

Matrice ExtraCellulare

Introduzione

<http://jpkc.scu.edu.cn/ywyy/zbsw%28E%29/edetail4.htm>

Take-home message

- ✚ Il **comportamento cellulare** (metabolismo, proliferazione, differenziamento o staminalità, migrazione, apoptosi) non dipende solo da caratteristiche intrinseche delle cellule, ma è **strettamente condizionato dall'interazione tra cellule, matrice e microambiente cellulare.**

Extracellular Matrix (ECM)

- ▶ A collection of proteins and carbohydrates produced by cells that forms a matrix outside the cell
- ▶ a.k.a. **connective tissue**, **interstitium**
- ▶ **The extracellular matrix is interesting to biotech** because it:
 - Is **involved in disease** processes, including atherosclerosis, cancer, arthritis, lupus...
 - Is a major **impediment to gene therapy**
 - Interactions of the matrix with cell surface receptors **influence cell behavior** and gene expression.
 - Creating artificial matrices is a big part of **tissue engineering**, and one of the biggest challenges.



ECM signalling:
orchestrating cell
behaviour and
misbehaviour

Lukashev ME, Werb Z. **ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour**. Trends Cell Biol. 8:437-441, 1998.

“Matrice extracellulare e matricine, segnali criptici fondamentali per il dialogo locale cellula-matrice” – [1]

- ✚ La **matrice extracellulare** è una struttura **dinamica** ricca di **proteine multimodulari altamente glicosilate** e di **polisaccaridi** che sorreggono meccanicamente e orientano le cellule che vi poggiano ma soprattutto modulano e pilotano ad ogni momento il loro comportamento (**metabolismo, proliferazione, differenziamento** o **staminalità, migrazione, apoptosi**)
- ✚ A loro volta **le cellule condizionano la composizione e dinamica della matrice.**



Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions

Completion of genome sequences for many organisms allows a reasonably complete definition of the complement of **extracellular matrix (ECM) proteins**. In mammals this “**core matrisome**” comprises **~300 proteins**. In addition there are **large numbers of ECM-modifying enzymes, ECM-binding growth factors, and other ECM-associated proteins**. These different categories of ECM and ECM-associated proteins **cooperate to assemble and remodel extracellular matrices and bind to cells through ECM receptors**. Together with receptors for ECM-bound growth factors, they provide multiple inputs into cells to control survival, proliferation, differentiation, shape, polarity, and motility of cells. The evolution of ECM proteins was key in the transition to multicellularity, the arrangement of cells into tissue layers, and the elaboration of novel structures during vertebrate evolution. This key role of ECM is reflected in the **diversity of ECM proteins** and the **modular domain structures of ECM proteins** both **allow their multiple interactions and, during evolution, development of novel protein architectures**.

Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Jan 1;4(1):a004903.

Matrisoma

- ✚ Elenco delle proteine che costituiscono la matrice extracellulare e di quelle che contribuiscono alle matrici in diverse situazioni.
- ✚ **Le proteine della matrice** tipicamente contengono **ripetizioni** di un insieme caratteristico di **domini**: LamG (Laminin G), TSPN (thrombospondin), FN3 (fibronectin 3), VWA (von Willebrandt A), Ig (immunoglobulin), EGF (epidermal growth factor), prodomini del collagene, ecc.
- ✚ Molti di questi domini non sono specifici delle proteine della MEC, ma la loro disposizione è unica e caratteristica

Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome—an inventory of extracellular matrix constituents and functions. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Jan 1;4(1):a004903.

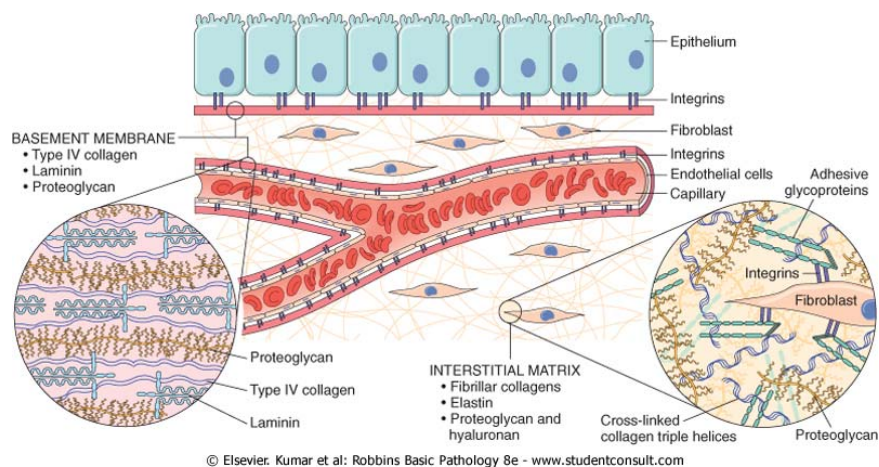
“Matrice extracellulare e matricine, segnali criptici fondamentali per il dialogo locale cellula-matrice” – [2]

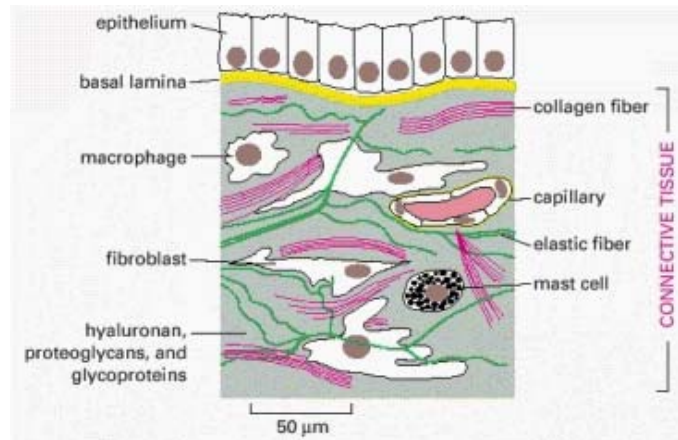
- ✚ La **proteolisi della matrice** in situazioni normali e patologiche induce **varchi** che facilitano la **migrazione** cellulare e provoca il **rilascio** di **frammenti peptidici in soluzione** nel liquido interstiziale oppure la **comparsa sulla superficie** proteica di **moduli precedentemente situati in posizione criptica**, che sono riconosciuti da integrine sulla superficie cellulare comportandosi da **fattori di crescita** o di **differenziamento**.
- ✚ I **proteoglicani** e l'**acido ialuronico** permettono una **concentrazione localizzata di tali segnali** contribuendo alla **diversificazione del microambiente cellulare**.

Matrice extracellulare, introduzione - [1]

- ✚ Nonostante la MEC sia composta soltanto da cinque classi di macromolecole - collageni, elastina, acido ialuronico, proteoglicani, glicoproteine - essa può assumere una **ricca varietà di forme** con **proprietà meccaniche altamente differenziate**.

Matrice extracellulare





Il tessuto connettivo sottostante un epitelio.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26810/figure/A3534/>

Matrice Extracellulare Materiale acellulare che circonda le cellule



Struttura della MEC:

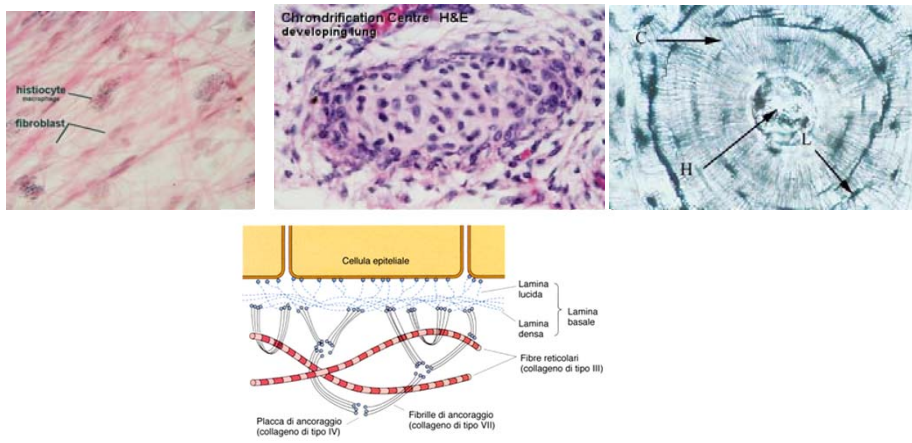
- ✚ **Fibre:** collagene ed elastina, che forniscono resistenza e flessibilità
- ✚ **Proteoglicani:** complessi proteina-polisaccaridi che forniscono una matrice voluminosa
- ✚ **Glicoproteine adesive:** "incollano le cellule" e la MEC, ad es. fibronectina e laminina.

Funzione

- ✚ Sostegno meccanico per le cellule e per il tessuto
- ✚ Integrazione delle cellule in tessuti
- ✚ Influenzamento della forma e il movimento della cellule
- ✚ Influenzamento dello sviluppo e il differenziamento delle cellule
- ✚ Coordinamento delle funzioni cellulari mediante segnalamento attraverso recettori di adesione (e recettori associati)
- ✚ Riserva di molecole di segnalamento extracellulare.
- ✚ Legame con proteasi della matrice e loro inibitori

MEC: Macromolecole secrete localmente da cellule specializzate

- ✚ **Fibroblasti** nei tessuti connettivi
- ✚ **Condroblasti**, osteoblasti: tessuti connettivi specializzati
- ✚ **Cellule epiteliali e fibroblasti**: lamina basale



Matrice Extracellulare, MEC

- ✚ E' costituita da **proteine** e **polisaccaridi** secreti da quasi tutti i **tipi cellulari** (eccezione: eritrociti)
- ✚ Riempie gli spazi tra le cellule
- ✚ Collega tra di loro cellule e tessuti.
- ✚ Una sottile lamina basale sostiene meccanicamente e metabolicamente cellule epiteliali, cellule muscolari, cellule adipose e i nervi periferici: **LAMINA BASALE**
- ✚ E' particolarmente abbondante nei tessuti connettivi.

Matrice Extracellulare

- ✚ Gran varietà di **polisaccaridi** e **(glico)proteine** altamente **versatili** che vengono secreti localmente e si assemblano in una rete organizzata
- ✚ Variazioni in:
 - quantità relative macromolecole della matrice
 - modo di organizzarsi
- ✚ Stupefacente **diversità di forme**, adattate alle richieste funzionali dei vari tessuti:
 - **Calcificazione**: strutture dure e compatte delle ossa o dei denti
 - **Matrice trasparente**: cornea
 - **Strutture cordoniformi**: tendini
 - Lamina di **controllo della permeabilità**: “lamina” basale

MEC: RUOLO

- ✚ Impalcatura **relativamente inerte** per stabilizzare la struttura fisica tessuti??? **NO!!**
- ✚ Ruolo attivo e complesso di regolazione del comportamento delle cellule
- ✚ Influenza su:
 - Sviluppo
 - Migrazione cellulare
 - Proliferazione
 - Apoptosi
 - Forma
 - Funzioni metaboliche

MACROMOLECOLE EXTRACELLULARI – [1]

- A. Polisaccaridi di tipo **glicosaminoglicani** (GAGs) di solito **legati covalentemente a proteine** formando **proteoglicani**.
- B. Proteine fibrose:
- Predominantemente **strutturali**: **collagene**, **elastina**
 - Predominantemente **adesive**: es:
 - **Fibronectina**
 - **Laminina**

MACROMOLECOLE EXTRACELLULARI – [2]

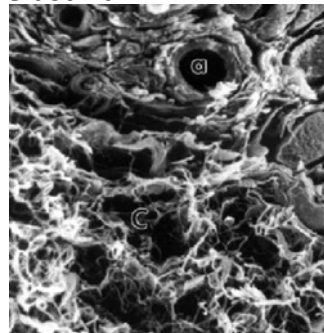
- ✚ **Fibre collagene**: rafforzano e aiutano ad organizzare la matrice.
- ✚ **Fibre di elastina**: conferiscono **resilienza** (capacità di riprendere la forma primitiva dopo deformazione).
- ✚ **Proteine multiadesive**: aiutano le cellule ad aderire alla matrice e organizzano le varie componenti della matrice.

GAGs & Proteoglicani

- ✚ “**Sostanza fondamentale**” altamente **idratata** tipo gel in cui sono incluse le proteine fibrose:
- ✚ Fase acquosa del gel di polisaccaridi → permette la **diffusione di nutrienti, metaboliti, cataboliti e ormoni tra sangue e cellule.**

La matrice idratata

- ✚ La MEC è essenzialmente un **gel** (solido fibroso permeato da un **liquido viscoso**) creato dalle cellule che vi aderiscono.
- ✚ Fibre strutturali di collagene ed elastina
- ✚ Matrice idratata
 - Fluido extracellulare
 - Proteoglicani
- ✚ Molecole adesive
 - Fibronectina
 - Laminina

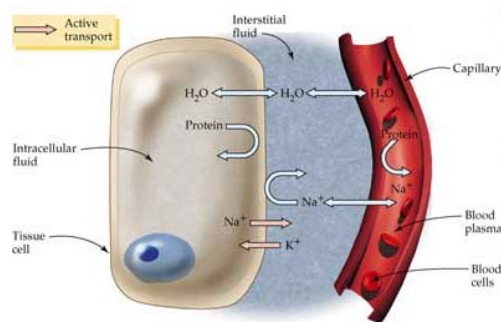


University of Virginia

Liquido interstiziale

✚ Il liquido interstiziale è fondamentale per **mantenere l'omeostasi fra le aree intracellulari e extracellulari**.

✚ E' composto da un vettore **acquoso** che contiene soprattutto acidi grassi, aminoacidi, zuccheri, coenzimi, messaggeri chimici (es. citochine, ormoni, neurotrasmettitori), sali minerali, gas in soluzione (es. O_2 , CO_2) e prodotti di scarto.

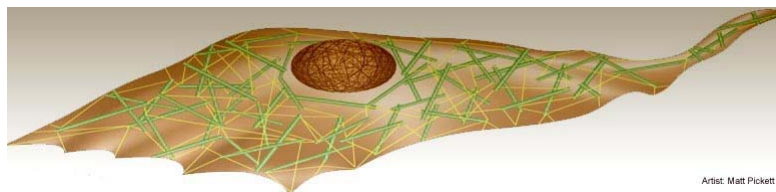


<http://www.fastexercise.com/?LP=102>

Meccanotrasduzione e biontegrità

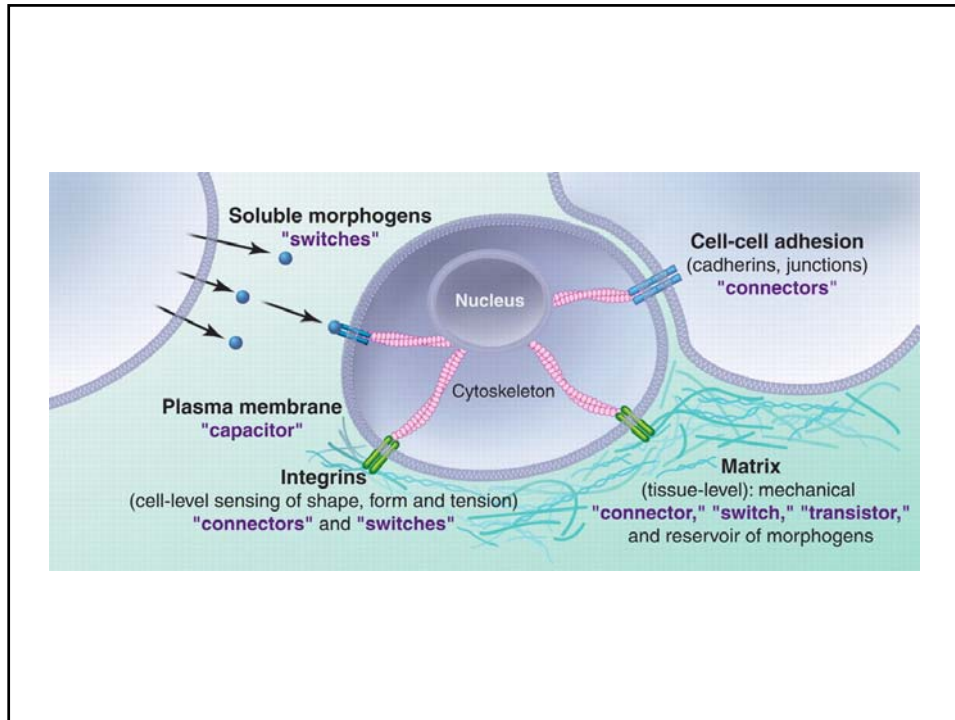
✚ Mediante il processo di **meccanotrasduzione**, le cellule sono in grado di convertire alterazioni di tipo meccanico in alterazioni chimiche o genetiche.

✚ Le cellule mantengono la loro morfologia e funzione mediante un **sistema di tensione integrato** denominato **tensegrità**.



Artist: Matt Pickett

<http://apps.childrenshospital.org/clinical/research/ingber/Tensegrity.html>



- ✦ All'interno delle cellule i **microtubuli** costituiscono le **strutture di compressione**, mentre **l'actina**, strettamente associata ai filamenti di miosina, forma le **strutture di tensione**.
- ✦ La tensione meccanica, generata dai movimenti, è trasmessa mediante pressione alla MEC, che a sua volta trasferisce i movimenti alle cellule mediante le integrine.
- ✦ Il citoscheletro trasduce queste forze in segnali chimici e stimoli meccanici che sono **trasferiti al nucleo** tramite i filamenti intermedi che sono collegati a proteine dette nesprine e Sun.
- ✦ Queste a loro volta comunicano con la **lamina nucleare** e la lamina con il **DNA**.
- ✦ Il nucleo stesso ha un sistema di tensegrità intrinseca e attiva la proliferazione, il metabolismo, il differenziamento o l'apoptosi in risposta a tali stimoli meccanici

Biotensegrità

La morfologia appiattita o arrotondata degli elementi cellulari e la struttura tridimensionale dei patterns tissutali formando ghiandole, alveoli, dotti e papille, dipendono dalla rigidità o flessibilità della membrana basale, nonché del suo movimento coordinato.

Noguera R, Nieto OA, Tadeo I, Fariñas F, Alvaro T. **Extracellular matrix, biotensegrity and tumor microenvironment.** An update and overview. *Histol Histopathol.* 2012 Jun;27(6):693-705.

a

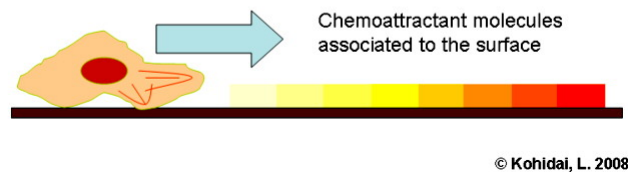
Cortical actin filaments, Cytoskeleton, Cell-cell contact, Cytoskeletal organisation, Transcription Proliferation Cell viability, Receptor activation, Extracellular matrix

b

Motility, Polarity established, Rear, Front, Lamellipodium protrusion, Actin polymerisation, New cell-matrix contact points, Retrograde flux of actin and associated surface receptors, Adhesive traction, Loss of cell-cell contact, Detachment, Polarised endocytic recycling

Cell adhesion and cell migration
Expert Reviews in Molecular Medicine © 1999 Cambridge University Press

Haptotaxis



Fattori di crescita secreti legati alla MEC (1)

- ✚ **Molti fattori di crescita si legano alle proteine della MEC** e debbono essere considerati come componenti della MEC.
- ✚ E' vero che molti fattori di crescita e secreti **si legano ai GAGs**, e specialmente ai **GAGs** ad **eparan solfato**.
- ✚ Tuttavia, molti fattori di crescita si possono legare a **domini specifici della proteine** della matrice:
 - La fibronectina si può legare specificamente a diversi tipi di fattori di crescita (VEGF, HGF, PDGF, ecc.)
 - I domini von Willebrand factor di tipo C (VWC/chordin) e follistatin che si trovano in molte proteine legano le "bone morphogenetic proteins» (BMPs),
 - Il TGF si lega specificamente a domini TB delle «Latent transforming growth-factor β -binding proteins» (LTBPs) che a loro volta si legano alle fibrilline e a matrici ricche di fibronectina.
 - Importante: mutazioni nelle fibrilline influenzano la regolazione della funzione del TGF- β nel sindrome di Marfan e altre patologie.

Hynes RO, Naba A. **Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions.** Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Jan 1;4(1):a004903.

Fattori di crescita secreti legati alla MEC (2)

- ✚ La MEC può fungere da **serbatoio di fattori di crescita**.
- ✚ Vi sono molti esempi di questo per le chemochine e per molti dei più importanti fattori di differenziamento (es. VEGFs, Wnt, Hhs, BMPs, FGFs)
- ✚ Tali fattori formano **gradienti che controllano la formazione dei diversi pattern tissutali** durante lo sviluppo embrionale;
- ✚ I gradienti sono fortemente influenzati dal legame alla MEC.

[**Chemochine**: piccole citochine (molecole di segnalamento) secrete dalle cellule. Il nome deriva dalla loro **capacità di indurre la chemotassi** in cellule vicine responsive]

Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Jan 1;4(1):a004903.

Agenti che modificano la struttura e la funzione della MEC (1)

- ✚ Le proteine della MEC e le fibrille in cui si assemblano sono in seguito spesso **modificate** in modo significativo.
- ✚ I collagene subiscono «**cross-links**» mediante **legami disolfuro** (S-S) o derivati dall'azione di transglutaminasi o lisil ossidasi e idrossilasi:
 - ◆ Le laminine e altre proteine della membrana basale anche esse subiscono «cross-links» mediante legami disolfuro.
 - ◆ Idem per la fibronectina che inoltre subisce ulteriore processamento ad uno stato caratterizzato da insolubilità in desossicolato (DOC).
 - ◆ Anche la fibronectina e altre proteine della MEC sono substrati per la transglutaminasi 2 che contribuisce indubbiamente per l'insolubilità della MEC.

Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Jan 1;4(1):a004903.

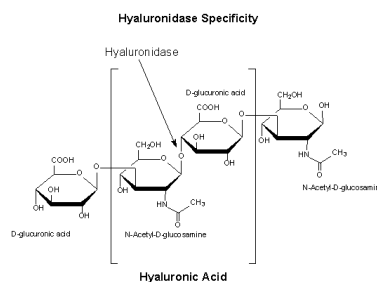
Agenti che modificano la struttura e la funzione della MEC (2)

- ✚ Anche gli **enzimi proteolitici** modificano la MEC:
 - ◆ Ad es le pro-peptidasi dei procollageni sono necessarie per processare i collageni in modo che essi possano polimerizzare.
 - ◆ I collageni e altre proteine della MEC sono inoltre substrati per le metalloproteinasi della matrice (MMPs) e per le proteasi ADAMTs («A Desintegrin and a Metalloproteinase with a Thrombospondin domain»).
 - ◆ Molti altri enzimi proteolitici (elastasi, catepsine, diverse serina esterasi proteasi, ecc.) possono intervenire su diverse proteine della MEC.
- ✚ Queste proteasi sono coinvolte nel **turn-over della MEC** e inoltre probabilmente contribuiscono a **rilasciare fattori di crescita** legati alla matrice oppure **ad esporre attività criptiche** della MEC, incluso il rilascio di **inibitori dell'angiogenesi**.

Hynes RO, Naba A. **Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions**. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Jan 1;4(1):a004903.

Agenti che modificano la struttura e la funzione della MEC (3)

- ✚ Allo stesso modo, **enzimi che degradano i GAGs**, quali ad esempio le **ialuronidasi**, le **eparanasi** e le **solfatasi**, possono alterare le proprietà dei PGs della matrice.
- ✚ Il **rimodellamento della MEC** da parte di queste attività ha effetti estremamente importanti nello sviluppo embrionale e nelle patologie.



http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/life-science/biochemicals/migrationbiochemicals1/hyaluronidase_hyaluronic_ac.gif

Recettori cellulari per la MEC (integrine e non solo) (1)

- ✚ La MEC influenza il comportamento cellulare tramite **recettori specifici**.
- ✚ I principali recettori sono la famiglia delle **integrine**, che comprende 24 eterodimeri $\alpha\beta$.
- ✚ Un altro recettore per le proteine della MEC è il **distroglicano**, che si lega alla laminina, agrina e perlecano nelle membrane basali ed anche alle neurexine transmembrana.
- ✚ Ciascuno di questi ligandi del distroglicano contengono domini LamG che si legano al distroglicano in modo dipendente dalla glicosilazione, probabilmente mediante legame alle catene di carboidrati laterali del distroglicano.
 - ◆ Mutazioni nel distroglicano o nelle sue proteine associate nella membrana o nel citoscheletro (o nella laminina) possono produrre varie forme di **distrofia muscolare**, a causa della perdita del collegamento transmembrana alla membrana basale che circonda le cellule muscolari.

Recettori cellulari per la MEC (integrine e non solo) (2)

- ✚ Altri recettori cellulari per la MEC includono:
 - ◆ La GPVI sulle piastrine e le tirosina chinasi «Discoidin Domain receptor» (DDR), tutti recettori per i collageni.
 - ◆ Il complesso GPIb/V/IX, che forma un recettore per il fattore di von Willebrand nelle piastrine
 - ◆ **CD44**, che si lega all'ialuronato ed è espresso in molte cellule.
- ✚ Oltre a collegarsi ai ligandi extracellulari questi recettori per la matrice forniscono **collegamenti transmembrana al citoscheletro** e alle vie di trasduzione del segnale.
- ✚ I **domini citoplasmatici dei recettori** per la MEC **assemblano grandi complessi dinamici di proteine** che **regolano l'assemblaggio del citoscheletro** ed all'interno delle cellule e **attivano molte cascate di segnalazione**
- ✚ Questo è vero non solo per le integrine ma anche per gli altri tipi di recettore.