liquido cefalorachidiano. In particolare, la determinazione delle MMPs nelle effusioni pleuriche potrebbe rappresentare un metodo alternativo non-invasivo per stabilire la diagnosi e definire la prognosi. Studi condotti nel nostro laboratorio hanno mostrato la costante presenza di discrete quantità di MMP-2 nelle effusioni pleuriche di soggetti con patologie maligne (carcinoma di: mammella, polmone, ovaio e colon) e di soggetti con patologie benigne (pleurite e cirrosi), mentre le concentrazioni di MMP-9 sono risultate inferiori. In tale studio, è stata osservata anche lieve attività litica corrispondente alle forme attive sia della MMP-2 che della MMP-9. L'attività litica associata alla MMP-2 è aumentata nelle effusioni di soggetti con patologie benigne rispetto ai soggetti con patologie maligne. La MMP-9 è presente nella maggior parte delle effusioni maligne anche se i livelli sono più alti nelle pleuriti ed è assente nei soggetti con cirrosi (Fig.15, 16) (84). Altri autori hanno osservato che i livelli della MMP-9 sono aumentati

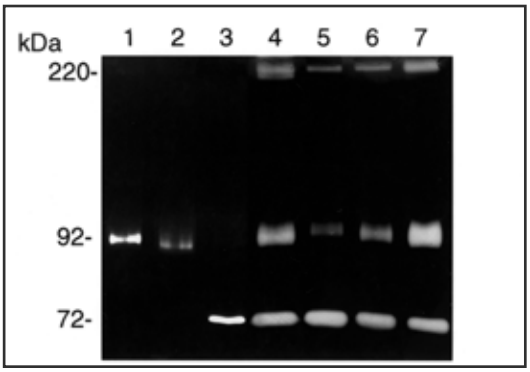


Figura 12. Gelatina-zimografia di gelatinasi purificate e di sieri. La zimografia è stata eseguita utilizzando gel di poliacrilamide (7,5%) contenente 0,6% di gelatina. I pesi molecolari sono indicati a sinistra. La quantità di siero utilizzata nel gel è stata di 25 μg di proteine per tutti i campioni. Linea 1, gelatinasi B (MMP-9, 92 kDa) 20 μU; linea 2, gelatinasi B (MMP-9, 92 kDa) 10 μU; linea 3, gelatinasi A (MMP-2, 72 kDa) 120 mU. Linee 4-5, cancro della mammella; linea 6, adenocarcinoma del polmone; linea 7, carcinoma epidermoide del polmone.

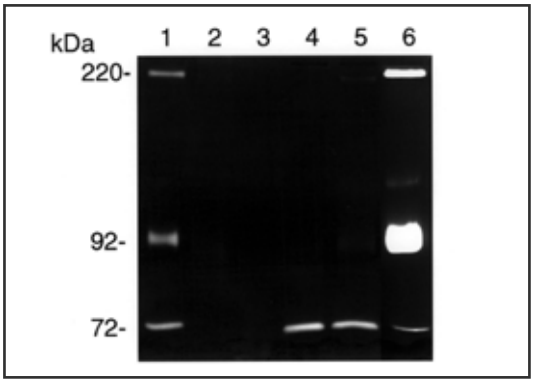


Figura 13. Gelatina-zimografia di gelatinasi purificate e di sieri. La zimografia è stata eseguita utilizzando gel di poliacrilamide (7,5%) contenente 0,6% di gelatina. I pesi molecolari sono indicati a sinistra. La quantità di siero utilizzata nel gel è stata di 25 μg di proteine per tutti i campioni. Linea 1, pleurite; linea 2, pleurite in presenza di EDTA 20 mM (selettivo inibitore dell'attività delle MMPs); linea 3, carcinoma epidermoide del polmone in presenza di 1.10 fenatroline (selettivo inibitore dell'attività delle MMPs); linea 4, siero controllo in presenza di PMSF (inibitore delle serine proteasi che non agisce sull'attività litica delle MMPs); linea 5, siero controllo (stesso soggetto della linea 4); linea 6, carcinoma epidermoide del polmone (stesso paziente della linea 3).

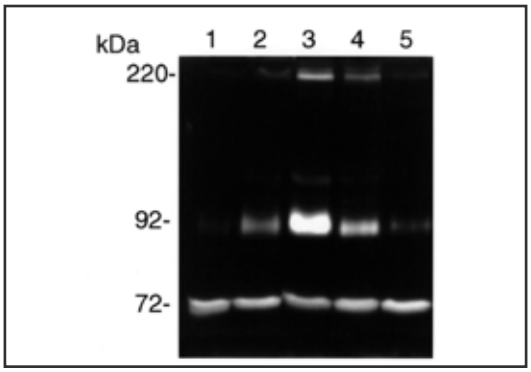


Figura 14. Gelatina-zimografia di gelatinasi purificate e di sieri. La zimografia è stata eseguita utilizzando gel di poliacrilamide (7,5%) contenente 0,6% di gelatina. I pesi molecolari sono indicati a sinistra. La quantità di siero utilizzata nel gel è stata di 25 μg di proteine per tutti i campioni. Linea 1, siero controllo; linea 2, pancreatite; linea 3, carcinoma epidermoide del polmone; linea 4, cancro della mammella; linea 5, siero controllo.

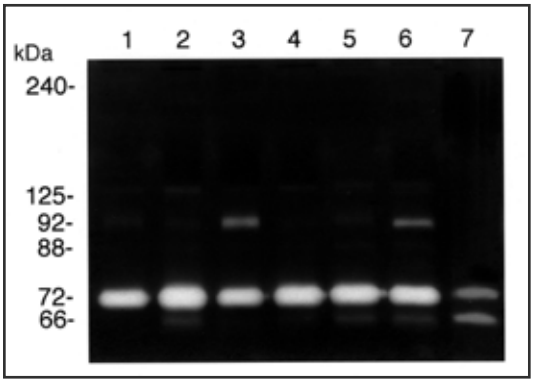


Figura 15. Gelatina-zimografia di liquidi pleurici e di gelatinasi A purificata. La zimografia è stata eseguita utilizzando gel di poliacrilamide (7,5%) contenente 0,1% di gelatina. I pesi molecolari sono indicati a sinistra. La quantità di liquido pleurico utilizzata nel gel è stata di 15 μg di proteine per tutti i campioni. Linee 1-6, cancro della mammella; linea 7, gelatinasi A (MMP-2) 120 mU.

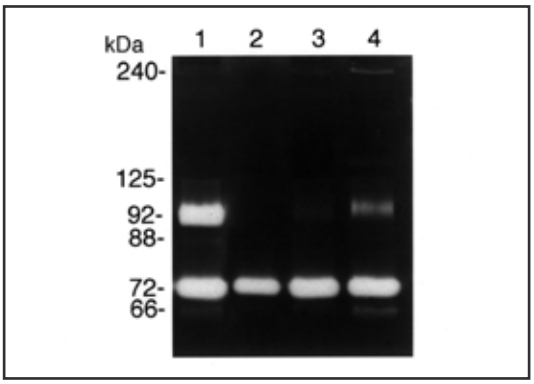


Figura 16. Gelatina-zimografia di liquidi pleurici e di gelatinasi A purificata. La zimografia è stata eseguita utilizzando gel di poliacrilamide (7,5%) contenente 0,1% di gelatina. I pesi molecolari sono indicati a sinistra. La quantità di liquido pleurico utilizzata nel gel è stata di 15 μg di proteine per tutti i campioni. Linea 1, pleurite; linea 2 e linea 3, cirrosi; linea 4, pleurite.

nelle effusioni parainfiammatorie e tali aumenti si correlano con i valori della proteina C reattiva (un marcatore sistemico dell'infiammazione) (85). Inoltre, Davidson et al. hanno osservato aumentati livelli di MMP-2 nelle cellule ottenute da effusioni pleuriche di soggetti con carcinoma dell'ovaio e della mammella e tali aumenti si correlano con prognosi negativa (86, 87).

MMPs e le caratteristiche del cancro

Nella fisiologia cellulare sei alterazioni fondamentali caratterizzano la progressione neoplastica: auto-supporto nei segnali di crescita, insensibilità agli inibitori della crescita, evasione dall'apoptosi, infinite replicazioni, formazione di nuovi vasi, invasione tissutale e metastasi. Inizialmente, le MMPs sono state considerate importanti quasi esclusivamente nell'invasione e nelle metastasi. Attualmente è stato ben documentato che le matrixine sono coinvolte in molte tappe dello sviluppo neoplastico (crescita, sopravvivenza, angiogenesi, invasione, differenziazione, evasione dalla sorveglianza immunologica). Le MMPs possono sia stimolare che inibire lo sviluppo neoplastico ed i pathways con effetti opposti sulla progressione neoplastica a volte sono iniziate dal taglio proteolitico della stessa sostanza (24).

Reazioni infiammatorie e neoplasie

Nelle neoplasie le reazioni infiammatorie sono una componente molto importante. Il sistema immunitario è in grado di riconoscere ed attaccare le cellule tumorali e probabilmente ritarda la progressione tumorale. Tuttavia, l'infiammazione cronica è anche associata con i tumori di pelle, mammella, prostata, ovaio, mucosa gastrica, colon-retto, fegato, vescica. Questo può esse-

re dovute a due motivi: A) le cellule infiammatorie sintetizzano molte MMPs (tra cui le MMP-9, -12 e -14) e pertanto possono stimolare la progressione tumorale. B) le cellule tumorali hanno sviluppato molti sistemi per evadere la sorveglianza immunologica e le MMPs sono coinvolte nei meccanismi di evasione. Per quanto concerne il punto A è noto che, in modelli animali le mast cellule, i neutrofili ed i macrofagi contribuiscono alla progressione tumorale (88) e che topi propensi a sviluppare tumori della pelle, se geneticamente modificati in MMP-9 *null*, hanno ridotta incidenza a sviluppare tumori, ma il trapianto di midollo osseo con cellule che esprimono MMP-9 ripristina la carcinogenesi.

Per quanto concerne il ruolo delle MMPs nell'evasione della sorveglianza immunologica va detto che: le MMPs (incluso la MMP-9) possono inibire le reazioni e la proliferazione e dei linfociti T, attivando il TGF-β (un importante inibitore delle reazioni delle cellule T contro le cellule tumorali) e tagliando il recettore α dell'interleuchina 2 (IL-2Rα) sui linfociti T. Inoltre, diminuiscono la sensibilità delle cellule tumorali ai natural killer, tagliano l'inibitore della α1-proteinasi (α1-PI). Infine è stato osservato che nei topi MMP-11 *null* un gran numero di neutrofili e macrofagi infiltra il tumore rispetto a quanto avviene nei topi wild-type indicando che la MMP-11 inibisce la chemioattrazione per queste cellule.

Conclusioni

E' ben evidente che le funzioni delle MMPs nel turnover della MEC sono molto complesse. La MEC oltre ad essere il supporto per le cellule ed i tessuti, regola molti comportamenti delle cellule come la crescita e la sopravvivenza e può anche servire come riserva di varie molecole biologicamente attive. Le MMPs, inizialmente identificate come le principali proteinasi in grado di degradare i vari componenti della MEC, hanno dimostrato di possedere caratteristiche funzionali molto complesse e svolgono un ruolo leader in molti processi fisiologici che coinvolgono il rimodellamento tissutale.

L'azione principale delle MMPs è il taglio proteolitico dei componenti della matrice extracellulare ma anche di molte altre sostanze (proteine leganti i fattori di crescita, precursori dei fattori di crescita, recettori delle tirosine chinasi, molecole di adesione cellulare, altre proteinasi ecc.) e tale azione è sufficientemente sofisticata da orchestrare varie funzioni. Sono coinvolte in molti processi patologici non tumorali (artrite, malattie cardiovascolari, nefriti, malattie neurologiche ecc.) e tumorali. Il contributo delle MMPs nella progressione neoplastica è estremamente complesso e sofisticato. L'idea iniziale che considerava le matrixine come i principali promotori delle metastasi è superata ed attualmente è evidente che i componenti della famiglia delle MMPs sono coinvolti anche nelle tappe iniziali dello sviluppo neoplastico. Infatti il taglio proteolitico delle molecole bioattive da parte delle MMPs contribuisce alla formazione di un complesso microambiente che promuove la trasformazione maligna nelle tappe iniziali della evoluzione tumorale (i.e. stimolazione della proliferazione cellulare, modulazione dell'angiogenesi ecc.) Inoltre, possono sia promuovere che inibire la progressione tumorale molto dipende dallo stadio del tumore, sito (primario o metastasi) localizzazione dell'enzima (tumore vs stroma) e dalle caratteristiche del microambiente in cui si sviluppa la massa tumorale.

Bibliografia

1. Bornstein P., Sage E.H.: Matricellular proteins. Extracellular modulators of cell function. Current Opin. of Cell Biol. 2002; 14: 608-616.
2. Wilson D.F., Jiang D.J., Pierce A.M., Wiebkin O.W.: Oral cancer: role of basement membrane in invasion. Aust. Dent. J. 1999; 44(2): 93-97.
3. Kreis T., Vale R. (eds): Guidebook to the extracellular matrix anchor and adesion proteins, Oxford University, Press Oxford UK, 1999.
4. Spinale F.G.: Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. Circ. Res. 2002; 90: 520-530.
5. Bissel M.J, Radisky D.: Putting tumors in context. Nature Rev. Cancer 2001; 1: 46-54.
6. Puente X.S., Sanchez L.M., Overall C.M., Lopez-Otin C.: Human and mouse proteases a comparative genomic approach. Nat. Rev. Genet. 2003; 4: 544-558.
7. Uria J.A., Lopez-Otin C.: Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. Cancer Res. 2000; 60: 4745-4751.
8. Overall C.M.: Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. Mol. Biotechnol. 2002; 22: 51-86.
9. Morgunova E., Tuuttila A., Bergmann U., Isupov M., Lindqvist Y., Schneider G., Tryggvason K.: Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. Science 1999; 284:1667-1670.
10. Pei D., Weiss S., J.: Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. Nature 1995; 375: 244-247.
11. Thomas G.: Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2002; 3: 753-766.
12. Zucker S., Pei D., Cao J. Lopez-Otin C.: Membrane type-matrix metalloproteinase (MT-MMP). Curr. Top. Dev. Biol. 2003; 54: 1-74.
13. Pei D., Kang T., Qi H.: Cystein array matrix metalloproteinase (CA-MMP) MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. J. Biol. Chem. 2000; 275: 33988-33997.
14. Velasco G., Pendas A.M., Fueyo. A., Knauper V., Murphy G. and Lopez-Otin C.: Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissue and lacking conserved domains in other family members. J. Biol. Chem. 1999; 274: 4570-4576.

15. McGowan K.A., Bauer E.A., Smith L.T.: Localization of type I human skin collagenase in developing embryonic and fetal skin. J. Invest. Dermatol. 1994;102: 951-957.
16. Ghilardi G., Biondi M.L., Mangoni J., Leviti S., DeMonti M., Guagnellini E., Scorza R.; Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism 1G/2G is correlated with colorectal cancer invasiveness. Clin. Cancer Res.: 2001; 7: 2344-2346.
17. Hasty K.A., Hibbis M.S., Kang A.H., Mainardi C.L.: Secreted forms of human neutrophil collagenase. J. Biol. Chem. 1986; 261: 5645-5650.
18. Hanemaaijer R., Sorsa T., Konttinen Y.T., Ding Y., Sutinen M., Visser H., Van Hinsbergh V.W.M., Helaakoski T., Kainulainen T., Rönkä H., Tschesche H., Salo T.: Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblast and endothelial cells. J. Biol. Chem.1997; 272: 31504-31509.
19. Stadlmann S., Pollheimer J., Moser P.L., Raggi A., Amberger A., Margreiter R., Offner F.A., Mikuz G., Dirnhofer S., Moch H.: Cytokine-regulated expression of collagenasae-2 (MMP-8) is involved in the progression of ovarian cancer. Eur. J. Cancer 2003: 39: 2499-2505.
20. Freije J.M., Dièz-Itza, Balbìn M., Sánchez L.M., Blasco R., Tolivia J., López-Otín C.: Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. J. Biol. Chem.1994; 269: 16766-16773.
21. Chen E.I., Li W., Godzik A., Howard E.W., Smith J.W.: A residue in the S2 subsite controls substrate selectivity of matrix metallo-proteinase-2 and matrix metallo- proteinase -9. J. Biol. Chem. 2003; 278: 17158-17163.
22. Huhtala P., Tuuttila A., Chow L.T., Lohi J., Keski-Oja J., Tryggvason K.: Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes HT-1080 cells. J. Biol. Chem. 1991; 266: 16485-16490.
23. Nagase H., Visse R., Murphy G.: Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc. Res. 2006; 69: 562-573.
24. Egeblad M., Werb Z.: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat. Rev. Cancer 2002; 2: 161-174.
25. Folgueras A.R, Pendás A.M., Sánchez L.M., López-Otín C: Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. Int. J. Rev. Biol. 2004; 48: 411-424.
26. Turpeenniemi-Hujanen T.: Gelatinases (MMP-2 and -9) and their inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. Biochimie 2005; 87: 287-297.
27. Holmbeck K., Bianco P., Caterina J., Yamanda S., Kromer M., Kuznetsov S.A., Mangani M., Robey P.G., Poole A.R., Pidoux I., Ward J.M., Birkedal-Hansen H.: MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia,

arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. Cell 1999; 99: 81-92.
28. Pepper M.S.: Extracellular proteolysis and angiogenesis. Thromb. Haemost. 2001; 86: 346-355.
29. Sekine.Aizawa Y., Hama E., Watanabe K., Tsubuki S., Kanai-Azuma M., Kanai Y., Arai H., Aizawa H., Iwata N., Saido T.C.: Matrix metalloproteinase (MMP) system in brain: identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum. Eur. J. Neurosci. 2001; 13: 935-948.
30. Velasco G., Cal S., Merlos-Suárez A., Ferrando A.A., Alvarez S., Nakamo A., Arribas J., López-Otín C.: Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. Cancer Res.200; 60: 877-882.
31. Lohi J., Wilson C.L., Roby J.D., Parks W.C.: Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. J. Biol. Chem. 2000; 276: 10134-10144.
32. Shapiro S.D., Kabayashy D.K., Ley T.J.: Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. J. Biol Chem. 1993; 268: 23824-23829.
33. Kolb C., Mauch S., Peter H.H., Krawinkel U., Sedlacek R.: The matrix metalloproteinase RASI-1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid arthritis patient. Immunol.Lett. 1997; 57: 83-88.
34. Li W., Gibson C.W., Abrams W.R., Andrews D.W., DenBesten P.K.: Reduced hydrolysis of amelogenin may result in X-linked amelogenesis imperfecta. Matix Biol. 2001; 19: 755-760.
35. Yang M., Kurkinen M.: Cloning and characterization of a novel matrix metalloproteinase (MMP), CMMP, from chicken embryo fibroblasts: CMMP, *Xenopus* XMMP, and human MMP-19 have a conserved unique cysteine in the catalytic domain. J. Biol. Chem. 1988; 273: 17893-17900.
36. Nagase H., Enghild J.J., Suzuki K., Salvesen G.: Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl) mercuric acetate. Biochemistry 1990; 29: 5783-5789.
37. He C., Wilhelm S.M., Pentland A.P., Marmer B.L., Grant G.A., Eisen A.Z., Goldberg G.I.: Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. Pro. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86: 2632-2636.
38. Wang Z., Juttermann R., Soloway P.D.: TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. J. Biol. Chem. 2000; 275: 26411-26415.
39. Strongin A.Y., Collier I., Bannikov G., Marmer B.L., Grant G.A., Goldberg G.I.: Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase: isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. J. Biol. Chem. 1995; 270: 5331-5338.

40. Itoh Y., Takamura A., Ito N., Maru Y., Sato H., Suenaga N., Aoki T., Seiki M.: Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion, EMBO J. 2001; 20: 4782-4793.
41. Hernandez-Barrantes S., Shimura Y., Soloway P.D., Sang Q.A., Fridman R.: Differential roles of TIMP-4 and TIMP-2 in proMMP-2 activation by MT1-MMP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001; 281: 126-130.
42. Overall C.M., Blobel C.P.: In search of partners: linking extracellular proteases to substrates. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007; 8: 245-257.
43. Bode W., Fernandez-Catalan C., Tschesche H., Grams F., Nagase H., Maskos K.: Structural properties of matrix metalloproteinases. Cell. Mol. Life Sci. 1999; 55: 639-652.
44. Nagase H.: Substrate specificity of MMPs. In Clendeninn N.J. Appelt K. (eds). Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. Humana Press.Totowa, New Jersey 2001; pp39-66.
45. Shipley J.M., Doyle G.A., Fliszar C.J., Ye Q.Z., Johnson L.L., Shapiro S.D., Welgus H.G., Senior R.M.: The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of the fibronectin type II-like repeats. J. Biol. Chem. 1996; 271: 4335-4341.
46. Barrett A.J., Starkey P.M.: The interaction of alpha2-macroglobulin with proteinases. Biochem. J. 1973; 133: 703-713.
47. Strickland D.K., Ashcom J.D., Williams S., Burgess W.H., Migliorini M., Argraves W.S.: Sequence identity between the alpha2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. J. Biol. Chem. 1990; 265: 17401-17404.
48. Brew K., Dinakarpandian D., Nagase H.: Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Biochem. Biophys Acta 2000; 1477: 267-283.
49. Baker A.H., Edwards D.R., Murphy G.: Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. J. Cell Sci. 2002; 115: 3719-3727.
50. Ray J.M, Stetler-Stevenson W.G.: TIMP-2 expression modulates human melanoma cell adhesion and mobility. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1994; 732: 233-247.
51. Visscher D.W., Hoyhtya M., Ottosen S.K., Liang C.M., Sarkar F.H., Crissman J.D., Fridman R.: Enhanced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in the stroma of breast carcinomas correlates with tumor recurrence. Int. J. Cancer 1994; 59: 339-344.
52. Heussen C., Dowdle E.B.: Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. Anal. Biochem. 1980; 102: 196-202.

53. Snoek-van Beurden P.A.M., Von den Hoff J.W.: Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. BioTecniques 2005; 38: 73-83.
54. Triebel S., Blaser J., Reinke H., Tschesche H.: A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. FEBS Lett. 1992; 314: 386-388.
55. Fernandez-Resa P., Mira E., Quesada A.R.: Enhanced detection casein zymography of matrix metalloproteinases. Anal. Biochem. 1995; 224: 434-435.
56. Gogly B., Groult N., Hornebeck W., Godeau G., Pellat B.: Collagen zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase. Anal. Biochem. 1998; 255: 211-216.
57. Hawkes S.P, Li H., Taniguchi G.T.: Zymography and reverse zymography for detecting MMPs, and TIMPs. In Matrix Metalloproteinases Protocols. Humana press Clark I. (Eds) 2001; pp 399-410.
58. Yan S.J., Blomme E.A.: In situ zymography: a molecular pathology technique to localize endogenous protease activity in tissue sections. Vet. Pathol. 2003; 40: 227-236.
59. Brinckerhoff C.E., Matrisian L.M.: Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.: 2002; 3: 207-214.
60. Streuli C.. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation . Curr. Opin. Cell. Biol. 1999; 11: 634-640.
61. Wu T.H., Werb Z.: Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. Genes. Dev. 2000; 14: 2123-2133.
62. Murphy G., Knäuper V., Atkinson S., Butler G., English W., Hutton M., Stracke J., Clark I.: Matrix metalloproteinases in arthritic disease. Arthritis Res. 2002; 4: S39-S49
63. Vihinen P., Kähäri V.M.: Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. Int J Cancer 2002; 99: 156-166
64. Kang K., Siegel P.M., Shu W., Drobnjack M., Käkönen S.M., Cordon-Cardo C., Guise T.A., Massagué J.: A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. Cancer Cell 2003; 3: 537-549.
65. Balbín M., Fueyo A., Tester A.M., Pendás A.M., Pitiot A.S., Astudillo A., Overall C.M., Shapiro S.D., López-Otín C.: Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. Nat. Genet. 2003; 35: 252-257.
66. Zucker S., Hymowitz M, Conner C., Zarrabi H.M., Hurewitz A.N., Matrisian L., Boyd D., Nicolson G., Montana S.: Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. Ann N Y Acad Sci 1999; 878: 212-227.

67. Di Carlo A., Terracciano D., Mariano A., Macchia V.: Urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) in human bladder tumors. Oncol Rep 2006; 15: 1321-1326.
68. Nutt J.E., Durkan G.C., Mellon J.K., Lunec J.: Matrix metalloproteinases (MMPs) in bladder cancer: the induction of MMP9 by epidermal growth factor and its detection in urine. BJU Int 2003; 91: 99-104.
69. Eissa S., Labib R.A., Mourad M.S., Kamel K., El-Ahmady O.: Comparison of telomerase activity and matrix metalloproteinase-9 in voided urine and bladder wash samples as a useful diagnostic tool for bladder cancer. Eur Urol 2003; 44: 687-694.
70. Moses M.A., Wiederschain D., Loughlin K.R., Zurakowski D., Lamb C.C., Freeman M.R.: Increased incidence of matrix metalloproteinases in urine of cancer patients. Cancer Res 1998; 58: 1395-1399.
71. Hanemaaijer R., Sier C.F., Visser H., Scholte L., van Lent N., Hoekman K., Verheijen J.H.: MMP-9 activity in urine from patients with various tumors, as measured by a novel MMP activity assay using modified urokinase as a substrate. Ann NY Acad Sci 1999; 878: 141-149.
72. Fernandez C.A., Yan L, Louis G., Yang J., Kutok J.L, Moses M.A.: The matrix metalloproteinase-9/neutrophil gelatinase-associated lipocalin complex plays a role in breast tumor growth and is present in the urine of breast cancer patients. Clin Cancer Res 2005; 11: 5390-5395.
73. Bazzett L.B., Magnus M., Taylor D.D., Gercel-Taylor C.: Urinary matrix metalloproteinases as a potential screening for gynecologic malignancies. Gynecol Oncol 2003; 90: 435-442.
74. Di Carlo A., Terracciano D, Mariano A., Macchia V.: Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 type IV collagenases in serum of patients with pleural effusions. Int J Oncol 2005; 26: 1363-1368.
75. Bjorklund M., Koivunen E.: gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. Biochim Biophys Acta 2005; 1755: 37-69.
76. Nikkola J., Vihinen P, Vuoristo M.S., Kellokumpu-Lehtinen P., Kähäri V.M., Pyrhönen S.: High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. Clin Cancer Res 2005; 11: 5158-5166.
77. Ranuncolo S.M, Matos E., Loria D, Vilensky M., Rojo R., Bal de Kier Joffé E., Inés Puricelli L.: Circulation 92-kilodalton matrix metalloproteinase (MMP-9) activity is enhanced in the euglobin plasma fraction of head and neck squamous cell carcinoma. Cancer 2002; 94: 1483-1491.
78. Nakajima M., Welch D.R., Wynn D.M., Tsuruo T., Nicolson G.L.: Serum and plasma M(r) 92,000 progelatinase levels correlate with spontaneous metastasis of rat 13762NF mammary adenocarcinoma. Cancer Res 1993; 53: 5802-5807.

79. Gohji K., Fujimoto N., Hara I., Fujii A., Okada H., Arakawa S., Miyake H., Kamidono S., Nakajima M.: Serum matrix metalloproteinase-2 and its density in men with prostate cancer as a new predictor disease extension. Int J Cancer 1998; 79: 96-101.
80. Baker A.H., Edwards D.R., Murphy G.: Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. J Cell Sci 2002; 115: 3719-3727.
81. Hayasaka A., Suzuki N., Fujimoto N., Iwama S., Fukuyama E., Kanda Y., Saisho H.: Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 (92kDa type IV collagenase/gelatinase B) in hepatocellular carcinoma. Hepatology; 1996; 24: 1058-1062.
82. Ishida H., Murata. N., Tada M., Okada N., Hashimoto D., Kubota S., Shirakawa K., Wakasugi H.: Determining the levels of Matrix Metalloproteinase-9 in portal and peripheral blood is useful for predicting liver metastasis of colorectal cancer. Jpn J Clin Oncol 2003; 33: 186-191.
83. Waas E.T., Wobbes T., Lomme R.M., DeGroot J., Ruers T., Hendriks T.: Matrix metalloproteinase 2 and 9 activity in patients with colorectal cancer liver metastasis. Br J Surg 2003; 90: 1556-1564.
84. Di Carlo A., Mariano A., Terracciano D., Mazzarella C., Galzerano S., Cicalese M., Cecere C., Macchia V.: Gelatinolytic activities (matrix metalloproteinase-2 and-9) and soluble extracellular domain of HER-2/neu in pleural effusions. Oncol Rep 2007; 18: 425-431.
85. Koitza J., Pesek M., Bednàrova V., Terl M., Werle B.: Pleural fluids associated with metastatic lung tumors are rich in pro-gelatinaseB/proMMP-9. Neoplasma 2005; 52: 388-392.
86. Davidson B, Reich R., Berner A., Givant-Hoewitz V., Goldberg I., Risberg B., Kristensen G.B., Trope C.G. Bryne M., Kopolovic J., Nesland J.M.: Ovarian carcinoma cells in serous effusions show altered MMP-2 and TIMP-2 mRNA levels. Eur J Cancer 2001; 37: 2040-2049.
87. Davidson B., Konstantinovsky S., Nielsen S., Dong H.P., Berner A., Vyberg M., Reich R.: Altered expression of metastasis associated and regulatory molecules in effusions from breast cancer patients: a novel model for tumor progression. Clin Cancer Res 2004; 10: 7335-7346.
88. Coussens L.M., Werb Z.: Inflammatory cells and cancer: think different ! J Exp med 2001; 6: F23-F26.

Indice

Editoriale ..... pag. 3

Introduzione ..... » 5

La famiglia delle Matrix Metallo-Proteinasi (MMPs) ..... » 7

Attivazione delle MMPs ..... » 19

Inibitori delle MMPs ..... » 23

Metodi per la determinazione delle MMPs ..... » 25

Funzioni fisiopatologiche delle MMPs ..... » 21

Ruolo delle MMPs nella progressione neoplastica ..... » 35

Conclusioni ..... » 45

Bibliografia ..... » 46

Indice ..... » 53

Caleidoscopio *Italiano*

... il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS SpA

1. Rassu S.: ***Principi generali di endocrinologia.*** **Gennaio '83**
2. Rassu S.: ***L'ipotalamo endocrino.*** **Giugno '83**
3. Rassu S.: ***L'ipofisi.*** **Dicembre '83**
4. Alagna., Masala A.: ***La prolattina.*** **Aprile '84**
5. Rassu S.: ***Il pancreas endocrino.*** **Giugno '84**
6. Fiorini I., Nardini A.: ***Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza).*** **Luglio '84.**
7. Rassu S.: ***L'obesita'.*** **Settembre '84**
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.:***Aspetti morfofunzionali dell'ovaio.*** **Novembre '84.**
9. Kubasik N.P.: ***Il dosaggio radioimmunologico (1)*****. Dicembre '84.**
10. Kubasik N.P.: ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima.*** **Gennaio'85.**
11. Kubasik N.P.: ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda.*** **Febbraio '85.**
12.Kubasik N.P.: ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima.*** **Aprile '85.**
13. Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.: ***Il TSH.*** **Giugno '85.**
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: ***La β-endorfina plasmatica e liquorale.*** **Agosto '85.**
15. Baccini C.: ***Le droghe d'abuso (1).*** **Ottobre '85.**
16. Kubasik N.P.: ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda.*** **Dicembre '85.**
17. Nuti R.: ***Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale.*** **Febbraio '86**
18. Cavallaro E.: ***Ipnosi: una introduzione psicofisiologica.*** **Marzo '86.**
19. Fanetti G.: ***AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti.*** **Maggio '86.**
20. Fiorini I., Nardini A.: ***Toxoplasmosi, immunologia e clinica.*** **Luglio '86.**
21. Limone P.: ***Il feocromocitoma.*** **Settembre '86.**
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: ***Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*****. Novembre '86.**
23. Bolcato A.: ***Allergia.*** **Gennaio '87.**
24. Kubasik N.P.: ***Il dosaggio enzimoimmunologico e fluoroimmunologico.*** **Febbraio '87.**
25. Carani C.: ***Patologie sessuali endocrino-metaboliche.*** **Marzo '87.**
26. Sanna M., Carcassi R., Rassu S.: ***Le banche dati in medicina.*** **Maggio '87.**
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: ***L'amenorrea.*** **Giugno '87.**
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: ***Il paziente terminale.*** **Luglio '87.**
29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: ***Patologie prostatiche.*** **Settembre '87.**
30. Cingolani M.: ***Manuale di ematologia e citologia ematologica.*** **Novembre '87.**

31. Kubasik N.P.: ***Ibridomi ed anticorpi monoclonali.*** **Gennaio '88.**
32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: ***Diagnostica del carcinoma mammario.*** **Febbraio '88.**
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: ***Neuroendocrinologia dello stress.*** **Marzo '88.**
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: ***La fecondazione*** **in vitro. Maggio '88.**
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: ***Il gozzo nodulare.*** **Giugno '88.**
36. Baccini C.: ***Le droghe d'abuso (2).*** **Luglio '88.**
37. Piantino P., Pecchio F.: ***Markers tumorali in gastroenterologia.*** **Novembre '88.**
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: ***Le leucemie acute infantili.*** **Gennaio '89.**
39. Sommariva D., Branchi A.: ***Le dislipidemie.*** **Febbraio '89.**
40. Butturini U., Butturini A.: ***Aspetti medici delle radiazioni.*** **Marzo '89.**
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: ***Diagnostica delle neoplasie colo-rettali.*** **Aprile '89.**
42. Palleschi G.: ***Biosensori in Medicina.*** **Maggio '89.**
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: ***HTLV-I.*** **Giugno '89.**
44. Fanetti G.: ***Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.*** **Luglio '89.**
45. Contu L., Arras M.: ***Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie.*** **Settembre '89.**
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: ***Immunologia dell'occhio.*** **Ottobre '89.**
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: ***Infezioni opportunistiche in corso di AIDS.*** **Gennaio '90.**
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: ***La coriogonadotropina umana.*** **Febbraio '90.**
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: ***L'immunologia del diabete mellito*****. Marzo '90.**
50. Cappi F.: ***La trasfusione di sangue: terapia a rischio*****. Aprile '90.**
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: ***I micobatteri*****. Maggio '90.**
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: ***Anticorpi antinucleo*****. Giugno '90.**
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: ***Le macchine in terapia intensiva.*** **Luglio '90.**
54. Goracci E., Goracci G.: ***Gli allergo-acari.*** **Agosto '90.**
55. Rizzetto M.: ***L'epatite non A non B (tipo C).*** **Settembre '90.**
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: ***Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali*****. Ottobre '90.**
57. La Vecchia C. ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (I).*** **Gennaio '91.**
58. La Vecchia C. ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (II).*** **Febbraio '91.**
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: ***Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti.*** **Marzo '91.**
60. Bedarida G., Lizioli A.: ***La neopterina nella pratica clinica.*** **Aprile '91.**
61. Romano L.: ***Valutazione dei kit immunochimici.*** **Maggio '91.**
62. Dondero F. e Lenzi A.: ***L'infertilità immunologica*****. Giugno '91.**
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: ***Gli Oncogèni*****. Luglio '91.**
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: ***Infezione-malattia da HIV in Africa*****. Agosto '91.**
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: ***L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni.*** **Settembre '91.**
66. Gentilomi G.A.: ***Sonde genetiche in microbiologia*****. Ottobre '91.**
67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: ***Le sonde di DNA e la virulenza batterica.*** **Gennaio '92.**

68. Zilli A., Biondi T.: ***Il piede diabetico.*** **Febbraio '92.**
69. Rizzetto M.: ***L'epatite Delta.*** **Marzo '92.**
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: ***Gli screening neonatali.*** **Aprile '92.**
71. Tavani A., La Vecchia C.: ***Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari.*** **Luglio '92.**
72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: ***L'ormone della crescita.*** **Agosto '92.**
73. Contu L., Arras M.: ***Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*****. Settembre '92.**
74. Ferrara S.:***Manuale di laboratorio I*****. Ottobre '92.**
75. Gori S.: ***Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*****. Novembre '92.**
76. Ferrara S.: ***Manuale di laboratorio II*****. Gennaio '93.**
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: ***Ipertensione Arteriosa.*** **Febbraio '93.**
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: ***I linfomi non Hodgkin.*** **Marzo '93.**
79. Arras M., Contu L.: ***Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*****. Aprile '93.**
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: ***Terapia antiretrovirale*****. Maggio '93.**
81. Rizzetto M.: ***L'epatite C*****. Settembre '93.**
82. Andreoni S.: ***Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*****. Ottobre '93.**
83.Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: ***Diagnostica con radionuclidi del Morbo di Graves-Basedow.*** **Novembre '93.**
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: ***Chemiluminescenza.*** **Dicembre '93.**
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: ***Applicazioni degli esami immunologici*****. Gennaio 94.**
86. Arras M., Contu L.: ***Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I lnfociti B*****. Febbraio '94.**
87. Rossetti R.: ***Gli streptoccocchi beta emolitici di gruppo B (SGB).*** **Marzo '94.**
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: ***Marcatori biochimici del rimodellamento osseo*****. Aprile '94.**
89. Fanetti G.: ***Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare*****. Settembre '94.**
90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: ***Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario*****. Ottobre '94.**
91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: ***Helicobacter pylori*****. Novembre '94.**
92. Parazzini F.: ***L'epidemiologia della patologia ostetrica*****. Febbraio '95.**
93. Proietti A., Lanzafame P.: ***Il virus di Epstein-Barr*****. Marzo '95.**
94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P, Romano L.: ***Immunoflogosi nell'asma bronchiale*****. Maggio '95.**
95. Manduchi I.: ***Steroidi*****. Giugno '95.**
96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: ***Sindromi tossiche sostenute da principi di origine vegetale*****. Luglio '95.**
97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: ***Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani*****. Ottobre '95.**
98.La Vecchia C., D'Avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: ***Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica*****. Dicembre '95.**
99.Zilli A., Biondi T., Conte M.: ***Diabete mellito e disfunzioni conoscitive*****. Gennaio '96.**
100.Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: ***Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma*****. Marzo '96.**
101.Cogato I. Montanari E.: ***La Sclerosi Multipla*****. Aprile '96.**
102.Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.: ***Malattie a trasmissione sessuale.*** **Maggio '96.**

103.Fiori G. M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: ***Il linfoma di Hodgkin*****. Giugno '96.**
104.Marcante R., Dalla Via L.: ***Il virus respiratorio sinciziale*****. Luglio '96.**
105.Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: ***Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tissutale specifico (TPS) in oncologia clinica: metodologie applicative.*** **Ottobre '96.**
106.Aiello V., Palazzi P., Calzolari E.: ***Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatici (SCE): significato biologico e sperimentale*****. Novembre '96.**
107.Morganti R.: ***Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali*****. Dicembre '96.**
108.Andreoni S.: ***Patogenicità di Candida albicans e di altri lieviti*****. Gennaio '97.**
109.Salemi A., Zoni R.: ***Il controllo di gestione nel laboratorio di analisi*****. Febbraio '97.**
110.Meisner M.: ***Procalcitonina*****. Marzo '97.**
111.Carosi A., Li Vigni R., Bergamasco A.: ***Malattie a trasmissione sessuale (2)*****. Aprile '97.**
112.Palleschi G. Moscone D., Compagnone D.: ***Biosensori elettrochimici in Biomedicina.*** **Maggio '97.**
113.Valtriani C., Hurle C.: ***Citofluorimetria a flusso*****. Giugno '97.**
114.Ruggenini Moiraghi A., Gerbi V., Ceccanti M., Barcucci P.: ***Alcol e problemi correlati*****. Settembre '97.**
115.Piccinelli M.: ***Depressione Maggiore Unipolare*****. Ottobre '97.**
116.Pepe M., Di Gregorio A.: ***Le Tiroiditi*****. Novembre '97.**
117.Cairo G.: ***La Ferritina*****. Dicembre '97.**
118.Bartoli E.: ***Le glomerulonefriti acute*****. Gennaio '98.**
119.Bufi C., Tracanna M.: ***Computerizzazione della gara di Laboratorio*****. Febbraio '98.**
120.National Academy of Clinical Biochemistry: ***Il supporto del laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio delle malattie della tiroide.*** **Marzo '98.**
121.Fava G., Rafanelli C., Savron G.: ***L'ansia*****. Aprile '98.**
122.Cinco M.: ***La Borreliosi di Lyme*****. Maggio '98.**
123.Giudice G.C.: ***Agopuntura Cinese*****. Giugno '98.**
124.Baccini C.: ***Allucinogeni e nuove droghe (1)*****. Luglio '98.**
125.Rossi R.E., Monasterolo G.: ***Basofili*****. Settembre '98.**
126. Arcari R., Grosso N., Lezo A., Boscolo D., Cavallo Perin P.: ***Eziopatogenesi del diabete mellito di tipo 1*****. Novembre '98.**
127.Baccini C.: ***Allucinogeni e nuove droghe (11)*****. Dicembre '98.**
128.Muzi P., Bologna M.: ***Tecniche di immunoistochimica*****. Gennaio '99.**
129.Morganti R., Pistello M., Vatteroni M.L.: ***Monitoraggio dell'efficacia dei farmaci antivirali*****. Febbraio '99.**
130.Castello G., Silvestri I.:***Il linfocita quale dosimetro biologico*****. Marzo '99.**
131.AielloV., Caselli M., Chiamenti C.M.: ***Tumorigenesi gastrica Helicobacter pylori - correlata.*** **Aprile '99.**
132.Messina B., Tirri G., Fraioli A., Grassi M., De Bernardi Di Valserra M.: ***Medicina Termale e Malattie Reumatiche.*** **Maggio '99.**
133.Rossi R.E., Monasterolo G.: ***Eosinofili.*** **Giugno '99.**
134.Fusco A., Somma M.C.: ***NSE (Enolasi Neurono-Specifica)*****. Luglio '99.**
135.Chieffi O., Bonfirraro G., Fimiani R.: ***La menopausa*****. Settembre '99.**
136.Giglio G., Aprea E., Romano A.: ***Il Sistema Qualità nel Laboratorio di Analisi.*** **Ottobre '99.**
137.Crotti D., Luzzi I., Piersimoni C.: ***Infezioni intestinali da Campylobacter e microrganismi correlati.*** **Novembre '99.**

138.Giovanella L.: ***Tumori Neuroendocrini: Diagnosi e fisiopatologia clinica*****. Dicembre '99.**
139.Paladino M., Cerizza Tosoni T.: ***Umanizzazione dei Servizi Sanitari: il Case Management*****. Gennaio 2000.**
140.La Vecchia C.: ***Come evitare la malattia*****. Febbraio 2000.**
141.Rossi R.E., Monasterolo G.: ***Cellule dendritiche*****. Marzo 2000.**
142.Dammacco F.: ***Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (I).*** **Aprile 2000.**
143.Dammacco F.: ***Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (II).*** **Maggio 2000.**
144.Croce E., Olmi S.: ***Videolaparoscopia.*** **Giugno 2000.**
145.Martelli M., Ferraguti M.: ***AllergoGest.*** **Settembre 2000.**
146.Giannini G., De Luigi M.C., Bo A., Valbonesi M.: ***TTP e sindromi correlate: nuovi orizzonti diagnostici e terapeutici.*** **Gennaio 2001.**
147.Rassu S., Manca M.G., Pintus S., Cigni A.: ***L'umanizzazione dei servizi sanitari*****. Febbraio 2001.**
148. Giovanella L.: ***I tumori della tiroide*****. Marzo 2001.**
149.Dessì-Fulgheri P., Rappelli A.: ***L'ipertensione arteriosa*****. Aprile 2001.**
150. The National Academy of Clinical Biochemistry: ***Linee guida di laboratorio per lo screening, la diagnosi e il monitoraggio del danno epatico*****. Settembre 2001.**
151.Dominici R.: ***Riflessioni su Scienza ed Etica*****. Ottobre 2001.**
152.Lenziardi M., Fiorini I.: ***Linee guida per le malattie della tiroide*****. Novembre 2001.**
153.Fazii P.: ***Dermatofiti e dermatofitosi*****. Gennaio 2002.**
154.Suriani R., Zanella D., Orso Giacone G., Ceretta M., Caruso M.: ***Le malattie infiammatorie intestinali (IBD) Eziopatogenesi e Diagnostica Sierologica*****. Febbraio 2002.**
155. Trombetta C.: ***Il Varicocele.*** **Marzo 2002.**
156.Bologna M., Colorizio V., Meccia A., Paponetti B.: ***Ambiente e polmone*****. Aprile 2002.**
157. Correale M., Paradiso A., Quaranta M.: I ***Markers tumorali.*** **Maggio 2002.**
158. Loviselli A., Mariotti S.: ***La Sindrome da bassa T3*****. Giugno 2002.**
159. Suriani R., Mazzucco D., Venturini I., Mazzarello G., Zanella D., Orso Giacone G.: ***Helicobacter Pylori: stato dell'arte.*** **Ottobre 2002.**
160. Canini S.: ***Gli screening prenatali: marcatori biochimici, screening nel 1° e 2° trimestre di gravidanza e test integrato.*** **Novembre 2002.**
161. Atzeni M.M., Masala A.: ***La β-talassemia omozigote*****. Dicembre 2002.**
162. Di Serio F.: ***Sindromi coronariche acute*****. Gennaio 2003.**
163. Muzi P., Bologna M.: ***Il rischio di contaminazione biologica nel laboratorio biosanitario*****. Febbraio 2003.**
164. Magni P., Ruscica M., Verna R., Corsi M.M.: ***Obesità: fisiopatologia e nuove prospettive diagnostiche*****. Marzo 2003.**
165. Magrì G.: ***Aspetti biochimici e legali nell'abuso alcolico*****. Aprile 2003.**
166. Rapporto dello Hastings Center: ***Gli scopi della medicina: nuove priorità.*** **Maggio 2003.**
167. Beelke M., Canovaro P., Ferrillo F.: ***Il sonno e le sue alterazioni*****. Giugno 2003.**
168. Macchia V., Mariano A.: ***Marcatori tumorali nel cancro della vescica*****. Luglio 2003.**
169. Miragliotta G., Barra Parisi G., De Sanctis A., Vinci E.: ***La Turbercolosi Polmonare: Diagnostica di Laboratorio*****. Agosto 2003.**
170. Aebischer T.: ***Il Comitato Internazionale della Croce Rossa ed il Diritto Internazionale Umanitario*****. Settembre 2003.**

171. Martino R., Frallicciardi A., Tortoriello R.: ***Il manuale della sicurezza*****. Ottobre 2003.**
172. Canigiani S. e Volpini M.: ***Infarto acuto del miocardio: biochimica del danno cellulare e marcatori di lesione.*** **Novembre 2003.**
173. La Brocca A. Orso Giacone G. Zanella D. Ceretta M.: ***Laboratorio e clinica delle principali affezioni tiroidee.*** **Dicembre 2003.**
174. Savron G.: ***Le Fobie*****. Gennaio 2004.**
175. Paganetto G.: ***Evoluzione storica del rischio di patologie umane per contaminazione chimica ambientale*****. Febbraio 2004.**
176. Giovanella L.: ***Iperparatiroidismo e tumori paratiroidei*****. Marzo 2004.**
177. Severino G., Del Zompo M.: ***Farmacogenomica: realtà e prospettive per una "Medicina Personalizzata".*** **Aprile 2004.**
178 Arigliano P.L.: ***Strategie di prevenzione dell'allergia al lattice nelle strutture sanitarie.*** **Maggio 2004.**
179. Bruni A.: ***Malattia di Alzheimer e Demenza Frototemporale.*** **Giugno 2004.**
180. Perdelli F., Mazzarello G., Bassi A.M., Perfumo M., Dallera M.: ***Eziopatogenesi e diagnostica allergologica.*** **Luglio 2004.**
181. Franzoni E., Gualandi P. Pellegrini G.: ***I disturbi del comportamento alimentare.*** **Agosto 2004.**
182. Grandi G., Peyron F.: ***La toxoplasmosi congenita*****. Settembre 2004.**
183. Rocca D.L., Repetto B., Marchese A., Debbia E.A: ***Patogeni emergenti e resistenze batteriche*****. Ottobre 2004.**
184. Tosello F., Marsano H.: ***Scientific English Handout*****. Novembre 2004.**
185. La Brocca A., Orso Giacone G., Zanella D.: ***Ipertensione arteriosa secondaria: clinica e laboratorio*****. Dicembre 2004.**
186. Paganetto G.: ***Malattie Neoplastiche: dalla Paleopatologia alle Fonti Storiche*****. Gennaio 2005.**
187. Savron G.: ***La sindrome dai mille tic: il disturbo di Gilles de la Tourette*****. Febbraio 2005.**
188. Magrì G., Baghino E., Floridia M., Ghiara F.: ***Leishmania.*** **Marzo 2005.**
189. Lucca U., Forloni G., Tiraboschi P., Quadri P., Tettamanti M., PasinaL.: ***Invecchiamento, deterioramento cognitivo e malattia di Alzheimer*****. Aprile 2005.**
190. Volpe G., Delibato E., Orefice L., Palleschi G.: ***Tossinfezioni alimentari e metodiche recenti ed innovative per la ricerca dei batteri patogeni responsabili*****. Maggio 2005.**
191. Mazzarello M.G., Albalustri G., Audisio M., Perfumo M., L. Cremonte G.: ***Aerobiologia ed allergopatie*****. Giugno 2005.**
192. Scalabrino G., Veber D., Mutti E.:*Nuovi orizzonti biologici per la vitamina B12***. Luglio 2005.**
193. Zepponi E.: ***Guida pratica per gli utenti del laboratorio analisi*****. Settembre 2005.**
194. Faricelli R., Esposito S., Martinotti S.: ***La sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi.*** **Ottobre 2005.**
195. Baccini C., Bezzi F., Conti M., Tazzari V.: ***Doping e antidoping nello sport*****. Novembre 2005.**
196. Lozzi M.: ***La Mediazione pacifica dei conflitti. Una risorsa socio-relazionale in ambito medico-sanitario*****. Dicembre 2005.**
197. Bracco G.: ***Progettare un Laboratorio di Analisi*****. Gennaio 2006.**
198. Angelucci A.: ***Apoptosi e sistema immunitario: regolazione e patologie associate*****. Febbraio 2006.**

199. Commissione Tecnica sul Rischio Clinico: ***Risk management in Sanità. Il problema degli errori*****. Marzo 2006**
200. Casati G., Marchese E., Roberti V., Vichi M.C.: ***La gestione dei processi clinico assistenziali per il miglioramento delle prassi*****. Aprile 2006.**
201. Zanella D., Ceretta M., Orso Giacone G.: ***Peptidi natriuretici: nuove frontiere in cardiologia?*** **Maggio 2006.**
202. Cicala M., Dal Lago U., Vinci P., Maggiorotti M.: ***L'accusa di malpractice in ambito medico*****. Giugno 2006.**
203. Martino R.: ***Manuale Qualità UNI EN ISO 9001*****. Luglio 2006.**
204. Mazzarello M.G., Arata M., Perfumo M., Marchese A., Debbia E.A.: ***Tubercolosi e micobatteri*****. Settembre 2006.**
205. Matrullo R.: ***Anoressia: la negazione della sessualità come difesa narcisistica*****. Ottobre 2006.**
206. Crotti D.: ***Le parassitosi intestinali ed uro-genitali*****. Novembre 2006.**
207. Orso Giacone G., Zanella D., Ceretta M.: ***Il referto interpretativo in infettivologia*****. Dicembre 2006.**
208. Baghino E., Magrì G., Nicoletti L., Novaro G., Vignale C., Mazzei C.: ***Stato dell'arte delle aneuploidie fetali, dall'indagine clinica prenatale alla diagnosi anatomo-patologica*****. Gennaio 2007.**
209. Mazzarello M.G., Brunetti R., Perfumo M., Torriglia A.M., Montresor G.: ***Principali Tecniche Analitiche in uso nei Laboratori di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche*****. Febbraio 2007.**
210. Orso Giacone G., Zanella D., Ceretta M.: ***Celiachia dalla A alla Z*****. Marzo 2007.**
211. Cingolani M., Sparviero E.: ***Decidere ora per allora: il testamento biologico (dichiarazioni anticipate di trattamento). Aprile 2007.***
212. Barletta G., Pastacaldi V., Peracino A.P.: ***La misura dei processi nella medicina di laboratorio*****. Maggio 2007.**
213. Rassu S., Masia L., Delussu P., Chessa P., Demartis M.G., Moroso G.: ***Manuale per il supporto vitale di base e la defibrillazione precoce (BLS-D)*****. Giugno 2007.**
214. Anchisi R., M. Gambotto Dessy: ***Il Burnout del personale sanitario*****. Marzo 2008.**
215. Gulletta E., Orrico F., Foti D.P.: ***Clinical Governance nel Laboratorio Biomedico*****. Aprile 2008.**
216. Rochira V., Scaltriti S., Zirilli L., Carani C.: ***Il ruolo degli estrogeni nel maschio*****. Maggio 2008.**
217. Gulletta E., Foti D.P., Corsi M.M., Galliera E.: ***Citochine e Chemochine*****. Giugno 2008.**
218. Zambotto F.M.: ***La biotecnologia transgenica utilizzata nella produzione degli alimenti di origine vegetale.*** **Settembre 2008**
219. Cavallini M.: ***Tecniche di Ringiovanimento del viso*****. Ottobre 2008**
220. Morra A., Odetto L., Bozza C., Bozzetto P., Agostinis S., Bariona M.: ***Compendio di Medicina delle Grandi Emergenze*****. Novembre 2008**
221. Di Lonardo A., Fagnani C., Pulciani S.: *I Microarray***. Dicembre 2008.**
222. Di Lonardo A., Fagnani C., Pulciani S.: *Applicazioni dei microarray (1)***. Marzo 2009**

223. Di Lonardo A., Fagnani C., Pulciani S.: *Applicazioni dei microarray (2)***. Giugno 2009**

I volumi disponibili su Internet nel sito www.medicalsystems.it sono riportati in nero mentre in grigio quelli non ancora disponibili su Internet.

Inoltre sono disponibili un limitato numero di copie di alcuni numeri del Caleidoscopio che ormai sono "storiche". Qualora mancassero per completare la collana potete farne richiesta al collaboratore Medical Systems della Vostra zona. I numeri sono: Caleidoscopio 14, 18, 33, 40, 48, 49, 50, 54, 65, 68, 84, 100, 106, 118, 121, 126, 129, 130, 131, 132, 133, 134. I volumi verranno distribuiti sino ad esaurimento e non verranno ristampati se non in nuove edizioni.

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 27, numero 224

Direttore Responsabile
Sergio Rassu
Tel. mobile 338 2202502
E-mail: sergiorassu@yahoo.it

Responsabile Ufficio Acquisti
Giusi Cunietti

Servizio Abbonamenti
Maria Grazia Papalia
Laura Cecchi

Progettazione e Realizzazione

Restless Architect of Human Possibilities s.a.s.
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel. 079 270464
http://rahp80.googlepages.com/

Consulenti di Redazione
Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione
Maria Speranza Giola

EDITORE

... il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS SpA

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. 010 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso);
Telefax 010/8340310- 809070.
Internet URL: http://www.medicalsystems.it
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio Illustrato, Caleidoscopio Letterario, Guida Pratica Immulite®, Guida Pratica Città, Journal of Clinical Ligand Assay, Pandora, Tribuna Biologica e Medica.

Stampa
Tipolitografia Nuova ATA
Via Gelasio Adamoli, 281 - Genova
Tel. 010 513120 - Fax 010 503320 - info@nuovaata.com - www.nuovaata.com

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989
Iscrizione al Registro degli Operatori di Comunicazione (ROC) n° 1188

Finito di stampare: Settembre 2009
Sped. in Abb. Post. 45%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano

www.medicalsystems.it

ISSN 0394 3291

Caleidoscopio *Italiano*

A cura di
Anna Di Lonardo, Corrado Fagnani,
Simonetta Pulciani

Applicazioni dei microarray (2)

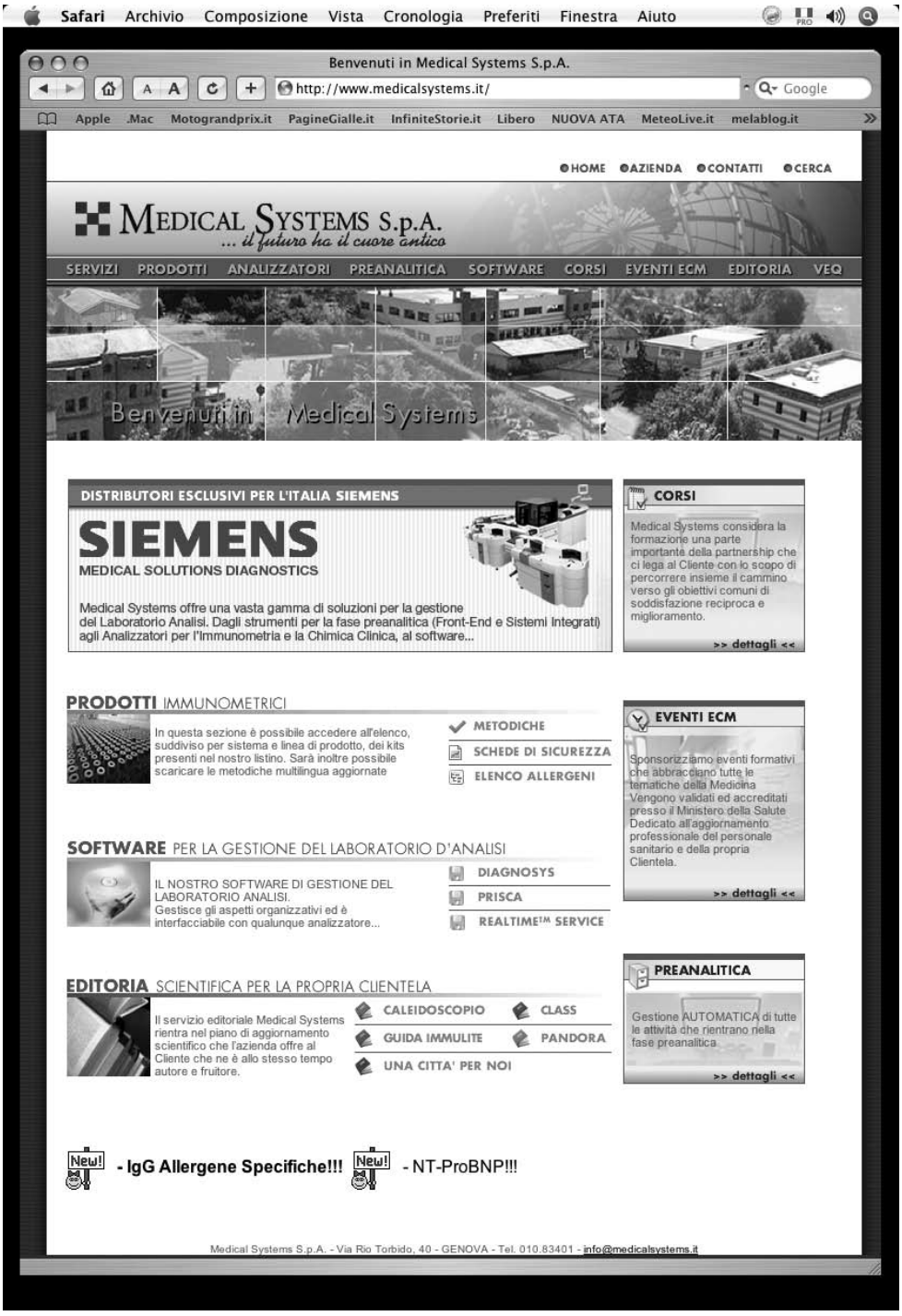
Direttore Responsabile
Sergio Rassu

223

... il futuro ha il cuore antico

MEDICAL SYSTEMS SpA

Tariffa R.O.C.: "Poste Italiane S.p.a. - Sped. in A.P. - D.L. 353/2003, (conv. in L. 27/02/2004 n. 46) art. 1 comma 1, DCB Genova" - n° 223- Giugno 2009 - Dir. resp.: Sergio Rassu - Editore: Medical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: Nuova ATA - Genova



In caso di mancato recapito,
pregasi ritornare al mittente che pagherà la tassa dovuta.

CALEIDO 224

€ 10,33