

Matrice Extracellulare

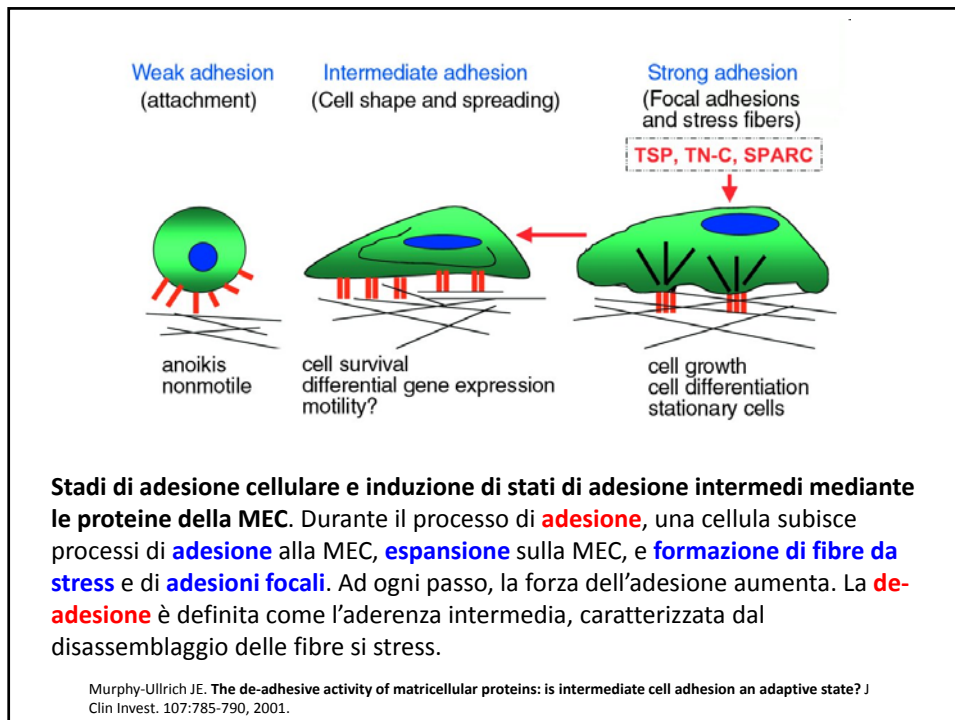
Glicoproteine Adesive

«...susseguirsi di domini diversi con proprietà di legame uniche e caratteristiche»

Le componenti extracellulari dell'adesione cellulare

- ✚ In vitro, l'**adesione**, l'**espansione** e la **migrazione** delle cellule richiedono **interazioni** tra la **cellula** e la **MEC**.
- ✚ Il grado di espansione della cellula dipende dalla **concentrazione delle componenti della MEC**, ossia del **numero di contatti focali** stabiliti.
- ✚ Quando una cellula incontra quantità limitate di sostanze adesive, essa tende a **migrare verso regioni dove la concentrazione è sufficiente per permettere alle cellule di espandersi**.
- ✚ Sembra che la migrazione abbia luogo quando le interazioni cellula-matrice sono **poche in numero** ma tali da conferire la **trazione** necessaria per la migrazione:
 - L'aumento del numero di punti di adesione cellulare immobilizza la cellula.
- ✚ Si ritiene che meccanismi simili abbiano luogo durante lo **sviluppo embrionale**, i processi di **riparo** e la **disseminazione metastatica**.

(Smith & Wood, Cell Biology, Stanley Thrones, 1999)



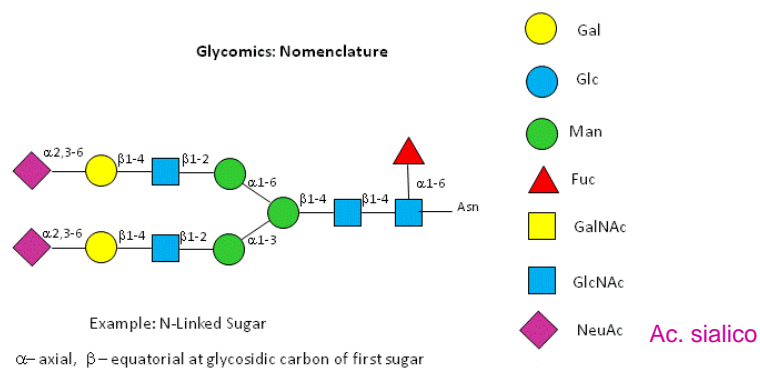
GLICOPROTEINE

- ✚ La maggior parte dei carboidrati delle membrane è collegata covalentemente a proteine, formando **glicoproteine**.
- ✚ I carboidrati legati sono **catene oligosaccaridiche**, che di solito non eccedono 15 unità monosaccaridiche.
- ✚ Un piccolo numero di monosaccaridi può fornire un **alfabeto per generare una gran diversità di messaggi**. Si ottengono messaggi diversi quando **tipi diversi di monosaccaridi si collegano in siti diversi e in numero diverso**. Ricordiamoci che i monosaccaridi si possono collegare con atomi di carbonio diversi per formare **oligomeri ramificati**. La possibilità di avere diversi quadri di ramificazione già di per se aumenta enormemente la specificità e diversità dei segnali che gli oligosaccaridi possono fornire.

✚ Gli oligosaccaridi legati a proteine o a lipidi possono avere **6 o più tipi diversi di zuccheri collegati sia mediante legami glicosidici lineari che ramificati**, il numero di tipi diversi di oligosaccaridi che si possono formare è estremamente elevato



Nuova nomenclatura visuale per la glicobiologia



Consortium for Functional Glycomics (2005)

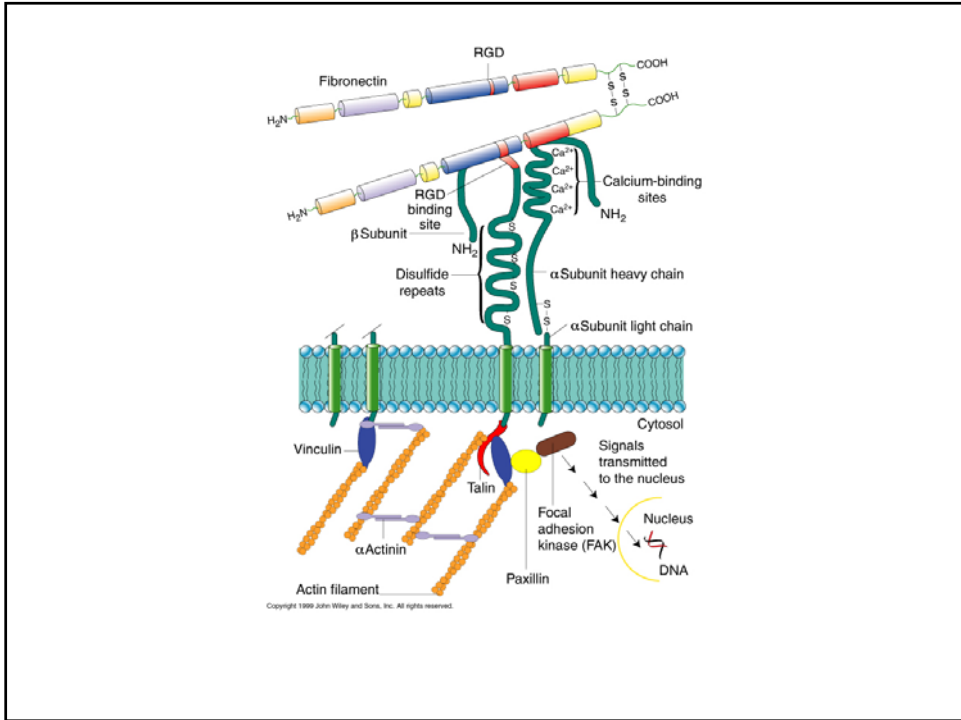
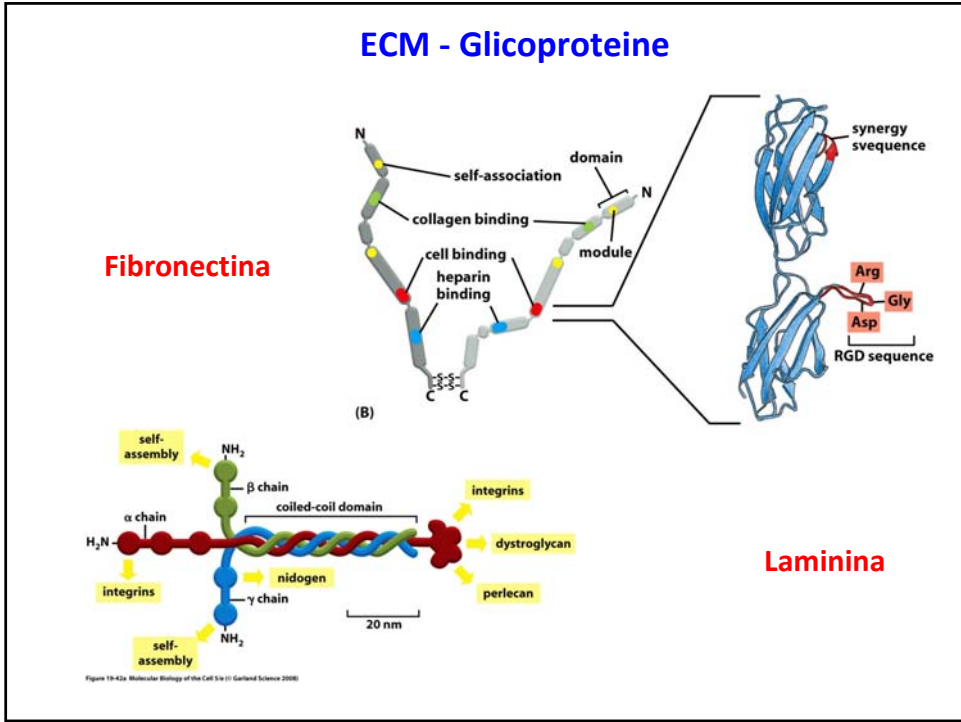
Glicoproteine strutturali

- ✚ Sono molecole **multifunzionali**.
- ✚ Di solito **interagiscono con diverse componenti della matrice extracellulare e delle superficie cellulari**, mediante **domini specifici**, e sembrano giocare un ruolo importante nelle interazioni cellula-matrice, fungendo da proteine di ancoraggio alla cellula.
- ✚ La loro capacità di auto-associarsi e di legarsi ad altre componenti della matrice suggerisce che esse collaborino inoltre **all'organizzazione cellulare della matrice circostante**.
- ✚ Le meglio caratterizzate sono la **fibronectina** e la famiglia della **laminina**.

TIPI DI MATRICE RAPPRESENTATIVE PRODOTTE DALLE CELLULE DEI VERTEBRATI IN VIVO

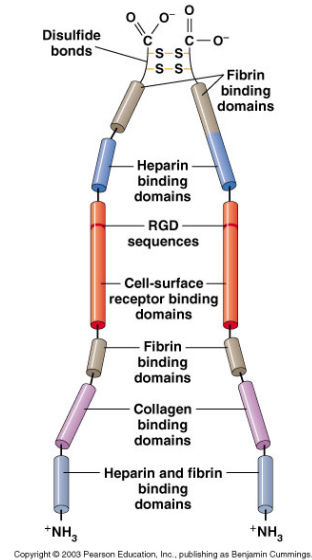
Tipo di Collagene	Proteina di ancoraggio associata	Proteoglicano associato	Recettore sulla superficie cellulare	Cellule che lo producono
I	Fibronectina	Condroitin solfato Dermatan solfato	Integrina	Fibroblasti
II	Fibronectina	Condroitin solfato	Integrina	Condrociti (cartilagine)
III	Fibronectina	Eparan solfato	Integrina	Epatociti quiescenti; fibroblasti associati agli epiteli
		Eparina		
IV	Laminina	Eparan solfato	Recettori per la laminina	Tutte le cellule epiteliali; cellule endotelali; epatociti in rigenerazione
		Eparina		
V	Fibronectina	Eparan solfato Eparina	Integrina	Fibroblasti quiescenti
VI	Fibronectina	Eparan solfato	Integrina	Fibroblasti quiescenti

Smith & Wood, **Cell Biology**, Stanley Thornes, Cheltenham, 2nd ed., 1999



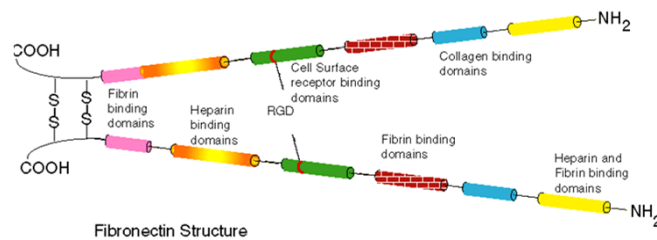
Fibronectina - 1

- ✦ La fibronectina lega le cellule alla matrice e collabora a guidare il movimento cellulare.
- ✦ E' presente sia in forma **solubile** che **insolubile**.
- ✦ Contiene **siti di legame** sia per **recettori sulla superficie cellulare** che per diversi altre componenti extracellulari; es:
 - **Eparina** (un GAG; **anticoagulante**)
 - **Fibrina** (proteina della cascata della coagulazione del sangue)
 - **Collageno**
- ✦ Ubiquitaria, presente anche nel sangue dove collabora al legame delle piastrine nella formazione dei coaguli sanguigni.



Fibronectina - 2

- ✦ **Glicoproteina multidominio** di grandi dimensioni che si trova:
 - tessuto connettivo
 - superficie cellulari
 - plasma
 - altri fluidi corporei



Fibronectina - 3

✚ *Interagisce con una grande diversità di macromolecole:*

- Del citoscheletro
- Della matrice extracellulare
- Del sistema di coagulazione del sangue (molecole circolanti)
- Del sistema della fibrinolisi (molecole circolanti)
- Del sistema di risposta acuta all'infezione (molecole circolanti)
- Recettori sulla superficie cellulare di diversi tipi di cellule:
 - fibroblasti
 - neuroni
 - fagociti
 - batteri

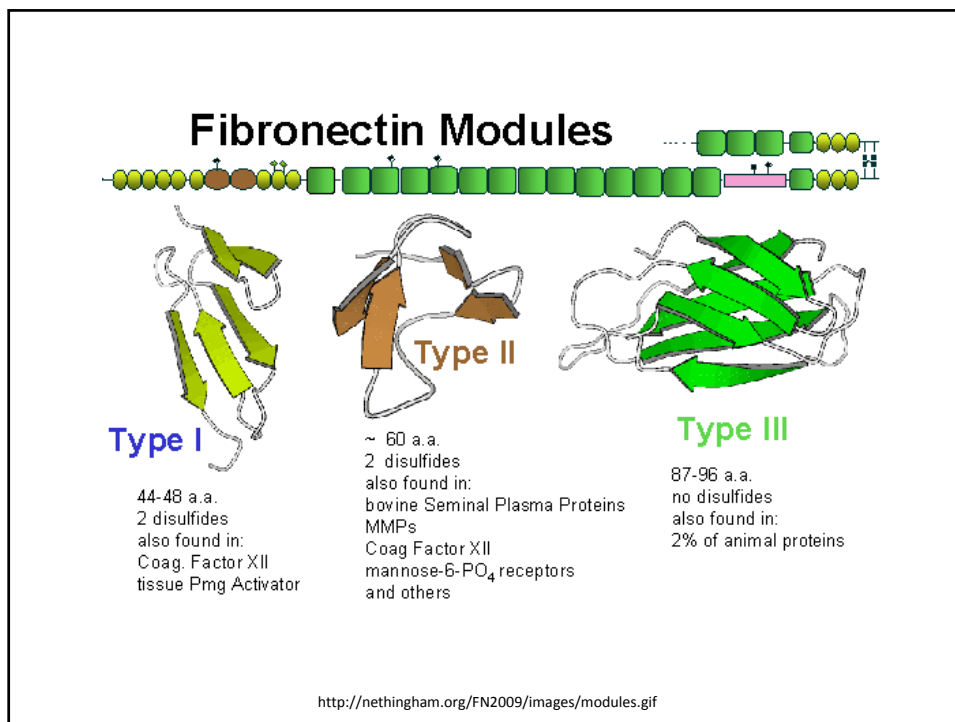
Fibronectina - 4

✚ Interagisce inoltre con se stessa, formando entità fibrillari la cui struttura è poco nota.

✚ Interagisce anche con piccole molecole:

- Gangliosidi (derivati dalla sfingosina)
- Zuccheri
- Ioni Ca^{2+} .

✚ Queste diverse **funzioni di riconoscimento** sono localizzate su frammenti distinti o **domini**, molti dei quali sono stati espressi in forma ricombinante o isolati mediante digestione proteolitica, trattenendo le loro capacità di legame specifiche.



PROPRIETA' DEI SITI DI LEGAME DELLA FIBRONECTINA

Sito (importanza fisiologica)	Proprietà
Fibrin(ogeno) I (formazione di coaguli; guarigione delle ferite)	Legame debole a 37°, probabilmente stabilizzato mediante cross-linking fatto dalla transglutaminasi al fibrin(ogeno)
Eparina I (legame alle cellule; migrazione cellulare)	Molto più debole dell'eparina II, a 37°C; significato fisiologico incerto
Legame agli Stafilococchi (infezione)	Si presume che opsonizzi i <i>Stafilococchi</i> , ma più probabilmente che alcuni ceppi abbiano sviluppato la capacità di legarsi alla fibrina per aiutare l'infezione
Sito di "cross-linking" mediato da transglutaminasi (formazione dei coaguli)	Coinvolge residui di glutamina dall'amino-terminale
Legame al collagene (gelatina) (legame e organizzazione cellula-matrice)	Si lega alla gelatina in modo più forte che al collagene nativo. Si lega inoltre a porzioni di collagene "denative" (?9del complemento C1q e acetilcolinesterasi
Legame con il DNA (?) [forse con DNA rilasciato da cellule morte]	Dopo il sito di legame al collagene verso il carbossi-terminale: significato sconosciuto
Siti di legame alle cellule (migrazione cellulare; interazione con la matrice)	Contiene sequenze Arg-Gly-Asp (RGD) che si legano a recettori sulla superficie cellulare.
Eparina II (aggregazione dei proteoglicani; legame alla superficie cellulare) Fibrin(ogeno) II (formazione di coaguli)	La principale funzione è il legame con i proteoglicani
Fibrin(ogeno) II (formazione di coaguli)	Come per fibrin(ogeno) I

LA TENSIONE ESERCITATA DALLE CELLULE REGOLA L'ASSEMBLAGGIO DELLA FIBRONECTINA -1

- ✚ La fibronectina può esistere:
 - in una **forma solubile**, che circola **nel sangue** e in altri fluidi corporei
 - In forma di **fibrille di fibronectina insolubili**, in cui i dimeri di fibronectina formano legami incrociati uno con l'altro mediante **legami disulfuro** addizionali, **nella matrice extracellulare**.
- ✚ Al contrario delle molecole di collagene fibrillare, che si possono auto-assemblare in vitro, **le molecole di fibronectina si assemano in fibrille soltanto sulla superficie cellulare**, e **soltanto** laddove le cellule posseggono **proteine di legame con la fibronectina adeguate** – in particolare le **integrine**.

LA TENSIONE ESERCITATA DALLE CELLULE REGOLA L'ASSEMBLAGGIO DELLA FIBRONECTINA -2

- ✚ Le **integrine** forniscono un **legame** fra la fibronectina all'esterno della cellula con il **citochesletro di actina** al suo interno.
- ✚ **Il legame trasmette tensione alle molecole di fibronectina** – purchè esse abbiano inoltre un legame ad un'altra struttura – e le tende, esponendo un **sito di legame criptico** (nascosto) all'interno delle molecole di fibronectina:

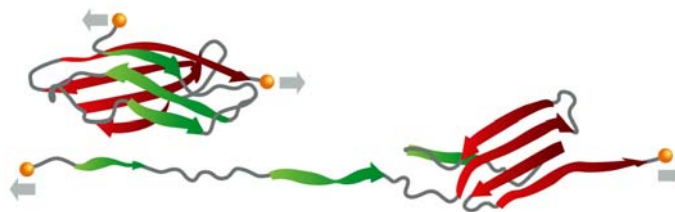
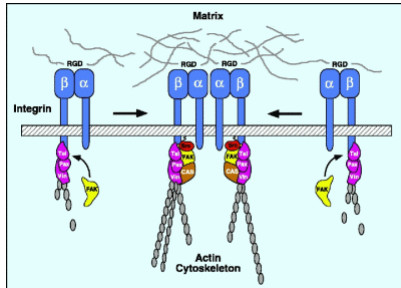
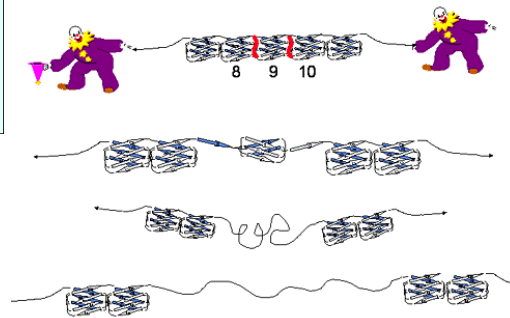


Figure 19-73 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

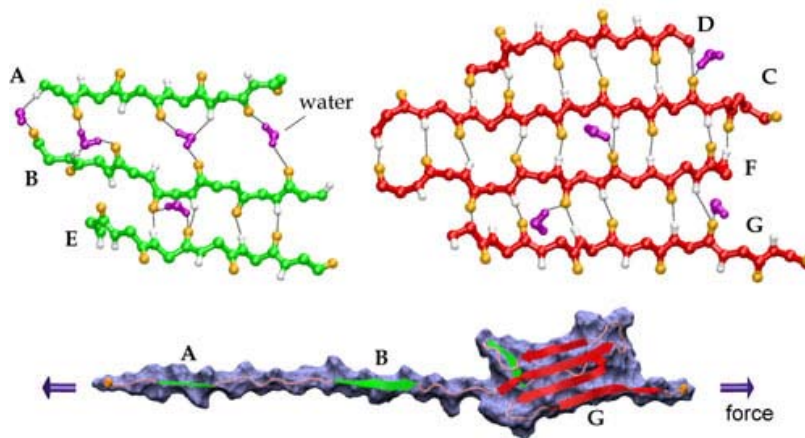
STIRAMENTO DELLE FIBRILLE DI FIBRONECTINA



Interazione della fibronectina con le integrine

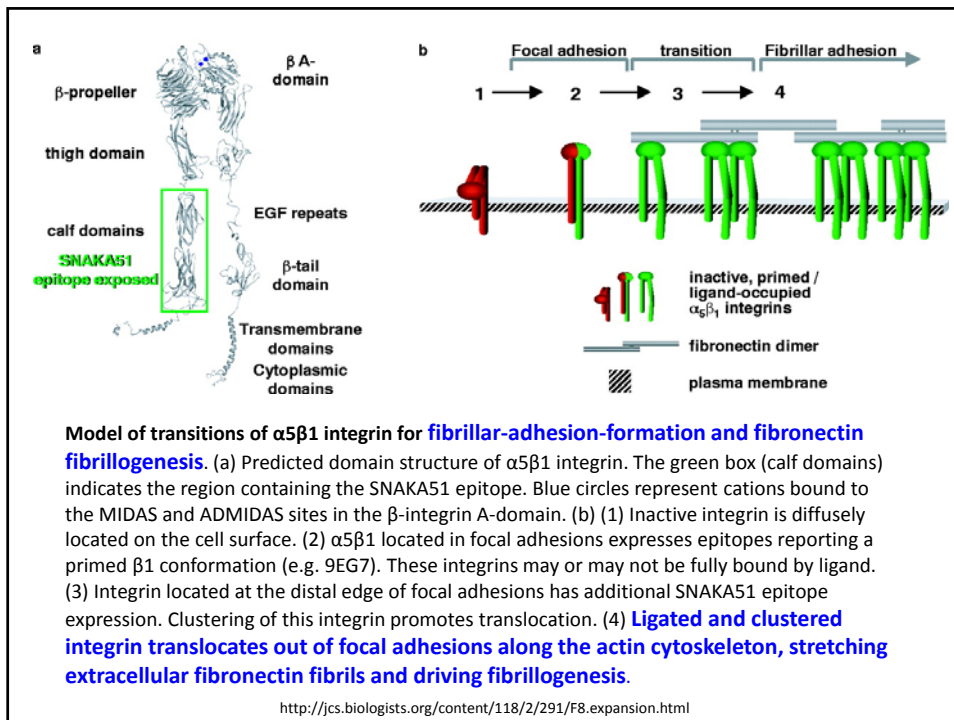


<http://nethingham.org/FN2009/images/fnstretch.gif>

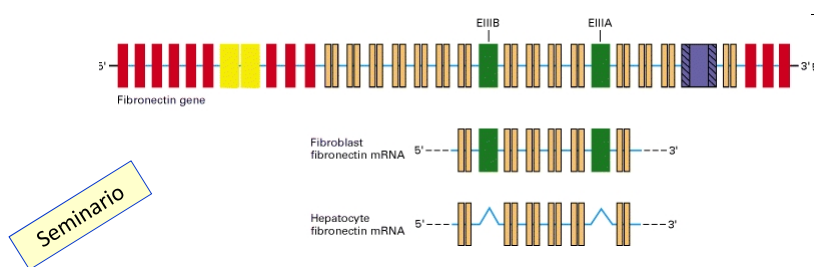


Stiramento di un modulo di tipo III1 della fibronectina

<http://www.ks.uiuc.edu/Research/fibronectin/>



Splicing tipo cellulare-specifico del pre-mRNA della fibronectina nei fibroblasti e negli epatociti



The ≈ 75 -kb fibronectin gene (*top*) contains **multiple exons** that likely evolved from an ancestral gene through a number of duplications of exons. Exons with homologous sequences are shown in the same color. In this diagram, introns (thin blue lines) are not drawn to scale; most of them are much longer than any of the exons. The fibronectin mRNA produced in fibroblasts includes the EIIIA and EIIIB exons, whereas these exons are spliced out of fibronectin mRNA in hepatocytes.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21558/figure/A2911/>

EFFETTI DELLE FIBRONECTINE SULLA FORMA DELLE CELLULE E SUL MOVIMENTO CELLULARE - 1

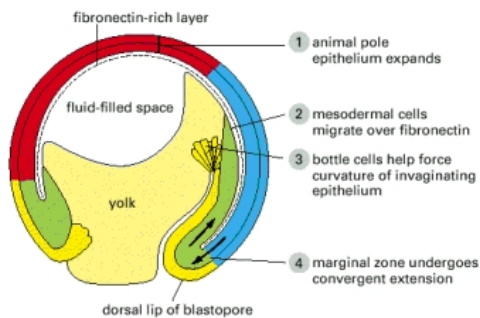
- ✚ La fibronectina lega recettori presenti sulla superficie delle cellule ed ad alcuni componenti della MEC, quali collagene e l'eparina, fungendo così da **molecola ponte che ancora le cellule alla MEC**.
- ✚ Questa funzione può essere dimostrata sperimentalmente, seminando le cellule in una piastra di coltura la cui superficie sia stata ricoperta di fibronectina:
 - In queste condizioni, le cellule si attaccano alla superficie della piastra in modo molto più efficiente che in assenza di fibronectina.
 - Una volta attaccate, le cellule si appiattiscono ed i filamenti di actina presenti all'interno delle cellule si allineano con le fibre di fibronectina presenti all'esterno della cellula.
 - Poiché l'orientamento e l'organizzazione del citoscheletro di actina sono importanti per determinare la forma delle cellule, si ritiene che la fibronectina sia importante per il mantenimento della forma delle cellule.

Adattato da: Becker – Kleinsmith – Hardin: **Il Mondo della Cellula**, II edizione (2006), EdiSES

EFFETTI DELLE FIBRONECTINE SULLA FORMA DELLE CELLULE E SUL MOVIMENTO CELLULARE - 2

- ✚ La fibronectina è coinvolta anche nel **movimento cellulare**:
 - Quando le cellule embrionali in migrazione sono cresciute su fibronectina esse vi aderiscono rapidamente.
 - Le **vie seguite dalle cellule in migrazione** contengono una notevole concentrazione di **fibronectina**, suggerendo che la loro migrazione sia guidata dal legame con la fibronectina lungo il percorso.
 - Quando anticorpi anti-fibronectina sono iniettati in embrioni di anfibi, la migrazione cellulare normale è bloccata, con il conseguente accumulo di anomalie dello sviluppo.
 - Topi knock-out per la fibronectina: mostrano gravi difetti nelle cellule della muscolatura che riveste tutta la lunghezza del corpo e nel sistema vascolare.

Adattato da: Becker – Kleinsmith – Hardin: **Il Mondo della Cellula**, II edizione (2006), EdiSES



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26863/figure/A3934/>

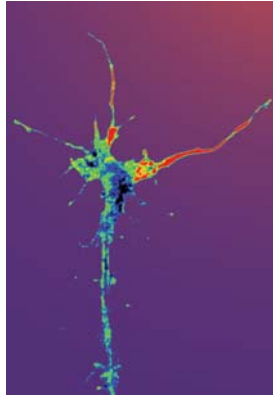
Movimenti cellulari durante la gastrulazione.

Una sezione su un embrione di *Xenopus* in fase di gastrulazione, che indica i **quattro principali tipi di movimento che la gastrulazione richiede**. L'epitelio al polo animale si espande mediante riarrangiamento cellulare, diventando più sottile man mano si espande. La migrazione delle cellule mesodermiche sopra una matrice ricca di fibronectina che riveste il tetto del blastocele può aiutare i tessuti invaginati in avanti. Ma la principale forza motrice per la gastrulazione dello *Xenopus* è l'estensione convergente nella zona marginale.

EFFETTI DELLE FIBRONECTINE SULLA FORMA DELLE CELLULE E SUL MOVIMENTO CELLULARE -3

- ✚ Possibile coinvolgimento della fibronectina nel **cancro**:
 - **Molti tipi di cellule tumorali sono incapaci di sintetizzare le fibronectine**, con conseguente perdita della normale forma cellulare e distacco dalla MEC.
 - Se si fornisce fibronectina a tali cellule, esse riacquisiscono una forma più normale e recuperano la capacità di legarsi alla MEC e non appaiono più maligne.
- ✚ Effetti della fibronectina sulla **coagulazione del sangue**:
 - La forma solubile della fibronectina presente nel sangue (***fibronectina plasmatica***), è coinvolta nella coagulazione del sangue.
 - La ***fibronectina plasmatica* promuove la coagulazione** in quanto **possiede diversi domini che riconoscono la fibrina**, una proteina della coagulazione, e **può ancorare le piastrine alla fibrina** durante la formazione del coagulo

Adattato da: Becker – Kleinsmith – Hardin: **Il Mondo della Cellula**, II edizione (2006), EdiSES

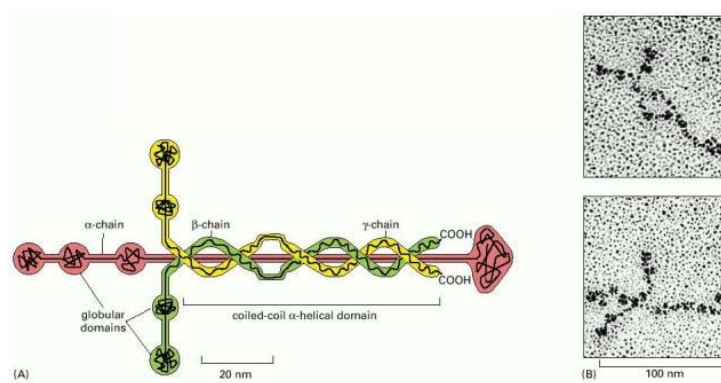


Glicoproteine della matrice

FAMIGLIA DELLE LAMININE

http://www.discoverlaminin.com/laminin_photo.html

Laminina



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26810/figure/A3580/>

Laminina - 1

- ✚ Glicoproteina di PM 900 kDa (Smith & Wood) [\sim 400 -800 kDa, Yurchenco].
- ✚ Originariamente isolata dalla MEC dei tumori.
- ✚ Nei tessuti normali è la principale glicoproteina non collagenosa delle **lamina basali**, localizzata nella "lamina rara".
- ✚ Rispetto alla fibronectina, si sa molto meno sui rapporti struttura-funzione della laminina.

(Smith & Wood, 1999)

Laminina: informazioni Miner (1)

- ✚ La «laminina» è una componente ubiquitaria delle membrane basali; questo termine tuttavia descrive una serie di isoforme diverse.
- ✚ Tutte le laminine sono secrete come **eterotrimeri $\alpha\beta\gamma$** , la cui struttura è stabilizzata da un numero limitato di **legami disolfuro** intercatenari:
 - 5 isoforme delle catene α .
 - 4 isoforme delle catene β
 - 3 isoforme delle catene γ .
- ✚ Le varie isoforme delle 3 catene si assemblano una con l'altra in modo non casuale e formano almeno 15 eterotrimeri diversi.
- ✚ Gli eterotrimeri sono designati in base alla specifica combinazione $\alpha\beta\gamma$:
- ✚ Es: laminina **$\alpha2\beta2\gamma1$** viene descritte come laminina **221** o come LM-**221**.

Miner JH. The glomerular basement membrane. Exp Cell Res. 2012 May 15;318(9):973-8.

Laminina: informazioni Miner (2)

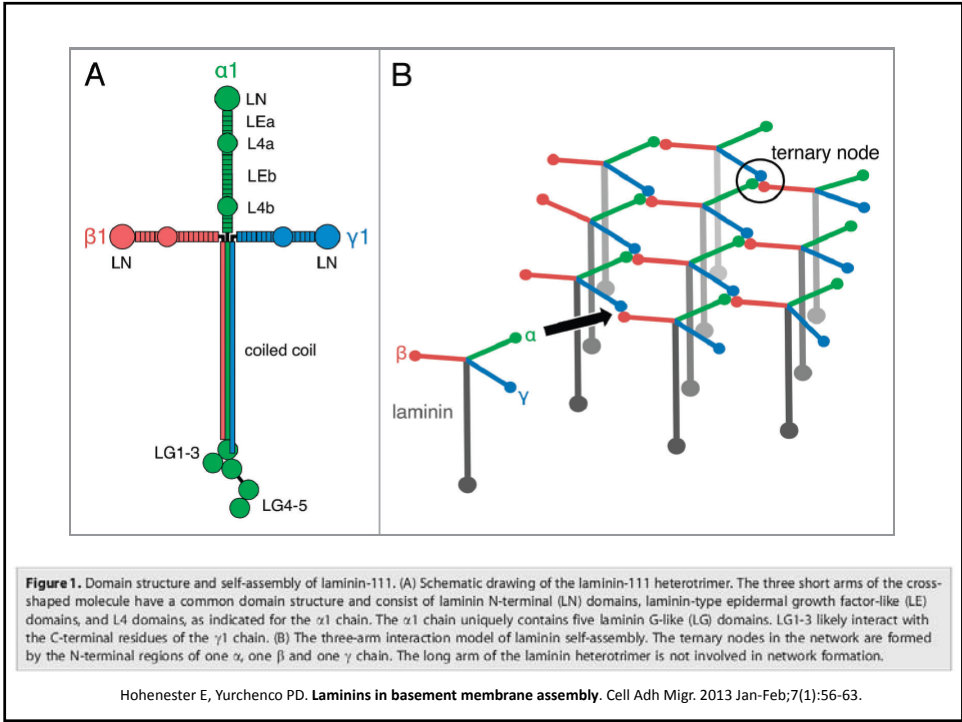
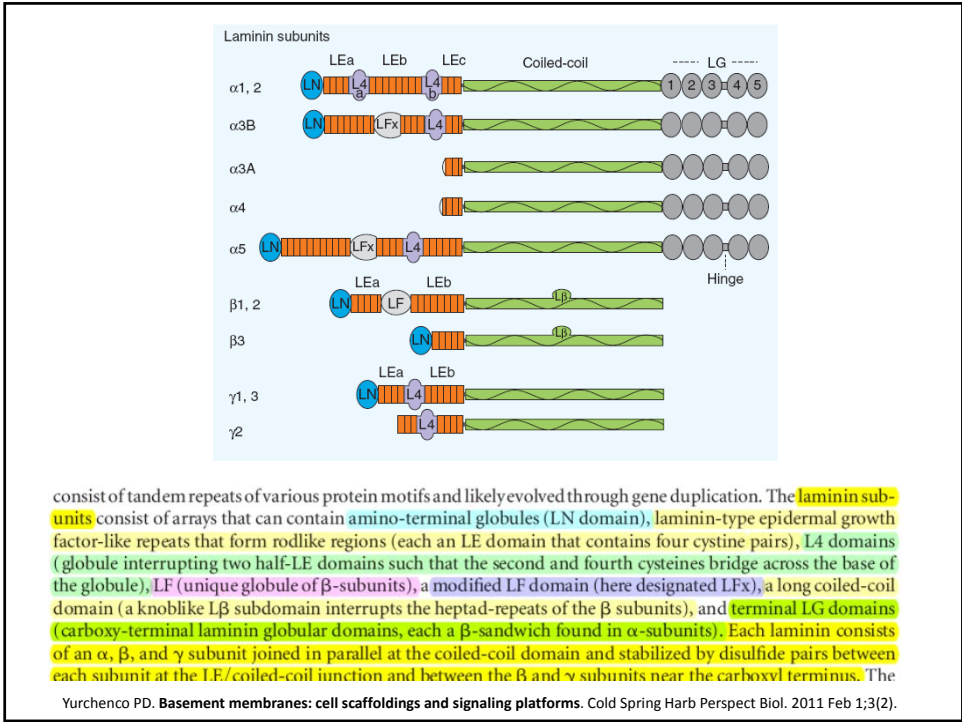
- Le varie catene della laminina sono correlate evolutivamente e quindi condividono diversi aspetti strutturali.
- Il tipico eterotrimerico viene schematizzato come una **struttura a croce** in cui le tre catene si avvolgono una rispetto all'altra mediante il loro dominio «**laminin coiled-coil**» (LCC) per formare il **braccio lungo** della croce.
- All'estremità di questo braccio lungo vi è un **dominio globulare** di **laminina (LG)** di grandi dimensioni (circa 900 AA) che si trova nel C-terminale di tutte le 5 isoforme di catene α .
- I domini LG contengono **5 sotto-domini** in tandem in cui si trovano i **siti di legame per recettori sulla superficie cellulare**, quali integrine e distroglicano.

Miner JH. *The glomerular basement membrane*. Exp Cell Res. 2012 May 15;318(9):973-8.

Laminina: informazioni Miner (3)

- Le altre tre braccia della croce, designate **braccia corte**, sono formate mediante domini alternati **globulari** e a **bastoncello**.
- Il dominio globulare N-terminale (**LN**) media le interazioni tra trimeri che portano alla formazione del polimero di laminina nella MEC e all'inizio dell'assemblaggio della membrana basale.
- I domini a bastoncello sono formati da ripetizioni «laminin-type epidermal growth factor-like» (**LE**) la cui struttura secondaria dipende da legami disolfuro molto estesi.

Miner JH. *The glomerular basement membrane*. Exp Cell Res. 2012 May 15;318(9):973-8.



Collegamento della laminina alla membrana plasmatica

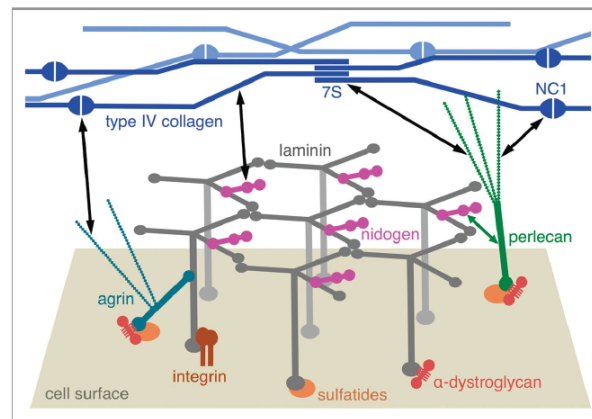


Figure 3. Schematic drawing of the molecular structure of a basement membrane. The laminin network is anchored to the cell surface by interactions of the long arms with cellular receptors (integrins, α -dystroglycan and sulfated glycolipids/sulfatides). Collateral interactions are made with the heparan sulfate proteoglycans agrin and perlecan. An independent network is formed by type IV collagen, through interactions of its N-terminal 7S and C-terminal NC1 domains, as well as through lateral associations of the triple helices. The laminin and collagen networks are linked by nidogen and heparan sulfates (black double-headed arrows).

Hohenester E, Yurchenco PD. Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adh Migr.* 2013 Jan-Feb;7(1):56-63.

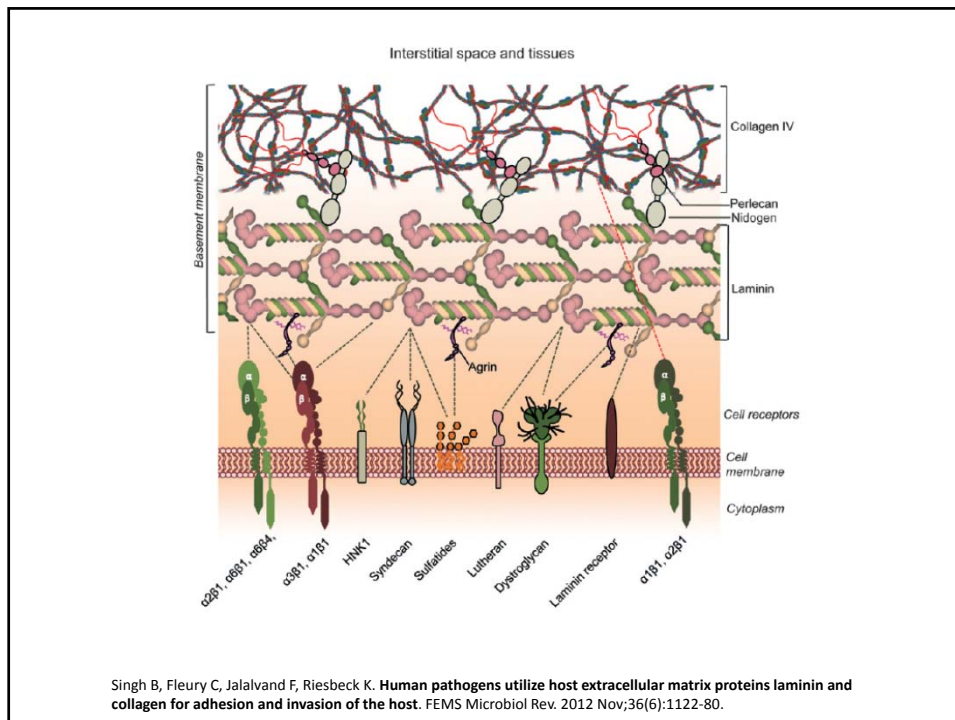
REVIEW ARTICLE

FEMS Microbiol Rev 36 (2012) 1122–1180

Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host

Birendra Singh, Christophe Fleury, Farshid Jalalvand & Kristian Riesbeck

Laminin (Ln) and collagen are multifunctional glycoproteins that play an important role in cellular morphogenesis, cell signalling, tissue repair and cell migration. These proteins are ubiquitously present in tissues as a part of the basement membrane (BM), constitute a protective layer around blood capillaries and are included in the extracellular matrix (ECM). As a component of BMs, both Lns and collagen(s), thus function as major mechanical containment molecules that protect tissues from pathogens. Invasive pathogens breach the basal lamina and degrade ECM proteins of interstitial spaces and connective tissues using various ECM-degrading proteases or surface-bound plasminogen and matrix metalloproteinases recruited from the host. Most pathogens associated with the respiratory, gastrointestinal, or urogenital tracts, as well as with the central nervous system or the skin, have the capacity to bind and degrade Lns and collagen(s) in order to adhere to and invade host tissues. In this review, we focus on the adaptability of various pathogens to utilize these ECM proteins as enhancers for adhesion to host tissues or as a targets for degradation in order to breach the cellular barriers. The major pathogens discussed are *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Treponema*, *Mycobacterium*, *Clostridium*, *Listeria*, *Porphyromonas* and *Haemophilus*; *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis*, *Cryptococcus* and *Coccidioides*; *Acanthamoeba*, *Trypanosoma* and *Trichomonas*; retrovirus and papilloma virus.



Laminina - 3

- ✚ La **digestione proteolitica** controllata della laminina dà origine a un gran numero di **frammenti in grado di legarsi a componenti della superficie cellulare e della MEC («matrichine»)**.
- ✚ La laminina è stata probabilmente la prima molecola di adesione a comparire durante lo sviluppo embrionale.
- ✚ La sua presenza ubiquitaria nella **lamina rara** delle lamine basali suggerisce che la laminina giochi un ruolo nell'interazione fra cellule epiteliali ed endoteliali con gli altri componenti della lamina basale.
 - La laminina promuove l'adesione di cellule epiteliali ed endoteliali specificamente al collagene di tipo IV, uno dei principali componenti della **lamina densa**.
 - La laminina sembra più attiva della fibronectina nella promozione della crescita dei neuriti e della formazione dei miotubi.
 - GAGs: la laminina si lega molto fortemente all'eparina e con moderata affinità all'eparan solfato, dermatan solfato e condroitin-4-solfato.

(Smith & Wood, 1999)