

MATRICHINE, MATRICRIPTINE & SITI MATRICRIPTICI

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

Abstract

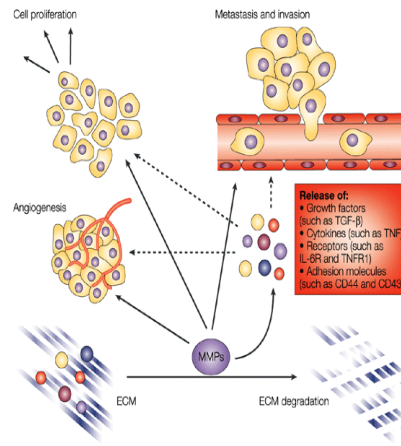
Matrikines originate from the fragmentation of extracellular matrix proteins and regulate cellular activities by interacting with specific receptors. Matrikines are implicated in inflammation, immune responses, organ development, wound repair, angiogenesis, atherosclerosis, tumor progression and metastasis due to their ability to alter cellular migration, chemotaxis, and mitogenesis. Matrix metalloproteinases (MMPs) degrade extracellular matrix components under normal circumstances and in disease processes. Of the 20 MMPs identified, MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, and MMP-12 have been implicated in regulating the matrikines Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly (elastin peptide) and proline-glycine-proline (PGP). Elastin peptide fragments are generated by elastolytic enzymes and have implications in atherosclerosis, neovascularization, chronic obstructive pulmonary disease, skin disease, as well as tumor invasion and spread. PGP is produced through a multistep pathway that liberates the tripeptide fragment from extracellular collagen. PGP is best described for its role in neutrophil chemotaxis and is implicated in the pathogenesis of corneal ulcers and in chronic lung conditions. In chronic cigarette smoke related lung disease, the PGP pathway can become a self-propagating cycle of inflammation through cigarette-smoke mediated inhibition of leukotriene A4 hydrolase, the enzyme responsible for degrading PGP and halting acute inflammation. This review highlights the roles of MMPs in generating these important matrikines.

© 2015 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

Wells JM, Gaggari A, Blalock JE. MMP generated matrikines. Matrix Biol. 2015 May-Jul;44-46:122-9.

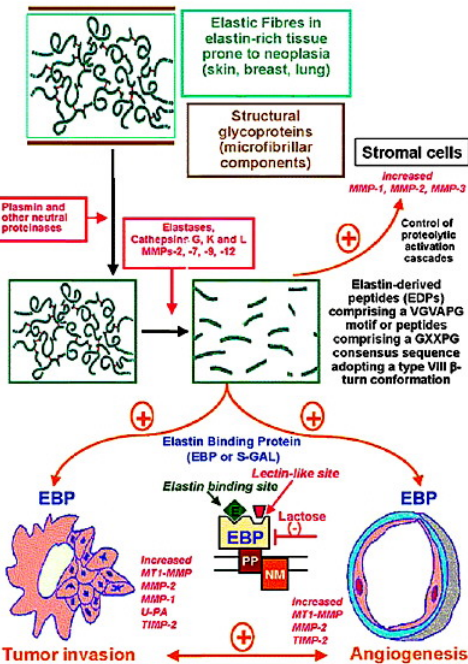
L'azione delle proteasi può rilasciare o semplicemente fare emergere polipeptidi bioattivi ("matrichine")

- 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 **rilasciando** ("shedding") **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).



Nature Reviews | Cancer

IL-6R: recettore per la interleuchina-6; TGF- β : "transforming growth factor- β "; TNF: "tumour necrosis factor".



Matrichine

- Peptidi biologicamente attivi ottenuti mediante scissione proteolitica dei costituenti della matrice extracellulare.**

Maquart FX, Bellon G, Pasco S, Monboisse JC. **Matrines in the regulation of extracellular matrix degradation.** Biochimie. 2005 Mar-Apr;87(3-4):353-60.

Matrichine – [1]

- ✚ Alcuni **componenti della MEC** possono essere **rilasciati** sotto forma di **matrichine** che hanno **attività biologica** indipendente dai 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**.

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

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**.
- ✚ Perché 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.

Matricine e matricriptine – [1]

✚ La **proteolisi controllata della MEC** rilascia **frammenti bioattivi** o **smaschera siti criptici** che giocano ruoli chiave nel controllo di diversi processi fisiopatologici che includono:

- ✚ Angiogenesi
- ✚ Rimodellamento dei tessuti
- ✚ Guarigione delle ferite
- ✚ Infiammazione
- ✚ Crescita tumorale
- ✚ Metastatzizzazione

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

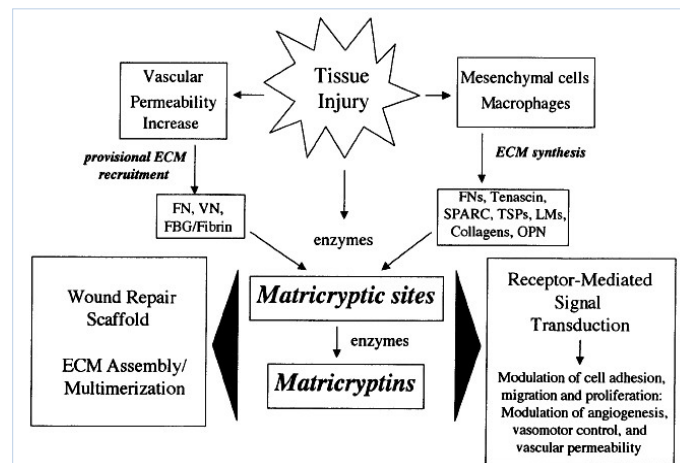
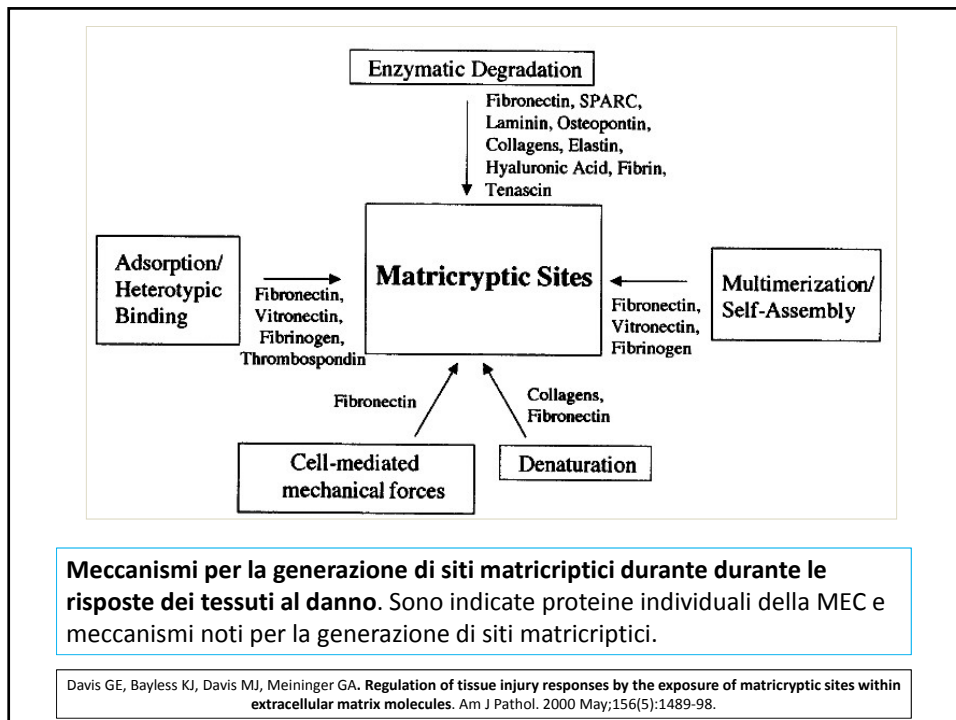


Diagramma schematico che illustra come il **danno tissutale** porti alla generazione di **siti matricriptici** e di **matricriptine** che partecipano alla **regolazione di processi chiave delle risposte dei tessuti al danno**. FN: fibronectina; VN: vitronectina; FBG: fibrinogeno; OPN: osteopontina; LM: laminina; TSP: trombospondina.

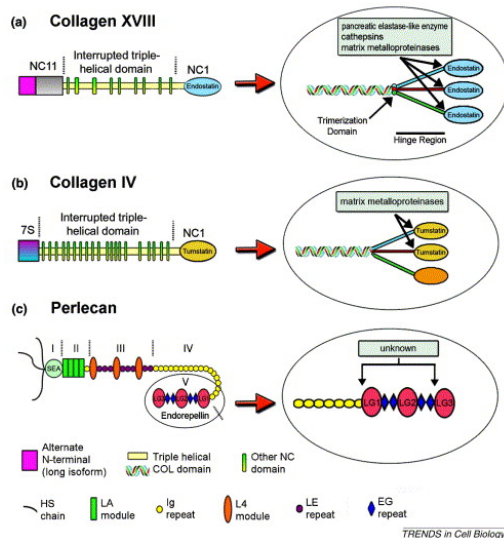
Davis GE, Bayless KJ, Davis MJ, Meininger GA. **Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules**. Am J Pathol. 2000 May;156(5):1489-98.



Matrichine - [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**.

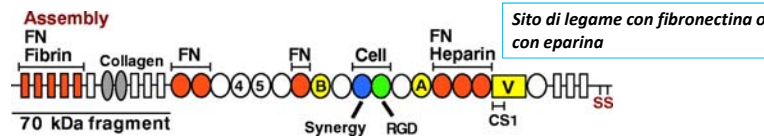


Bix G, Iozzo RV. Matrix revolutions: "tails" of basement-membrane components with angiostatic functions. Trends Cell Biol. 15: 52-60, 2005.

Seminario

Siti «matricriptici nelle molecole della MEC – [1]

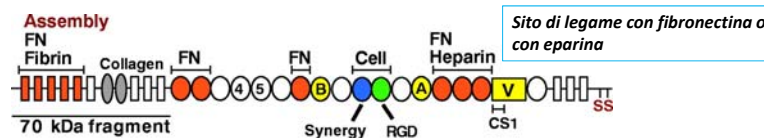
Fibronectina	Dominio cellulare	Migrazione stimolata da RGD Inibisce il differenziamento	Denaturazione (urea), adsorbimento (legame in superficie), frammentazione proteolitica (matrilisina)
	N-terminale della fibrina-1	Differenziamento	Frammentazione proteolitica (stromalisina, collagenasi, MMP-2)
	C-terminale 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)



Seminario

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	



Seminario

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 $\alpha 1$, 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 $\alpha 1$	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**, **multimerizzazione 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.

PER ESAME

Meccanismo di 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-tumourogenic
	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. *continued*

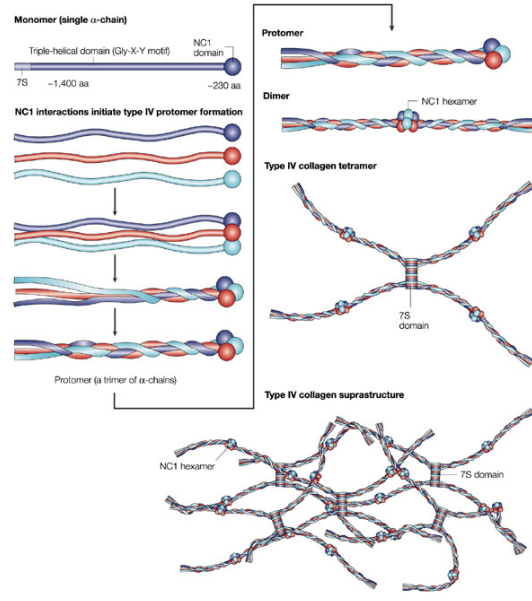
Fibronectin	Fragments P1 P2 P3 P4 P5	Induces expression of MMP-1 (fibroblast) Induces expression of MMP-13 (chondrocytes) Increase MMP9, 12, IL-1, IL-6, TNFa (macrophage) Chemotactic for fibroblasts, antiproliferative for bovine VEC, Schwann cells
Elastin	Fragments	Th1 cell differentiation with PHA Desensitise to LPS stimulus Mouse smoke injury – monocyte recruitment Facilitates autoactivation of MMP2 Anti-metastatic
Perlecan	Endorepellin	Modulates angiogenesis
Tenascin	TNIIIA2 P12 P13 P14 P15 P16	Anti-angiogenic, anti-migratory (HDMVEC) Cytotoxic (monocytes), maturation of lymphomononuclear cells, induce expression of IL-1a, IL-1b, TNFa (lymphomononuclear cells)

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

**Proteasi
che
degradano
la MEC
rilasciando
matricine**

Burgess JK,
Weckmann M.
**Matrines 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 $\alpha v\beta 3$ -dependent ligand. Abolishes integrin $\alpha 2\beta 1$ binding
Collagen IV	Serine and metalloproteinases MMP9	Exposes cryptic sites which promote binding to $\alpha v\beta 3$ 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 XVIII to release active endostatin Cleavage of human collagen XVIII 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 XVIII to release active endostatin (4–20 times less active than cathepsin L and elastase in vitro) Cleavage of human collagen XVIII 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



Matricine derivate dai

COLLAGENI

Nature Reviews | Cancer

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.

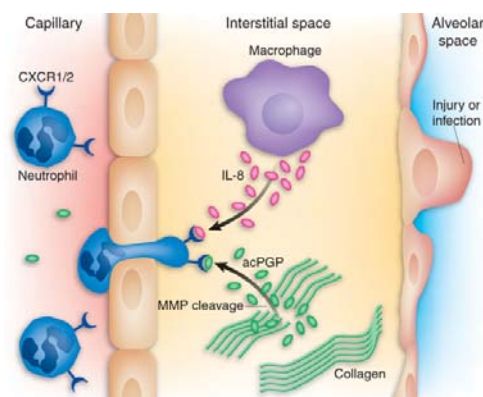
Table 3. Major matricryptins of collagens.

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.

Matricine derivate dal collagene fibrillare di tipo I

✚ Potenti proprietà chemotattiche verso i granulociti.



The matrix degrades, neutrophils invade

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

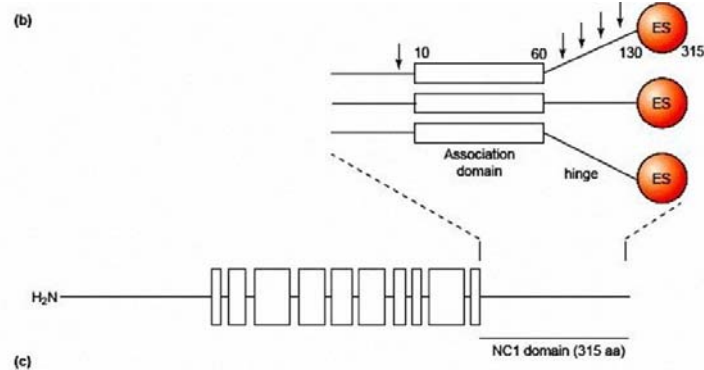
Seminario

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.

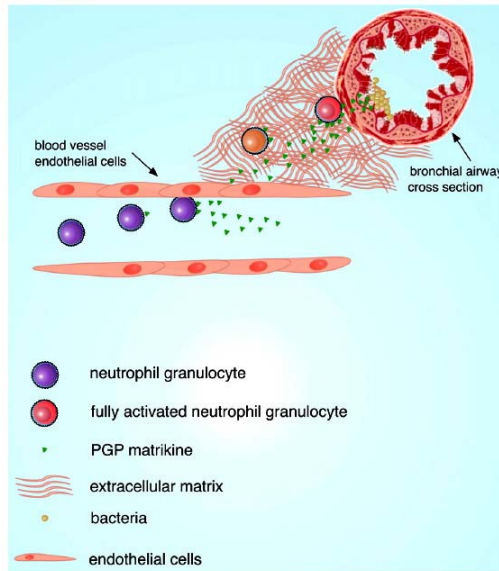
Siti critici nel collagene XVIII



Il **collagene XVIII** è caratterizzato da dieci domini a tripla elica (rettangoli vuoti), separati da tre regioni non a tripla elica (linee sottili). Il dominio C-terminale non collagenosi NC1 è evidenziato. Questo dominio consiste di tre segmenti: un dominio di associazione (coinvolto nell'autoassemblaggio di omotrimeri di collXVIII). Una regione di perno centrale sensibile alle proteasi e il modulo di endostatina (ES). Le frecce indicano i siti di proteolisi coinvolti nel rilascio dei frammenti di NC1 e di endostatina, e i numeri si riferiscono alla sequenza approssimativa NC1.

Schenk S, Quaranta V. **Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix**. Trends Cell Biol. 2003 Jul;13(7):366-75.

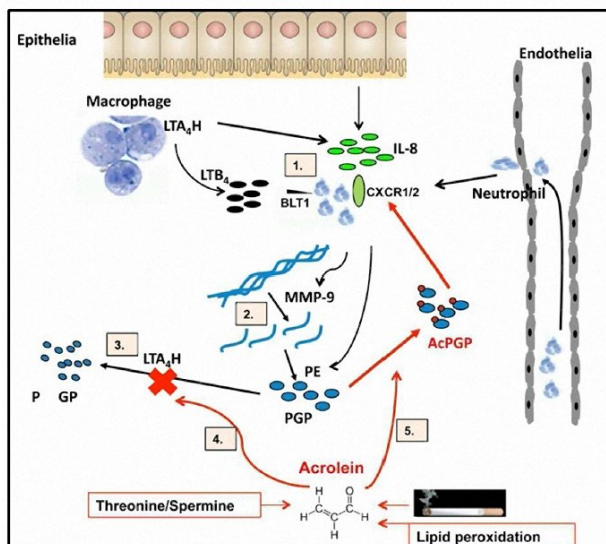
Recruitment of neutrophils by collagen degradation products in invasive bacterial infection.



Bacteria (yellow conglomerate) **release collagenases**, which in turn allow for an invasive infection, but at the same time **releases PGP fragments** (green triangular shapes) from collagen I of the basement membrane. **PGP in turn recruits circulating neutrophils**, which follow the PGP gradient by leaving the blood vessel and migrating through the interstitial space. This may lead to an **additional exposure to other matrikines** from this ECM and may change the programming of the neutrophil (indicated by orange colour). The neutrophil reaches the source of PGP and is likely to be exposed to bacterial endotoxins and proteins initiating secretion of defensive molecules and phagocytosis, again changing its programming (indicated as a red cell). This leads to the control of the bacterial invasive front, and promotes clearance of the bacteria.

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

Central role of MMP-derived PGP in smoking-induced pulmonary inflammation



Vedi didascalìa

PGP: proline-glycine-proline

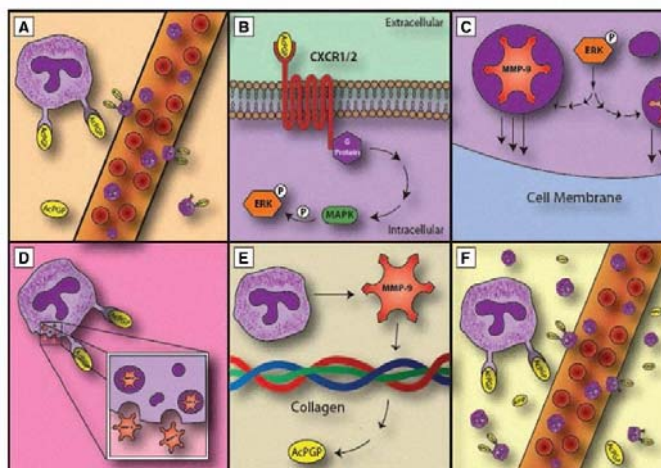
Wells JM, Gaggari A, Blalock JE. **MMP generated matrikines**. Matrix Biol. 2015 May-Jul;44-46:122-9.

Didascalía Figura Wells

Fig. 1. Central role of MMP-derived PGP in smoking-induced pulmonary inflammation. (1) In response to infection or injury, resident cells within the lung release chemoattractants that promote neutrophil recruitment from the vasculature into the tissue. Epithelial cells and alveolar macrophages, for example, release IL-8 that binds to CXCR1/2 on the neutrophil surface and promote recruitment. The intracellular activity of LTA4H within leukocytes can generate the lipid mediator LTB4 that promotes neutrophil recruitment by binding to LTB4 receptor (BLT1). (2) Neutrophils release an array of proteases within the lung tissue—the coordinated action of matrix metalloproteinases (MMPs; especially MMP-1, -8, and -9) and prolyl endopeptidase (PE) released from the neutrophil target extracellular matrix collagen, releasing the neutrophil chemoattractant, proline-glycine-proline (PGP). PGP binds CXCR1/2 on the neutrophil and sustains neutrophil recruitment. (3) To terminate PGP-directed neutrophilic inflammation, LTA4H is released into an extracellular environment to degrade the peptide. (4) Acrolein, derived from cigarette smoke or physiologically during inflammation (lipid peroxidation, metabolism of threonine or spermine), can inhibit LTA4H-mediated degradation of PGP, allowing the peptide to accumulate and maintain neutrophilic inflammation. (5) Acrolein (and other components of cigarette smoke) can also chemically acetylate PGP on its N terminus, completely protecting the peptide from LTA4H-mediated degradation, and thus facilitating neutrophil recruitment. AcPGP = acetylated PGP; PE = prolyl endopeptidase. Reproduced with permission [73].

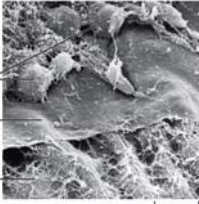
Wells JM, Gaggari A, Blalock JE. MMP generated matrikines. Matrix Biol. 2015 May-Jul;44-46:122-9.

A model of persistent matrikine production and neutrophilic inflammation



Wells JM, Gaggari A, Blalock JE. MMP generated matrikines. Matrix Biol. 2015 May-Jul;44-46:122-9.

During chronic PMN inflammation, collagen is hydrolyzed and releases AcPGP causing ongoing neutrophilic influx (A). In addition to causing neutrophilic influx, AcPGP ligation of CXCR1 and CXCR2 leads to intracellular ERK phosphorylation and activation (B) and degranulation of MMP-9 from tertiary granules of neutrophils (C and D). This MMP-9 acts on exposed collagen leading to AcPGP (acetylated PGP) generation (E) and a feed-forward inflammatory response on neutrophils (F).



epithelial cells
basal lamina
collagen

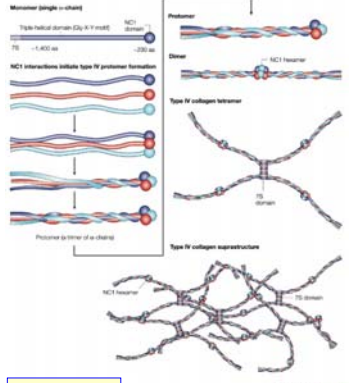
10 μm

Matricine derivate dal collagene IV (non fibrillare)

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

- ✚ Terminale NC1 della catena $\alpha 1$: **Arresten** – anti-angiogenico.
- ✚ Terminale NC1 della catena $\alpha 2$: **Canstatina**.
- ✚ Terminale NC1 della catena $\alpha 3$: **Tumstatina**.

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



Seminarario

Seminarario

Matriciptine 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**

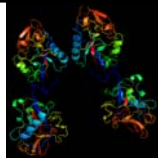
✚ La degradazione della catena $\alpha 4$ del coll IV porta a:

- 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.

Matricine 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**.

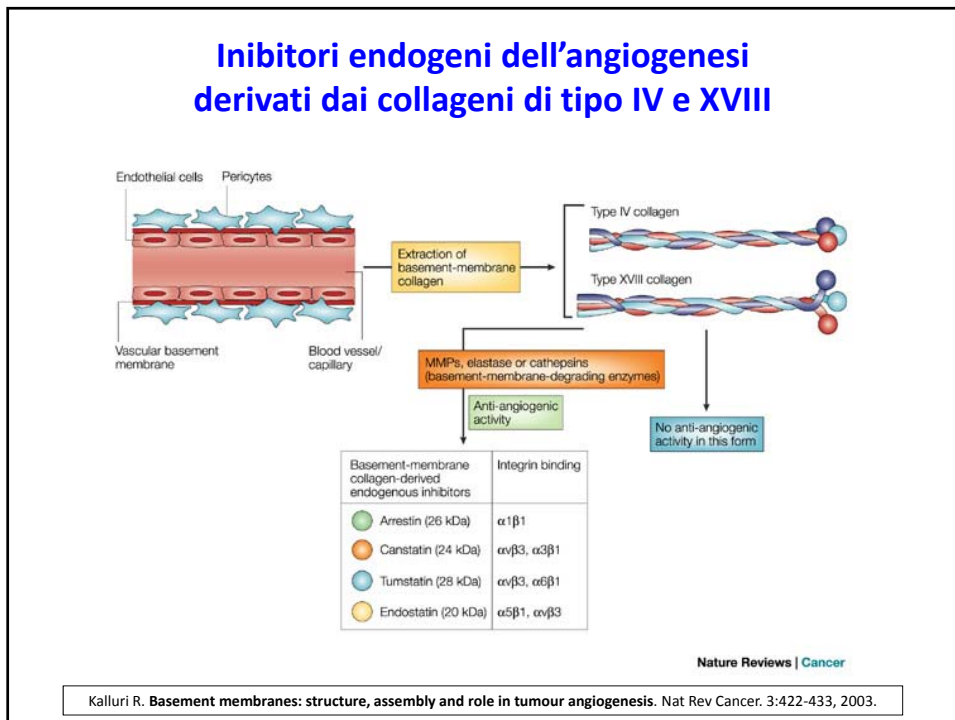
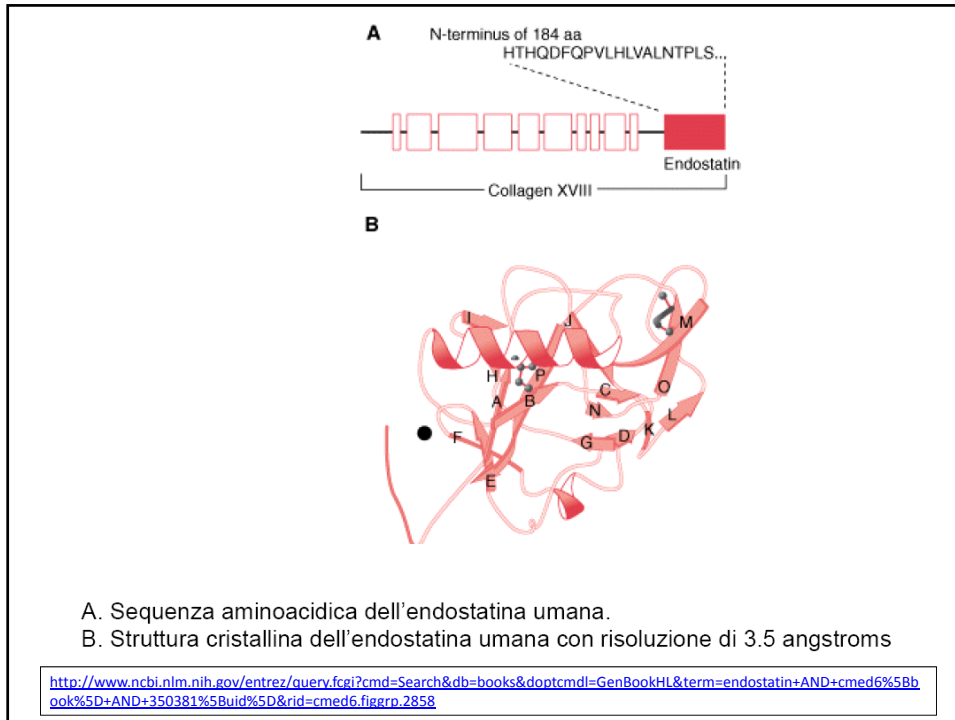
Burgess JK, Weckmann M. **Matrikines and the lungs**. Pharmacol Ther. 134:317-37, 2012.



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.

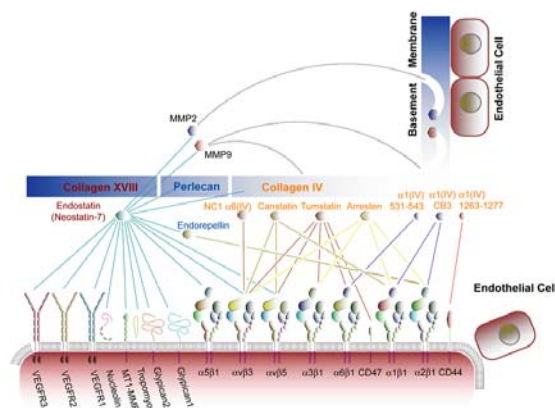
http://en.wikipedia.org/wiki/Collagen,_type_XVIII,_alpha_1



Frammenti proteolitici derivati dal collagene				
Isoforma del collagene	catena α	Frammento NC1 attivo	MW (kDa)	Funzione
IV	$\alpha 1$	Arresten	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

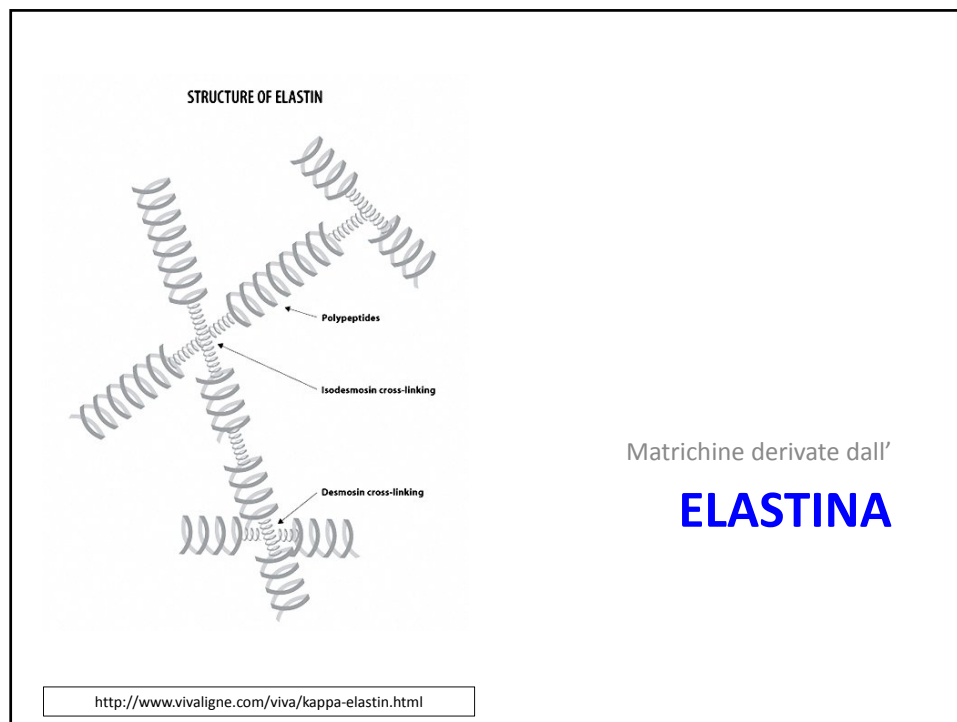
Matricriptine e siti critici che regolano l'angiogenesi



Matricriptine e siti matricriptici dei collageni IV, XV, XVIII e del 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.



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**

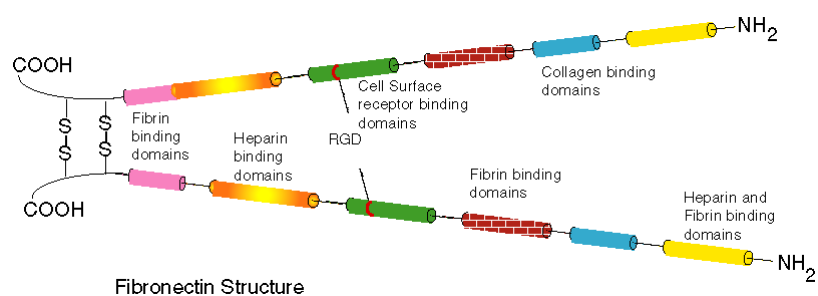
Seminario

Matrichine derivate dall'elastina – [1]

Fra i **peptidi derivati dall'idrolisi dell'elastina**, alcuni sono particolarmente coinvolti nella **regolazione cellulare**:

- ◆ **VGPGV**, pentapeptide idrofobico:
 - ◆ stimola la proliferazione della muscolatura liscia e diminuisce la loro produzione di elastina
- ◆ **VGVPAG** (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]



Matrichine derivate dalla

FIBRONECTINA

<https://beyondthedish.files.wordpress.com/2013/11/fibronectin.gif>

Seminario

Matrichine 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 neutrofili.
- ✚ 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]

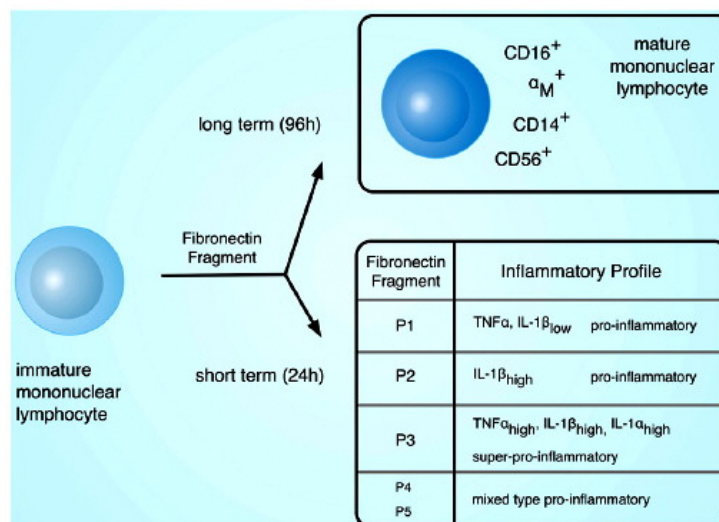
- ✚ Cinque frammenti di FN (P1-P5) che coprono l'intera molecola, incubati con leucociti mononucleari di sangue periferico, provocarono aumentata espressione di CD11b (integrina α_M), CD14, CD16 (recettore per il Fc a bassa affinità) e CD56 (N-CAM) in modo simile.
 - Probabilmente inducono la maturazione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

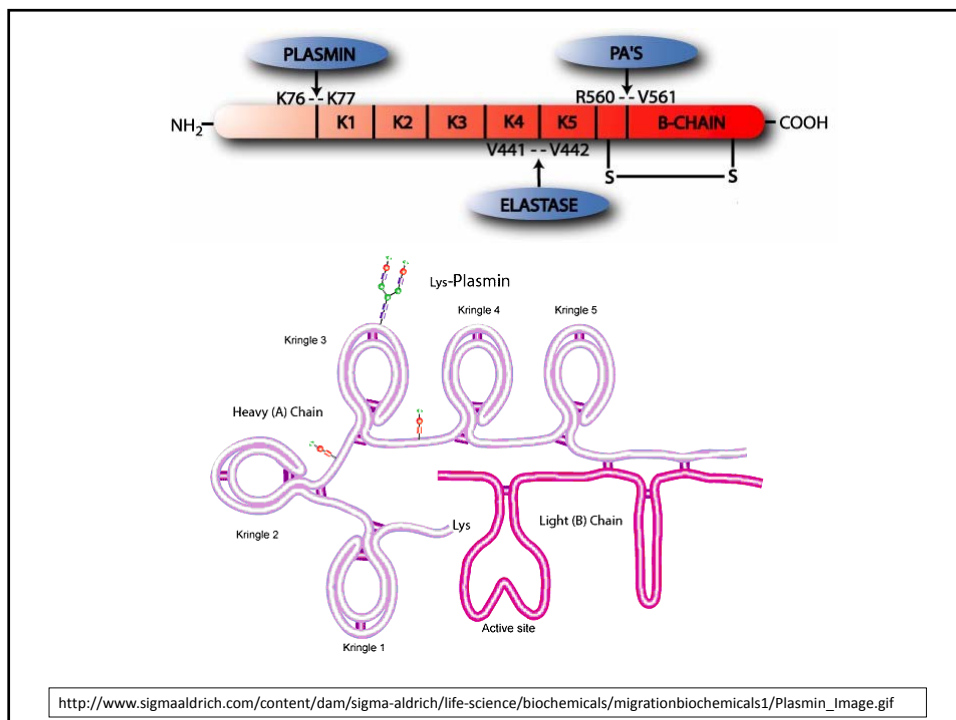
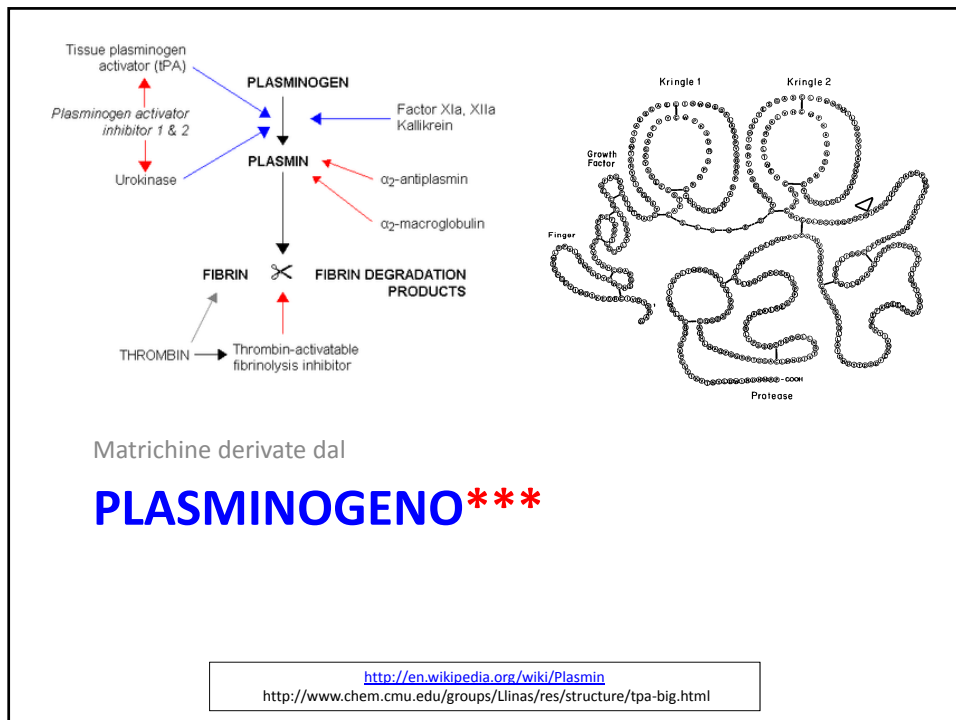
Burgess JK, Weckmann M. **Matrikines and the lungs**. Pharmacol Ther. 134:317-37, 2012.

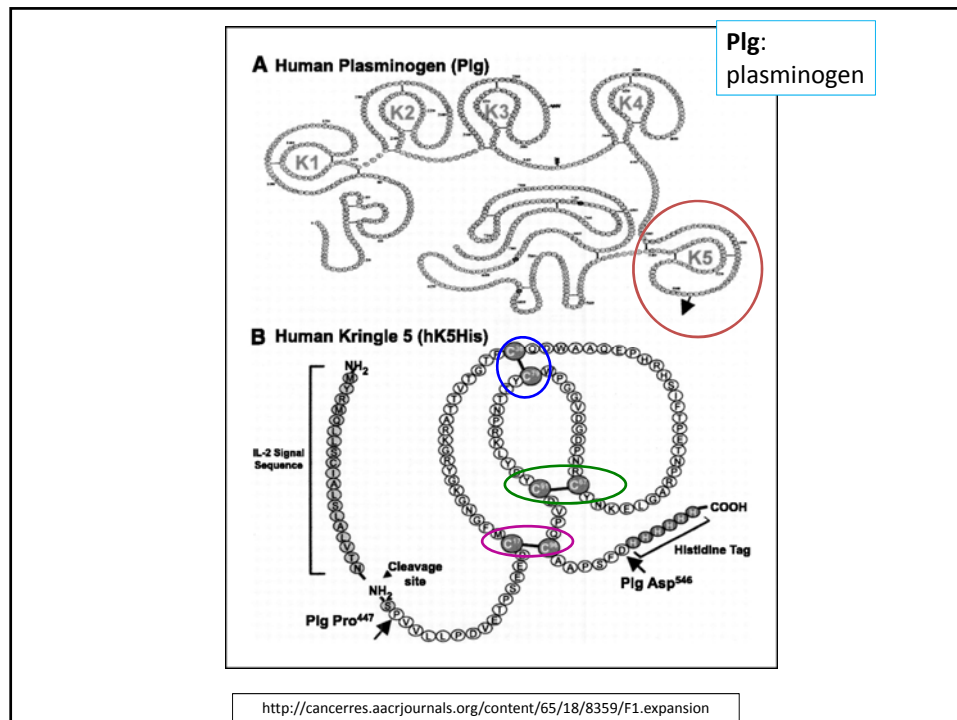
Seminario

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

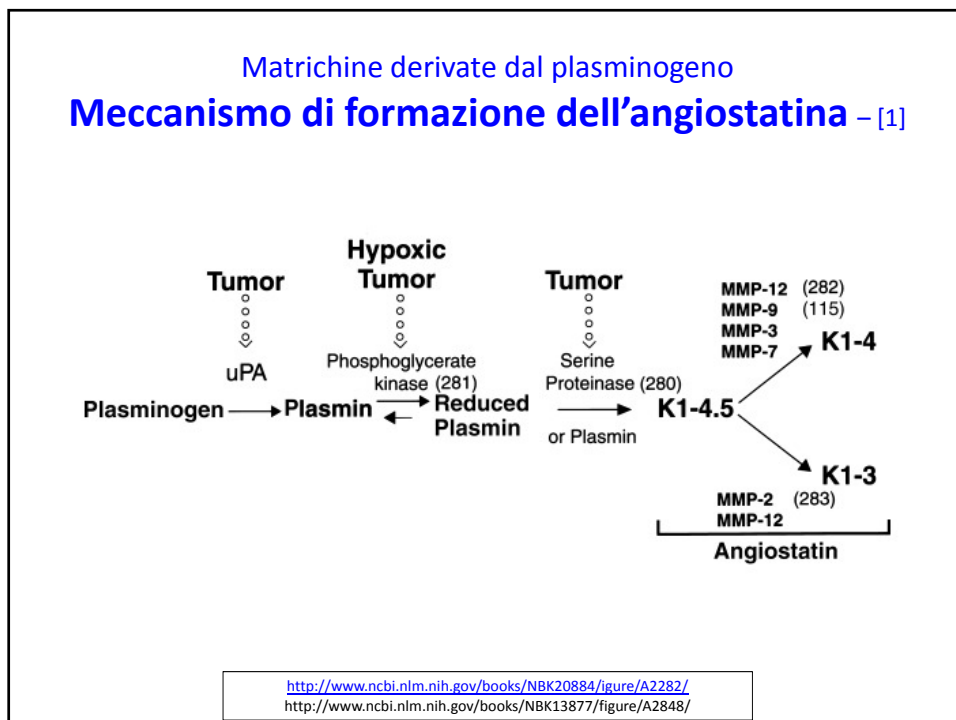
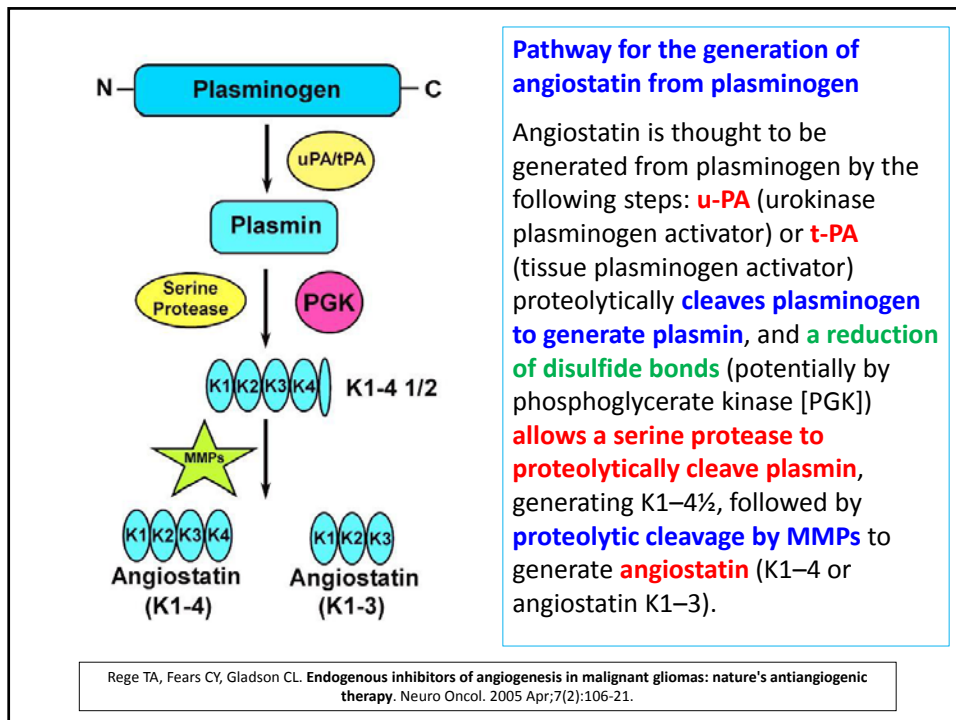




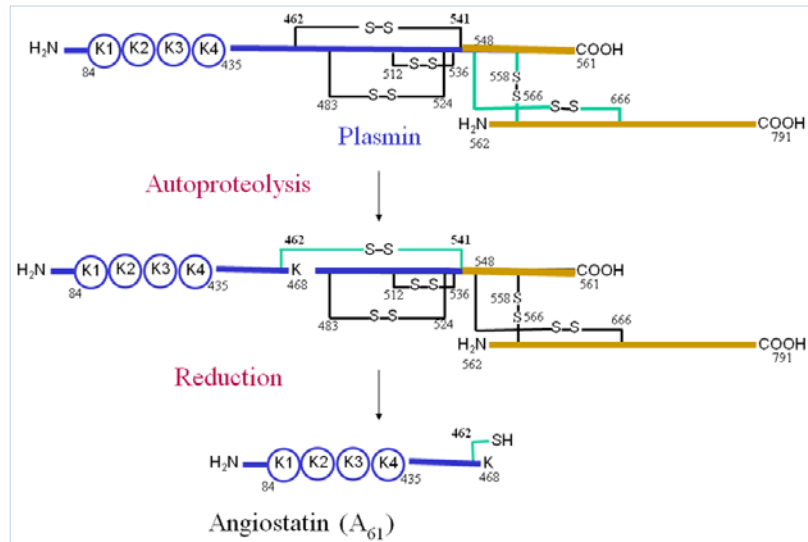
Angiostatina*** - [1]

- ✚ 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 sé, 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.



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 scatena 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 cellulari 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 metalloproteinase della matrice per produrre sia i kringle 1–4 che 1–3.

Curiosamente, la **plasmina reduttasi** è risultata essere l'enzima glicolitico **fosfoglicerato chinasi** (PGK1; ATP:3-fosfo-D-glicerato 1-fosfotrasferasi, EC 2.7.2.3), che quindi è una proteina multifunzionale.

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 di carcinoma di «Lewis lung» inoculate sub-cutaneamente, 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 reductasi.
- ✚ **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, Condrón R, Hogg PJ. **Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase.** Nature. 2000 Dec 14;408(6814):869-73.

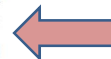
Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase

NATURE | VOL 408 | 14 DECEMBER 2000 |

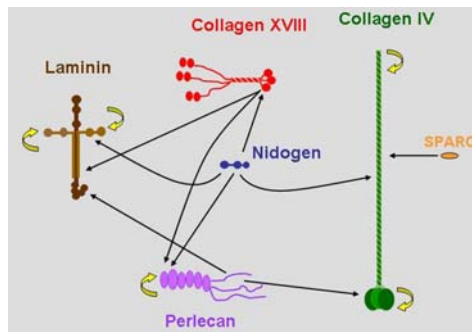
Angelina J. Lay¹, Xing-Mai Jiang¹, Oliver Kisker¹, Evelyn Flynn¹, Anne Underwood², Rosemary Condrón³ & Philip J. Hogg¹

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



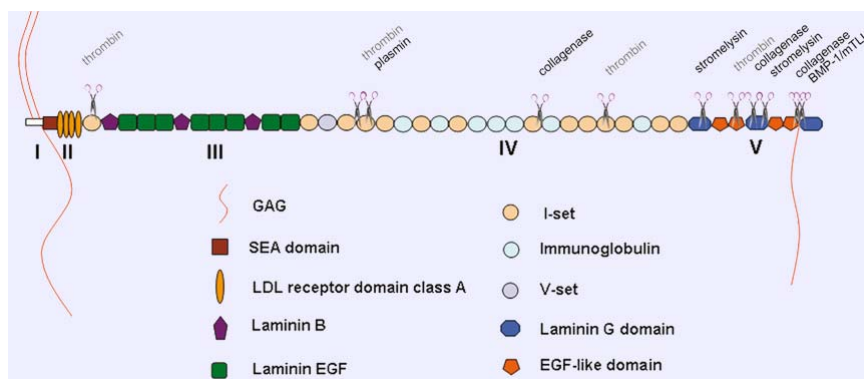
Matricine derivate dal

PERLECANO

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

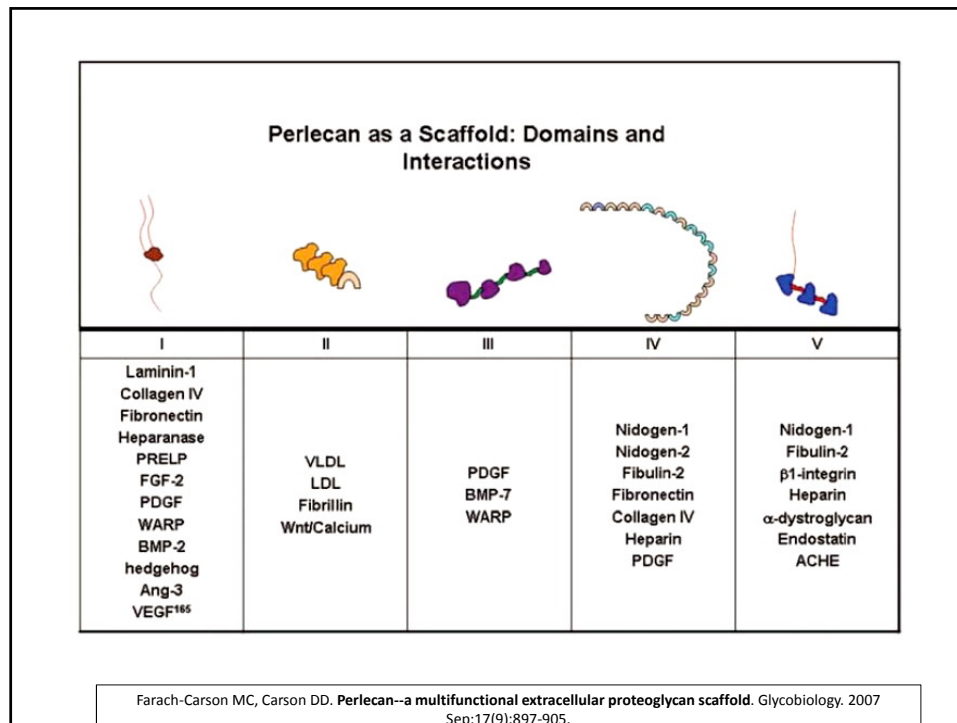
The matrix revisited: a surprise from the tail of perlecan

- 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.

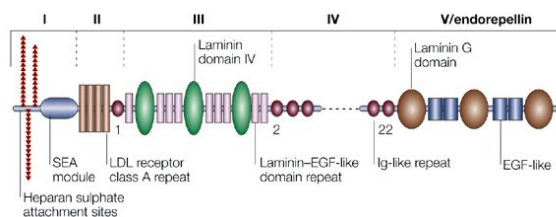
<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/Images/HSPG2Fig1.jpg>



Seminario

Matricine derivate dal perlecano

- ✚ Il **dominio V** del perlecano – **endorepellina** (Mongiat *et al.*) è inibitorio per la migrazione di cellule “human umbilical vein endothelial cells” (HUVEC) verso un gradiente di VEGF 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 *de novo* indotta.
- ✚ L’endorepellina è tuttavia in grado di legarsi molto efficacemente all’endostatina, inibendo le sue proprietà antiangiogeniche.

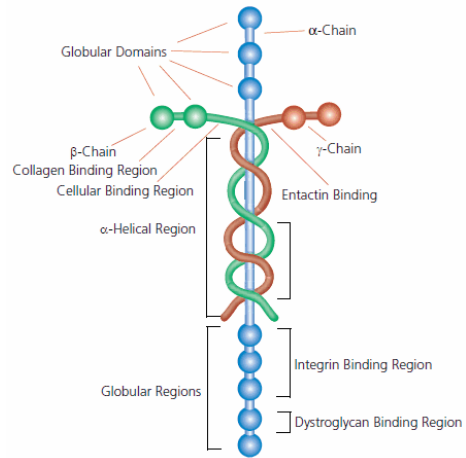


Burgess JK, Weckmann M. **Matrines and the lungs**. Pharmacol Ther. 134:317-37, 2012.
Iozzo RV. **Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling**. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Aug;6(8):646-56.

Seminario

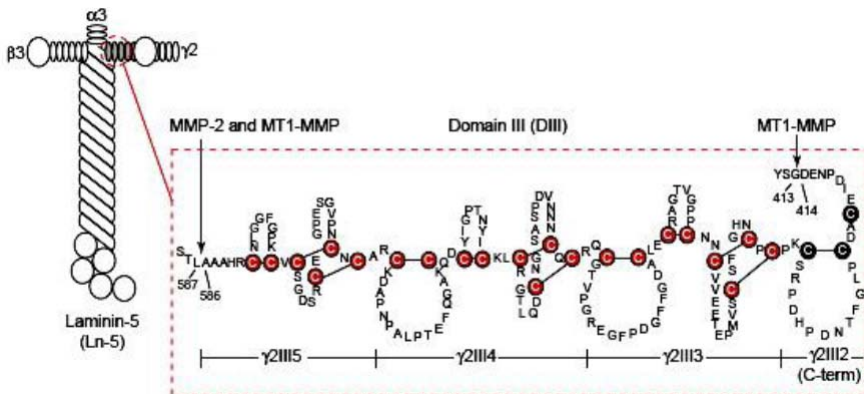
Matricine derivate dalla

LAMININA



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

(c)



Int. J. Dev. Biol. 55: 455-465

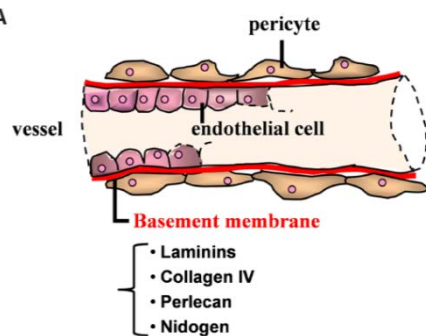
Role of laminins in physiological and pathological angiogenesis

PATRICIA SIMON-ASSMANN*, GERTRAUD OREND, ELMINA MAMMADOVA-BACH, CAROLINE SPENLÉ and OLIVIER LEFEBVRE

2011

ABSTRACT The interaction of endothelial cells and pericytes with their microenvironment, in particular with the basement membrane, plays a crucial role during vasculogenesis and angiogenesis. In this review, we focus on laminins, a major family of extracellular matrix molecules present in basement membranes. Laminins interact with cell surface receptors to trigger intracellular signalling that shapes cell behaviour. Each laminin exerts a distinct effect on endothelial cells and pericytes which largely depends on the adhesion receptor profile expressed on the cell surface. Moreover, proteolytic cleavage of laminins may affect their role in angiogenesis. We report *in vitro* and *in vivo* data on laminin-111, -411, -511 and -332 and their associated signalling that regulates cell behaviour and angiogenesis under normal and pathological conditions. We also discuss how tissue-specific deletion of laminin genes affects the behaviour of endothelial cells and pericytes and thus angiogenesis. Finally, we examine how coculture systems with defined laminin expression contribute to our understanding of the roles of laminins in normal and pathological vasculogenesis and angiogenesis.

A

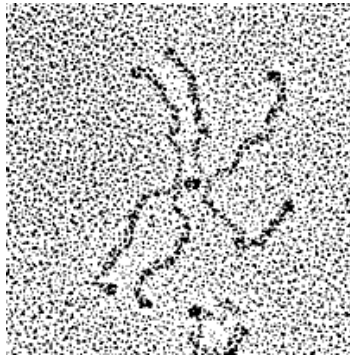


Laminin isoforms

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.

Seminario



Matrichine 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

Hyaluronic Acid

Matricine 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

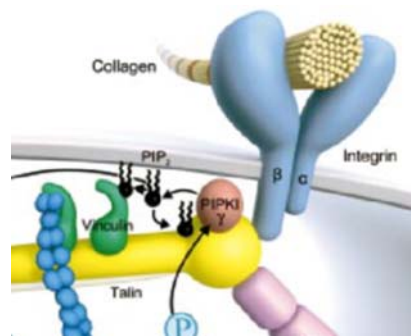
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis/carbohydrate-analysis-iii.printerview.html>

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 solfatati 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.



Matrichine

RECETTORI

<http://www.uib.no/rg/matrix/nyheter/2009/05/integrins-during-evolution>

Recettori per le matrichine

- ✚ 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 $\alpha 1$ Col IV $\alpha 2$ Col IV $\alpha 3$	Arresten Canstatin Tumstatin	aa1-113 of the molecule/ $\alpha 1\beta 1$ $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ 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 FCNINNVCFNFSRNDYSYWL 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 KLGVRPSQGGAPR IKGLKPGVVYEGQL IISCHPVGTDDEPL QIGHIPREDVDYHL LVRYSVPKNEEDVA
Elastin	Fragments	VG VAPG/GXXPG galectin-3, $\alpha v\beta 3$, elastin-binding protein
Perlecan	Endorepillin	$\alpha 2\beta 1$, VEGFR-2
Tenascin	TNIIIA2 P12 P13 P14 P15 P16	$\alpha 8\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 6$ RSTDLPLKAATHYITIRGV IGNLKPDTTEYEVSL RIKYAPISGGDHAE LLWKTPLAKFDRYR QGYRTPVLSAEAST RGYRTPVLSAEAST

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