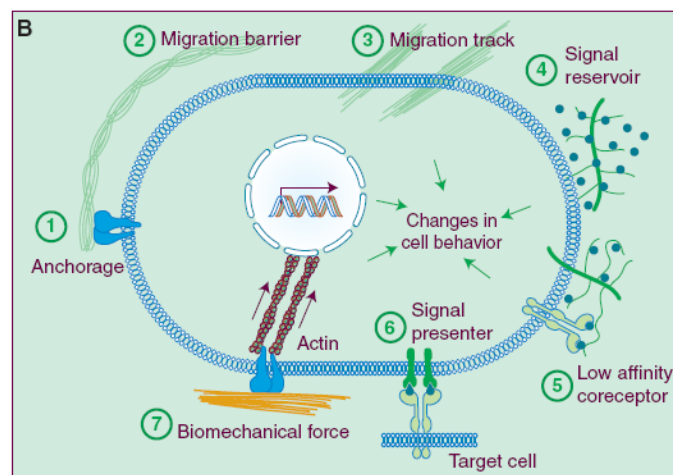


Didascalia Figura A di Lu et al.: **Alcuni dei meccanismi tramite i quali le attività degli enzimi che rimodellano la ECM sono regolati**

1. L'espressione spazio-temporale degli **enzimi che rimodellano la ECM** è regolata da fattori di trascrizione.
2. Una volta espressi, gli enzimi possono essere **consegnati in localizzazioni subcellulari specifiche**, incluso il fronte di migrazione di una cellula. A seconda che essi contengono o meno un dominio transmembrana, gli **enzimi** possono **ancorarsi alla membrana plasmatica** o venire **secreti**.
3. Quando prodotti inizialmente, la maggior parte degli enzimi che rimodellano la ECM si trovano sotto forma di **precursori inattivi** finché non vengono processati e i **pro-dominanti inibitori** sono **rimossi** da altre proteasi.
4. Gli enzimi attivi possono essere prontamente neutralizzati da **inibitori endogeni specifici** o da pan-inibitori,
5. venendo in seguito sottoposti a rimozione permanente mediante degradazione nei lisosomi.

Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. **Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease**. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Dec 1;3(12). doi:pii: a005058. 10.1101/cshperspect.a005058.

**Regolazione degli enzimi di rimodellamento della ECM e conseguenze biologiche della dinamica della ECM - [2]**



Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. **Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease**. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Dec 1;3(12). doi:pii: a005058. 10.1101/cshperspect.a005058.

Didascalia Figura B di Lu et al.: **Le funzioni versatili della matrice dipendono dalle sue diverse proprietà fisiche, biochimiche e biomeccaniche**

1. **L'ancoraggio alla lamina basale** è essenziale per diversi processi biologici, che includono ad esempio la **divisione cellulare asimmetrica** nella biologia delle cellule staminali e il **mantenimento della polarità** dei tessuti.
2. A seconda del contesto, la **ECM** può servire da **barriera**
3. o **facilitare la migrazione cellulare**.
4. Inoltre, **legando molecole di segnalamento con funzione di fattori di crescita**, e **impedendo** la loro altrimenti **diffusione libera**, la ECM funge da serbatoio per quei segnali ed aiuta a stabilire un **gradiente di concentrazione**.
5. Alcuni componenti della ECM, incluso l'eparan solfato e recettori per la ECM, quali ad esempio il CD44, possono legarsi selettivamente a diversi fattori di crescita e fungere da **co-recettori per segnali**,
6. oppure come «**presentatori**» di segnali, aiutando a determinare il senso della comunicazione cellula-cellula.
7. Infine, le **proprietà biomeccaniche** della ECM, incluso la **rigidità**, hanno un'influenza pronunciata su diversi comportamenti cellulari, quali il differenziamento cellulare.

Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. **Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease**. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Dec 1;3(12). doi:pii: a005058. 10.1101/cshperspect.a005058.

**LA DEGRADAZIONE DEI COMPONENTI DELLA MEC E' STRETTAMENTE CONTROLLATA - [1]**

- ✚ Il "turnover" delle macromolecole della matrice extracellulare é un parametro di particolare importanza per una gran varietà di processi biologici.
- ✚ Una **rapida degradazione** ha luogo, ad es., quando nel processo di **involutione dell'utero** dopo il parto, o quando la **coda del girino** viene **riassorbita** durante la **metamorfosi**.
- ✚ Una **degradazione più localizzata** dei componenti della matrice é richiesta quando le **cellule migrano attraverso la membrana basale**, o quando i **leucociti migrano attraverso la lamina basale vascolare** verso i tessuti in risposta ad infezione o danno, o quando le **cellule cancerose migrano** dal loro sito originario verso organi distanti tramite il flusso sanguigno o i vasi linfatici (**metastatzazione**).

## LA DEGRADAZIONE DEI COMPONENTI DELLA MEC E' STRETTAMENTE CONTROLLATA – [2]

- ✚ Anche nell'apparentemente statica matrice extracellulare degli animali adulti vi é un **lento ma continuo turnover** dovuto a **degradazione** e **re-sintesi**.
- ✚ In ciascuno di questi casi i **componenti della matrice** vengono **degradati da enzimi proteolitici extracellulari** che sono **secreti localmente** dalle cellule.
- ✚ Principali classi di proteasi:
  - **Metalloproteasi:** dipendono da un **metallo** legato nel sito attivo (es. **Zn<sup>2+</sup>**) per la loro attività
  - **Serina proteasi:** hanno un residuo di **serina altamente reattivo nel loro sito attivo**.

## LA DEGRADAZIONE DEI COMPONENTI DELLA MEC E' STRETTAMENTE CONTROLLATA – [3]

- ✚ Insieme, le **metalloproteasi** e le **serina proteasi** collaborano per degradare le proteine della matrice come il **collagene**, la **laminina** o la **fibronectina**.
- ✚ Alcune delle metalloproteasi, come le **collagenasi** sono altamente **specifiche**, scindendo particolari proteine in un **piccolo numero di siti**, e sono spesso **posizionate in modo tale che l'integrità strutturale della matrice viene distrutta da una proteolisi relativamente limitata**; in questo modo, la migrazione cellulare può essere grandemente facilitata con una proteolisi limitata.

## LA DEGRADAZIONE DEI COMPONENTI DELLA MEC E' STRETTAMENTE CONTROLLATA – [4]

- ✚ Una importante **serina proteasi** coinvolta nella degradazione della matrice é il “**urokinase-type plasminogen activator**” (**U-PA**).
- L'attività U-PA ha come risultato quello di **scatenare specificamente una cascata proteolitica**: il suo **bersaglio** specifico é il **plasminogeno**, un precursore di tipo serina proteasi inattivo che abbonda nel torrente sanguigno e si accumula nei siti di rimodellamento dei tessuti come le **ferite**, i **tumori** e i **siti di infiammazione**.
- L'U-PA scinde un singolo legame nel **plasminogeno** per dare la **proteasi attiva, plasmina**.
- ✚ Al contrario del U-PA, la **plasmina** ha un'**ampia specificità**, degradando una gran varietà di proteine, includendo la **fibrina** (uno dei componenti dei coagoli sanguigni), la **fibronectina** e la **laminina**.

## LA DEGRADAZIONE DEI COMPONENTI DELLA MEC E' STRETTAMENTE CONTROLLATA – [5]

- ✚ Diversi meccanismi collaborano per assicurare che la **degradazione** dei componenti della matrice sia **strettamente controllata**.
  1. Molte proteasi come il plasminogeno, sono **secrete come precursori inattivi** che possono venire attivati localmente.
  2. L'**azione** delle proteasi é **confinata in aree specifiche mediante diversi inibitori delle proteasi**, anche essi secreti, come gli **inibitori tissutali delle metallo proteinasi** (“tissue inhibitors of metalloproteinases, **TIMPs**” e gli **inibitori delle serine proteasi**, noti come **serpine**).

## LA DEGRADAZIONE DEI COMPONENTI DELLA MEC E' STRETTAMENTE CONTROLLATA – [6]

- ✚ Questi **inibitori** sono **specifici per le diverse proteasi** e si legano strettamente all'enzima attivato bloccandone l'attività.
- ✚ Gli inibitori possono essere **secreti** dalle cellule ai **confini delle aree di attiva degradazione**, per proteggere la matrice non coinvolta; inoltre, gli inibitori possono **proteggere la proteine della superficie cellulare** coinvolte nell'adesione o nella migrazione cellulare.
- ✚ Molte cellule hanno **recettori** sulla loro superficie **che legano le proteasi** come il U-PA, così **confinando l'enzima soltanto laddove é necessario**: l'U-PA legato a recettori é stato visto ad es. nei coni di crescita dei nervi e alla estremità anteriore dei leucociti migranti, dove può servire per pulire la strada per la loro migrazione, e sembra che sia necessario per alcuni tipi di cellule tumorali per metastatizzare.

## Classi di enzimi proteolitici – [1]

- ✚ Le **serina proteasi** o **serina endopeptidasi** sono enzimi che scindono legami peptidici delle proteina in un processo in cui la serina funge da aminoacido **nucleofilico** nel sito attivo dell'enzima.

[**Agente nucleofilico**: specie chimica che **dona una coppia di elettroni ad un elettrofilo per formare un legame chimico**. Tutte le molecole o ioni con una coppia di elettroni liberi o almeno un legame  $\pi$  possono fungere da nucleofili. Dato che i nucleofili donano elettroni sono per definizione basi di Lewis.]

## Seminario

**Meccanismi delle proteasi – [1]**

- ✚ **Proteasi:** enzimi che catalizzano la scissione idrolitica dei legami peptidici, ossia, rompono i legami peptidici mediante l'aggiunta di una molecola di acqua.
- ✚ Le proteasi subentrano in quattro principali classi di meccanismi: **serina**, **cisteina**, **aspartil** e **metalloproteasi**.
- ✚ Nei siti attivi delle **serina** e **cisteina proteasi**, il residuo che dà il nome all'enzima è di solito **appaiato ad un gruppo che ritira un protone** per promuovere un attacco nucleofilo ad un legame peptidico.
- ✚ Viceversa, le **aspartil proteasi** e le **metallo proteasi** attivano una molecola di **acqua** che servirà da **agente nucleofilo**, invece di utilizzare un gruppo funzionale dell'enzima stesso.
- ✚ Tuttavia, il processo complessivo di scissione del legame peptidico è essenzialmente lo stesso per tutte le classi.

Erez E, Fass D, Bibi E. **How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane.** Nature. 2009 May 21;459(7245):371-8.

**Meccanismi delle proteasi – [2]****Serina proteasi solubili**

- ✚ Le serina proteasi solubili (E.C. 3.4.21) usano una **triade catalitica** localizzata nel sito attivo dell'enzima.
- ✚ La **triade** è una struttura coordinata che consiste in tre aminoacidi: **istidina**, **serina** e **acido aspartico**.
- ✚ Ciascuno di questi aminoacidi gioca un ruolo importante nel meccanismo della proteasi.
- ✚ L'**istidina**, con l'aiuto dell'**aspartato** (che ritira il protone), deprotona il gruppo idrossilico della **serina**, permettendo un attacco nucleofilo al gruppo carbonilico del substrato.
- ✚ Il secondo aspetto caratteristico delle serina proteasi è un **buco ossianionico**, che stabilizza lo stato di transizione tetraedrico.
- ✚ Nella serina proteasi chimotripsina, ad es., il buco ossianionico è formato usando i gruppi NH dell'impalcatura della glicina 193 e della serina 195.

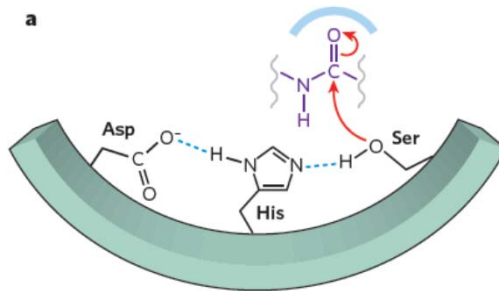
## Seminario

Erez E, Fass D, Bibi E. **How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane.** Nature. 2009 May 21;459(7245):371-8.

Seminario

## Meccanismi delle proteasi – [3]

### Serina proteasi solubili (*segue*)



Nell'immagine, le **curve azzurre** rappresentano i buchi ossianionici. Le curve più spesse rappresentano schematicamente l'enzima. Le **freccette rosse** indicano il movimento delle copie di elettroni. Le **linee tratteggiate blu** rappresentano legami di idrogeno o altre interazioni elettrostatiche. Le linee **ondulate grigie** rappresentano il proseguimento del polipeptide substrato a ciascuno dei lati del legame peptidico, che è rappresentato esplicitamente.

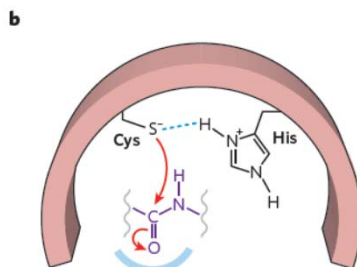
Erez E, Fass D, Bibi E. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. Nature. 2009 May 21;459(7245):371-8.

Seminario

## Meccanismi delle proteasi – [4]

### Cisteina proteasi [E.C. 3.4.22]

- ✚ Il suo meccanismo di azione è simile a quella delle serina proteasi in quanto usano un forte agente nucleofilo e la formazione di un complesso covalente enzima-substrato.
- ✚ Tuttavia, in questo caso l'agente nucleofilo è l'atomo di **zolfo** di un residuo di **cisteina**, invece dell'ossigeno di una serina.
- ✚ Nella cisteina proteasi papaina, i gruppi NH della cisteina 25 e della glutamina 19 formano il buco ossianionico



Erez E, Fass D, Bibi E. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. Nature. 2009 May 21;459(7245):371-8.

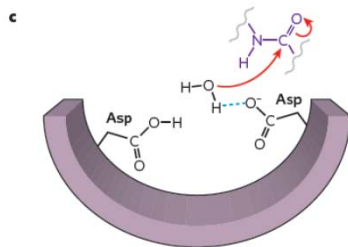


## Seminario

## Meccanismi delle proteasi – [5]

### Aspartil proteasi [E.C. 3.4.23]

- Le aspartil proteasi contengono due residui di **acido aspartico** che agiscono in un meccanismo generale acido-base.
- Una molecola di acqua coordinata fra gli acidi aspartici viene attivata mediante sottrazione di un protone, il che permette all'acqua polarizzata di attaccare il carbonio carbonilico del legame scindibile del substrato.
- Lo stato di transizione tetraedrico formato nell'attacco nucleofilo sembra di non essere modificato, al contrario dell'ossianione che si forma durante la catalisi svolta dalle serina o cisteina proteasi.



Erez E, Fass D, Bibi E. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. Nature. 2009 May 21;459(7245):371-8.

## Meccanismi delle proteasi – [6]

### Metalloproteasi [E.C. 3.4.24] - 1

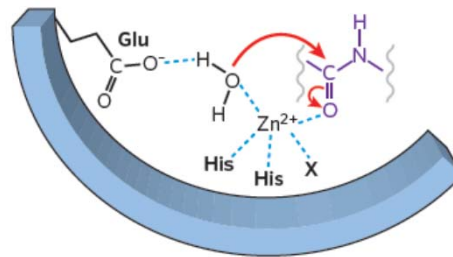
- Le metalloproteasi usano un metallo di coordinazione, spesso lo zinco, nel loro meccanismo catalitico.**
- Il molte metalloproteasi solubili, quali ad es. la termolisina e nelle metalloproteasi della matrice, la coordinazione è svolta da tre istidine, o da due istidine e da una catena acida laterale.
- Una molecola di acqua, che funge da ligando aggiuntivo con lo zinco, viene legata mediante un ponte di idrogeno al glutamato, che estrae un protone dalla molecola di acqua attaccante.
- L'ione zinco stesso stabilizza l'ossianione.

## Seminario

Erez E, Fass D, Bibi E. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. Nature. 2009 May 21;459(7245):371-8.

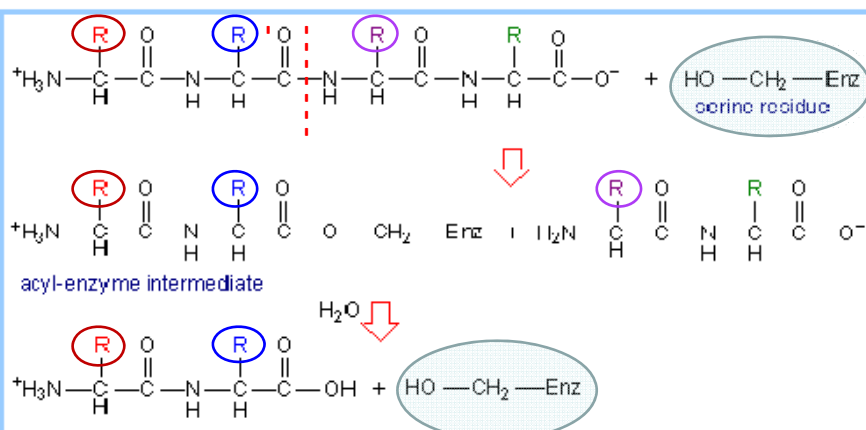
## Meccanismi delle proteasi – [7] Metalloproteasi [E.C. 3.4.24] - 2

d



Erez E, Fass D, Bibi E. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. Nature. 2009 May 21;459(7245):371-8.

## Meccanismo di azione delle serina proteasi



<http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb2/part1/protease.htm>

## Classi di enzimi proteolitici – [2]

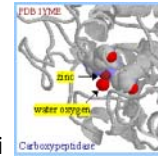
- ✚ **Serina proteasi:** includono gli enzimi digestivi **tripsina**, **chimotripsina** e **elastasi**.
- ✚ Le differenti **serina proteasi** differiscono nella **specificità per il substrato:**
  - Ad es., la chimotripsina preferisce una catena laterale aromatica nel residuo aminoacidico il cui atomo di carbonio carbonilico è parte del legame peptidico che verrà scisso (gruppo **R-** colorato in blu, figura precedente).
  - La tripsina preferisce un residuo di Lys o Arg carico in quella posizione

Seminario

## Classi di enzimi proteolitici – [3]

- ✚ **Aspartato proteasi:** includono l'enzima digestivo **pepsina**, alcune proteasi dei **lisosomi**, l'enzima renale **renina**, e la **HIV-proteasi**. Due residui di aspartato partecipano a catalisi di tipo acido/base nel sito attivo.
- ✚ **Cisteina proteasi:** includono le **caspasi**, che funzionano nella degradazione delle proteine durante l'apoptosi (morte cellulare programmata), l'enzima delle piante **papaina** e alcune delle **cathepsine** dei lisosomi. Tutte le caspasi scindono il lato carbonilico di un residuo di aspartato.

## Classi di enzimi proteolitici – [4]



✚ **Zinco proteasi (*metalloproteasi*)**: includono gli enzimi digestivi **carbossi-peptidasi**, diverse metalloproteasi della matrice (“**matrix metalloproteases**”, MMPs), che possono essere secrete dalle cellule (oppure rimangono legate alla membrana plasmatica), e una proteasi lisosomiale.

- Alcune MMPs (ad es. le collagenasi) sono coinvolte nella **degradazione della matrice durante il rimodellamento dei tessuti**.
- Alcune MMPs giocano un **ruolo nel segnalamento cellulare**, correlato alla loro **capacità di rilasciare citochine** e **fattori di crescita** dalla superficie cellulare mediante scissione di pre-proteine legate alla membrana.
- Il **motivo legante lo zinco nel sito attivo** della metalloproteasi include **due residui di istidina**, i cui anelli imidazolici laterali sono ligandi per il  $Zn^{2+}$ .
- Durante la catalisi, lo  $Zn^{2+}$  promuove l’attacco nucleofilo dell’ossigeno dell’acqua nel sito attivo al carbonio carbonilico.