

Matrice ExtraCellulare

Glicosaminoglicani e Proteglicani

http://csls-text.c.u-tokyo.ac.jp/images/fig/fig11_5.gif

Glycosaminoglycans: mortar [malta], matrix, mentor

(Trelstad RL. Lab Invest. 53:1-4, 1985)

<p>D-Glucuronic acid (GlcA) N-Acetyl-D-Galactosamine (GalNAc) Chondroitin Sulfate</p>	<p>L-Iduronic acid (IdoA) N-Acetyl-D-Galactosamine (GalNAc) Dermatan Sulfate</p>	<p>ECM HSPGAG Collagen Disaccharide unit Uronic acid Glucosamine Cell-surface receptor Proteoglycan Nature Reviews Cancer</p>
<p>D-Glucuronic acid (GlcA) D-Glucosamine (GlcNH2) Heparan Sulfate</p>	<p>L-Iduronic acid (IdoA) D-Glucosamine (GlcNH2) Heparin</p>	

GlycoWord

Glicosaminoglicani, GAGs ^{-[1]}

- ✚ Classe molto eterogenea di macromolecole glucidiche di grande importanza biologica.
- ✚ Sono polimeri derivati da zuccheri semplici tra i quali i più importanti sono gli **acidi uronici** [es. **acido D-glucuronico** (in cui la funzione alcolica in posizione C2 è sostituita da una carbossilica) o l'**acido L-iduronico**, un epimero del 1°] e gli **aminozuccheri glucosamina** e **galattosamina** (in cui la funzione alcolica in posizione C2 è sostituita da una funzione aminica che a sua volta può essere **acetilata** come nella **N-acetilglucosamina**) o solforata, come nella N-solfatoglucosamina).

Glicosaminoglicani, GAGs ^{-[2]}

- ✚ Il **glicosaminoglicano** è quindi costituito dalla **ripetizione** per un elevato numero di volte di un'**unità disaccaridiche** specifiche, formate da un'esosamina e da un acido uronico.
- ✚ Alcuni glicosaminoglicani di grande importanza biologica contengono nella molecola, oltre agli zuccheri e agli acidi uronici, **elevate concentrazioni di gruppi solforici**. A causa della presenza di **gruppi acidi**, **carbossilici** e **solforici**, queste molecole si comportano come **polianioni** e sono quindi fortemente basofile e spesso metacromatiche.

Sequenza disaccaridica ripetuta del glicosaminoglicano ad Eparan Solfato

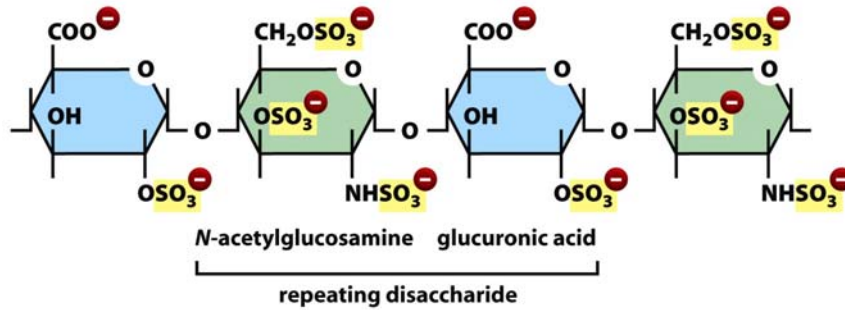
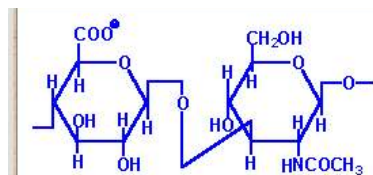


Figure 19-55 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

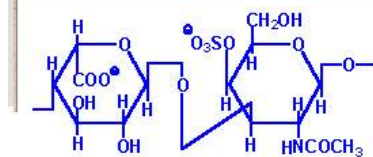
Queste catene possono contenere fino a 200 unità di disaccaride, ma di solito sono lunghe la metà. Lungo la catena vi è un'alta densità di cariche negative dovute alla presenza dei gruppi solfato e carbossile.

I proteoglicani della **lamina basale**, **perlecano**, **distroglicano** e **collagene XVIII** hanno tutti il GAG eparan solfato.



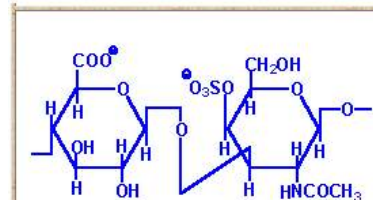
Hyaluronates:
composed of D-glucuronate + GlcNAc

linkage is $\beta(1, 3)$



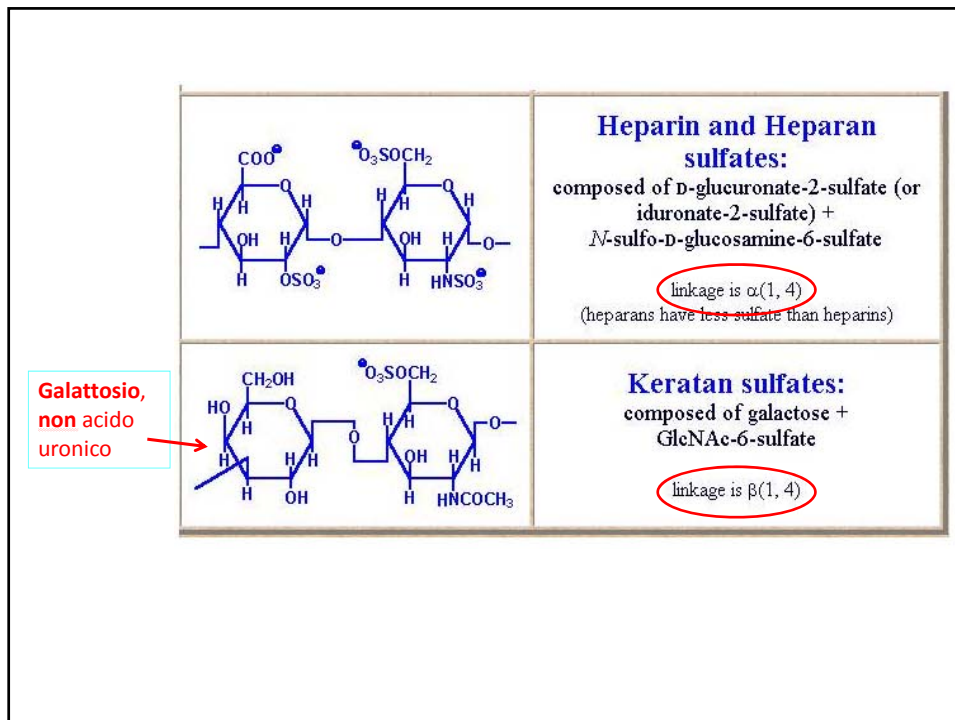
Dermatan sulfates:
composed of L-iduronate (many are sulfated) + GalNAc-4-sulfate

linkages is $\beta(1, 3)$



Chondroitin 4- and 6-sulfates
:
composed of D-glucuronate + GalNAc-4- or 6-sulfate

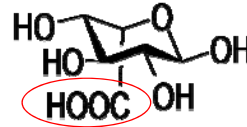
linkage is $\beta(1, 3)$
(the figure contains GalNAc 4-sulfate)



Meccanismi ancora ignoti

- ✚ Quali proteine sono modificate nel Golgi con l'aggiunta di catene di GAGs?
- ✚ Sequenza di disaccaridi da aggiungere?
- ✚ Quali siti che verranno solfatati?
- ✚ Lunghezza delle catene dei GAGs?

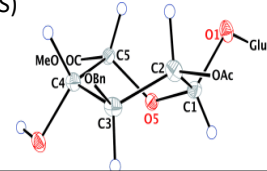
Acidi uronici: iduronico e glucuronico 1. Acido Iduronico (IdouA)



- ✚ E' la principale componente del GAG **Dermatan Solfato (DS)** e **dell'eparina**.
- ✚ E' inoltre presente nell'Eparan Solfato (HS) nonostante si trovi in quantità minore rispetto all'acido glucuronico.
- ✚ E' uno zucchero esapiranosio.
- ✚ Nella maggior parte degli esapiranosio, solo **una** delle due **conformazioni** tipo "sedia", 1C_4 o 4C_1 , è **stabile**.
- ✚ **L'iduronato invece adotta più di un tipo di conformazione**, con un **equilibrio** fra tre isomeri conformazionali a bassa-energia: le due forme a "sedia" (1C_4 e 4C_1) e un'altra conformazione "skew-boat" (2S_0). E' perciò considerate **un'unità di zuccheri "elastica"** (Scott & Stockwell, 2006).
- ✚ Può essere modificato mediante l'aggiunta di un gruppo O-solfato al carbonio in posizione 2 per formare l'acido 2-O-sulfo-L-iduronico (IdoA2S)

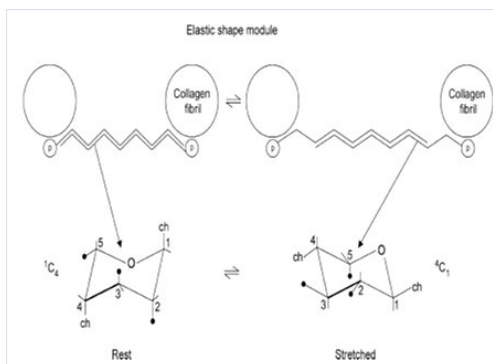
Seminario

Skew-boat conformation 2S_0



Espansione e contrazione a fisarmonica delle subunità di iduronato nel Dermatan Solfato (DS)

Schema dei moduli di forma elastici a riposo (sn) e sotto stress tensile (ds) (non in scala)

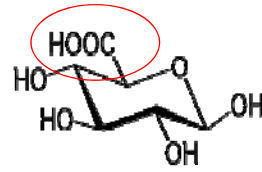


PG proteins (p) are attached non-covalently to specific binding sites on collagen fibrils, seen in cross section and linked anti-parallel via AGAG chains. **Ch**: AGAG chain. **The AGAG aggregates are stabilized by H-bonds and hydrophobic bonds. L-iduronate in the unstretched DS AGAG is in the 1C_4 chair form (left), elongating under tension to the longer C_1 chair form in the stretched shape module (right).** This occurs at relatively low tension (200 pN). Tensioned AGAG chains slip with rupture of H- and hydrophobic bonds (right), slipping back to the unstretched form, post deformation, in which these bonds have been re-formed.

Scott JE, Stockwell RA. Cartilage elasticity resides in shape module decoran and aggrecan sumps of damping fluid: implications in osteoarthritis. J Physiol. 2006 Aug 1;574(Pt 3):643-50.
<http://cdn5.acolore.com/disegni/colori/201101/bd080ffed2eff174b724346733570e56.png>

Acidi uronici: iduronico e glucuronico

2. Acido glucuronico

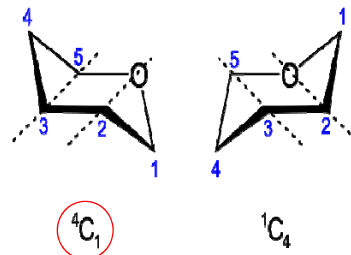


Conformazione:

Al contrario del suo epimero C5, l'acido iduronico (che può esistere in diverse conformazioni), **l'acido glucuronico** si trova **predominantemente** nella conformazione a "sedia", 4C_1 .

Seminario

Conformation
tetrahydropyran.svg



http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Conformation_tetrahydropyran.svg

Characteristics of GAGs

GAG	Localization	Comments
Hyaluronate	synovial fluid, vitreous humor, ECM of loose connective tissue	large polymers, shock absorbing
Chondroitin sulfate	cartilage, bone, heart valves	most abundant GAG
Heparan sulfate	basement membranes, components of cell surfaces	contains higher acetylated glucosamine than heparin
Heparin	component of intracellular granules of mast cells lining the arteries of the lungs, liver and skin	more sulfated than heparan sulfates
Dermatan sulfate	skin, blood vessels, heart valves	
Keratan sulfate	cornea, bone, cartilage aggregated with chondroitin sulfates	

Chondroitin Sulfate	
GlcA β 1-3GalNAc(4S) β 1-4	Receptor for malaria-infected erythrocytes, Receptor for CD44
GlcA β 1-3GalNAc(6S) β 1-4	Binding of pleiotrophin to RPTP ζ
GlcA β 1-3GalNAc(4S, 6S) β 1-4	Component of granules in mast cell, Anticoagulant activity
GlcA(2S) β 1-3GalNAc(6S) β 1-4	Adhesion of neural cells through binding to midkine Neurite growth promoting activity
Dermatan Sulfate	
IdoA α 1-3GalNAc(4S) β 1-4	Binding to HGF
IdoA(2S) α 1-3GalNAc(4S) β 1-4	Binding domain for heparin cofactor II
Keratan Sulfate	
GlcNAc(6S) β 1-3Gal β 1-4	Transparency of cornea, Mask of immunogenicity
GlcNAc(6S) β 1-3Gal(6S) β 1-4	of G1 domain of aggrecan
Heparan Sulfate, Heparin	
(IdoA(2S) α 1-4GlcNS α 1-4) $_3$	Binding domain for FGF2
(IdoA(2S) α 1-4GlcNS(6S) α 1-4) $_3$	Binding domain for FGF1
IdoA(2S) α 1-4GlcNS α 1-4IdoA(2S) α 1-4GlcNS(6S) α 1-4IdoA(2S) α 1-4GlcNS α 1-4IdoA(2S) α 1-4GlcNS(6S)	Binding domain for HGF
GlcNAc α 1-4GlcA β 1-4GlcNS(3S) α 1-4IdoA(2S) α 1-4GlcNS(6S)	Binding domain for antithrombin III
IdoA(2S) α 1-4GlcN(3S)	Receptor for HSV infection

GlycoWord

Glicosaminoglicano non legato covalentemente a proteine

Acido ialuronico (ialuronato)

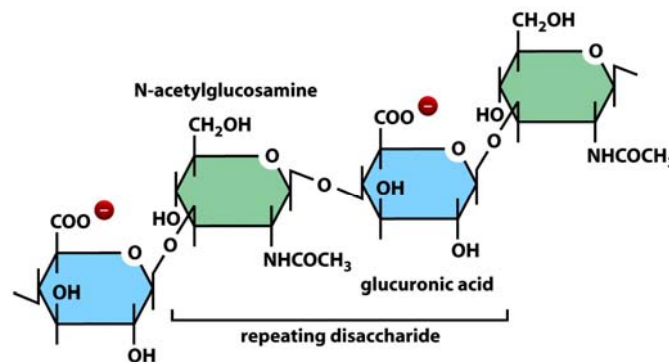
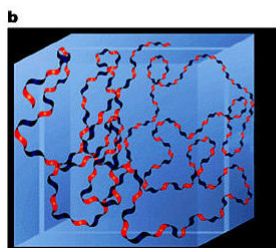
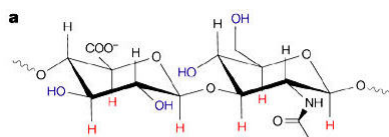


Figure 19-57 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Sequenze ripetuta del disaccaride **N-acetilglucosamina** e **glucuronato** nell'**ialuronato**, un GAG relativamente semplice. Questa molecola ubiquitaria nei Vertebrati consiste di una singola ed unica catena contenente **fino a 25000 monomeri** di zuccheri. Notare **l'assenza di gruppi solfato**.

Acido ialuronico



(a) Struttura dell'ialuronato, che è composto di **unità disaccaridiche ripetute di acido glucuronico e N-acetilglucosamina**. Il polimero ha regioni sia **cariche** sia **idrofobiche**, a causa, rispettivamente, dei **gruppi carbossilici dell'acido glucuronico** e di un **cluster di atomi di idrogeno su una faccia del disaccaride**. Gli atomi di idrogeno assiali che contribuiscono alla forza idrofobica sono illustrati in **rosso**.

(b) Il dominio occupato da ogni molecola di ialuronato in soluzione diluita si **espande** a causa di **repulsione reciproca fra i gruppi carbossilici**, e perciò **occupa un grande volume**, in cui **l'acqua è intrappolata all'interno della struttura**.

In soluzioni più concentrate, le molecole di ialuronato si aggrovigliano, formando una rete continua ma porosa. Questa rete esercita la cosiddetta **"pressione di turgore"** a causa dell'aumentata repulsione fra e all'interno delle molecole.

Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. Nat Rev Cancer. 4: 528-539, 2004.

Acido ialuronico, 1

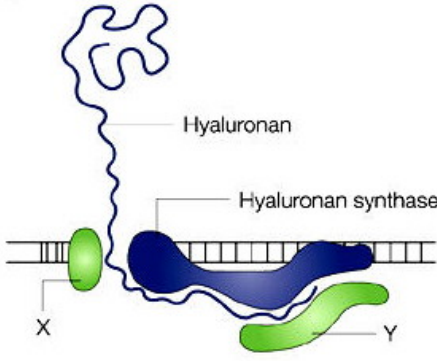
✚ Somiglianza con gli altri GAGs:

- **Polisaccaride lineare** (non ramificato), composto dalla ripetizione regolare di un'unità disaccaridica (glucuronato – N-acetilglucosamina).

✚ Differenze dagli altri GAGs

- La lunghezza della sua catena è molto superiore a quella degli altri GAGs.
- Tutte le subunità disaccaridiche sono identiche.
- **NON è solfato.**
- NON subisce epimerizzazione durante la sintesi.
- **NON è legato covalentemente ad un asse proteico.**
- NON è sintetizzato nell'apparato di Golgi come gli altri glicosaminoglicani e rilasciato per esocitosi, **ma viene "estruso" direttamente dalla superficie cellulare da un complesso enzimatico inglobato nella membrana plasmatica**. L'allungamento della catena avviene per aggiunta di zuccheri all'estremità riducente.
- Nei tessuti adulti è presente di solito in piccole quantità.

c



Hyaluronan

Hyaluronan synthase

X

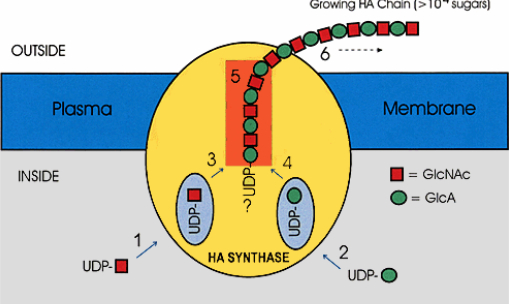
Y

Sintesi dell'ialuronato nella membrana cellulare delle cellule eucariotiche

La sintesi dell'ialuronato ha luogo sulla superficie interna della membrana plasmatica e l'ialuronato nascente viene estruso sulla membrana plasmatica mentre è ancora legato alla sintasi che lo produce. Ciò assicura che l'ialuronato abbia un rapporto intimo con la superficie cellulare e possa partecipare prontamente alla creazione di una **zona pericellulare idratata** (X e Y sono proteine regolatorie putative).

Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. Nat Rev Cancer. 4: 528-539, 2004.

Seminario



OUTSIDE

Plasma

Membrane

INSIDE

HA SYNTHASE

UDP-GlcNAc

UDP-GlcA

Growing HA Chain (>10⁴ sugars)

1) UDP-GlcNAc Binding Site

2) UDP-GlcA Binding Site

3) beta (1,4) GlcNAc Transferase

4) beta (1,3) GlcA Transferase

5) HA (acceptor) Binding Site

6) HA Transfer (translocation)

Multiple Functions of Hyaluronan Synthases

Enzyme functions needed for hyaluronan biosynthesis. The diagram shows the membrane-bound hyaluronan synthase and the six independent activities required for the enzyme to make a disaccharide unit and extend the growing hyaluronan chain. Before it is released, the chain can grow to more than 40,000 monosaccharides, corresponding to a mass of more than 8 million Da. The sugar-nucleotide substrates are produced and used by the synthase inside the cell, and the hyaluronan chain is continuously transferred (translocated) so that it is extruded into the exterior of the cell to form the capsule.

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA06/HA06E.html>

Acido ialuronico, 2

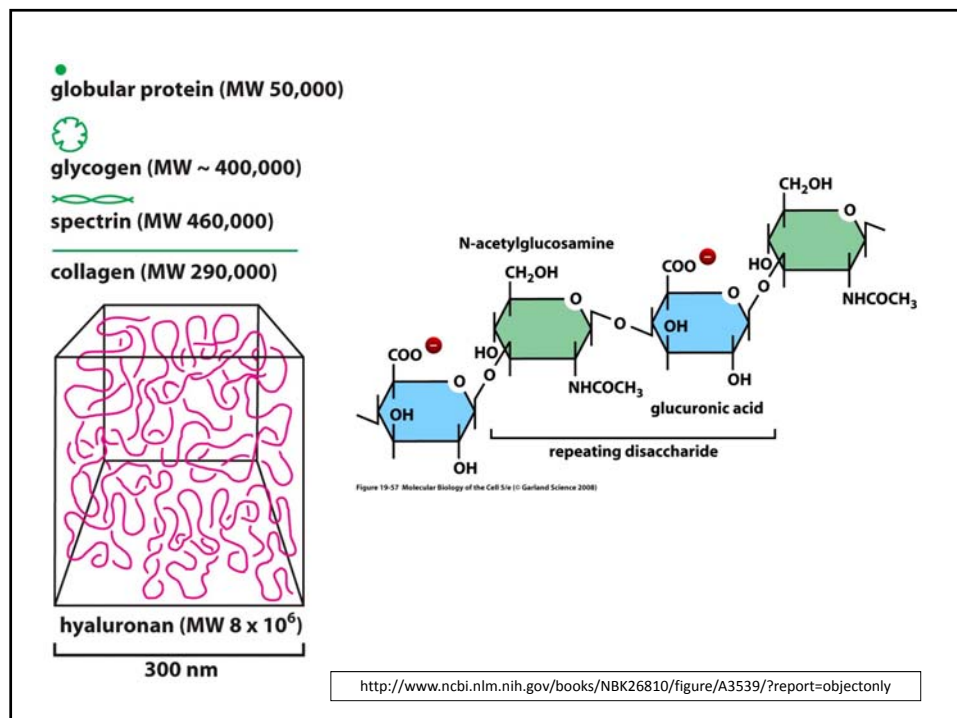
- ✚ E' presente in grandi quantità durante lo **sviluppo embrionale**, e, nell'adulto durante la **fase di guarigione delle ferite** ed in alcuni tessuti specializzati quali la **cartilagine**, l'**umor vitreo** dell'occhio, il **cordone ombilicale** e il **fluido sinoviale**.
- ✚ Nei tessuti è presente come:
 - Rivestimento alla superficie cellulare.
 - Come parte di grandi aggregati con i proteoglicani.
- ✚ Presente, **apparentemente come polisaccaride libero**, nel fluido sinoviale e nell'**umor vitreo**.

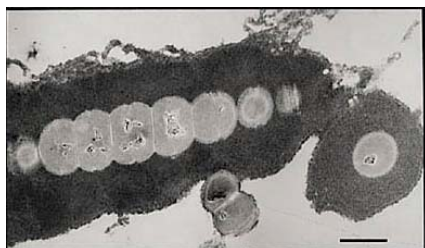
Acido ialuronico, 3

- ✚ A causa sia della **repulsione tra cariche negative** che alla **formazione di legami di idrogeno fra residui adiacenti di zuccheri**, esiste una inerente **rigidità** della molecola che dà origine ad una struttura avvolta espansa e polidispersa ad elevato peso molecolare.
- ✚ Tuttavia, ad elevate concentrazioni le catene si possono aggrovigliare e formare strutture lasse a doppia o tripla elica formando una **rete continua** che **intrappola molecole di acqua**.
- ✚ La capacità dell'ialuronato di formare una rete continua anche a basse concentrazioni è dipendente dall'alto peso molecolare del polisaccaride.
- ✚ Una limitata **degradazione** delle molecole produce una **riduzione** considerevole della **viscosità** delle soluzioni di ialuronato.

Acido ialuronico, 4

- ✦ Nel fluido della **sinovia** e nell'**umor vitreo** dell'occhio, l'elevata concentrazione di ialuronato ha due scopi:
 - ✦ Produce un **gel ad alta viscosità** che ritarda i movimenti dell'acqua ed inoltre ammortizza gli effetti dei carichi rapidi sulle articolazioni
 - ✦ **Esclude le cellule o materia particolata di grandi dimensioni** in modo da permettere un **percorso ottico pulito nell'occhio**.
- ✦ Nell'**embrione** svolge importanti compiti come riempitore di spazi, potendo essere usato per **forzare una variazione di forma di una struttura**, dato che una piccola quantità si espande con acqua occupando un grande volume.
- ✦ L'ialuronato sintetizzato nel dominio basale di un epitelio, ad esempio, spesso serve per **creare uno spazio libero in cui le cellule possano in un secondo tempo migrare**; ciò si verifica ad esempio nella formazione del cuore, della cornea e di diversi altri organi.
- ✦ Quando la migrazione delle cellule cessa, **l'eccesso di ialuronato viene di solito degradato dall'enzima ialuronidasi**.





Seminario

SINTESI BATTERICA DELL'IALURONATO [1]

- ✚ Nonostante possa sembrare strano che **alcuni batteri possano sintetizzare lo stesso polimero di ialuronato dei mammiferi**, questi microorganismi hanno creato un modo molto furbo per vivere il loro stile di vita di agente patogeno.
- ✚ I batteri di tipo *Streptococcus equisimilis* del Gruppo C (un patogeno degli animali e talvolta dell'uomo), gli *Streptococcus pyogenes* del gruppo A (un patogeno umano), e la *Pasteurella multocida* (un patogeno animale) **sono in grado di nascondersi dal sistema immunitario dei loro ospiti circondandosi con una spesso strato di ialuronato**.
- ✚ **Dato che questa barriera di ialuronato, o capsula, ha la stessa struttura dell'ialuronato dei nostri tessuti, i batteri non sono facilmente riconoscibili dagli anticorpi o attaccati dai fagociti**. Diversi studi hanno confermato che **la capsula di ialuronato contribuisce in gran parte alla patogenicità di questi batteri**.

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA06/HA06E.html#II>

Seminario

SINTESI BATTERICA DELL'IALURONATO [2]

- ✚ Nonostante il vantaggio guadagnato da un battere patogeno nel fare una capsula di ialuronato, solo circa sei specie di batteri (fra molte migliaia) hanno acquisito questa capacità biosintetica.
- ✚ Forse la formazione della capsula comporta allo stesso tempo dei notevoli **svantaggi**. Uno svantaggio ... é che la capsula può rallentare la crescita cellulare direttamente inibendo la produzione della parete cellulare. Un altro fattore consiste nel fatto che la spessa capsula di ialuronato rappresenta un carico metabolico molto grande.
- ✚ **Le subunità di zuccheri usate per assemblare questa capsula potrebbero essere usate invece come sorgenti di energia per la crescita e la divisione della cellula batterica**. Non tutti i tipi di batteri hanno la capacità metabolica di sostenere la propria crescita mentre usano una gran parte dei loro carboidrati e metabolismo energetico per produrre la capsula.

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA06/HA06E.html#II>

PATHOGENS → TLRs

ALLERGENS → FcεRI

STEM CELL FACTOR → cKit

Granule constituents: histamine, proteases, proteoglycans

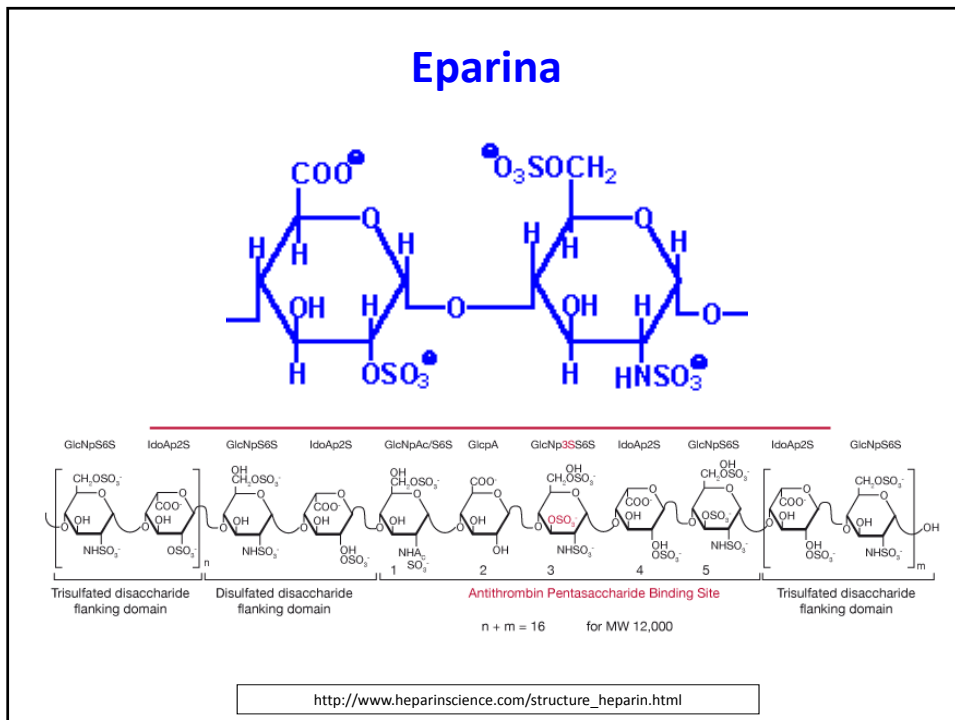
Synthesis of eicosanoids from arachidonic acid

Production of cytokines

Glicosaminoglicani

MAST CELLS - EPARINA

http://www.nutritionreview.org/images/figure1_mastcells.jpg



a 'Resting' mast cell. Cytoplasmic granule. Membrane. Matrix. Normal venule. Leukocytes. Endothelial cell.

Intracellular heparin
Storage of mMCP-4, mMCP-5, mMC-CPA
Storage of mMCP-6/histamine/serotonin (heparin is not the only site)
Storage of other mediators/cytokines/growth factors?

b 'Activated' mast cell. Granule matrix exposed to exterior. Mediators, cytokines. Fibrinogen, Thrombin, Antithrombin III. Interstitial clotting. Enhanced permeability. Leukocyte recruitment.

Extracellular heparin
Regulation of protease localization/activity
Release of ionically 'stored' histamine/serotonin
Regulation of interstitial clotting?
Regulation of cytokine/growth factor biodistribution/function?

A: Mast cellula e venula in un tessuto normale in condizioni fisiologiche. Sono elencate le funzioni note e potenziali (?) dell'eparina immagazzinata nei granuli citoplasmatici delle mast cells. **b:** Una mast cell attivata ("degranolata") induce un'aumentata permeabilità nella venula vicina, e anche il reclutamento dei leucociti.

http://www.nature.com/nature/journal/v400/n6746/fig_tab/400714a0_F1.html

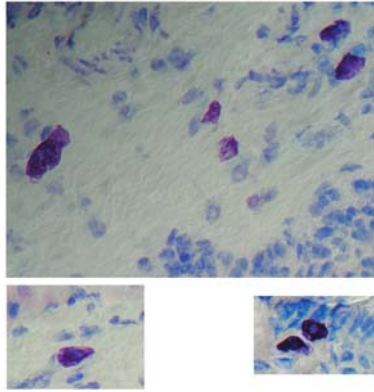
Eparina nei granuli delle mast cells

Chymase
Histamine
Serotonin
Heparin proteoglycan monomer
Glycosaminoglycan side chain

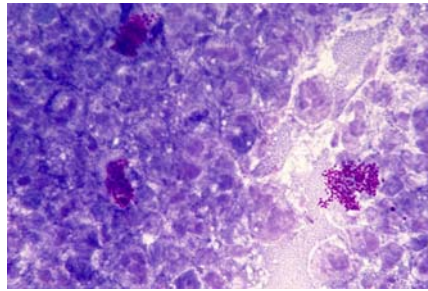
- ✚ Schema di un proteoglicano ad eparina a forma di piuma nei granuli delle mast cells.
- ✚ L'asse lungo è una proteina alla quale sono legate covalentemente molecole di glicosaminoglicani (GAGs).
- ✚ Ai GAGs sono legati **non covalentemente istamina, serotonina ed enzimi proteolitici** (chimasi di diversi tipi).

Adattato da Majno & Joris: Cells, Tissues and Disease, Blackwell, 1996.

Basofilia dell'eparina Colorazione Giemsa



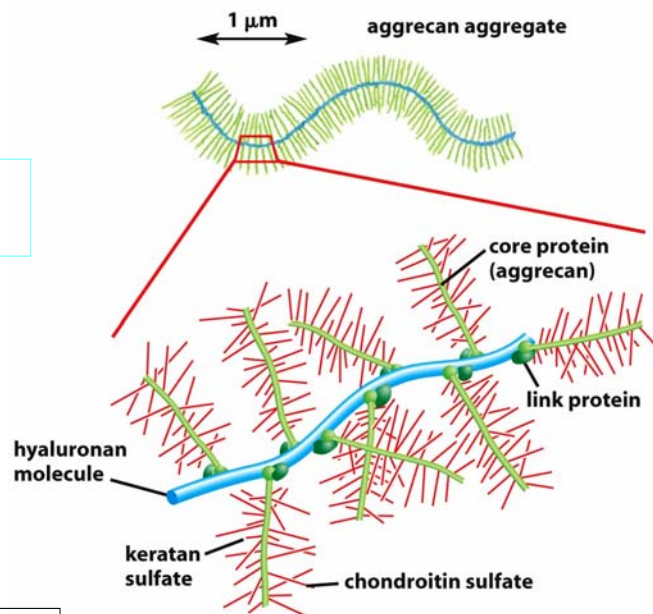
Mast cells nel polmone di ratto normale



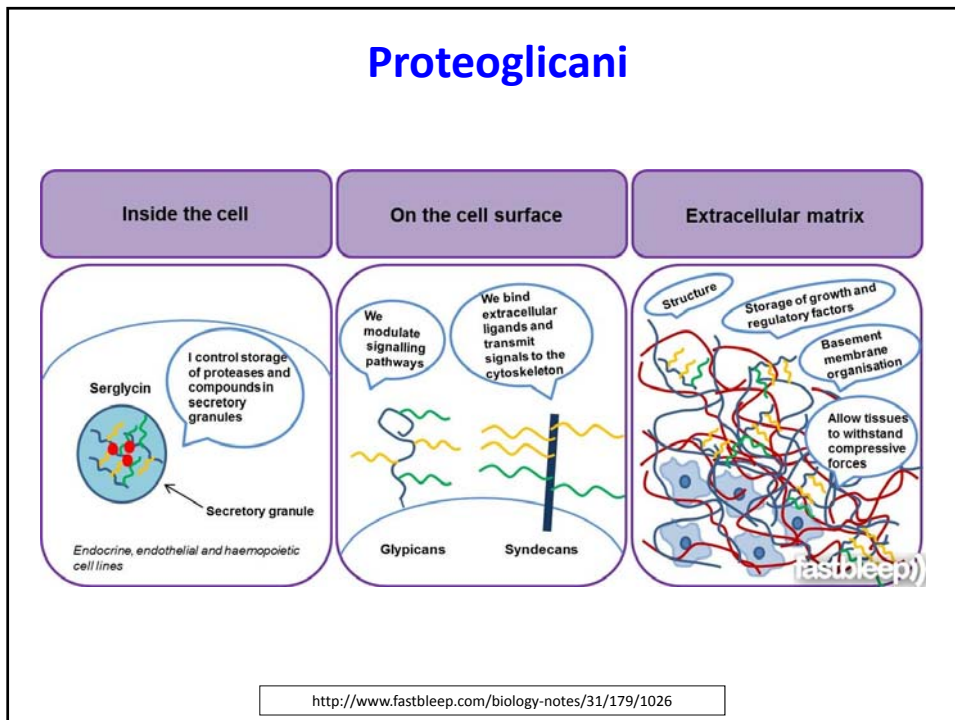
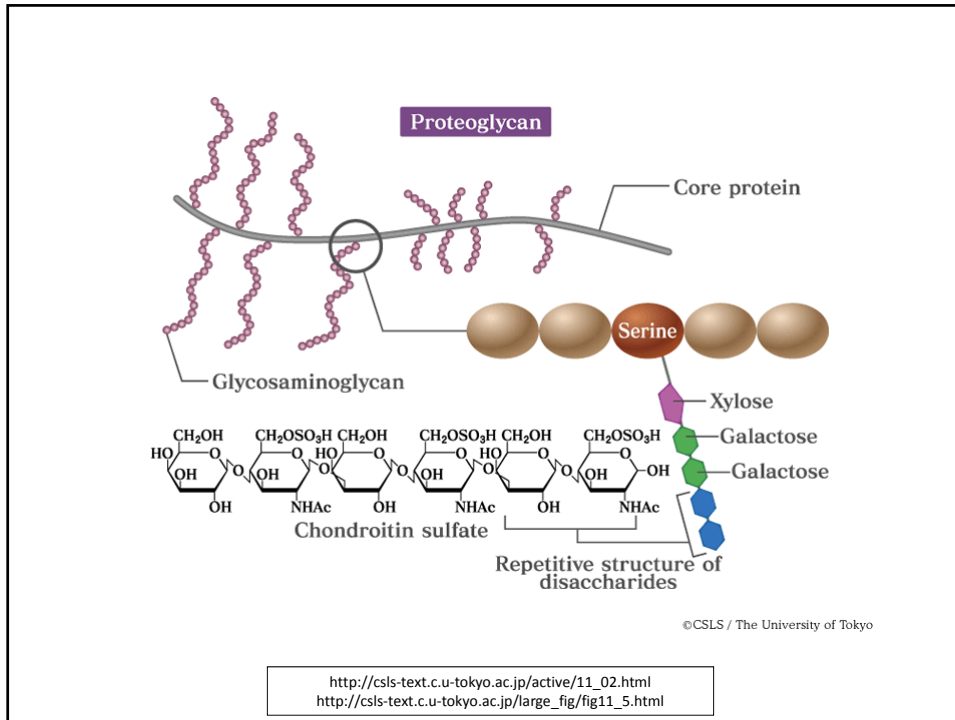
Mast cells nel carcinoma di Ehrlich

Freitas *et al.*

ECM proteoglicani

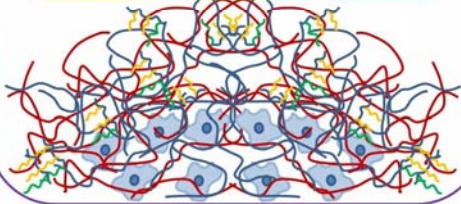


<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26810/figure/A3547/?report=objectonly>



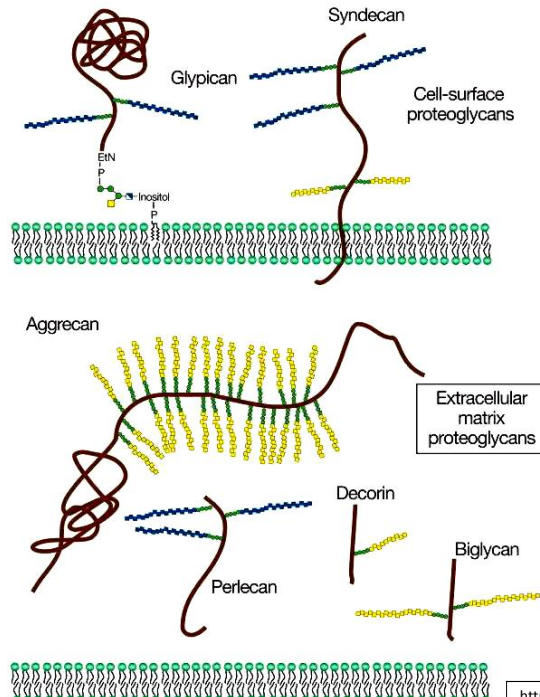
Proteoglicani extracellulari

Extracellular proteoglycans			Functions
CS chains Aggrecan family SLRPs (decorin/ biglycan)	KS chains Aggrecan (human) SLRPs (lumican/ fibromodulin)	HS chains Perlecan Agrin Collagen type XVIII	Provide a hydrated gel to resist compressive forces (mostly proteoglycans with CS/DS chains as these can bind a lot of water!) Structural organisation of matrix – e.g collagen Binding to and regulation of regulatory and signalling factors Creation of morphogen gradients Basement membrane organisation – <i>in some specialised tissues proteoglycans control the permeability of basement membranes</i>



fastbleep)

<http://www.fastbleep.com/biology-notes/31/179/1026>



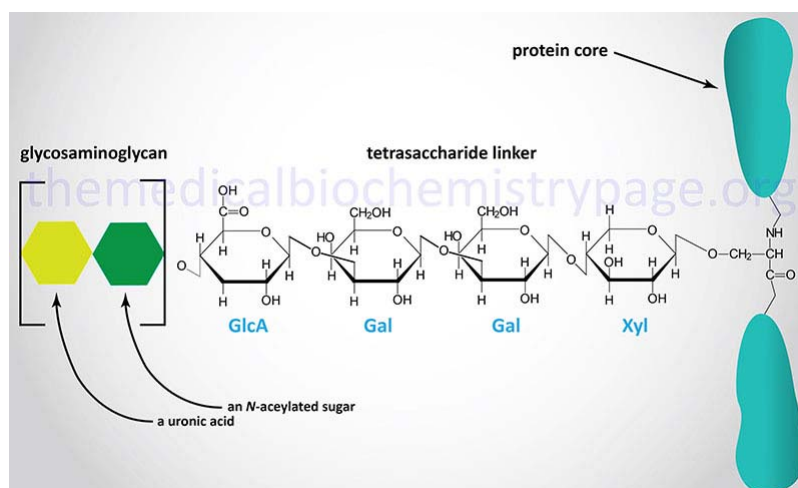
- ✚ I proteoglicani consistono di un “core” centrale proteico (marrone) e di una o più catene di glicosaminoglicani legati covalentemente. HS: blu; CS/DS: giallo.
- ✚ I **proteoglicani della membrana plasmatica** attraversano totalmente la membrana (proteine di membrana di tipo I) oppure sono legati ad un’ancora di GPI.
- ✚ I proteoglicani della matrice extracellulare sono di solito secreti, ma alcuni possono essere scissi proteoliticamente e **rilasciati dalla superficie cellulare**.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1900/figure/ch16.f2/>

Proteoglicani

- ✚ Sono costituiti da un asse proteico a cui si lega covalentemente un elevato numero di **glicosaminoglicani**, che costituiscono circa il 90% della molecola di proteoglicani.
- ✚ Solitamente alla stessa proteina si lega **un singolo tipo di glicosaminoglicano**, ma può essere presente anche **più di un tipo**, come ad es. nel proteoglicano della cartilagine (aggregano), che contiene quasi in uguale misura condroitin solfato e cheratan solfato.
- ✚ I glicosaminoglicani si legano all'asse proteico sia mediante **legame N-glicosidico**, analogo a quello delle glicoproteine, sia mediante **legame O-glicosidico** a cui può partecipare il monosaccaride xiloso oltre a due molecole di galattosamina.

Collegamento «O-linked» di un GAG alla proteina assiale in un proteoglicano



<http://themedicalbiochemistrypage.org/images/proteoglycancore.jpg>

Classificazione dei proteoglicani in base alla loro localizzazione e tipo di proteina centrale

Localizzazione	Tipo di catena di GAG	M _r della proteina "core" (kD)	Principali membri
ECM	HA, CS, KS	225-250	aggrecano, versicano
Associati al collagene	CS, DS, KS	40	decorina, biglicano fibromodulina
"Membrana"/lamina basale	HS	120	perlecano
Superficie cellulare	HS, CS	33 ^[a] -60 ^[b] -92 ^[c]	sindecano, glicano, betaglicano, CD44E, cerebroglicano
Granuli intracellulari	Eparina, CS	17-19	serglicina

CS, condroitin solfato; DS, dermatan solfato; KS, cheratan solfato; HA, acido ialuronico; HS, eparan solfato

Alcuni comuni proteoglicani

PROTEOGLICANO	PESO MOLECOLARE APPROSSIMATIVO DELLA PROTEINA "CORE"	TIPO DI CATENE DI GAGs	NUMERO DI CATENE DI GAGs	LOCALIZZAZIONE	FUNZIONI
Aggrecano	210,000	condroitin solfato + cheratan solfato (in catene separate)	~130	cartilagine	sostegno meccanico; forma grandi aggregati con l'ialuronato
Betaglicano	36,000	condroitin solfato/dermatan solfato	1	superficie cellulare e matrice	si lega al TGF- β
Decorina	40,000	condroitin solfato/dermatan solfato	1	diffuso nei tessuti connettivi	si lega a fibrille di tipo I di collagene e al TGF- β
Perlecano	600,000	eparan solfato	2-15	lamine basali	funzione strutturale e di filtrazione nella lamina basale
Sindecano-1	32,000	condroitin solfato + eparan solfato	1-3	superficie cellulare	adesione cellulare; si lega al FGF β ad altri fattori di crescita
Dally (nella <i>Drosophila</i>)	60,000	eparan solfato	1-3	superficie cellulare	co-recettore per proteine di segnalamento Wingless e Decapentaplegic

Proteoglicani - [A]

- In termini di dimensioni vanno dalla serglicina con 104 residui di aminoacidi (10,2 kD) al versicano, con 2409 residui (265 kD).
- Ogni tipo di proteoglicano contiene **uno** o **due** tipi di GAGs legati covalentemente
- Di solito le unità di GAGs sono **“O-linked” a residui di serina** nell’ambito di **sequenze dipeptidiche Ser-Gly**.
- La **serglicina** prende il nome da un **dominio centrale caratteristico con 49 aminoacidi** composti di **residui alternati di serina e di glicina**.
- Il proteoglicano della matrice della cartilagine contiene **117 paia** di Ser-Gly ai quali si legano le catene di condroitin solfato.
- La decorina, un piccolo PG secreto dai fibroblasti nella matrice del tessuto connettivo contiene soltanto **tre paia** di Ser-Gly, una delle quali è di solito glicosilata.
- Oltre alle unità di GAGs, i PGs possono contenere altri gruppi oligosaccaridici “O-linked” oppure “N-linked”

Proteoglicani - [B]

- Nel genoma dei mammiferi ci sono circa 3 dozzine di proteoglicani della MEC che subentrano in diverse famiglie.
- Le due famiglie più ampie sono quelle basate su **ripetizioni LRR** («Leucine-Rich Repeat») o quelle **contenenti domini LINK** (regioni di **legame all’acido ialuronico**) e **domini «C-type lectin» (CLET)**; moduli leganti carboidrati Ca-dipendenti) («**hyalectans**»).
- Molti dei **proteoglicani LRR** si legano a **diversi collagene** e a **fattori di crescita**.
- I membri della famiglia degli «**hyalectans**» si legano a varie **glicoproteine** della MEC (ad es. tenascine) e, mediante il dominio **LINK**, **all’acido ialuronico**.
- Queste funzioni di legame contribuiscono alla regolazione dei complessi proteici nella 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.

Leucine-rich repeat

http://en.wikipedia.org/wiki/Leucine-rich_repeat

Proteoglicani - [C]

- ✚ Inoltre, ci sono circa una dozzina di PGs che non cadono in queste famiglie (es. lubricin/PRG4, endocan/ESM1, serglycina, ecc).
 - ✚ Forse il più significativo di questi è il **Perlecano** (HSPG2), una **proteina multidominio che è il «core proteoglycan» di tutte le membrane basali.**
- ✚ Ci sono inoltre molti altri esempi di PGs che cadono in altre categorie (es. alcuni collagene, agrina, betaglicano, CD44 e altre glicoproteine) che sono talvolta o sempre modificate dal legame con GAGs.
- ✚ Ci sono infine due piccole famiglie di PGs integrali di membrana con catene laterali di eparan solfato (HS)
 - ✚ Glipicani
 - ✚ Sindecani
- ✚ ...e alcuni PGs transmembrana a Condroitin Solfato (CS)

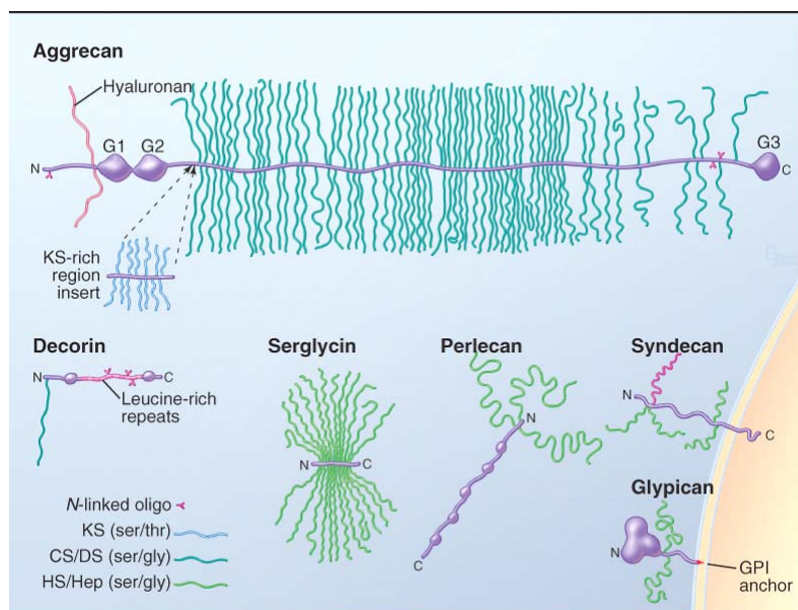
Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome—an inventory of extracellular matrix constituents and functions. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Jan 1;4(1):a004903.

Proteoglicani - [D]

- ✚ Le cellule secernono molti proteoglicani nella MEC, ma **trattengono alcuni tipi nella membrana plasmatica** mediante polipeptidi transmembrana o un'ancora a glicosilfosfatidilinositolo (GPI).
- ✚ Le proteine assiali variano in dimensioni da 100 a 4000 aminoacidi.
- ✚ Molte sono **modulari**, e contengono i domini strutturali familiari: EGF, proteina regolatoria del complemento, ripetizioni ricche di leucina o lectine.
- ✚ Tre famiglie di **collageni** hanno catene laterali di GAGs: i tipi IX e XII hanno catene di **condroitin solfato** e il tipo XVII ha catene di **eparan solfato**.

Proteoglicani - [E]

- ✚ I numeri di GAGs attaccati alla proteina assiale varia da uno (decorina) a più di 200 (aggrecano).
- ✚ Una particolare proteina assiale può avere tipi di **GAGs identici** (fibroglicano, glipicano, versicano) oppure **GAGs diversi** (aggrecano, serglicina, sindecano).
- ✚ Alcuni tipi cellulari possono aggiungere diversi GAGs alla stessa proteina assiale o secernere una proteina assiale senza GAGs.



Proteoglicani - [F]

- ✚ Date le loro proprietà fisiche e distribuzione fra gli elementi fibrosi della MEC, i proteoglicani e l'acido ialuronico sono considerati come **"riempitori di spazi"**.
- ✚ Ogni disaccaride idrofilico porta un **gruppo carbossilico** o **solfo** o entrambi, e quindi i GAGs sono **polianioni** carichi che si espandono tramite repulsione elettrostatica in soluzione e attraggono fino a 50g di acqua per grammo di proteoglicano.
- ✚ L'ialuronato, il GAG di maggiori dimensioni, occupa un volume molto ampio:
 - ◆ Una singola molecola idratata di 25,000 kD occupa un volume simile a quello di un piccolo organello con un diametro di 200 nm.
- ✚ La ritenzione di acqua provocata dall'ialuronato e dal proteoglicano aggregano-cheratan solfato/condroitin solfato è essenziale per la **cartilagine**.

Proteoglicani - [G]

- ✚ Nella MEC, le **reti di ialuronato ad elevata densità di cariche negative restringono il flusso di acqua, limitano la diffusione dei soluti** (specialmente delle macromolecole) e **impediscono il passaggio dei microorganismi**.
- ✚ L'ialuronato e i proteoglicani possono agire inoltre da **lubrificanti** nelle articolazioni e come **mezzo otticamente trasparente**, riempitivo degli spazi dell'umor vitreo dell'occhio.

RUOLI FUNZIONALI PROPOSTI PER I PROTEOGLICANI

Tipo	Localizzazione	Interazione/collegamento	Ruoli funzionali
Proteoglicani a Condroitin Solfato (CS-PGs)	Cartilagine	Acido ialuronico, proteine di collegamento	Resilienza, legame con acqua
	Parete dei vasi sanguigni	Acido ialuronico, proteine di collegamento, elastina, collagen, superficie cellulare	Mantenimento della viscoelasticità, regolazione della permeabilità e della deposizione lipidica
Proteoglicano a dermatan Solfato (DS-PGs)	Fluido follicolare ovarico	(?) (1985)	Mantenimento della viscosità, coinvolto nell'ovulazione
	Tendine, pelle	Banda-d del collagene, auto-interazione	Regolazione della fibrillogenisi e del diametro delle fibrille; mantenimento dell'architettura normale
Proteoglicano ad eparan solfato (HS-PGs)	Superficie cellulare	Auto-interazione, fibronectina, collagene, membrana plasmatica	Riconoscimento cellulare, collegamento cellulare, trasformazione neoplastica
	"Membrana"/lamina basale	Collagene di tipo IV	Permeabilità, filtrazione di macromolecole
Proteoglicano a cheratan solfato (KS-PGs)	Stroma della cornea	Collagene (?)	Mantenimento della trasparenza e delle proprietà rifrattive della cornea

Funzioni dei proteoglicani

✚ Solubili, localizzati nella MEC

- Es: Serpicina, versicano, proteoglicano della matrice della cartilagine (aggrecano)

✚ Proteine integrali transmembrana

- Es: Sindecano

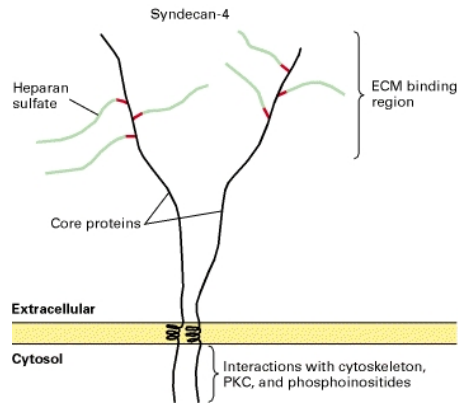
✚ Entrambi i tipi funzionano interagendo con una gran varietà di molecole:

- Mediante le componenti GAGs
- Mediante domini recettoriali specifici nel polipeptide stesso.

<http://web.virginia.edu/Heidi/chapter9/chp9frameset.htm>

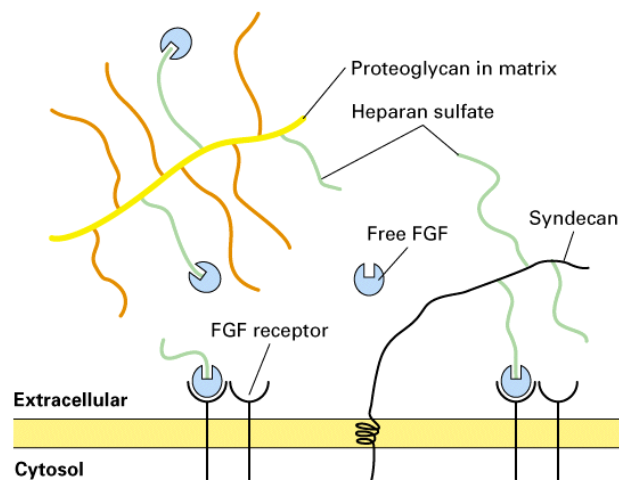
Esempio: PG transmembrana SINDECANO

- ✚ Si associa **intracellularmente** con il citoscheletro di **actina**
- ✚ **Fuori dalla cellula** interagisce con la **fibronectina**, proteina extracellulare che si lega a diverse proteine della superficie cellulare e a componenti della MEC
- ✚ La sua capacità di **partecipare a interazioni multiple** con queste proteine bersaglio lo rende una sorta di **"colla"** nello spazio extracellulare
 - Collegando componenti della MEC
 - Facilitando il legame delle cellule alla MEC
 - Mediando il legame di fattori di crescita e di altre molecole solubili alla matrice e alle superficie cellulari.

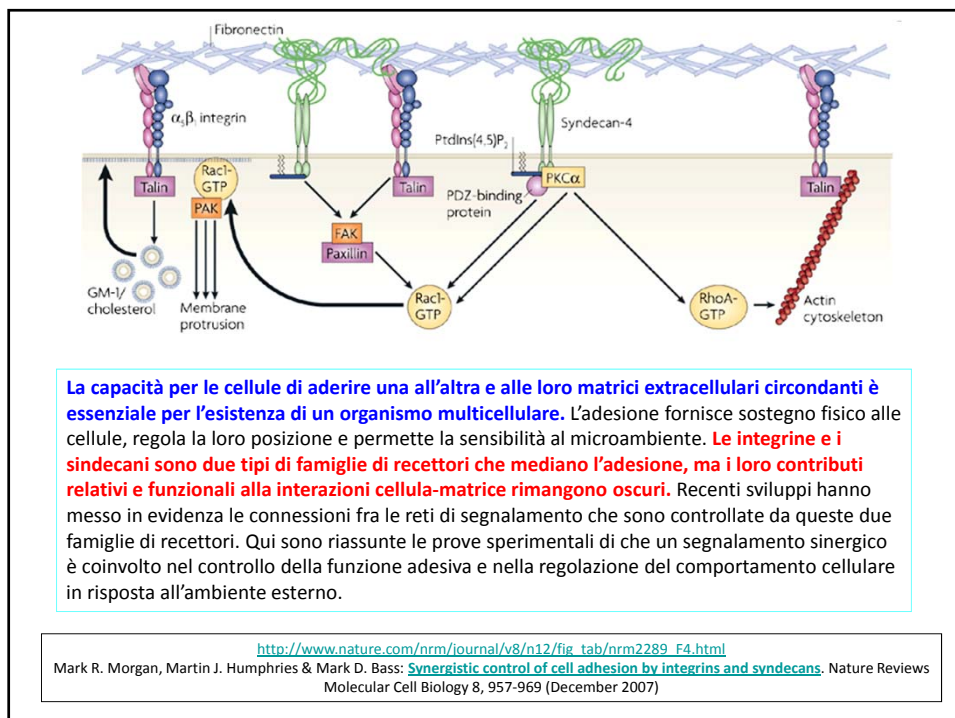
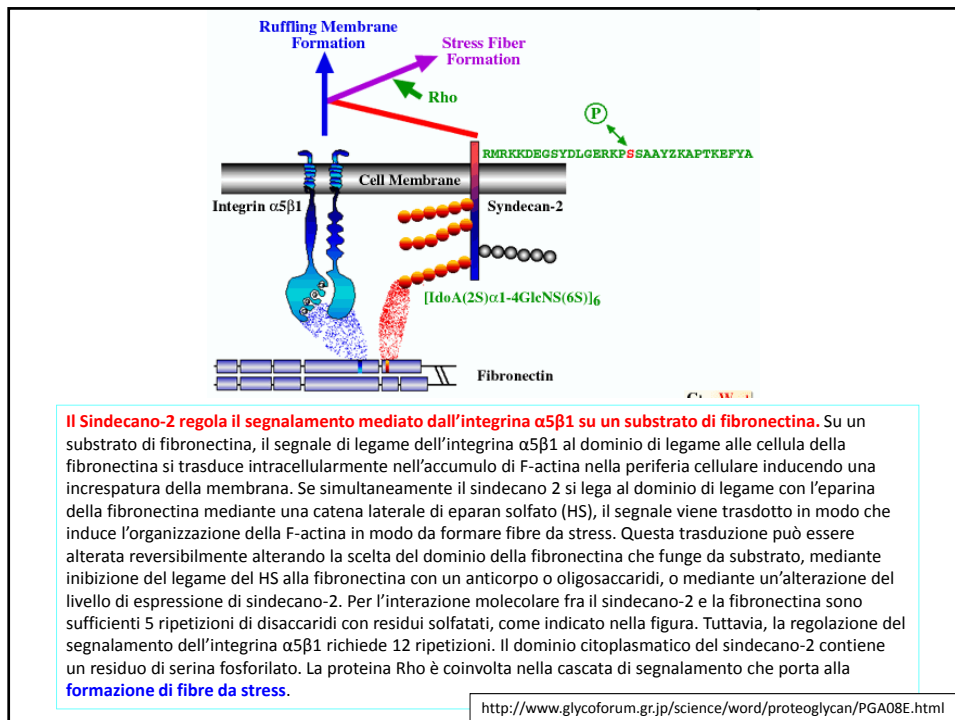


<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21706/figure/A6578/>

I fattori di crescita sono sequestrati e presentati alle cellule dai proteoglicani della matrice e della membrana plasmatica

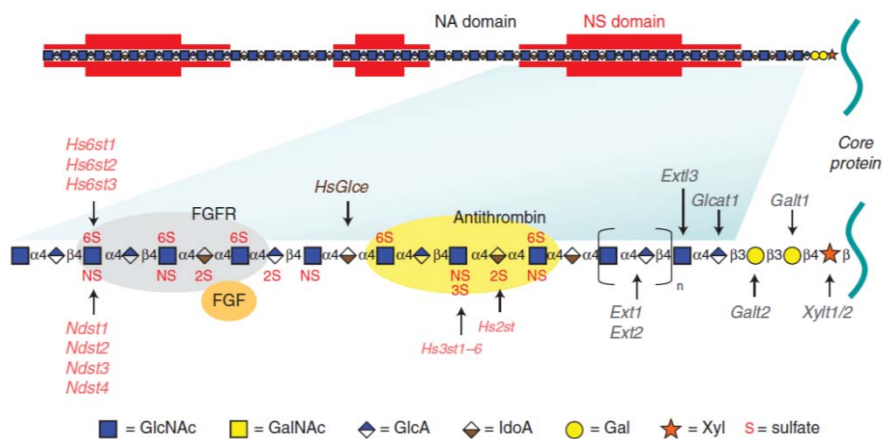


<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21706/figure/A6580/>



Funzioni dei PGs, segue

- ✚ Molte delle funzioni dei PGs coinvolgono il **legame di proteine specifiche** ai **gruppi di GAGs** dei PGs.
- ✚ I siti specifici di legame con i GAGs di queste proteine contengono molteplici residui di **aminoacidi basici**.
 - La sequenza di AA BBxB BBXXB (dove **B** è un **aminoacido basico** e X un AA qualsiasi) è ricorrente in questi siti.
 - Aminoacidi basici come la **lisina** e l'**arginina** forniscono una **neutralizzazione delle cariche negative dei residui dei GAGs**.
 - In molti casi il legame delle proteine della MEC ai GAGs è soprattutto carica-dipendente.
 - Ad es. sono i GAGs più altamente solfatati quelli che si legano più fortemente alla fibronectina.

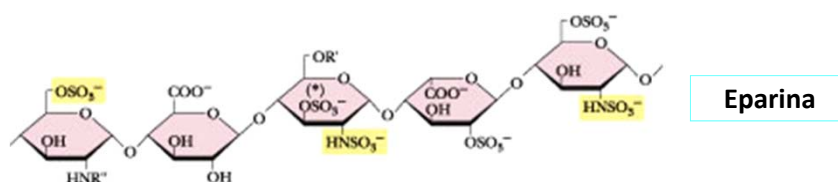


Struttura dell'eparan solfato (HS)

Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan sulfate proteoglycans. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Jul 1;3(7).

Funzioni dei PGs, segue, 2

- ✚ Alcune interazioni proteina-GAG tuttavia richiedono **sequenze di carboidrati specifiche**:
 - Nell'**eparina**, ad es. una particolare **sequenza pentosaccaridica** si lega strettamente all'**antitrombina III**, favorendo la sua interazione con la trombina (enzima proteolitico che converte il fibrinogeno in fibrina), così spiegando le **proprietà anticoagulanti dell'eparina**.
 - Altri GAGs si legano molto più debolmente.



Funzioni dei PGs, segue, 3

- ✚ I proteoglicani ad eparan solfato (HSPGs) possono legarsi a **citochine, fattori di crescita** e ad **agenti morfogenetici**.
- ✚ Queste interazioni forniscono un **deposito di fattori regolatori** che possono essere rilasciati mediante regolazione selettiva delle catene di HS.
- ✚ Ciò facilita la formazione di **gradienti morfogenetici** essenziali per la **specificazione cellulare** durante lo sviluppo embrionale e i **gradienti di chemochine** coinvolti nei processi di **reclutamento** e «**homing**» dei **leucociti**.

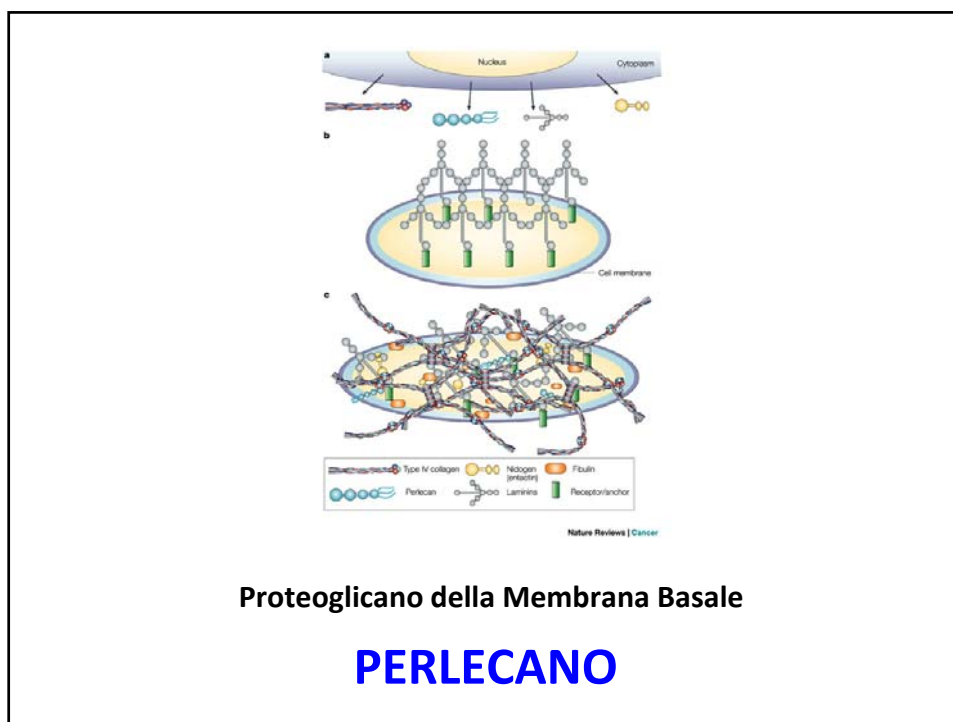
I proteoglicani ad eparan solfato (HSPGs) svolgono molteplici attività nelle cellule e nei tessuti.

Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. **Heparan sulfate proteoglycans.** Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Jul 1;3(7). pii: a004952. doi: 10.1101/cshperspect.a004952.

Differenze di genere tra catene di Eparan Solfato (HS)

Proposed structural model of male and female mouse liver intact HS chains. The structure of **male** and **female** mouse liver HS chains has been predicted with combined data obtained from chain length heparin lyases digestion patterns, SAX-HPLC disaccharide profile, percentage disaccharide composition and percentage of sulfated and N-unsubstituted disaccharides. Note: 3 repeats of duplicated GlcA- GlcNAc, 4 repeats of triplicated GlcA-GlcNH 3 + and 2 repeats of triplicated GlcA-GlcNH 3 + (6S).

Murali S, Leong DF, Jaslyn LJ, Cool SM, Nurcombe V. **Comparative assessment of the effects of gender-specific heparan sulfates on mesenchymal stem cells.** J Biol Chem. 2011 Mar 25.

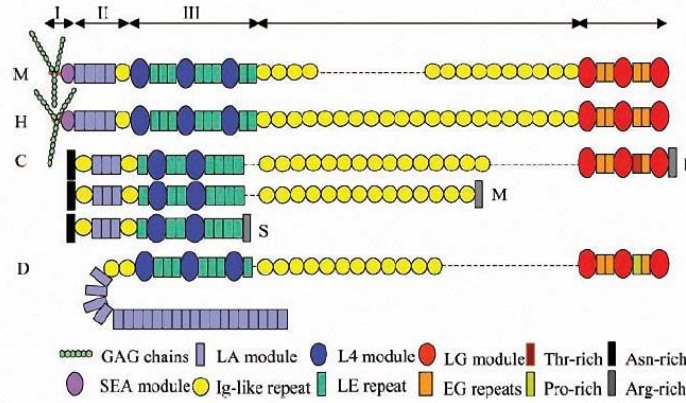


Perlecano (1)

- ✚ Proteoglicano **multidominio** ad **eparan solfato** (HSPG) essenziale per lo sviluppo dei **vasi sanguigni**, del **cuore**, del **cervello** e **cartilagine**
- ✚ Si trova in tutte le **lamine basali vascolari** (soprattutto quelle associate alle cellule endoteliali) e dei tessuti epiteliali; può anche trovarsi associato alla superficie cellulare dove si ritiene interagisca con integrine.
- ✚ Si trova inoltre in tessuti avascolari quale la cartilagine e nello stroma del tessuto connettivo.

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

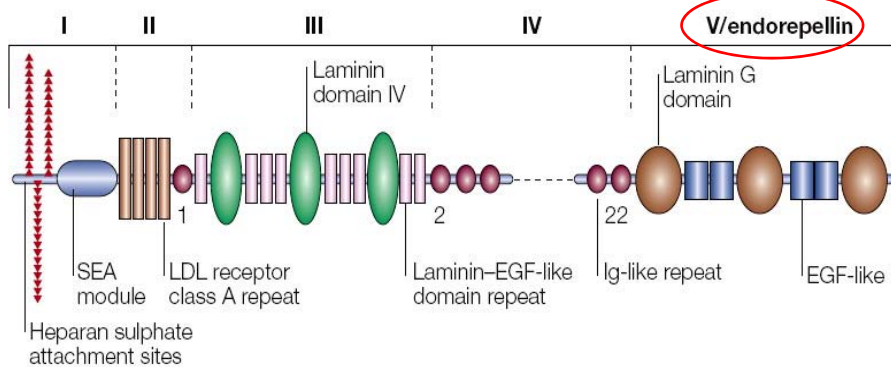
PERLECANO



Schematic structures of perlecan from mouse (M), human (H), C. elegans (C), and Drosophila (D). Dashed lines, no corresponding sequence.

Jiang X, Couchman JR. *Perlecan and tumor angiogenesis*. J Histochem Cytochem. 2003 Nov;51(11):1393-410.

matrichina



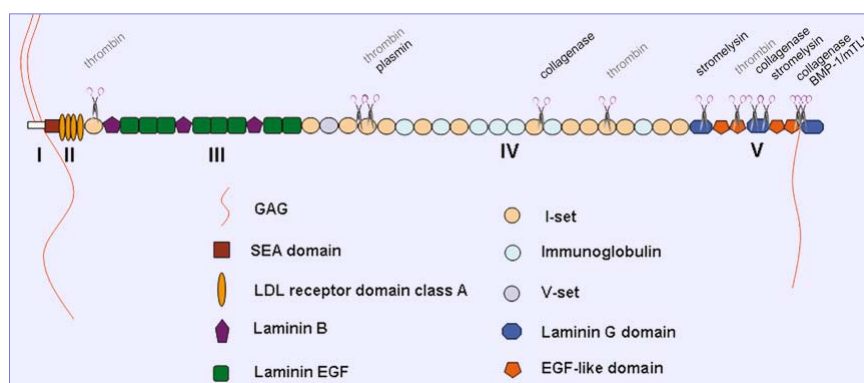
Structural domains of human perlecan.

Iozzo RV. *Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Aug;6(8):646-56.

Glycobiology vol. 17 no. 9 pp. 897–905, 2007
doi:10.1093/glycob/cwm043
Advance Access publication on April 18, 2007

Perlecan—a multifunctional extracellular proteoglycan scaffold


Perlecan is a **large multidomain heparan sulfate proteoglycan of the extracellular matrix**. Expression of this proteoglycan changes dynamically during embryo implantation and placentation. Perlecan is expressed by various cells of the embryo including trophoblast and trophoblast as well as the maternal compartment, including basal lamina underlying uterine epithelia and endothelia and, most dynamically, in developing decidua. **Perlecan supports various biological functions, including cell adhesion, growth factor binding, and modulation of apoptosis**. Moreover, studies in other systems demonstrate that **perlecan expression and activity can be controlled at many levels, including transcription, alternative splicing, and extracellular proteolysis**. This review will discuss changes in perlecan expression that occur during embryo implantation and placentation. Furthermore, we propose a **model in which perlecan represents an extracellular scaffold protein that supports complex, distinct functions in its full-length form or smaller forms generated by alternative mRNA splicing, extracellular proteolysis, or glycosidase action**.



Perlecan as a scaffold—functional uncoupling by proteolysis. The figure diagrams perlecan and indicates **domains I–V as well as major structural subdomains**. The scissors indicate the positions of predicted sites of cleavage by the corresponding enzymes. **Thrombin** sites are indicated in grey. Although thrombin-sensitive sites are predicted by sequence inspection, these sites appear to be **cryptic** because intact perlecan is not sensitive to thrombin cleavage.

Farach-Carson MC, Carson DD. **Perlecan—a multifunctional extracellular proteoglycan scaffold**. Glycobiology. 2007 Sep;17(9):897–905.

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 MC, Carson DD. Perlecan--a multifunctional extracellular proteoglycan scaffold. Glycobiology. 2007 Sep;17(9):897-905.

Seminario

Perlecano (2)

- ✚ Ha **cinque domini** (I a V) dal N-terminale al C-terminale.
- ✚ I domini contengono **regioni di omologia con altre proteine note coinvolte nel controllo della crescita, adesione cellulare e captazione di nutrienti**.
 - Il **dominio I** contiene tre sequenze tripeptidiche a cui si lega l'eparan solfato e un modulo caratteristico "sea urchin sperm protein, enterokinase, agrin (SEA)" che non ha altra funzione nota tranne quella di aumentare il collegamento dell'HS e la glicosilazione "O-linked".
 - Il **dominio II** contiene quattro regioni omologhe al recettore per le lipoproteine a bassa densità di classe A (LDL) e una ripetizione tipo immunoglobulina.
 - Il **dominio III** possiede tre moduli tipo laminina e otto ripetizioni tipo «epidermal growth factor» (EGF).
 - Il **dominio IV** è il dominio di maggiori dimensioni. Ha ripetizioni immunoglobuliniche di tipo N-CAM, il cui numero varia fra le specie.
 - Il **dominio V** ha tre domini globulari separati da quattro ripetizioni tipo EGF. E' potenzialmente molto interattivo ed è il principale dominio coinvolto nel legame cellulare.

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

Seminario

Perlecano (3)

- ✚ La proteina centrale del perlecano ha approssimativamente 470 kDa.
- ✚ Se si prendono in considerazione i molti oligosaccaridi "O-linked" e le fino a quattro catene di HS (tre nel dominio I e una potenzialmente nel dominio V), la dimensione totale può raggiungere i 800 kDa.

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

Seminario

Perlecano (4)

- ✚ I **domini del perlecano e le catene laterali di eparan solfato** possono **interagire con un gran numero di ligandi**. Ad es:
 - Le catene laterali di HS del dominio I interagiscono con laminina, collagene IV, fibronectina, "fibroblast growth factor" (FGF) 2, "platelet derived growth factor"(PDGF), VEGF, trombospondina, prolina, "arginine-rich and leucine-rich repeat protein" (PRELP), angiopoietina-3 e fibrillina-1.
 - Il dominio II interagisce con "very low density lipoprotein" (VLDL) e con la fibrillina-1.
 - Il dominio III interagisce con FGF7, "FGF-binding protein" e PDGF.
 - Il dominio IV interagisce con nidogeno-1/2, fibulina, fibronectina, collagene IV, sulfatidi e PDGF.
 - Il dominio V interagisce con nidogeno-1, fibulina-2, FGF7,sulfatidi, complesso laminina-nidogeno, α -dystroglycan, α 2 β 1 integrina, progranulina, ECM1, e collagen XVIII/endostatin.

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

The diagram illustrates the layers of articular cartilage from top to bottom: articular surface, superficial tangential zone (10-20%), middle transitional zone (40-60%), deep zone (30%), calcified cartilage, subchondral bone, and cancellous bone. A red line labeled 'Tide mark' is shown at the boundary between the deep zone and the calcified cartilage. The collagen arrangement is depicted with fibers that are randomly oriented in the superficial zone and become increasingly aligned parallel to the articular surface in the middle and deep zones.

Collagen Arrangement of the Articular Cartilage

Proteoglicani

CARTILAGINE - AGGREGANO

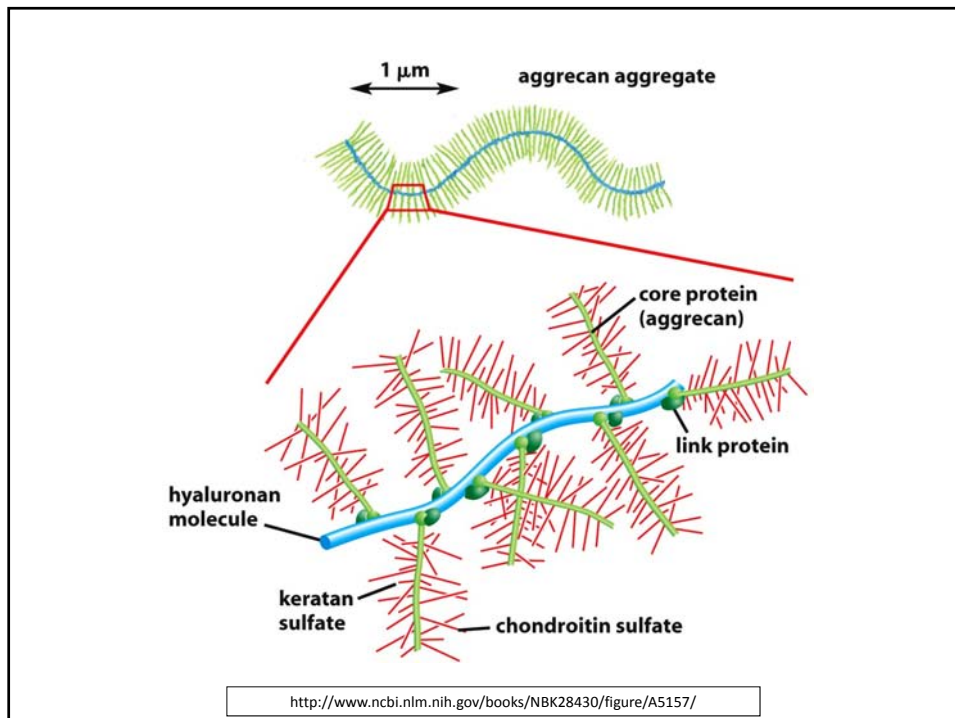
<http://www.pt.ntu.edu.tw/hmchai/Biomechanics/BMmaterial/Cartilag.files/Cartilagelayer.png>

Cartilagine

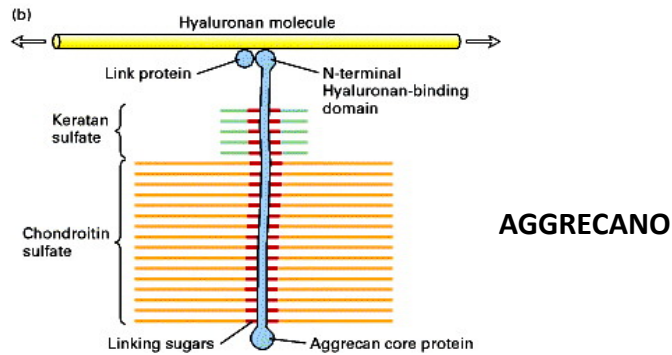
The left image is a histological section of cartilage showing the perichondrium, chondrocytes in lacunae, cartilage matrix, and elastic fibers in the matrix. The right image is a higher magnification view of chondrocytes in lacunae.

I proteoglicani rendono la cartilagine flessibile e resiliente

- Il proteoglicano della matrice della cartilagine è responsabile della **flessibilità e resilienza** del tessuto cartilagineo.
- Nella cartilagine lunghi filamenti di **acido ialuronico** sono tempestati o rivestiti di molecole di **PGs**.
- Le catene di ialuronato possono essere lunghe fino a 4 μm e possono coordinare 100 o più unità di proteoglicani.
- Il proteoglicano della cartilagine possiede nella porzione N-terminale un **dominio di legame (indiretto)** con l'**ialuronato** mediato da una "**link protein**".
- Gli aggregati ialuronato-PGs possono avere pesi molecolari superiori ai 2 milioni di Dalton. [1Dalton: 1/12 della massa di un atomo di carbonio].

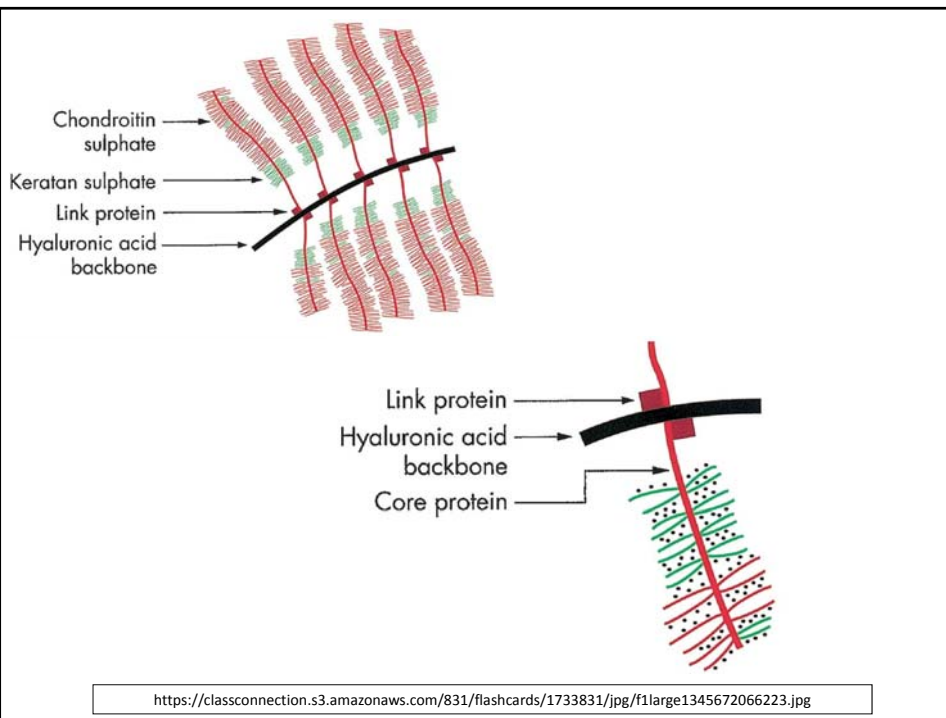


Struttura dell'aggregato di proteoglicani della cartilagine



- ✚ Il dominio N-terminale della "core protein" si lega indirettamente ad una molecola di acido ialuronico (HA).
- ✚ Il legame è facilitato da una "**link protein**", che si lega sia al disaccaride dell'ialurano che alla "core protein" dell'aggrecano.
- ✚ Ogni "core protein" dell'aggrecano ha 127 sequenze Ser-Gly alle quali sono aggiunte le catene di GAGs:
 - 30 corte catene di cheratan solfato
 - 97 catene di condroitin solfato più lunghe

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21706/figure/A6576/>

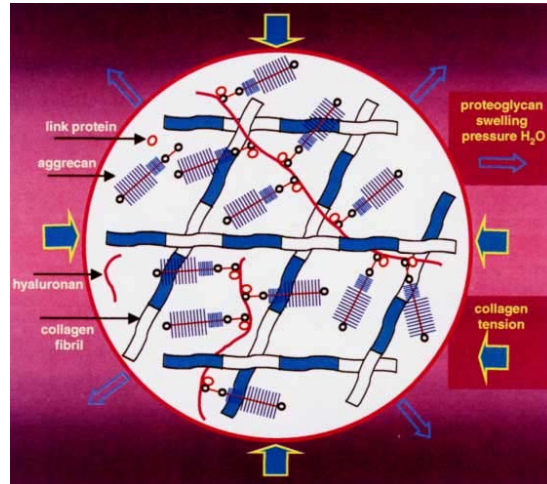


<https://classconnection.s3.amazonaws.com/831/flashcards/1733831/jpg/f1large1345672066223.jpg>

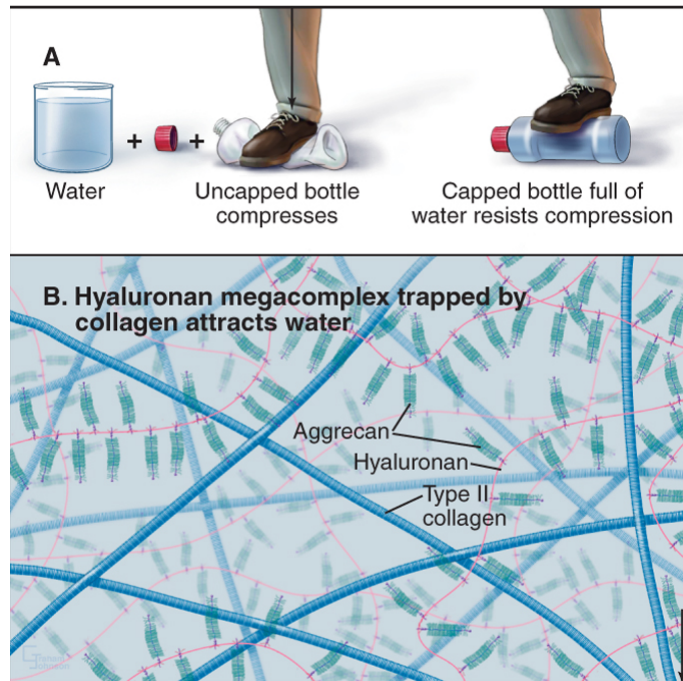
AGGREGANO

✚ L'**aggrecano** è il principale proteoglicano della **cartilagine articolare**. Questa molecola è importante per il funzionamento corretto della cartilagine articolare perchè fornisce una **struttura gelatinosa idratata** (mediante le sue interazioni con l'ialurano e con proteine di collegamento) che conferisce alla cartilagine proprietà di **resistenza ai carichi**.

✚ E' anche cruciale per la morfogenesi del condroscheletro durante lo sviluppo.



Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. Structure and function of aggrecan. Cell Res. 12:19-32, 2002.



© Elsevier. Pollard et al: Cell Biology 2e - www.studentconsult.com

CARTILAGINE

A

Cartilaginous endplate:
Water - 55%
Proteoglycan - 8%
Collagen - 25%

Annulus fibrosus:
Water - 70%
Proteoglycan - 5%
Collagen - 15%

Nucleus pulposus:
Water - 77%
Proteoglycan - 14%
Collagen - 4%

B

Capsule
Cell
Proteoglycan monomer
Collagen fibril

A

B

COMPRESSION

H₂O

increased charge density during compression

Repulsive Force on GAG of Articular Cartilage

Raj PP. Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment. Pain Pract. 2008 Jan-Feb;8(1):18-44.

Matrice extracellulare della cartilagine.

Nella **cartilagine articolare** sono presenti tre classi di proteine: **collageni** (soprattutto collagene di tipo II), **proteoglicani** (soprattutto aggrecano) e altre **proteine non affini ai collageni** (che includono le proteine di collegamento "link", la fibronectina, e la proteina oligomerica della matrice della cartilagine) nonchè **proteoglicani più piccoli** (biglicano, decorina e fibromodulina). L'interazione fra i proteoglicani ad elevata carica negativa della cartilagine e le fibrille di collagene di tipo I è responsabile della **resistenza alla tensione alla compressione del tessuto**, che resiste ai carichi in vivo.

Abbreviazioni: COMP: "cartilage oligomeric matrix protein".

Chen FH, Rousche KT, Tuan RS. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. Nat Clin Pract Rheumatol. 2:373-382. 2006.