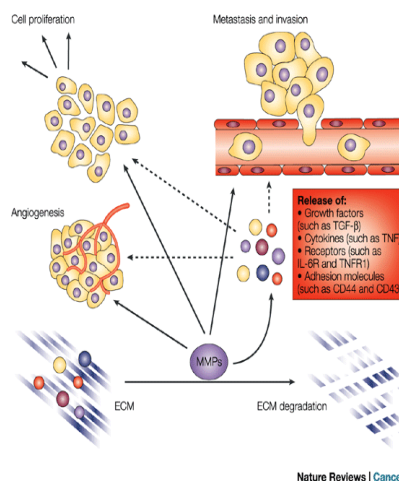


MATRICHINE, MATRICRIPTINE & SITI MATRICRIPTICI

(Con particolare attenzione agli **INIBITORI DELL'ANGIOGENESI**)

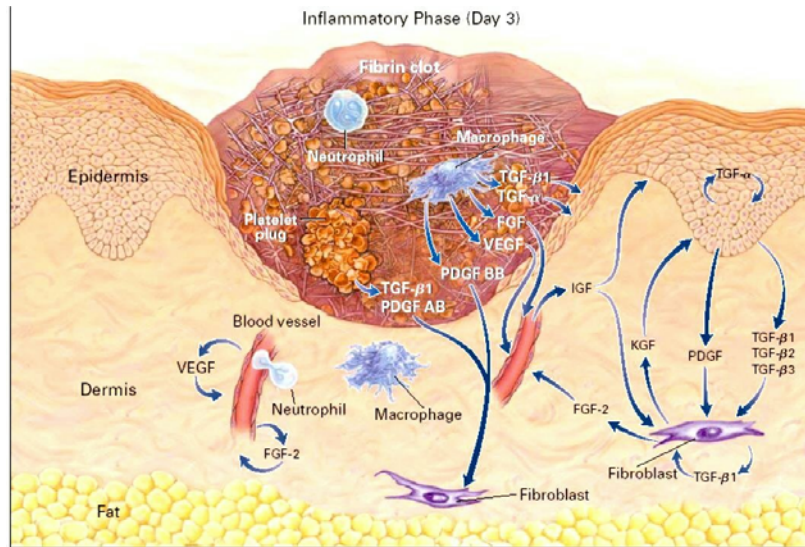
L'azione delle proteasi può rilasciare o semplicemente fare emergere polipeptidi bioattivi ("matrichine")

- Le metalloproteasi della matrice (MMPs) possono promuovere la **proliferazione delle cellule tumorali** mediante l'**interazione delle molecole della MEC con le integrine**, scindendo "**insulin-like growth factors**" e rilascio ("shedding") di **precursori transmembrana di fattori di crescita** (es. "transforming growth factor- α ;
TGF- α ").
- Le MMPs possono **promuovere l'angiogenesi aumentando la biodisponibilità di fattori di crescita pro-angiogenici**.
- Le MMPs regolano inoltre l'**invasione e la migrazione** in quanto degradano i componenti strutturali della MEC (in particolare scindendo la laminina-5).



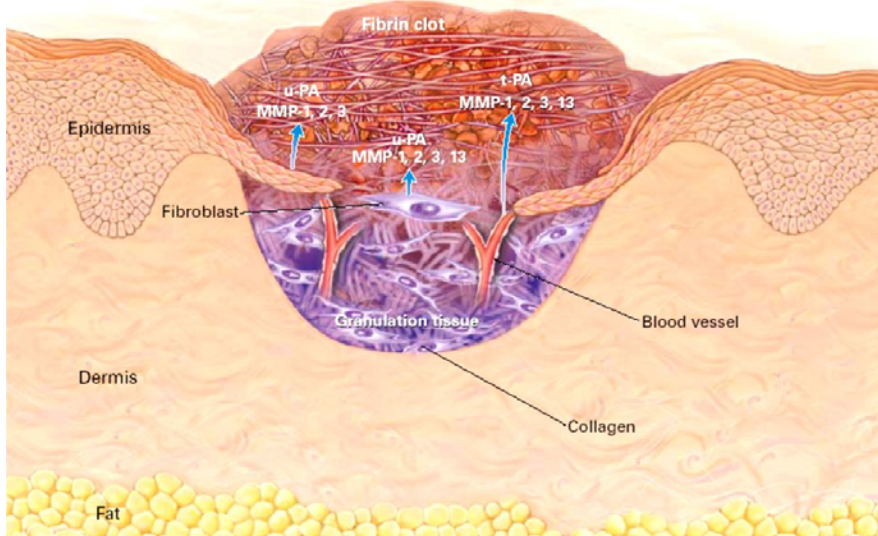
IL-6R: ricettore per la interleukin-6; TGF- β : transforming growth factor- β ; TNF: tumour necrosis factor.

Tessuto di granulazione

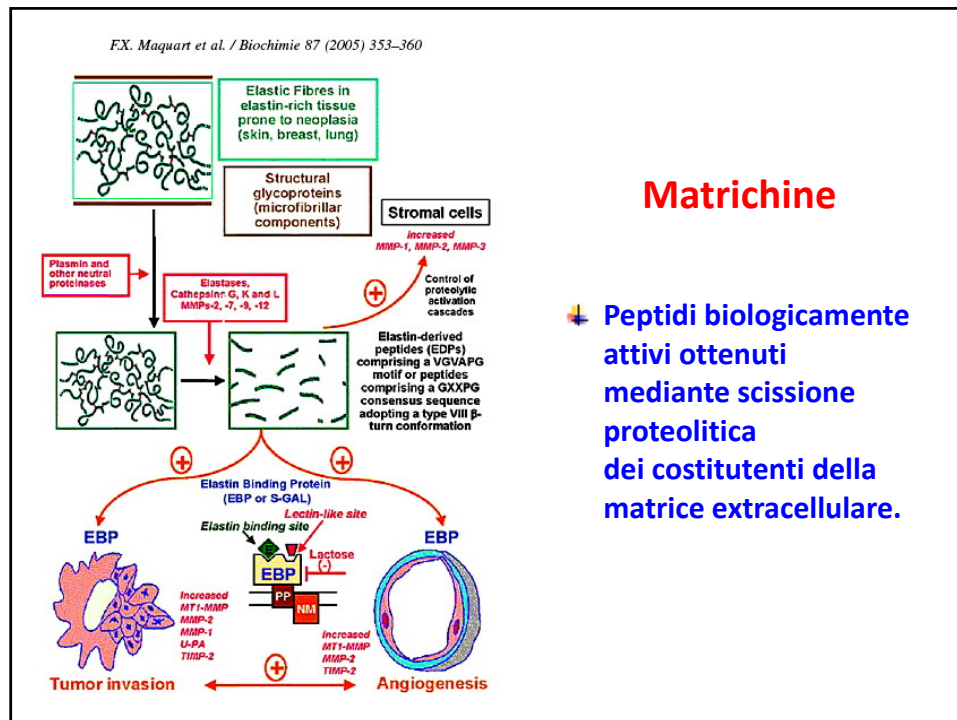


Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. N Engl J Med. 1999 Sep 2;341(10):738-46.

Reepithelialization and Neovascularization (Day 5)



Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. N Engl J Med. 1999 Sep 2;341(10):738-46.



Matrichine – [1]

- Alcuni **componenti della MEC** possono essere **rilasciati** sotto forma di **matrichine** che hanno **attività biologica** indipendente dal loro ruoli nell'ambito della struttura della MEC.
- Queste molecole possono **legarsi** a diversi **recettori** su cellule stazionarie o migranti, inducendo una gran diversità di risposte che dipendono dal **tipo cellulare**, **stato di attivazione** e altri **fattori ambientali**.
- La risposta delle cellule bersaglio è ulteriormente determinata dalla **presenza di chemochine**, **collegamento con integrine**, **citochine** o **fattori di crescita**.

Matricriptine

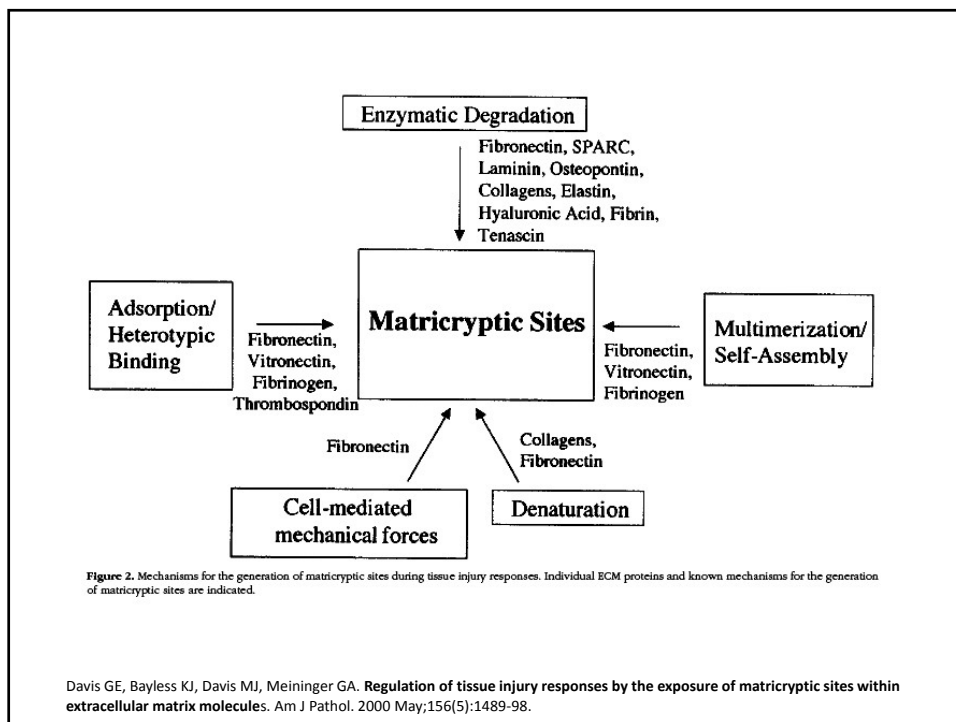
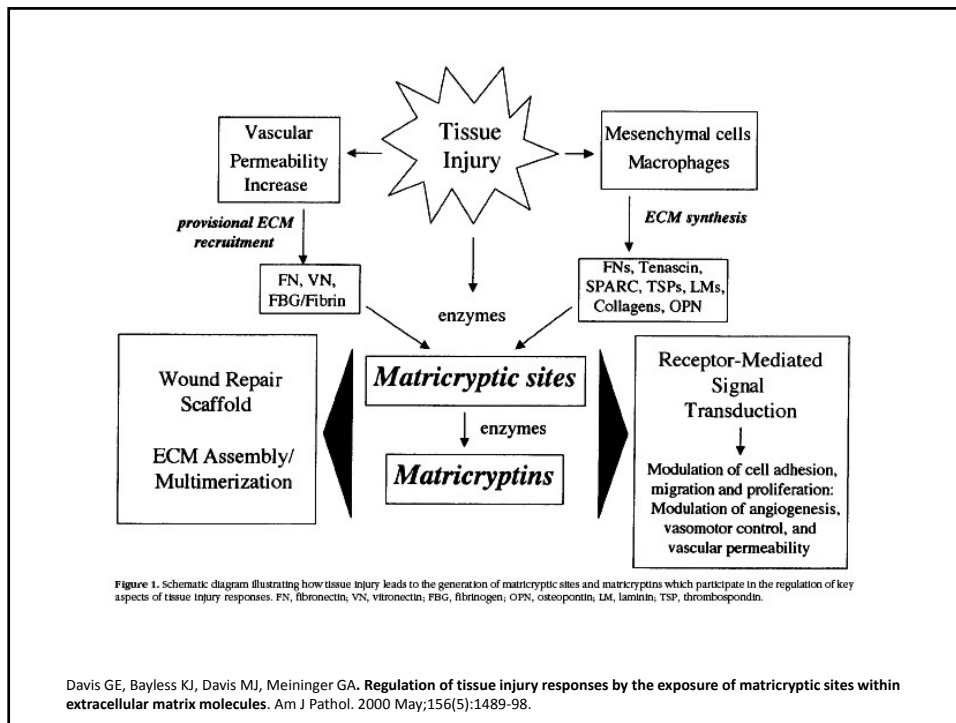
- ✚ Frammenti enzimatici della MEC che espongono siti precedentemente criptici.
- ✚ Questi frammenti biologicamente attivi contengono un **dominio criptico** che **non è normalmente esposto nella molecola intatta**.
- ✚ Perchè questa attività biologica si possa esercitare è necessaria una **degradazione enzimatica** che **alteri strutturalmente** o **conformazionalmente** la molecola di partenza.

Davis GE, Bayless KJ, Davis MJ, Meininger GA. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. Am J Pathol. 2000 May;156(5):1489-98.

Matricrine e matricriptine – [1]

- ✚ La **proteolisi controllata della MEC** rilascia **frammenti bioattivi** o **smaschera siti criptici** che giocano ruoli chiave nel controllo di diversi processi fisio-patologici che includono:
 - ✚ Angiogenesi
 - ✚ Rimodellamento dei tessuti
 - ✚ Guarigione delle ferite
 - ✚ Infiammazione
 - ✚ Crescita tumorale
 - ✚ Metastatizzazione

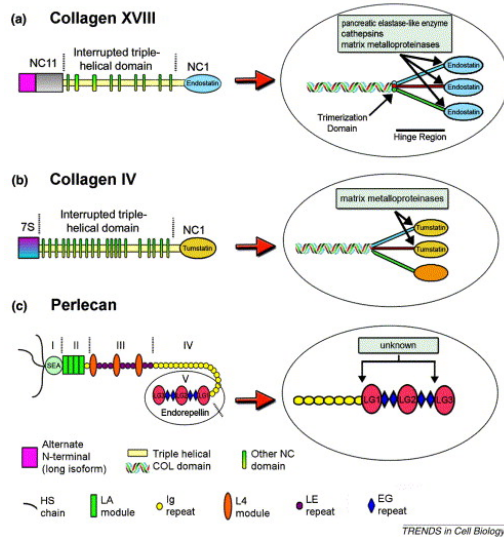
Ricard-Blum S, Ballut L. Matricryptins derived from collagens and proteoglycans. Front Biosci. 16:674-697, 2011.



Matricrine - [2]

✚ Diverse **matricriptine** rilasciate dai collagene (**endostatina, arresten, canstatina, tumstatina, restina, vastatina**) e da un proteoglicano (**endorepellina**) corrispondono al **dominio C-terminale** di queste molecole.

✚ La maggior parte esercita la loro attività biologica mediante segnalamento mediato da **integrine**.



Bix G, Iozzo RV. Matrix revolutions: "tails" of basement-membrane components with angiostatic functions. Trends Cell Biol. 15: 52-60, 2005.

Seminario

Siti «matricriptici nelle molecole della MEC - [1]

Fibronectina	Dominio cellulare	Migrazione stimolata da RGD	Denaturazione (urea), adsorbimento (legame in superficie), frammentazione proteolitica (matrilisina)
		Inibisce il differenziamento	
	N-terminale della fibrina-1	Differenziamento	Frammentazione proteolitica (stromalisina, collagenasi, MMP-2)
	C-terminale della fibrina-2	Migrazione indipendente da RGD	Probabilmente proteolisi
	Dominio Eparina-1	Induzione della degradazione dei proteoglicani e della frammentazione del collagene II	Denaturazione (urea), eparina, frammentazione proteolitica (MMP-2)

Seminar

Siti «matricriptici nelle molecole della MEC – [2]

Fibronectina, (cont.)	Frammento dell'eparina-2	Anti-adesivo	Frammentazione proteolitica (tripsina e chimotripsina)
	Frammenti (30 e 120 kDa)	Proliferazione delle cellule microvascolari	
	Frammenti (45 e 120 kDa)	Migrazione delle cellule microvascolari	
	Frammenti contenenti RGD	Induzione dell'espressione della collagenasi e della stromelisinasi	

Seminar

Siti «matricriptici nelle molecole della MEC – [3]

Molecola della MEC	Sito criptico	Funzione	Meccanismo di esposizione delle zone criptiche
Laminina-1	C-terminale della catena α_1 , soprattutto frammenti che si legano all'eparina	Stimola l'espressione di urochinasi e MMP-9	Frammentazione proteolitica (elastasi)
	Frammenti E1 e P1	Sito di legame per il Tumor Necrosis Factor $-\alpha$	Immobilizzazione della Frammentazione proteolitica (elastasi o pepsina)
	Domini G del C-terminale della catena α_1	Esposizione di un nuovo sito di frammentazione per la catepsina B e rilascio di nuovi frammenti con attività migratoria	Legame al peptide G (la sequenza aminoacidica corrisponde al sito di legame per il recettore della laminina di 67 kDa)

Siti matricriptici – [1]

- ✚ La matrice extracellulare (ECM) fornisce segnali che controllano la **forma**, la **migrazione**, il **differenziamento**, la **morfogenesi** e la **sopravvivenza** delle cellule.
- ✚ Alcuni di questi segnali sono **derivati da siti criptici biologicamente attivi all'interno delle molecole della matrice (siti matricriptici)** che sono rivelati dopo un'alterazione strutturale o conformazionale di queste molecole.
- ✚ **MATRICRIPTINE**: frammenti derivati dalla degradazione enzimatica della ECM che contengono siti matricriptici esposti.

Davis GE, Bayless KJ, Davis MJ, Meininger GA. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. Am J Pathol 156: 1489-1498, 2000.

Siti matricriptici – [2]

- ✚ I meccanismi che regolano **l'esposizione dei siti matricriptici all'interno delle molecole di ECM** includono: principali meccanismi di **degradazione enzimatica**, **multidimerizzazione di proteine** della ECM, **adsorbimento ad altre molecole**, **forze meccaniche** mediate dalle cellule, **denaturazione** della ECM.
- ✚ Tali alterazioni della matrice possono avere luogo durante o come risultato del **danno ai tessuti** e quindi **la comparsa di siti matricriptici all'interno di un sito di danno può fornire importanti nuovi segnali per regolare il processo di riparo**.

Davis GE, Bayless KJ, Davis MJ, Meininger GA. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. Am J Pathol 156: 1489-1498, 2000.

Meccanismi di esposizione dei siti matricriptici

- ✚ Degradazione enzimatica
- ✚ Multimerizzazione di proteine
- ✚ Adsorbimento (legami deboli alla superficie di altre molecole)
- ✚ Forze meccaniche mediate da cellule
- ✚ Denaturazione

PER ESAME

Meccanismo genesi di alcuni
PEPTIDI AD AZIONE ANTI-ANGIOGENETICA
(ad es. Endostatina, Angiostatina; segnalati da*)

SEMINARIO

**MATRICHINE/MATRICRIPTINE DERIVATE
DALLE MOLECOLE DELLA MATRICE**

Table 1
Extracellular matrix proteins and their matrikines. Description of reported activities.

Molecule	Matrikine	Activities
Collagen 1		Neutrophil chemoattractant (mice)
Col IV a1	Arresten	Anti-tumourogenic, anti-angiogenic, inhibition of MMP2/3 Inhibits HIF-1a expression (endothelial cells)
Col IV a2	Canstatin	Anti-tumourogenic, anti-angiogenic inhibition of MMP2/3
Col IV a3	Tumstatin	Anti-tumourogenic, anti-angiogenic Anti-inflammatory, neutrophil suppressor
Col IV a4	Tetrastatin-1/-2/-3	Weak anti-proliferative (HUVECS), anti-migratory (HUVECS)
Col IV a5	Pentastatin-1/-2/-3	Anti-proliferative (HUVECS), anti-migratory (HUVECS)
Col IV a6	NC1 domain	Anti-angiogenic, anti-tumuogenic
	Hexastatin-1/-2	Weak anti-proliferative (HUVECS), anti-migratory (HUVECS)
Col XVIII	Endostatin	Anti-tumourgenic, anti-lymphangiogenic, anti-migratory (Mastcells)

Burgess JK, Weckmann M. **Matrikines and the lungs**. Pharmacol Ther. 134:317-37, 2012.

Table 1
Extracellular matrix proteins and their matrikines. Description of reported activities.

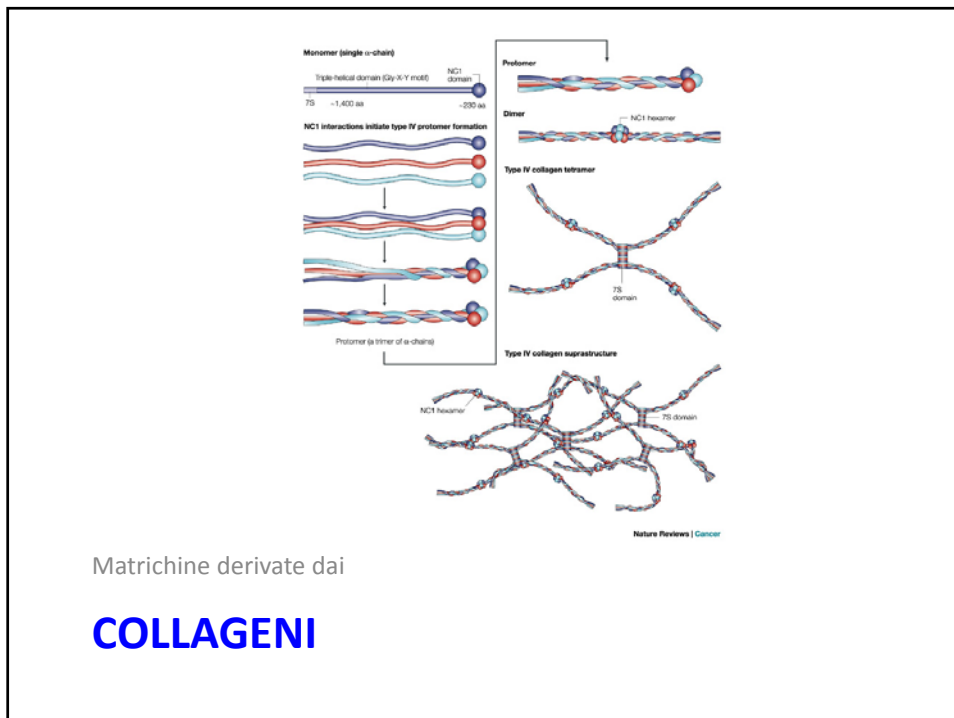
Fibronectin	Fragments	Induces expression of MMP-1 (fibroblast)
	P1	Induces expression of MMP-13 (chondrocytes)
	P2	Increase MMP9,12,IL-1,IL-6,TNFa (macrophage)
	P3	Chemotactic for fibroblasts, antiproliferative for bovine VEC,
	P4	Schwann cells
Elastin	Fragments	Th1 cell differentiation with PHA
		Desensitise to LPS stimulus
		Mouse smoke injury – monocyte recruitment
Perlecan	Endorepellin	Facilitates autoactivation of MMP2
		Anti-metastatic
		Modulates angiogenesis
Tenascin	TNIIIA2	Anti-angiogenic, anti-migratory (HDMVEC)
	P12	Cytotoxic (monocytes), maturation of lymphomononuclear cells,
	P13	induce expression of IL-1a, IL-1b, TNFa (lymphomononuclear cells)
	P14	
	P15	
	P16	

Burgess JK, Weckmann M. **Matrikines and the lungs**. Pharmacol Ther. 134:317-37, 2012.

Proteinasi che degradano la MEC rilasciando matricine

Burgess JK, Weckmann M. **Matrikines and the lungs.** Pharmacol Ther. 134:317-37, 2012.

Molecule	Proteinase	Action and result
Collagen Collagen I	MMPs 1, 8, 13 and 14 and cathepsin K Cathepsin K Undefined proteinases	Cleavage of fibrillar collagens Hydrolyses triple helical collagen I Alters the triple helical structure exposing cryptic RGD sites converting collagen I from a $\beta 1$ integrin mediated ligand to an $\alpha \nu \beta 3$ -dependent ligand. Abolishes integrin $\alpha 2 \beta 1$ binding
Collagen IV	Serine and metalloproteinases MMP9	Exposes cryptic sites which promote binding to $\alpha \nu \beta 3$ Releases tumstatin for $\alpha 3$ chain
Collagen XVIII	Cathepsin S Cathepsin L	Releases canstatin and arrestin from $\alpha 1$ and $\alpha 2$ respectively Cleavage of C-terminal portion from collagen XVIII (mouse and human)
	Cathepsin B Cathepsin K Metal dependent proteinase followed by elastase	Cleavage of human collagen XVII to release active endostatin Cleavage of human collagen XVII to release active endostatin Two step process cleaving C-terminal portion from collagen XVIII to release functional endostatin
	MMP9, MMP3, MMP12, MMP13 and MMP20 MMP2 and MMP14	Cleavage of human collagen XVII to release active endostatin (4–20 times less active than cathepsin L and elastase in vitro) Cleavage of human collagen XVII to release active endostatin (100 times less active than cathepsin L and elastase in vitro)
Fibronectin	MMP7 ADAM8 MMP7 MMP3 (stromelysin), MMP8 (collagenase), and MMP2 (gelatinase A)	Cleavage of human collagen XVII to release active endostatin in vitro Releases active fragments of fibronectin Release of central cell-binding domain Release of amino-terminal fibrin-binding (Fib 1) domain; the central cell-binding (cell) domain (cell domain activity); and the carboxyl-terminal fibrin-binding (Fib 2) domain,
Elastin	Human neutrophil elastase	Degradation of insoluble bovine elastin Release of chemotatic fragments
	Pancreatic elastase MMP2 MMP9 MMP7 (matrilysin) MMP12	Degradation of insoluble bovine elastin Degradation of insoluble bovine elastin Degradation of insoluble bovine elastin Degradation of lung elastin in cigarette smoke-exposed mice
	Cathepsin L Cathepsin S	Degradation of elastin substrate Degradation of bovine elastin
Perlecan	Plasmin Stromelysin and rat collagenase	Release of a large fragment of approximately 300 kDa Cleave the protein core into small fragments
Tenascin-C	MMP12 Cathepsin B	Extensive fragmentation Degradation of tenascin



Matricriptine derivate dal collagene – [1]

✚ Frammenti bioattivi rilasciati mediante scissione proteolitica dei collageni regolano diversi processi fisiologici e patologici:

- Sviluppo embrionale
- Angiogenesi
- Crescita tumorale
- Metastatzazione
- Riparo dei tessuti

Ricard-Blum S, Ballut L. *Matricryptins derived from collagens and proteoglycans*. Front Biosci (Landmark Ed). 2011 Jan 1;16:674-97.

Matricriptine derivate dal collagene – [2]

✚ Queste matricriptine **aumentano** la **diversità funzionale** dei collageni perché molte di esse possiedono **attività biologiche diverse** da quelle della molecola di origine.

✚ Un singolo tipo di collagene può dare origine a diverse matricriptine.

Ricard-Blum S, Ballut L. *Matricryptins derived from collagens and proteoglycans*. Front Biosci (Landmark Ed). 2011 Jan 1;16:674-97.

Table 3. Major matricryptins of collagens.

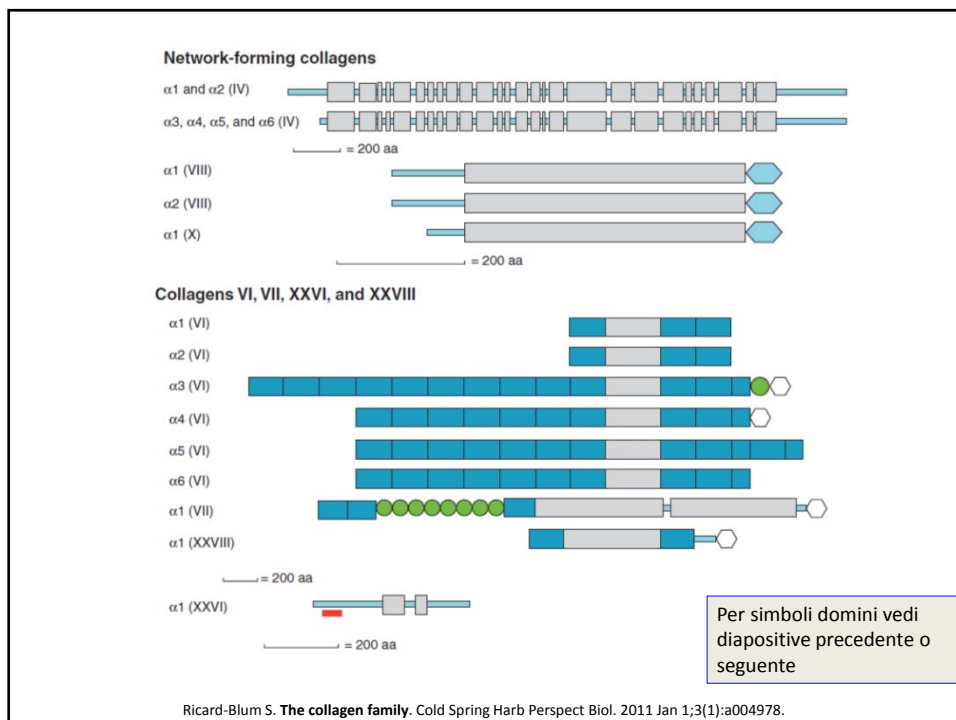
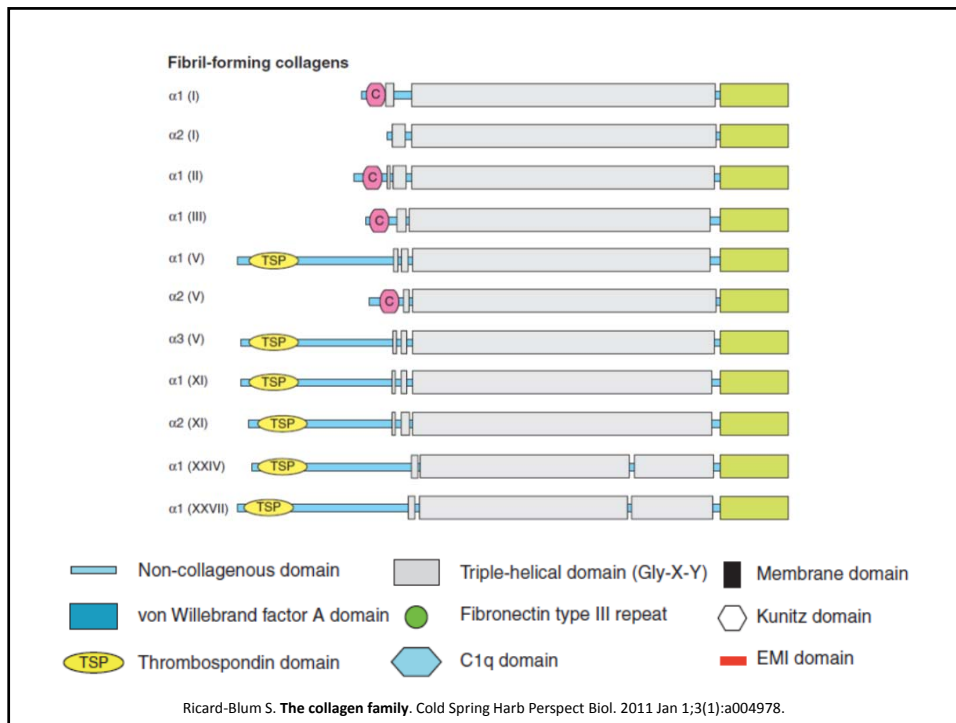
Collagens	Collagen α chain	Matricryptins	Domain
Collagen IV	α 1(IV) chain	Arresten	NC1
	α 2(IV) chain	Canstatin	NC1
	α 3(IV) chain	Tumstatin	NC1
	α 4(IV) chain	Tetrastatins 1-3	
	α 5(IV) chain	Pentastatins 1-3	
	α 6(IV) chain	NC1 α 6(IV)	Hexastatins 1-2
Collagen VIII	α 1(VIII) chain	Vastatin	NC1
Collagen XV	α 1(XV) chain	Restin	NC1
Collagen XVIII	α 1(XVIII) chain	Endostatin	NC1
Collagen XIX	α 1(XIX) chain		NC1

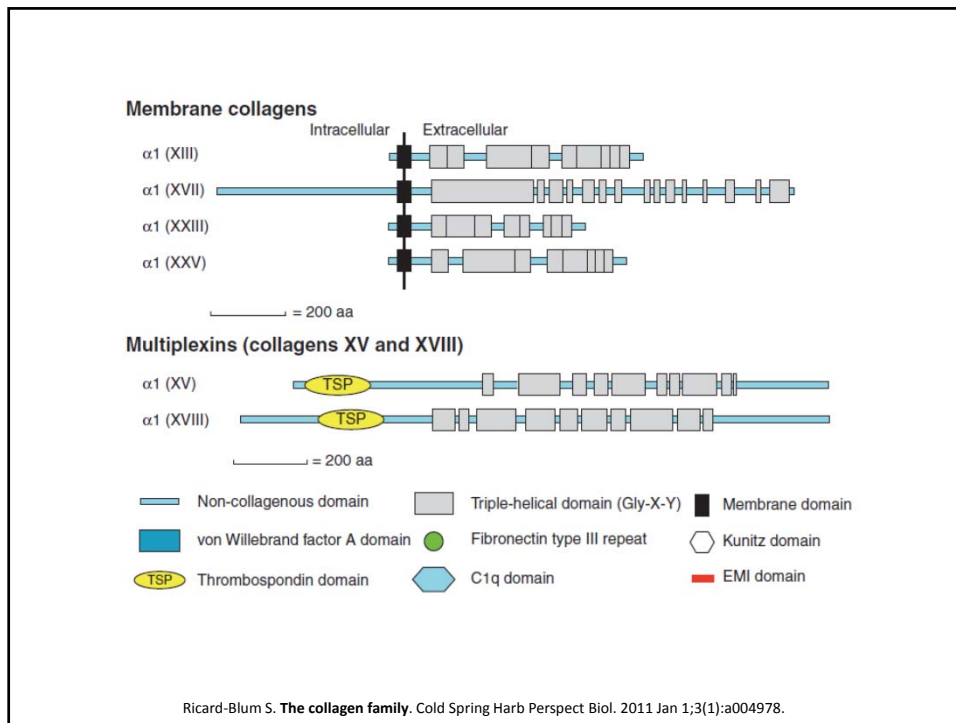
Ricard-Blum S, Ballut L. **Matricryptins derived from collagens and proteoglycans**. Front Biosci (Landmark Ed). 2011 Jan 1;16:674-97.

Matricriptine derivate dal collagene – [3]

- ✚ La maggior parte delle matricriptine derivate dal collagene sono **derivate dai collagene non fibrillari della lamina basale** (collagene IV, VIII, and XVIII) o localizzati nell'area della lamina basale (collagene XV e XIX) e rivelano proprietà **anti-angiogeniche** e **anti-tumorali**.
- ✚ Sono molto note l'**endostatina***, un frammento carbossi-terminale del collagene XVIII (collagene/proteoglicano della lamina basale), e la **tumstatina**, il carbossi-terminale della catena α 3 del collagene di tipo IV.

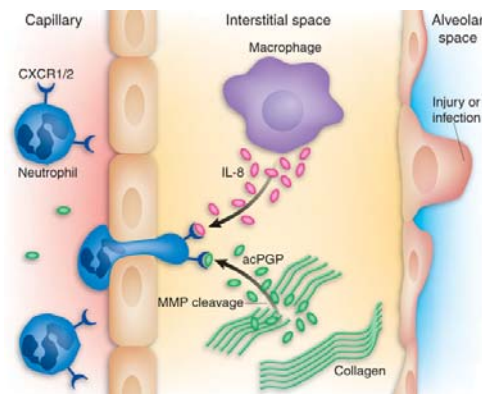
Ricard-Blum S. **The collagen family**. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Jan 1;3(1):a004978.





Matricine derivate dal collagene fibrillare di tipo I

✚ Potenti proprietà chemotattiche verso i granulociti.



The matrix degrades, neutrophils invade

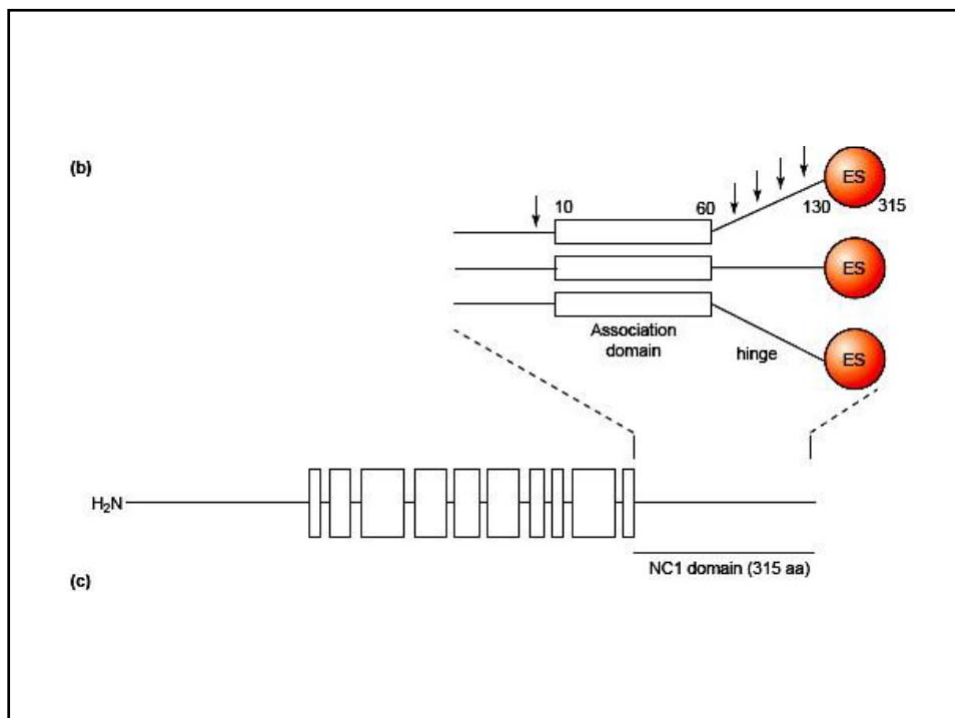
Burgess JK, Weckmann M. **Matrines and the lungs**. Pharmacol Ther. 134:317-37, 2012.
 Henson PM, Vandivier RW. **The matrix degrades, neutrophils invade**. Nat Med. 12:280-281, 2006.

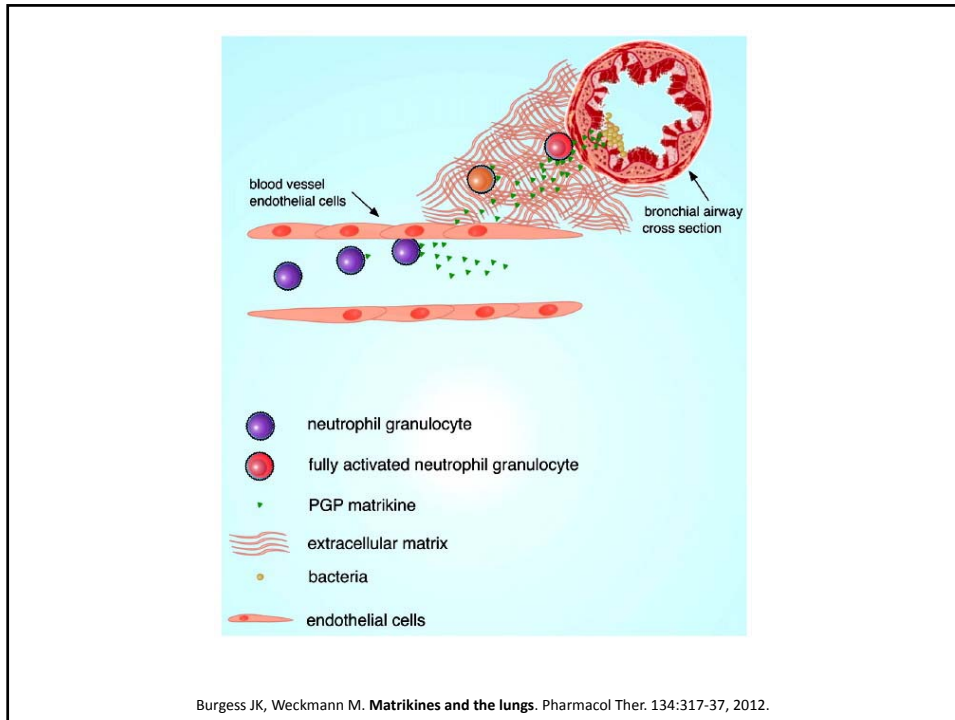
Seminario

Matricriptine derivate dal collagene fibrillare di tipo I

- ✚ Le collagenasi batteriche inducono la formazione di **frammenti del collagene di tipo I** che hanno potenti **proprietà chemotattiche** verso **granulociti neutrofili** del sangue periferico.
- ✚ La chemotassi dei granulociti è predominantemente provocata da peptidi che contengono 3-5 ripetizioni di un tripeptide contenente prolina, idrossiprolina e glicina (Pro-Hyp-Gly)₃₋₅.
- ✚ **Peptidi sintetici** contenenti Pro-Pro-Gly o Pro-Hyp-Gly hanno dimostrato attività chemotattica dipendente dalla dimensione e composizione:
 - Peptidi pentamerici più attivi di peptidi decamerici.
 - Presenza di idrossiprolina: riduce l'attività chemotattica.
- ✚ I peptidi **riducono l'apoptosi dei granulociti** in modo indipendente dalla dimensione e composizione.
- ✚ Gli effetti dei peptidi sia sulla chemotassi che sull'apoptosi sono bloccati da inibitori della "phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)" e della "p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase."

Burgess JK, Weckmann M. **Matrikines and the lungs**. Pharmacol Ther. 134:317-37, 2012.
 Weinberger B, Hanna N, Laskin JD, Heck DE, Gardner CR, Gerecke DR, Laskin DL. **Mechanisms mediating the biologic activity of synthetic proline, glycine, and hydroxyproline polypeptides in human neutrophils**. Mediators Inflamm. 2005 Feb 24;2005(1):31-8.





Matrichine derivate dal collagene IV (non fibrillare)

epithelial cells

basal lamina

collagen

10 μm

✚ La degradazione delle catene α del collagene di tipo IV porta al **rilascio dei domini carbossi-terminali globulari (NC1)**:

- ✚ Terminale NC1 della catena α1: **Arresten** – anti-angiogenico.
- ✚ Terminale NC1 della catena α2: **Canstatina**.
- ✚ Terminale NC1 della catena α3: **Tumstatina**.

Monomer (single α-chain)

Triple helical domain (α1, α2, α3)

NC1 domain

NC1 interactions initiate type IV procollagen formation

Type IV collagen trimer

Procollagen

Dimer

Type IV collagen apposition

NC1 domain

NC1 domain

NC1 domain

Nature Reviews | Cancer

Seminario

NC: «non collagenous domain»; «collagenous domain»: contiene tripla elica

Seminario

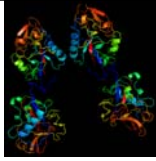
Matricriptine derivate dal collagene non fibrillare di tipo IV

- ✚ La degradazione delle catene α del coll IV da parte di enzimi endogeni porta al rilascio di domini globulari NC1 nel C-terminale:
 - Dominio NC1 della catena $\alpha 1$ – «**arresten**»: **attività anti-angiogenica**
 - Dominio NC1 della catena $\alpha 2$ – «**canstatin**»: **id.**
 - Dominio NC1 della catena $\alpha 3$ – «**tumstatin**» **id.**
 - Dominio NC1 della catena $\alpha 6$: «**hexastatin 1- e 2-**»: **anti-angiogenico, anti-tumorale**
- ✚ La degradazione della catena $\alpha 4$ del coll IV porta a:
 - Peptidi (es. tetrastatins 1/-2 e -3) debolmente **antiproliferativi** ma fortemente **antimigratori** per cellule HUVEC («human umbilical vein endothelial cells»).
 - Peptidi (es. pentastatins-1, -2 e -3) **antiproliferativi** e **anti-migratori** per le HUVECs.

Matrichine derivate dal collagene non fibrillare di tipo XVIII

- ✚ Il dominio non-collagenoso del col XVIII è un agente anti-angiogenico – **endostatina*** (forma terapeutica: **Endostar**).
- ✚ Tuttavia, **peptidi** derivati dalla **degradazione dall'endostatina promuovono l'angiogenesi**.

Burgess JK, Weckmann M. **Matrikines and the lungs**. Pharmacol Ther. 134:317-37, 2012.



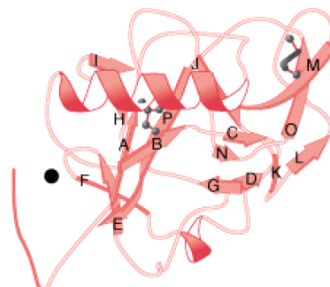
Catena $\alpha 1$ del collagene di tipo XVIII (precursore dell'**endostatina***)

- ✚ Proteina codificata nell'uomo dal gene COL18A1.
- ✚ Il gene codifica per la catena β del collagene di tipo XVIII.
- ✚ Questo collagene è una delle **multiplexine, proteine della MEC che contengono molteplici domini a tripla elica** (domini collagenosi) **interrotti da domini non-collagenosi**.
- ✚ Il frammento C-terminale del collagene di tipo XVIII prodotto proteoliticamente è l'**endostatina**, una potente proteina **antiangiogenica**.
- ✚ Mutazioni in questo gene sono associate alla sindrome di Knobloch (elevato grado di miopia).
- ✚ I principali aspetti di tale sindrome coinvolgono anomalie alla retina e quindi il coll XVIII potrebbe giocare un ruolo importante nella struttura della retina e nella chiusura del tubo neurale.
- ✚ Sono state identificate due varianti di trascrizione di questo gene che codificano per isoforme diverse.

http://en.wikipedia.org/wiki/Collagen,_type_XVIII,_alpha_1



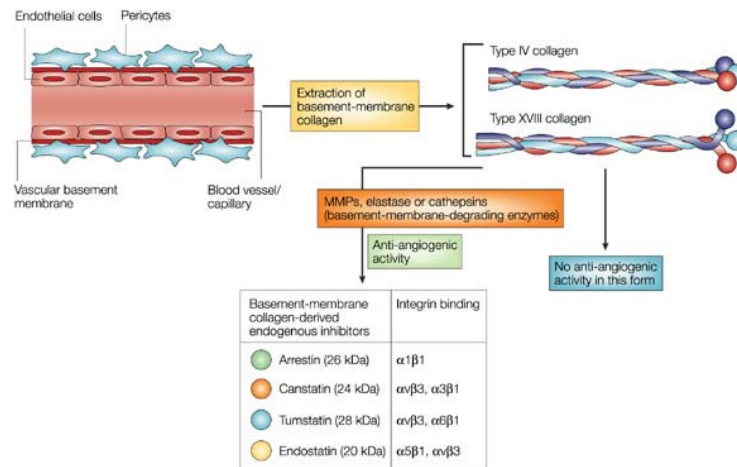
B



- A. Sequenza aminoacidica dell'endostatina umana.
B. Struttura cristallina dell'endostatina umana con risoluzione di 3.5 angstroms

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Search&db=books&doptcmdl=GenBookHL&term=endostatin+AND+cmed6%5Bbook%5D+AND+350381%5Buid%5D&rid=cmed6.figprp.2858>

Inibitori endogeni dell'angiogenesi derivati dai collagene di tipo IV e XVIII



Nature Reviews | Cancer

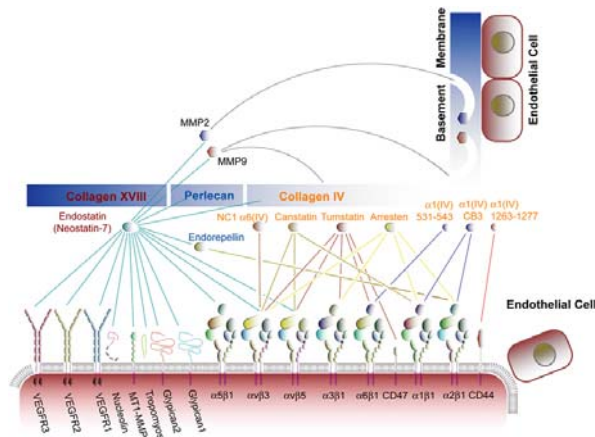
Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. Nat Rev Cancer. 3:422-433, 2003.

Frammenti proteolitici derivati dal collagene

Isoforma del collagene	catena α	Frammento NC1 attivo	MW (kDa)	Funzione
IV	$\alpha 1$	Arrestin	26	Antiangiogenica, inibizione della crescita tumorale
	$\alpha 2$	Canstatin	24	Antiangiogenica, inibizione della crescita tumorale, apoptotico
	$\alpha 3$	Tumstatin	28	Antiangiogenico (aminoacidi 54-132), inibizione della crescita tumorale (aminoacidi 186-203), e soltanto dopo ulteriore proteolisi, inibitore della sintesi proteica
XV	$\alpha 1$	Restin o endostatin XV	22	Antiangiogenica, inibizione della crescita tumorale
XVIII	$\alpha 1$	Endostatin XVIII	20	Antiangiogenica, inibizione della crescita tumorale, apoptotico

NC: "non-collagenous", senza struttura a tripla elica tipica del collagene

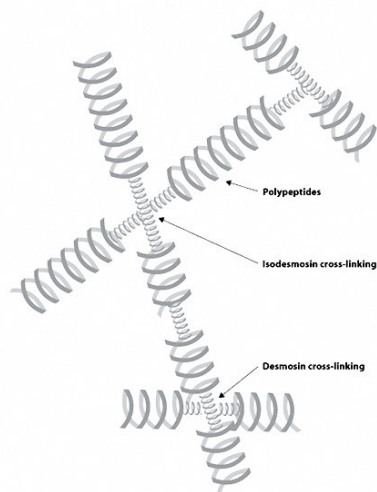
Matricriptine e siti criptici che regolano l'angiogenesi



Matricriptine e siti matricriptici dei collagene IV, XV, XVIII e perlecano e loro recettori sulla superficie delle cellule endoteliali.
 (CB: CNBr peptide, MMP: Matrix metalloproteinase, MT-MMP: Membrane type-matrix metalloproteinase, NC1: Non collagenous, VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor).

Ricard-Blum S, Ballut L. Matricryptins derived from collagens and proteoglycans. Front Biosci (Landmark Ed). 2011 Jan 1;16:674-97.

STRUCTURE OF ELASTIN



Matricrine derivate dall'

ELASTINA

<http://www.vivaligne.com/viva/kappa-elastin.html>

Seminario

Matricine derivate dall'elastina – [1]

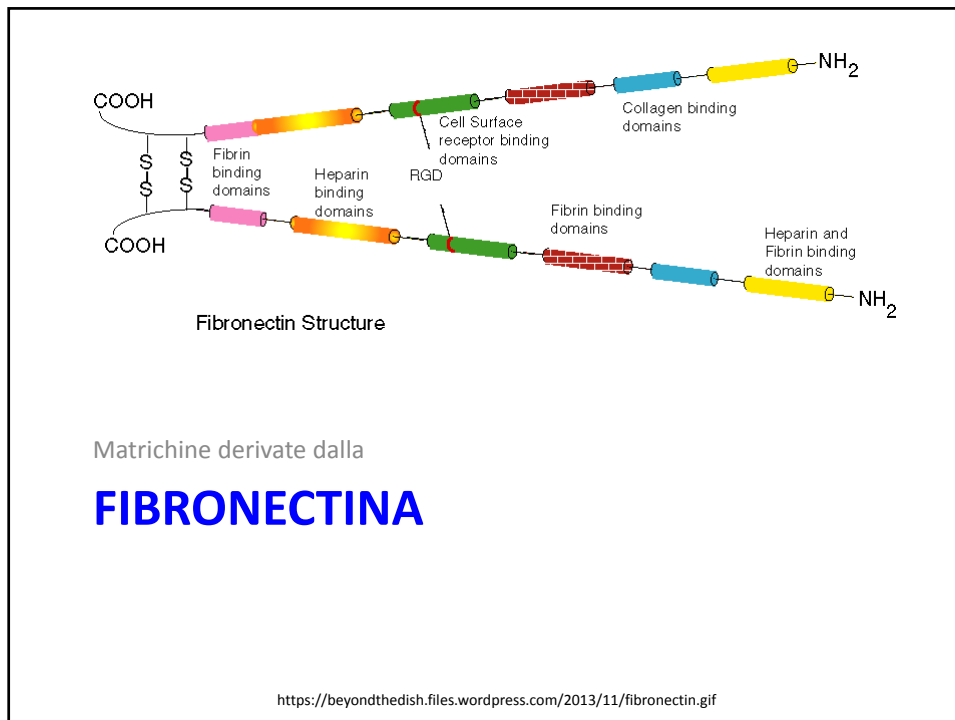
- ✚ **Elastina**: importante sorgente di matricine nei tessuti normali e patologici
- ✚ L'idrolisi alcalina delle fibre di elastina dà origine ad una miscela solubile di peptidi derivati dall'elastina, la Kappa-elastina, che:
 - Induce **attivazione** di **monociti** e **granulociti**
 - E' **chemotattica** per leucociti
 - Inibisce **l'attività dell'elastasi**
 - Induce **vasodilatazione**
 - Induce **apoptosi** nei linfociti-T
 - Stimola la **proliferazione di fibroblasti**

Seminario

Matricine derivate dall'elastina – [1]

- ✚ Fra i **peptidi derivati dall'idrolisi dell'elastina**, alcuni sono particolarmente coinvolti nella **regolazione cellulare**:
 - VGPVG, pentapeptide idrofobico:
 - stimola la proliferazione della muscolatura liscia e diminuisce la loro produzione di elastina
 - VGVAPG (ripetuto diverse volte nel monomero dell'elastina; definisce il sito di legame con il recettore sulla molecola):
 - Stimola l'espressione della gelatinasi-A/MMP-2 in fibroblasti umani
 - Aumenta l'espressione dei componenti del complesso di attivazione della MMP-2, ossia del MT1-MMP
 - Aumenta l'espressione di TIMP-2
 - Stimola l'espressione di collagenasi/MMP-1
 - Il peptide quindi dovrebbe giocare un ruolo molto importante nella regolazione del rimodellamento del tessuto connettivo.

[Codice alfabetico degli aminoacidi: **V**: valina; **G**: glicina; **P**: prolina; **A**: alanina]



Seminario

Matricine della fibronectina – [1]

- Nel 1981 è stato identificato un frammento della FN di 140kDa che induceva la **chemotassi dei fibroblasti** ma non di monociti e neutrofilii.
- La fibronectina, e soprattutto frammenti della fibronectina degradata dalla chimotripsina, stimolano il **rilascio di TNF dai monociti**.
- Su monociti legati ad una matrice di fibronectina/gelatina i frammenti N-terminali della FN provocano il **rilascio di elastasi** suggerendo che **gli aumentati livelli di fibronectina depositati in patologie come l'artrite reumatoide possano giocare un ruolo nella regolazione delle funzioni immunologiche dei monociti**.

Burgess JK, Weckmann M. **Matrikines and the lungs**. Pharmacol Ther. 134:317-37, 2012.

Seminario

Matrichine della fibronectina – [2]

- ✚ Cinque frammenti di FN (P1-P5) che coprono l'intera molecola, incubati con leucociti mononucleari di sangue periferico, provocarono aumentata espressione di CD11b (integrina α_M), CD14, CD16 (recettore per il Fc a bassa affinità) e CD56 (N-CAM) in modo simile.
 - Probabilmente inducono la maturazione delle cellule linfo-mononucleate.
- ✚ Viceversa, i cinque frammenti provocavano rilascio di IL-1 α , IL-1 β e TNF- α in modo frammento-dipendente.

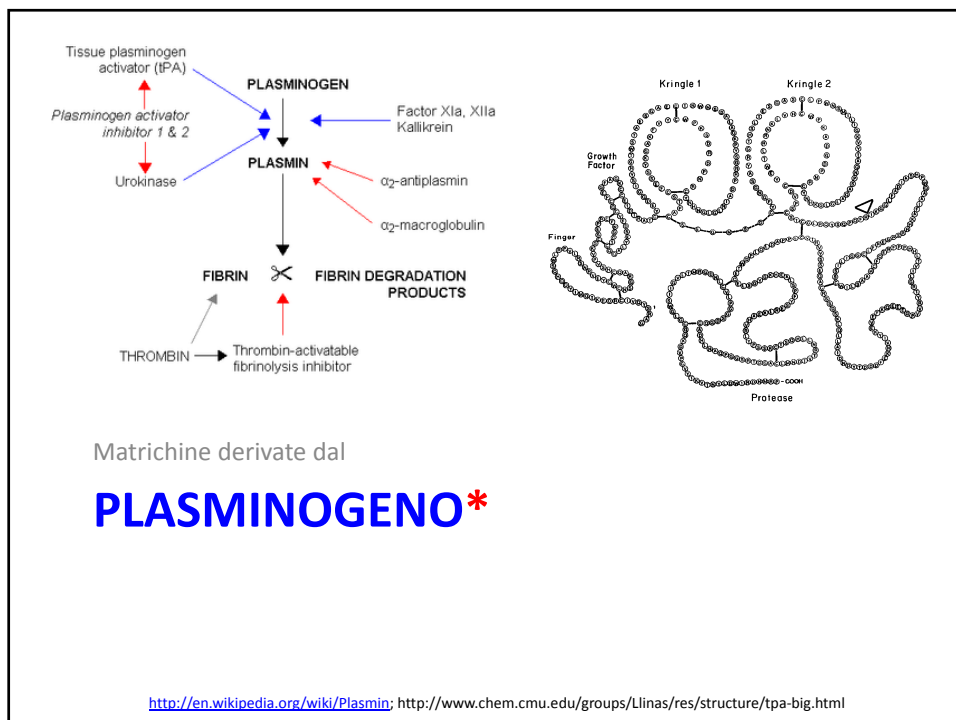
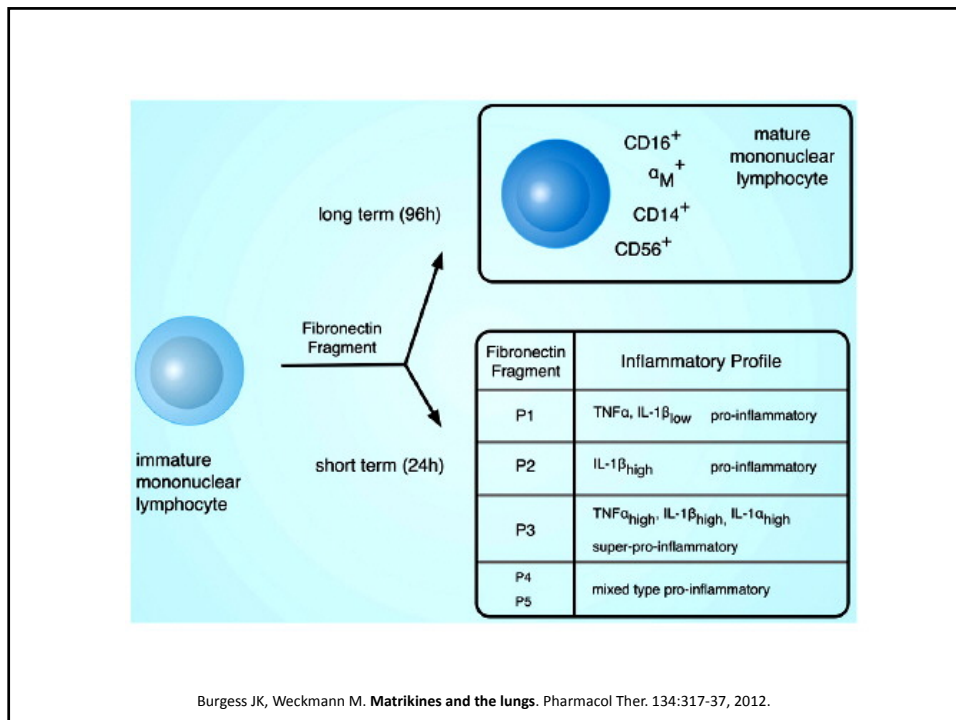
Burgess JK, Weckmann M. **Matrikines and the lungs**. Pharmacol Ther. 134:317-37, 2012.

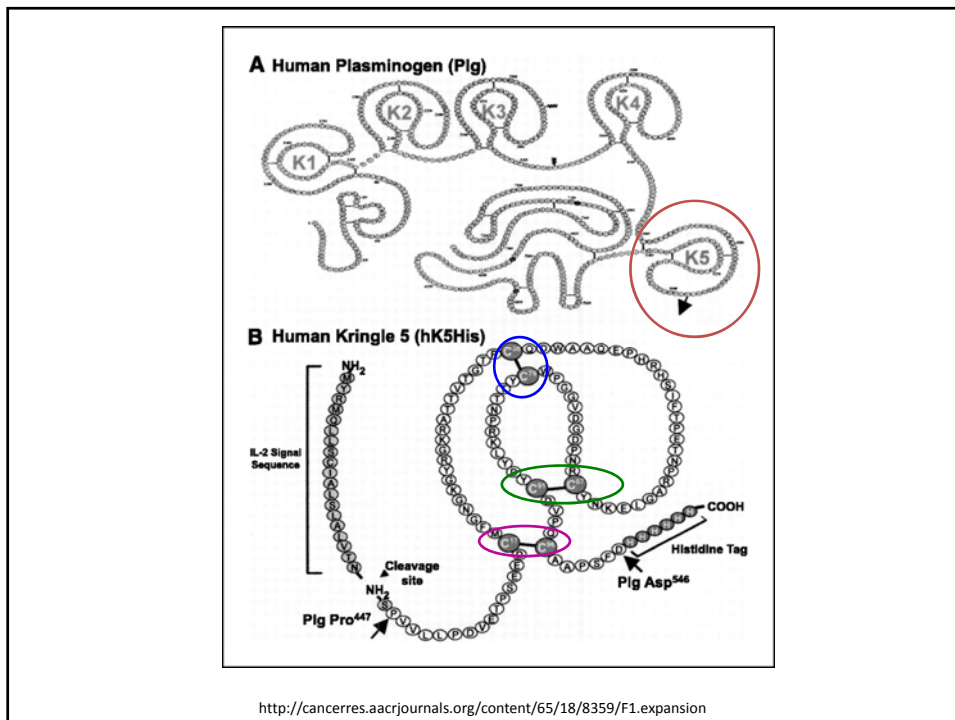
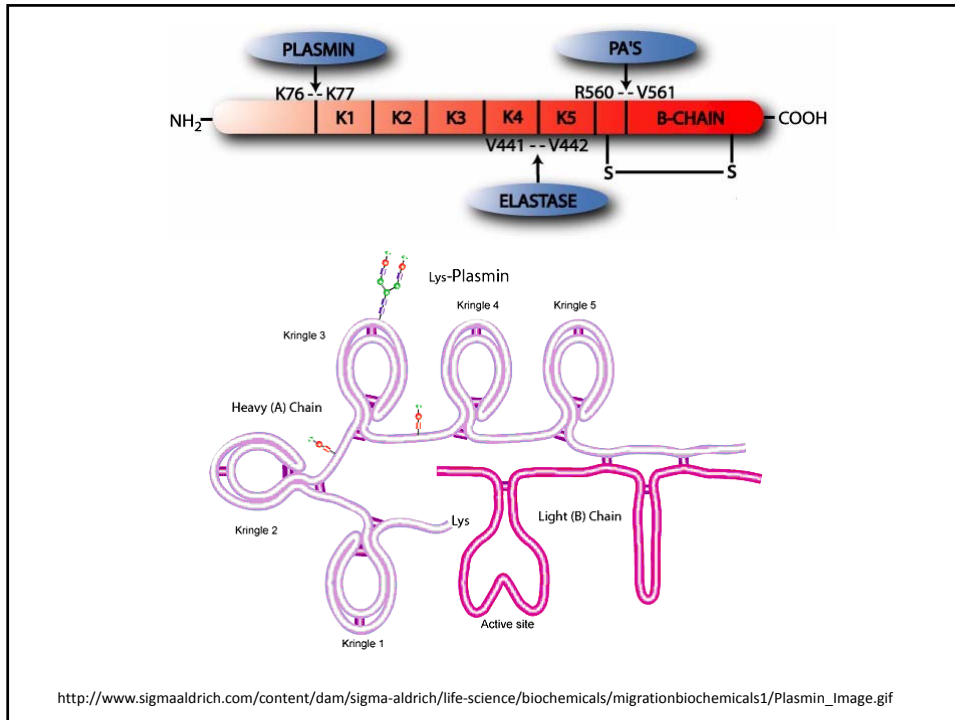
Seminario

Matrichine della fibronectina – [3]

- ✚ Frammenti derivati dalla fibronectina inoltre provocano **sintesi e rilascio di MMP-13** e di **pro-MMP-3** nei condrociti.
- ✚ Fibronectina e frammenti provocano l'espressione di **collagenasi** e di **stromalisina** e l'aumentata **secrezione** dell'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi (**U-PA**) da cellule periodontali.
- ✚ Frammenti hanno effetto **anti-proliferativo** in cellule endoteliali bovine e in cellule di Schwann.

Burgess JK, Weckmann M. **Matrikines and the lungs**. Pharmacol Ther. 134:317-37, 2012.

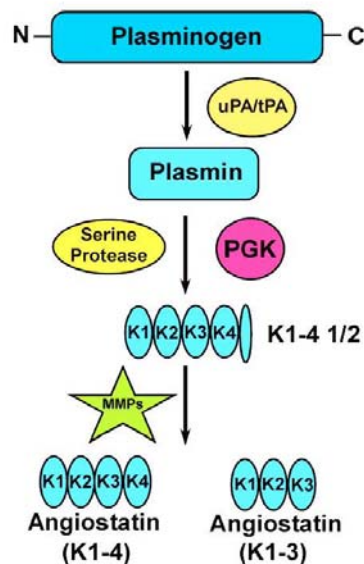




Angiostatina* - [1]

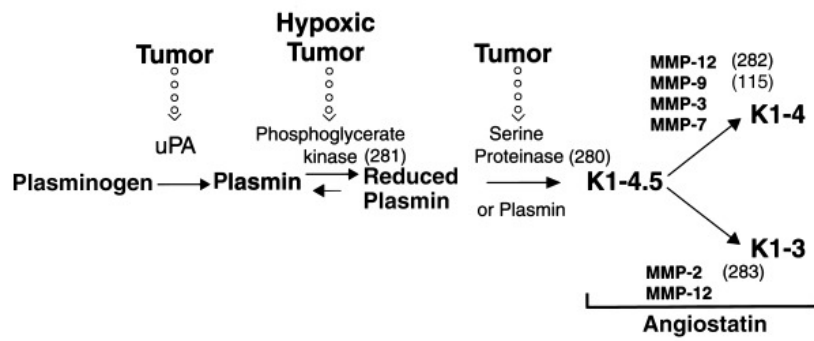
- La scissione mediante proteasi del **plasminogeno**, che contiene **cinque domini kringle**, dà origine alla formazione di **peptidi antiangiogenici** da 38-45 kDa, che contengono domini kringle omogenei legati da tre ponti disolfuro: kringle 1-4 oppure kringle 1-3.
- Questi sono collettivamente chiamati **ANGIOSTATINA***.
- Studi successivi hanno mostrato che il kringle-5 del plasminogeno, di per se, esibisce attività antiangiogenetica.
- L'angiostatina è un frammento criptico del plasminogeno che possiede **proprietà antiangiogenetiche**, una proprietà non condivisa dalla molecola di origine (plasminogeno).

Nyberg P, Xie L, Kalluri R. **Endogenous inhibitors of angiogenesis**. Cancer Res. 2005 May 15;65(10):3967-79.



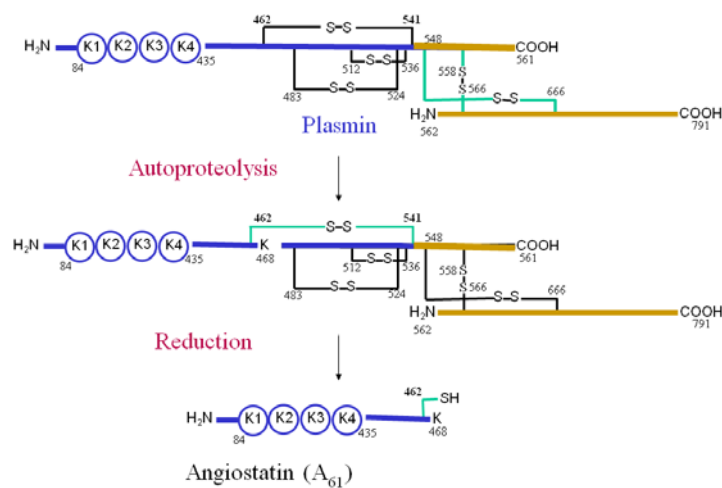
Rege et al. Neuro Oncol. 7:106-121, 2005

Matricine derivate dal plasminogeno Meccanismo di formazione dell'angiostatina – [1]



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20884/figure/A2282/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13877/figure/A2848/>

Meccanismo di formazione dell'angiostatina – [2]



Madureira PA, Waisman DM. *Annexin A2: the importance of being redox sensitive.* Int J Mol Sci. 2013 Feb 7;14(2):3568-94.

Seminario

Passi della proteolisi della plasmina

1. Una **plasmina reduttasi** riduce i **legami disolfuro** fra le Cys-462–Cys-541 e Cys-512–Cys-536 nel dominio kringle 5 della plasmina.
2. La riduzione dei legami disolfuro nel kringle 5 induce la rottura, mediante una serina protease, a livello di Arg-530–Lys-531 nel kringle 5 e anche in due altre posizioni nel versante C-terminale della Cys-462. L'autoproteolisi può spiegare questa scissione, ma nel mezzo condizionato di una linea cellulare di fibrosarcoma umano un'altra serina protease può svolgere questa funzione.
3. I frammenti 1–41/2 del kringle sono a loro volta scissi da metalloproteinasi della matrice per produrre sia i kringle 1–4 che 1–3.

La **plasmina reduttasi** è risultata essere l'enzima glicolitico **fosfoglicerato chinasi** (PGK1; ATP:3-fosfo-D-glicerato 1-fosfotrasferasi, EC 2.7.2.3).

Lay AJ, Jiang XM, Daly E, Sun L, Hogg PJ. Plasmin reduction by phosphoglycerate kinase is a thiol-independent process. J Biol Chem. 2002 Mar 15;277(11):9062-8.

Angiostatina* - [2]

- L'angiostatina è stata originariamente purificata dal siero e delle urine di topi portatori di cellule inoculate subcutaneamente di carcinoma di «Lewis lung», in cui **la crescita delle metastasi nel polmone era inibita dall'angiostatina generata dal tumore**.
- Diversi membri della famiglia delle MMPs umane, incluso la matrilisina (MMP-7) e le gelatinasi 8 e 9 (MMP-9 e -2), metalloelastasi (MMP-12) e stromalisina (MMP-3) sono in grado di idrolizzare il plasminogeno umano per generare frammenti di angiostatina, **dopo che il plasminogeno è stato convertito in plasmina dall'attivatore del plasminogeno**, che è **seguita dalla riduzione mediante la fosfoglicerato chinasi che agisce da disolfuro reduttasi**.
- L'angiostatina inibisce la **proliferazione** e la **migrazione** delle cellule endoteliali.

Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. Cancer Res. 2005 May 15;65(10):3967-79.
Lay AJ, Jiang XM, Kisker O, Flynn E, Underwood A, Condron R, Hogg PJ. Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase. Nature. 2000 Dec 14;408(6814):869-73.

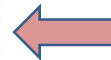
Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase

NATURE | VOL 408 | 14 DECEMBER 2000

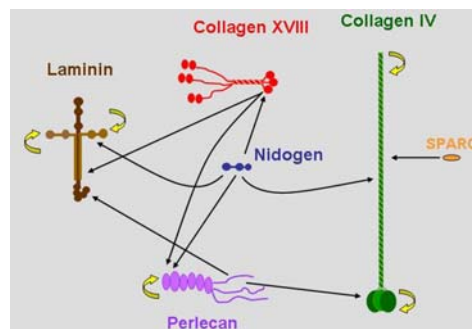
Angelina J. Lay^{*}, Xing-Mai Jiang^{*}, Oliver Kisker[†], Evelyn Flynn[†], Anne Underwood[‡], Rosemary Condon[§] & Phillip J. Hogg^{*}

Disulphide bonds in secreted proteins are considered to be inert because of the oxidizing nature of the extracellular milieu. An exception to this rule is a reductase secreted by tumour cells that reduces disulphide bonds in the serine proteinase plasmin^{1,2}. Reduction of plasmin initiates proteolytic cleavage in the kringle

5 domain and release of the tumour blood vessel inhibitor angiostatin³. New blood vessel formation or angiogenesis is critical for tumour expansion and metastasis^{4,5}. Here we show that the plasmin reductase isolated from conditioned medium of fibrosarcoma cells is the glycolytic enzyme phosphoglycerate kinase⁶. Recombinant phosphoglycerate kinase had the same specific activity as the fibrosarcoma-derived protein. Plasma of mice bearing fibrosarcoma tumours contained several-fold more phosphoglycerate kinase, as compared with mice without tumours. Administration of phosphoglycerate kinase to tumour-bearing mice caused an increase in plasma levels of angiostatin, and a decrease in tumour vascularity and rate of tumour growth. Our findings indicate that phosphoglycerate kinase not only functions in glycolysis but is secreted by tumour cells and participates in the angiogenic process as a disulphide reductase.



Seminario



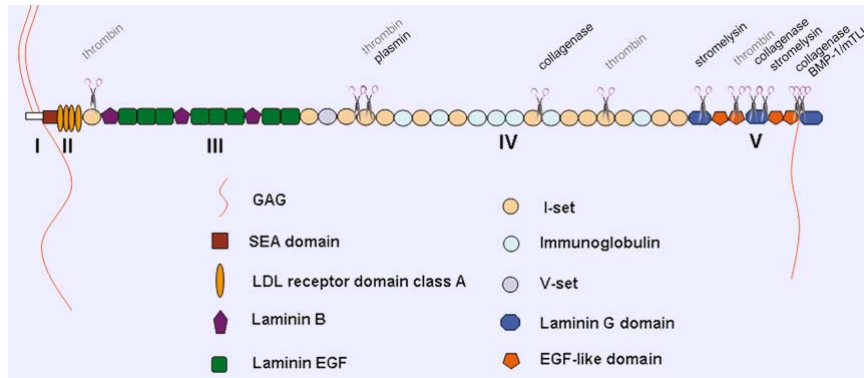
Matricine derivate dal

PERLECANO

http://www.wormbook.org/chapters/www_basementmb/basementmb.html

The matrix revisited: a surprise from the tail of perlecan

Negli ultimi anni il “core proteico” del perlecano è stato oggetto di diverse ricerche collegando la sua **struttura modulare** alla **regolazione dell'angiogenesi**.



Bix G, Iozzo RV. Matrix revolutions: “Tails” of basement-membrane components with angiostatic functions. Trends Cell Biol. 15:52-60, 2005. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/Images/HSPG2Fig1.jpg>

Perlecan as a Scaffold: Domains and Interactions

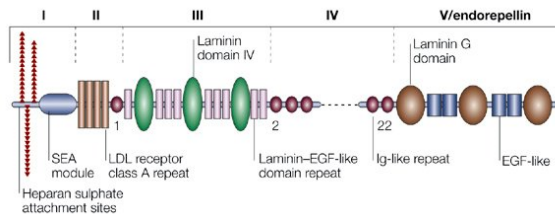
I	II	III	IV	V
Laminin-1 Collagen IV Fibronectin Heparanase PRELP FGF-2 PDGF WARP BMP-2 hedgehog Ang-3 VEGF ¹⁶⁵	VLDL LDL Fibrillin Wnt/Calcium	PDGF BMP-7 WARP	Nidogen-1 Nidogen-2 Fibulin-2 Fibronectin Collagen IV Heparin PDGF	Nidogen-1 Fibulin-2 β 1-integrin Heparin α -dystroglycan Endostatin ACHE

Farach-Carson & Carson. Glycobiology. 17:897-905, 2007.

Seminario

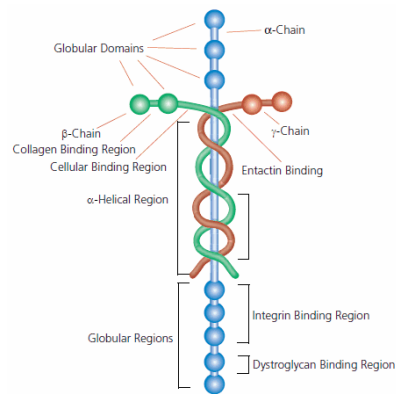
Matricine derivate dal perlecano

- Il **dominio V** del perlecano – **endorepellina** (Mongiat *et al.*) è inibitorio per la migrazione verso un gradiente di VEGF di “human umbilical vein endothelial cells” (HUVEC) ed è antiangiogenico nei test fatti sulla membrana corioallantoica.
- Inoltre, topi trattati con frammenti di matrigel carichi di “basic fibroblast growth factor” (bFGF) erano protetti dalla endorepellina dall’angiogenesi indotta *de novo*.
- L’endorepellina è tuttavia in grado di legarsi molto efficacemente all’endostatina, inibendo le sue proprietà antiangiogeniche.



Burgess JK, Weckmann M. **Matrines and the lungs**. *Pharmacol Ther.* 134:317-37, 2012.
Iozzo RV. **Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling**. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Aug;6(8):646-56.

Seminario

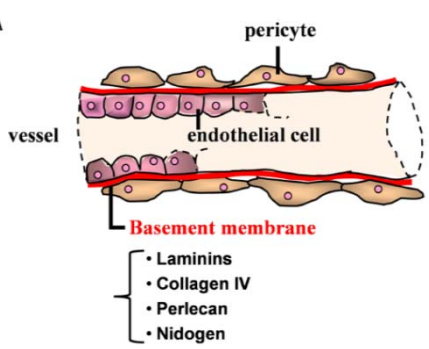


Matricine derivate dalla

LAMININA

<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/laminin.html>

A



pericyte
vessel
endothelial cell
Basement membrane

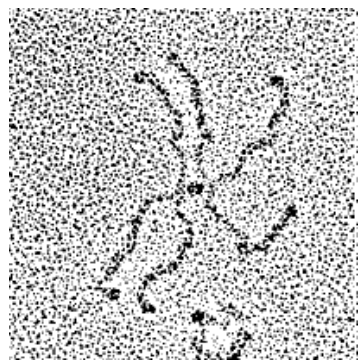
- Laminins
- Collagen IV
- Perlecan
- Nidogen

Laminin isoforms

Name	Chain composition
Laminin-111	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$
Laminin-121	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$
Laminin-211	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$
Laminin-213	$\alpha 2\beta 1\gamma 3$
Laminin-221	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$
Laminin-311	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$
Laminin-321	$\alpha 3\beta 2\gamma 1$
Laminin-332	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$
Laminin-411	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$
Laminin-421	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$
Laminin-423	$\alpha 4\beta 2\gamma 3$
Laminin-511	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$
Laminin-521	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$
Laminin-522	$\alpha 5\beta 2\gamma 2$
Laminin-523	$\alpha 5\beta 2\gamma 3$

Simon-Assmann P, Orend G, Mammadova-Bach E, Spenlé C, Lefebvre O. **Role of laminins in physiological and pathological angiogenesis.** *Int J Dev Biol.* 2011;55(4-5):455-65.

Seminaro



Matricine derivate dalla

TENASCINA

<http://nethingham.org/FN2009/figs/tn.htm>

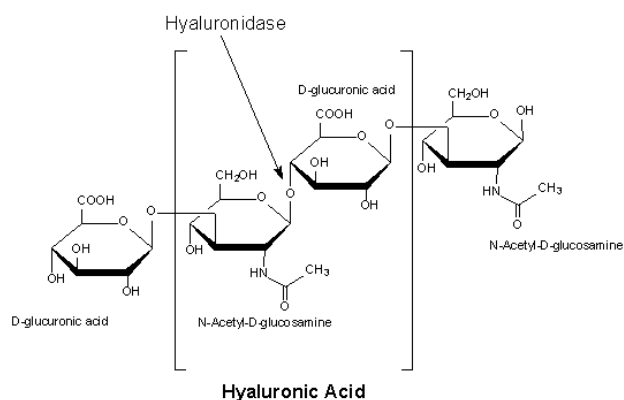
Seminario

Matrichine derivate dalla tenascina

- ✦ Ci sono almeno 5 regioni con caratteristiche di **peptidi immunomodulatori** (almeno 15 aa con prolina in posizione 6, valina, leucina, isoleucina, glicina, alanina o lisina in posizione 2 e acido glutamico o aspartico in posizione 11).
- ✦ Questi peptidi hanno dimostrato un **effetto citotossico** verso cellule HT-29 (cellule di colon carcinoma umano) equivalente a quello di 100U di interferone γ .
- ✦ I peptidi P13, P14 e P16 alterano l'espressione di CD11b, CD14, CD16 e/o CD56 in cellule linfomononucleate compatibilmente con la loro maturazione.
- ✦ Nonostante le sue **capacità modulatorie del sistema immunitario**, la tenascina contiene inoltre un **dominio antiangiogenetico/anti migratorio** -TNIII2A.

Seminario

Hyaluronidase Specificity



Matrichine derivate dall'

ACIDO IALURONICO

<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis/carbohydrate-analysis-iii.printerview.html>

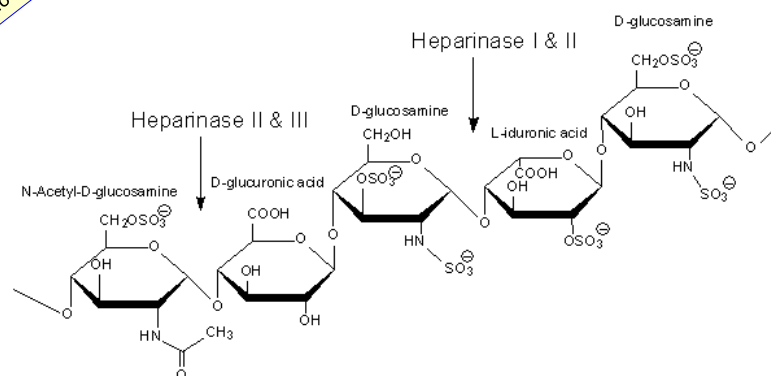
Seminario

Frammenti di acido ialuronico

- La degradazione enzimatica dell'acido ialuronico mediata dalle ialuronidasi 1 e 2 nei processi di rimodellamento dei tessuti dà origine a **frammenti** oligosaccaridici di **diverse dimensioni** (4-1000 saccaridi) che scatenano risposte cellulari (**proliferazione, migrazione, sintesi di citochine**) in modo dipendente dalle dimensioni.
- Questi frammenti sinergizzano con **specie reattive derivate dall'ossigeno (ROS)** per **attivare il sistema immunitario** e **promuovere ulteriormente sintesi di ROS**, generazione di **frammenti di acido ialuronico, infiammazione, danno al tessuto e fibrosi**.
- Inoltre i frammenti di ialuronato giocano un ruolo importante nell'**angiogenesi, condrogenesi, guarigione** delle ferite, **tumori e infezioni**.

Ricard-Blum S, Ballut L. *Matricryptins derived from collagens and proteoglycans*. Front Biosci. 16:674-97, 2011.

Seminario



Matricine derivata dall'

EPARAN SOLFATO

<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis/carbohydrate-analysis-iii.printerview.html>

Seminario

Frammenti di eparan solfato (HS)

- ✚ L'**eparan solfato** presente sulla superficie delle cellule tumorali contiene **sequenze criptiche bioattive** che **promuovono** o **inibiscono la crescita tumorale** e le **metastasi in vivo**.
- ✚ L'**eparinasi I** che **scinde le regioni altamente solfatate dell'HS**, rilascia **frammenti di HS che promuovono la crescita tumorale in vivo**.
- ✚ Viceversa, l'**eparinasi III**, che **scinde le regioni poco solfatate della catena di HS**, rilascia **frammenti di HS che inibiscono la crescita dei tumori** primari del circa 70%.

Ricard-Blum S, Ballut L. Matricryptins derived from collagens and proteoglycans. Front Biosci. 16:674-97, 2011.

Recettori per le matricine

- ✚ La maggior parte delle cellule usa recettori eterodimerici della famiglia delle **integrine** per legarsi alla MEC circostante.
- ✚ Tuttavia, gli effetti osservati *in vitro* e *in vivo* non dipendono soltanto dal coinvolgimento delle integrine.
- ✚ Sono necessari inoltre diversi **altri cofattori** e altri **recettori**.

Matricine e recettori della famiglia delle integrine nei polmoni – [1]

Molecole	Matrikine	Active region/receptor
Collagen 1	Fragments	DGGRYY,PGP, procollagen c-terminal region/ $\alpha 2\beta 1$, LIAR-1/-2, APP
Col IV $\alpha 1$	Arresten	aa1-113 of the molecule/ $\alpha 1\beta 1$
Col IV $\alpha 2$	Canstatin	$\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$
Col IV $\alpha 3$	Tumstatin	CNYYSNSYSFWLASLD PKR $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ $\alpha 3\beta 1/\alpha 2\beta 1$
Col IV $\alpha 4$	Tetrastatin-1/-2/-3	LPVFSTLPFAYCNIHQVCHY YCNHQVCHYAQRNDRSYWL AAPFLECQGRGTCHFFAN
Col IV $\alpha 5$	Pentastatin-1/-2/-3	LRRFSTMPFMFCNINNVCFN FCNINNVCFNFRNDYSYWL SAPFIECHGRGTCNYYANS
Col IV $\alpha 6$	NC1 domain Hexastatin-1/-2	Whole molecule/ $\alpha v\beta 3$ ATPFIECSGARGTCHYFAN YCNINEVCHYARRNDKSYWL
Col XVIII	Endostatin	$\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 5$, nucleolin, caveolin-1

Burgess JK, Weckmann M. **Matrikines and the lungs**. Pharmacol Ther. 134:317-37, 2012.

Matricine e recettori della famiglia delle integrine nei polmoni – [2]

Molecole	Matrikine	Active region/receptor
Fibronectin	Fragments P1 P2 P3 P4 P5	$\alpha 5\beta 1$, galectin-1 KLGVRPSQGGEAPR IKGLKPGVVYEGQL IISCHPVGTDDEPL QIGHIPREDVDYHL LVRYSPVKNEEDVA
Elastin	Fragments	VGVPAG/GXXPG galectin-3, $\alpha v\beta 3$, elastin-binding protein
Perlecan	Endorepillin	$\alpha 2\beta 1$, VEGFR-2
Tenascin	TNIIA2 P12 P13 P14 P15 P16	$\alpha 8\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 6$ RSTDLPGLKAATHYTITIRGV IGNLKPDTYEYVSL RIKYAPISGGDHAE LLWKTPLAKFDRYR QGYRTPVLSAEAST RGYRTPVLSAEAST

Burgess JK, Weckmann M. **Matrikines and the lungs**. Pharmacol Ther. 134:317-37, 2012.