

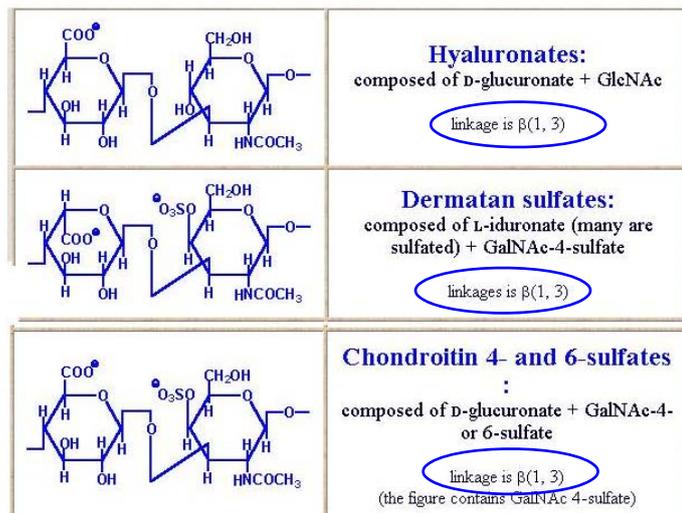
Glicosaminoglicani, GAGs ^{-[1]}

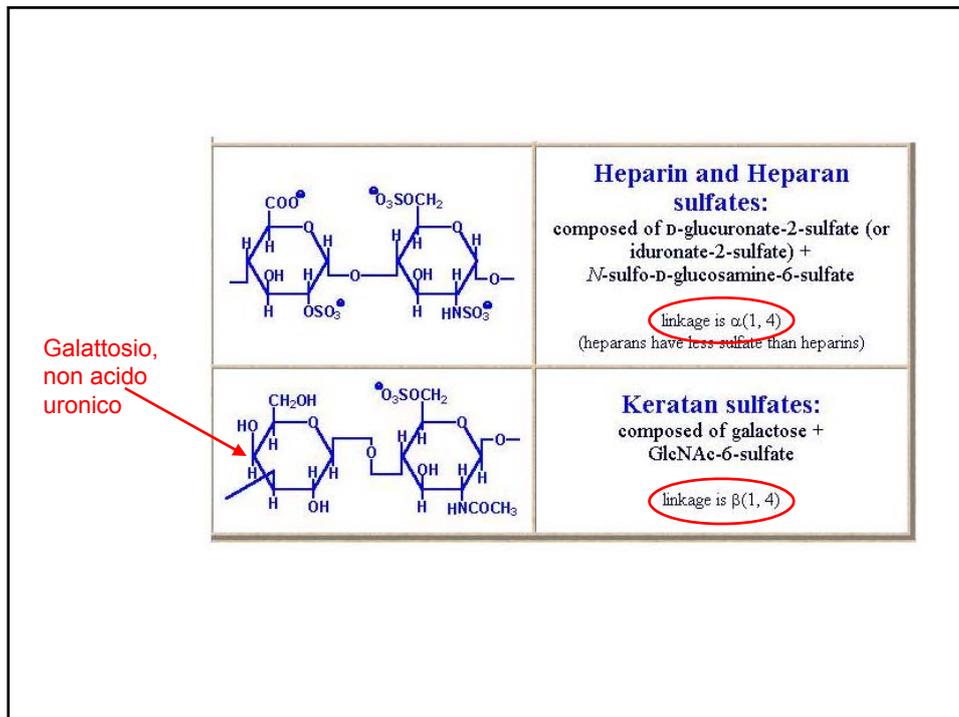
- ✚ Classe molto eterogenea di macromolecole glucidiche di grande importanza biologica.
- ✚ Sono polimeri derivati da zuccheri semplici tra i quali i più importanti sono gli **acidi uronici** [es. **acido D-glucuronico** (in cui la funzione alcolica in posizione C2 è sostituita da una carbossilica) o 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 disaccaridica** specifica, formata 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.



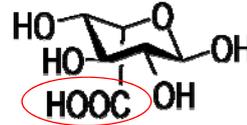


Meccanismi ancora ignoti

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

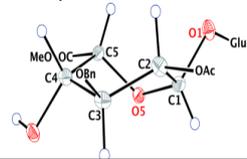
Acidi uronici: glucuronico e iduronico

1. Acido Iduronico (IdoA)



- ✚ 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 esapiranoso.
- ✚ Nella maggior parte degli esapiranosi, solo **una** delle due **conformazioni** tipo "sedia", 1C_4 o 4C_1 , è **stabile**.
- ✚ **L'iduronato è diverso e adotta più di una soluzione di conformazioni**, con un **equilibrio** fra tre isomeri conformazionali a bassa-energia: le forme "sedia" 1C_4 e 4C_1 e un'altra conformazione "skew-boat" 2S_0 . E' perciò considerate **un'unità di zuccheri "elastica"** (Scott & Roswell, 2007).
- ✚ 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).

Skew-boat
conformation 2S_0



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

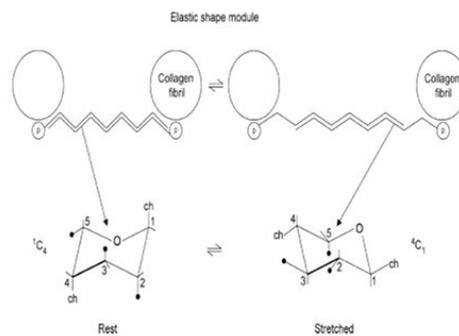


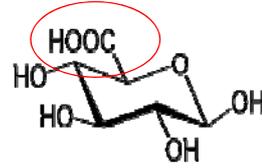
Figure 1. Scheme showing **elastic shape modules at rest (left) and under tensile stress (right)**, not to scale

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 4C_1 chair form in the stretched shape module (right). This occurs at relatively low tension (200 pN, Haverkamp et al. 2005). 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 (Fischer et al. 2002).

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.

Acidi uronici: glucuronico e iduronico

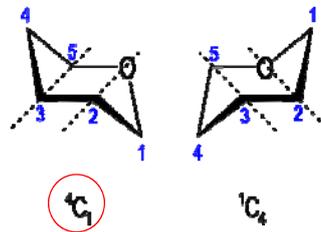
2. Acido glucuronico



Conformazione:

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

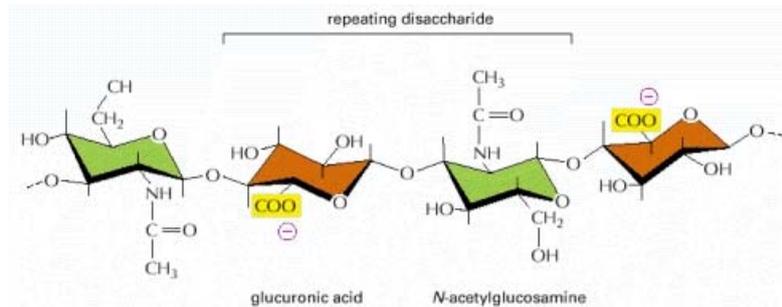
Conformation
tetrahydropyran.svg
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Conformation_tetrahydropyran.svg



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	

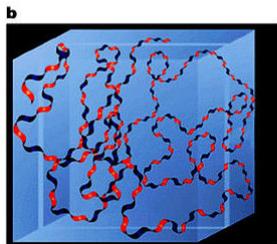
Glicosaminoglicano non legato covalentemente a proteine
Acido ialuronico (ialuronato)



Sequenze ripetute di disaccaride 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**.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26810/figure/A3541/>

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.

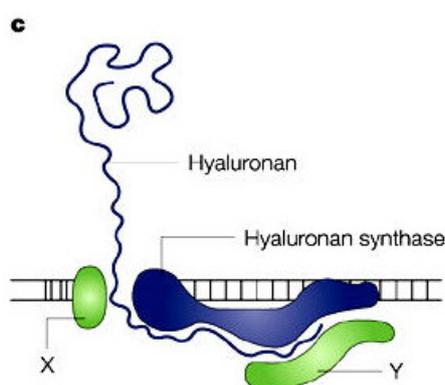
Acido ialuronico, 1

+ Somiglianza con gli altri GAGs:

- Polisaccaride *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 solfatato.**
- 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.



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.

Acido ialuronico, 2

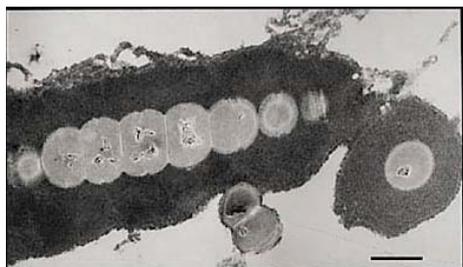
- ✚ E' presente in grandi quantità durante lo **sviluppo embrionale**, e, nell'adulto durante la **fase di guarigione delle ferite** ed in alcuni tessuti specializzati quali la **cartilagine**, l'**umor vitreo** dell'occhio, il **cordone ombelicale** e il **fluido sinoviale**.
- ✚ Nei tessuti è presente 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**.

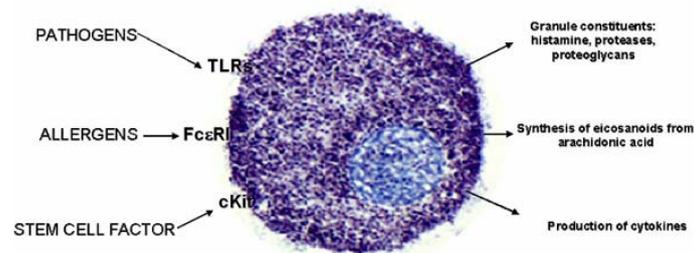
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA06/HA06E.html#II>

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#I>

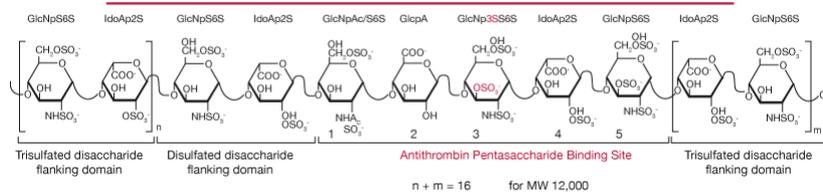
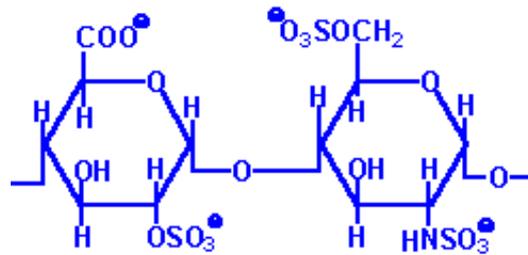


Glicosaminoglicani

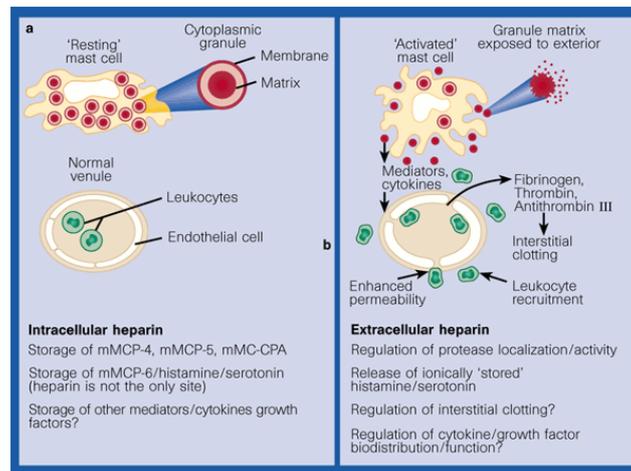
MAST CELLS - EPARINA

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

Eparina



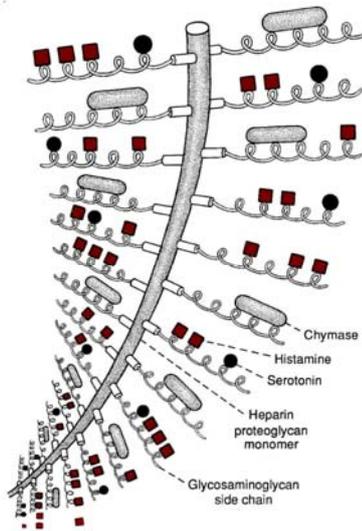
http://www.heparin-science.com/structure_heparin.html



a, Mast cellula e venula (vena sottile) 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



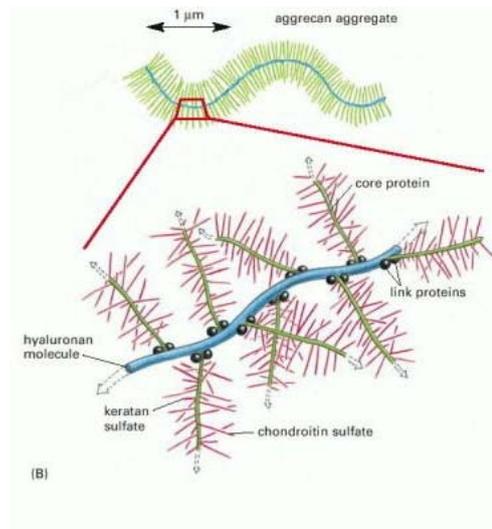
✚ Schema di un proteoglicano ad eparina a forma di piuma nei granuli delle mast cells.

✚ L'asse lungo è una proteina alla quale sono legate covalentemente molecole di glicosaminoglicani (GAGs).

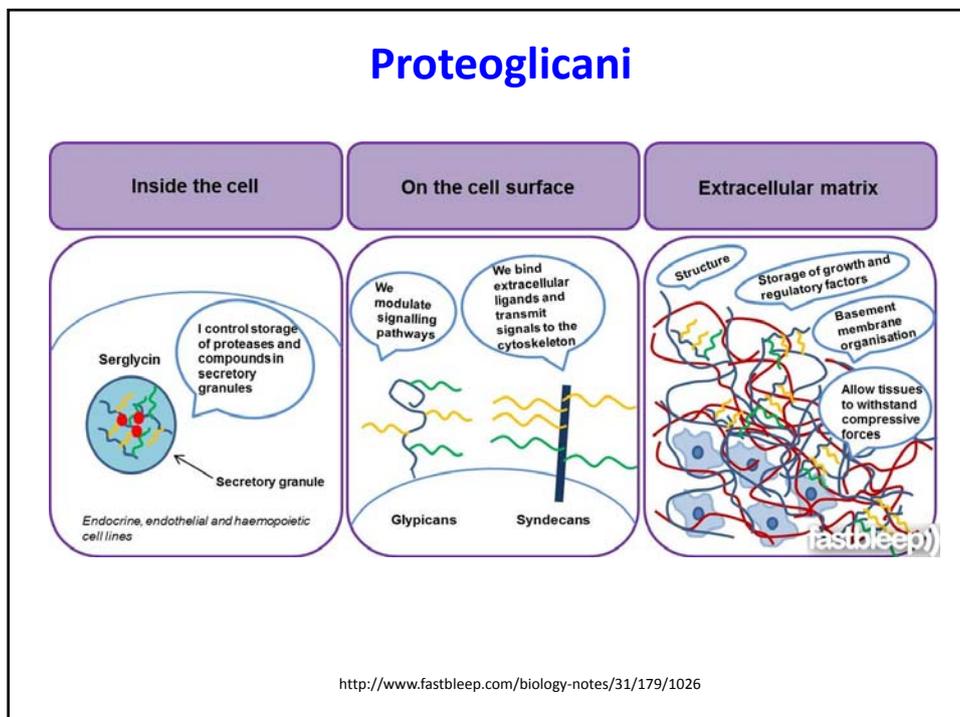
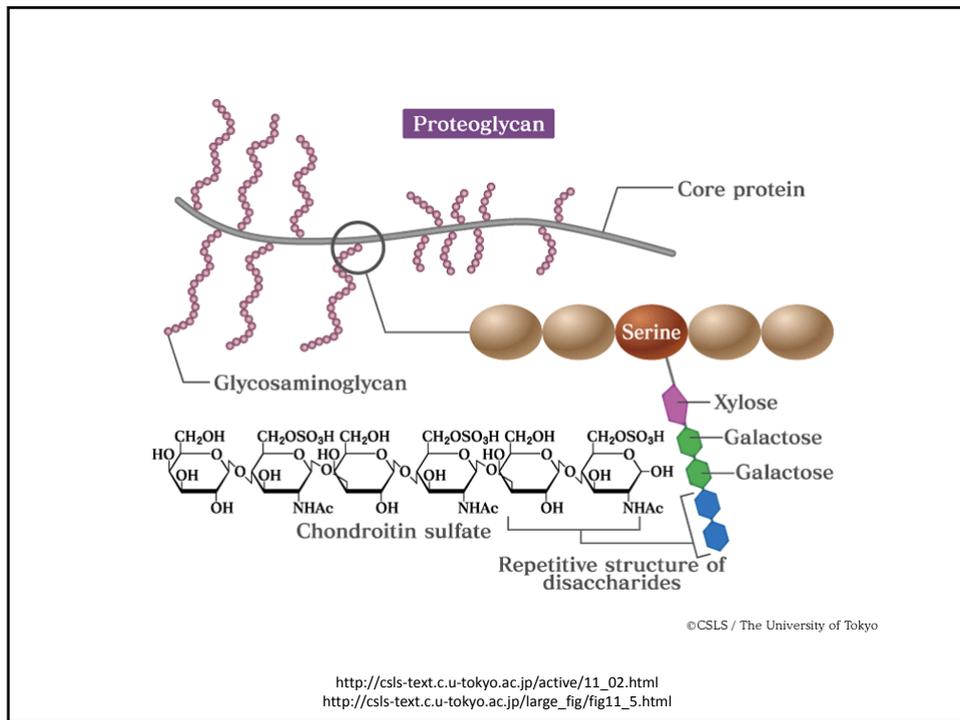
✚ Ai GAGs sono legati **non covalentemente** istamina, serotonina ed **enzimi proteolitici** (chimasi di diversi tipi).

(adattato da Majno & Joris: Cells, Tissues and Disease, Blackwell, 1996)

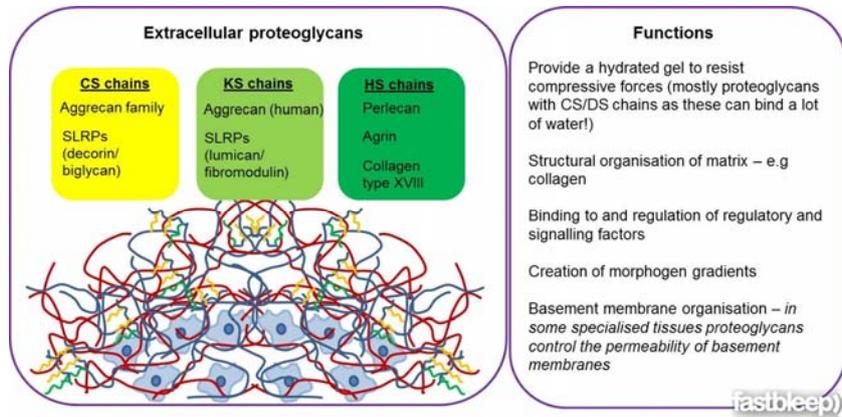
ECM proteoglicani



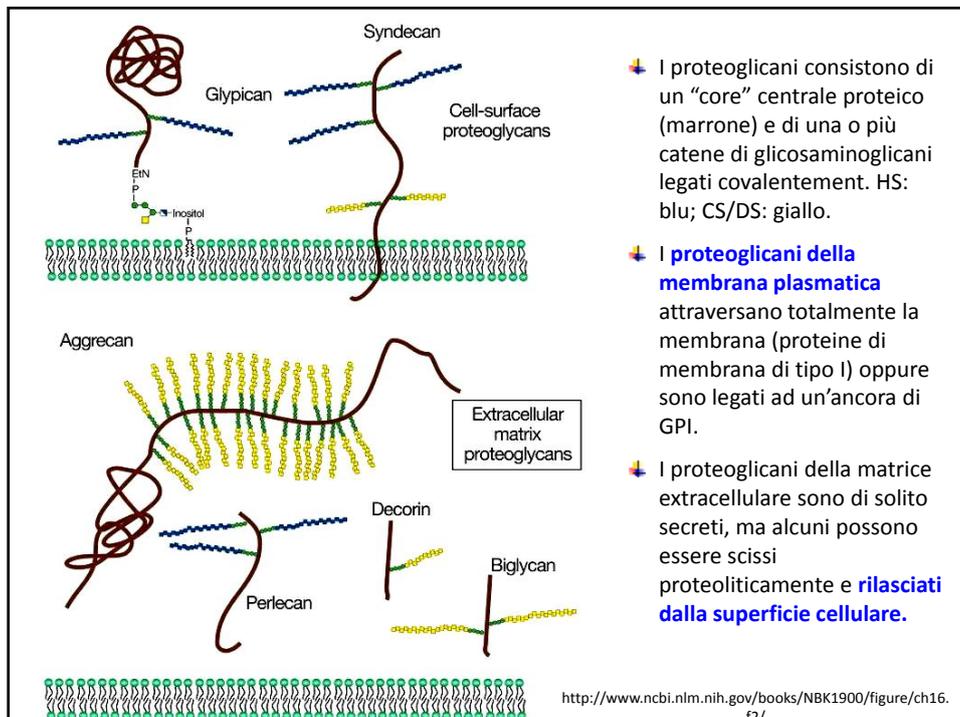
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26810/figure/A3547/?report=objectonly>



Proteoglicani extracellulari



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

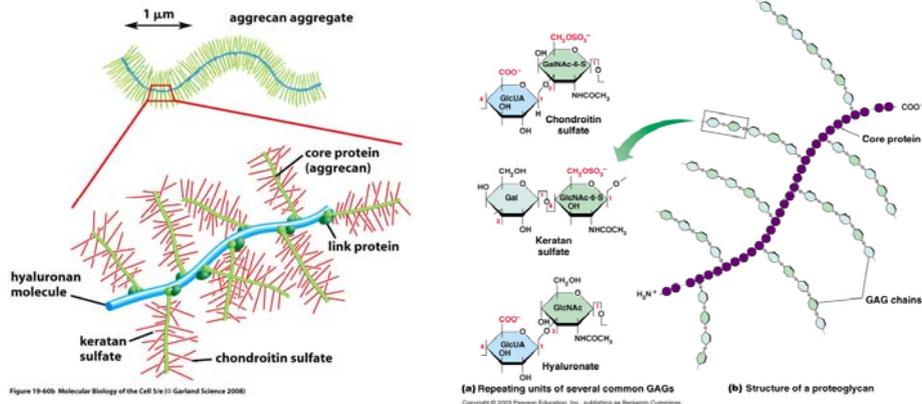


✚ I proteoglicani consistono di un "core" centrale proteico (marrone) e di una o più catene di glicosaminoglicani legati covalentemente. HS: blu; CS/DS: giallo.

✚ 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.

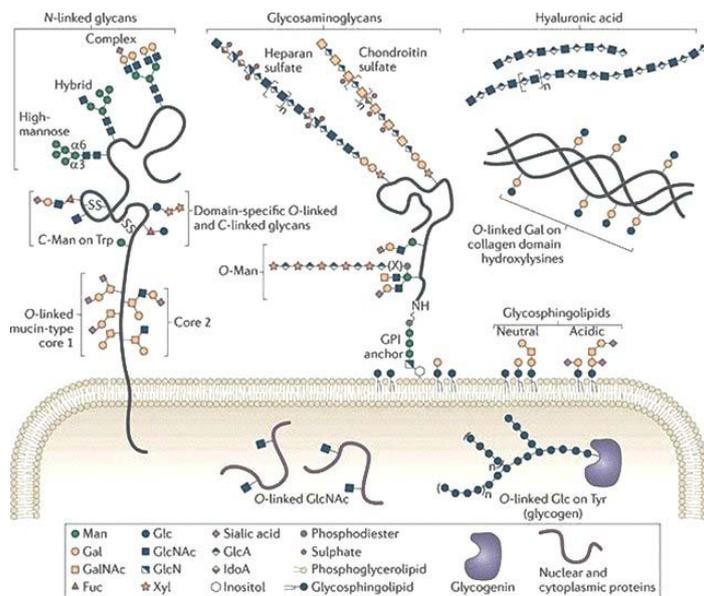
Polisaccaridi e proteoglicani



✚ richiamano l'acqua

✚ riempiono gli spazi

✚ resistono alla compressione meccanica



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012 Jun 22;13(7):448-62.

Struttura del collegamento di un GAG alla proteina in un proteoglicano

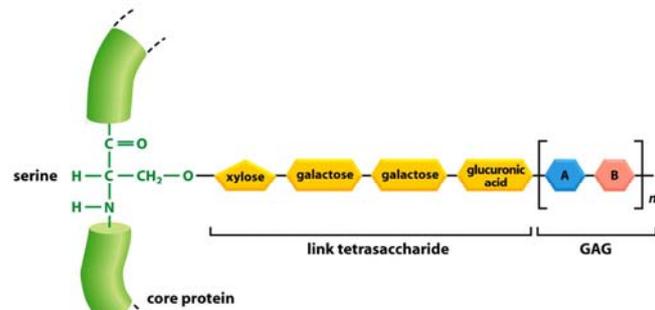


Figure 19-58 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

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 e 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.

Table 1. Extracellular matrix proteoglycans

GENE NAME	COMMON NAME(S)	DOMAINS	GAGs
HSPG2	heparan sulfate proteoglycan 2/perlecan	complex	HS/GS
ASPN	asporin	LRR	maybe none
SGN	biglycan	LRR	CS/DS
DCN	decorin	LRR	CS/DS
FMOD	fibronectin	LRR	KS
NERP1	neratinib	LRR	KS
LN3	lumican	LRR	KS
OMD	osteononulin/osteonon	LRR	KS
PRG4	PRG4/Prytagin (prolyg-and/au-rich repeat protein)	LRR	KS 77
EPYC	epiphysean	LRR	CS/DS
ODK	ostiodyschimesan	LRR	KS
OPTC	opticon	LRR	77
CHAD	chondroitinase	LRR	maybe none
CHADL	chondroitinase-like	LRR	maybe none
ITX	rycacin (probably GPI-linked)	LRR	maybe none
NEFN	nephrin (pseudogene in human)	LRR	maybe none
POCN	podocan	LRR	maybe none
PODNL1	podocan-like 1	LRR	maybe none
ACAN	aggrecan	LINKLECCCP	CS/KS
BCAN	brevican	LINKLECCCP	CS
NCAN	neurocan	LINKLECCCP	CS
VCAN	versican	LINKLECCCP	CS/DS
HAPLN1	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	LNK	
HAPLN2	hyaluronan and proteoglycan link protein 2	LNK	
HAPLN3	hyaluronan and proteoglycan link protein 3	LNK	
HAPLN4	hyaluronan and proteoglycan link protein 4	LNK	
PRG2	proteoglycan 2, bone marrow PG	CLEC	
PRG3	proteoglycan 3	CLEC	
SPOCK1	testican 1	SPARC, Kazal, TY CS/KS	
SPOCK2	testican 2	SPARC, Kazal, TY CS/KS	
SPOCK3	testican 3	SPARC, Kazal, TY CS/KS	
PRGA	proteoglycan ephrulin	SOXK	maybe none
SPGN	serglycin	serglycin	HS/CS
MPG1	microphallid matrix proteoglycan 1	SEA domain	CS
MPG2	microphallid matrix proteoglycan 2	SEA domain	CS
ESM1	endothelial cell-specific molecule 1	IB domain	CS/DS

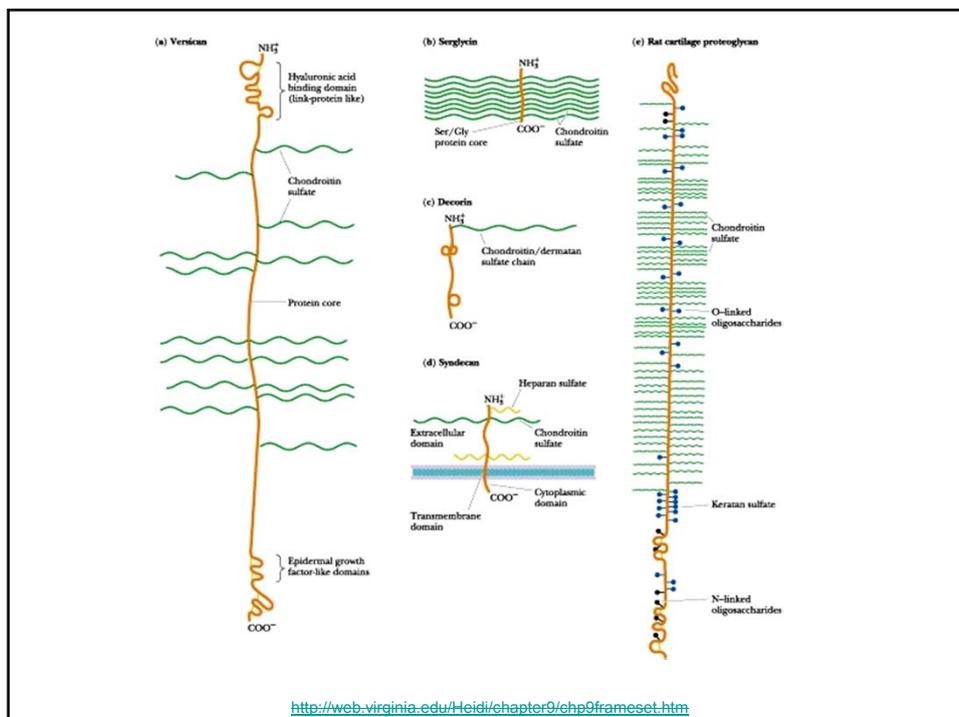
Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Jan 1;4(1):a004903.

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 collagene 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 dall'ialuronato e del 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 fibrillogenesi 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

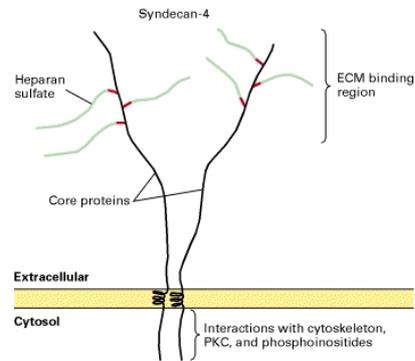
✚ Entrambi i tipi funzionano interagendo con una gran varietà di molecole:

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

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

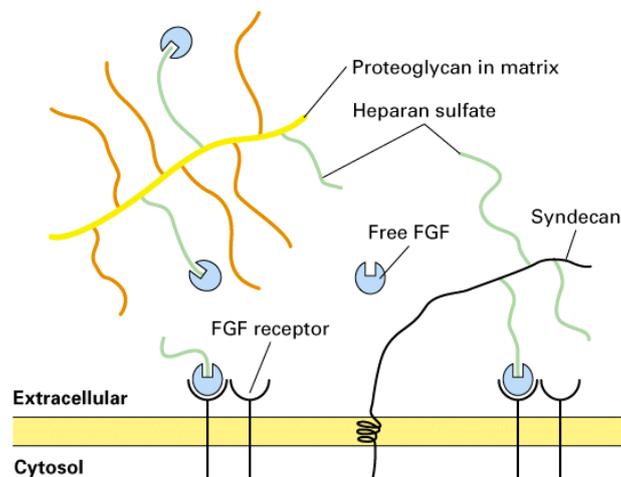
Esempio: PG transmembrana SINDECANO

- ✚ 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 come una specie 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.

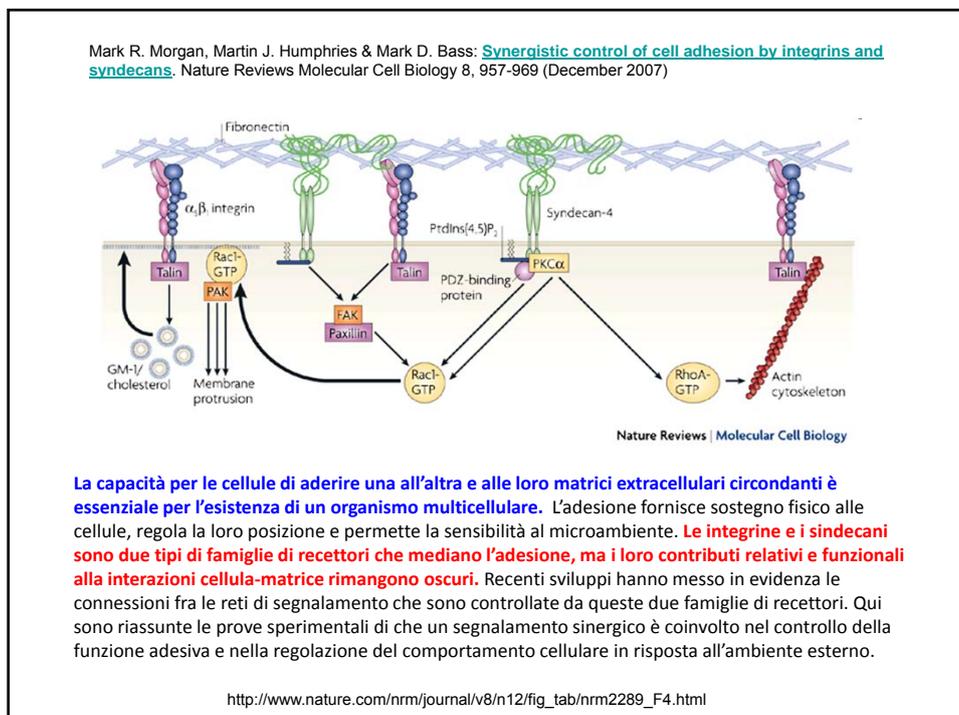
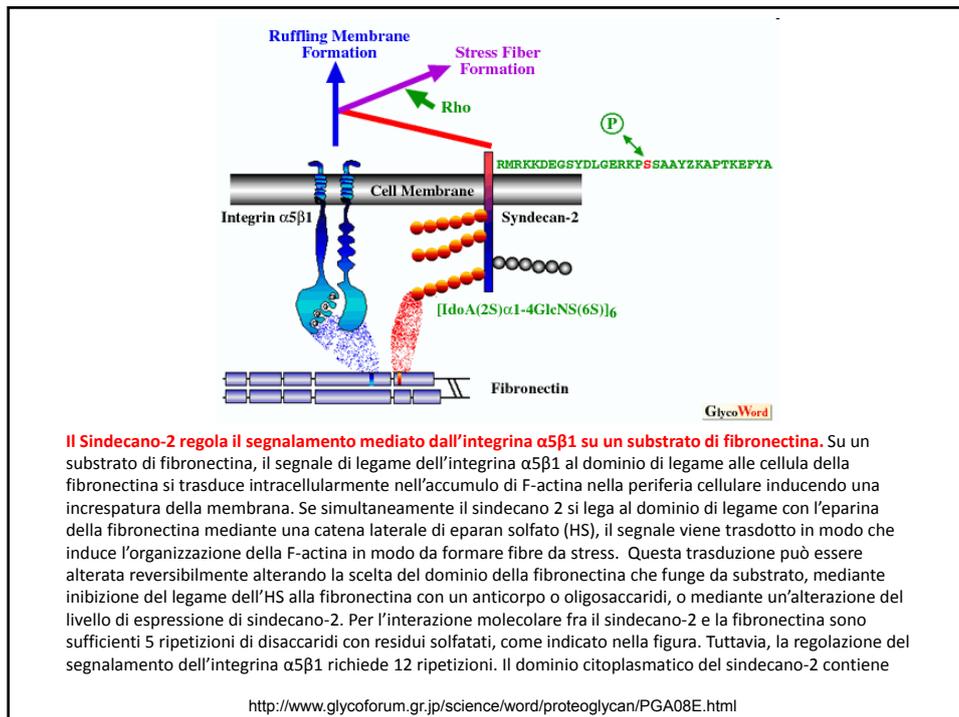


<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21706/figure/A6578/>

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

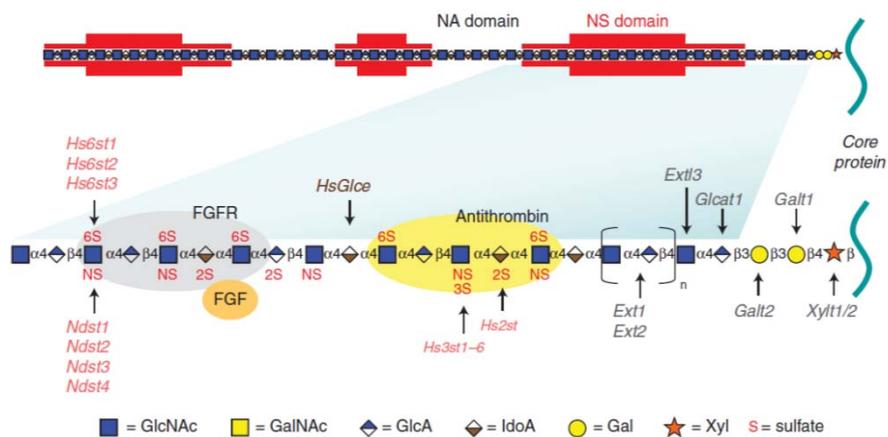


<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21706/figure/A6580/>



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 BBxBe BBBXB (dove **B** è un **aminoacido basico** e X un qualsiasi AA) 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.

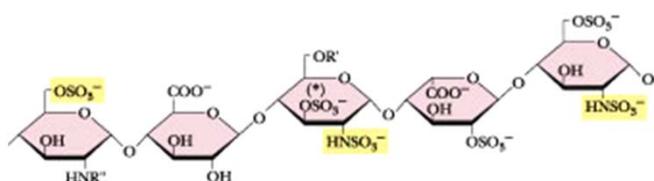


Struttura dell'eparan solfato (HS)

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**.

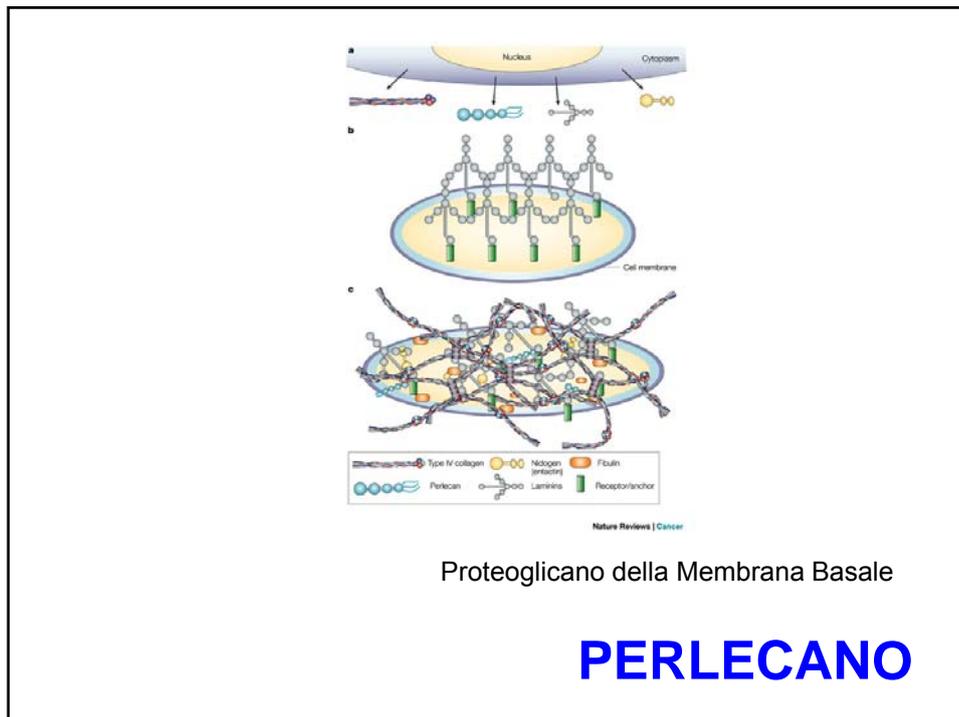
I proteoglicani ad eparan solfato (HSPGs) svolgono molteplici attività nelle cellule e nei tessuti.

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 Eparan Solfati (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- GlcNH 3 +, 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.

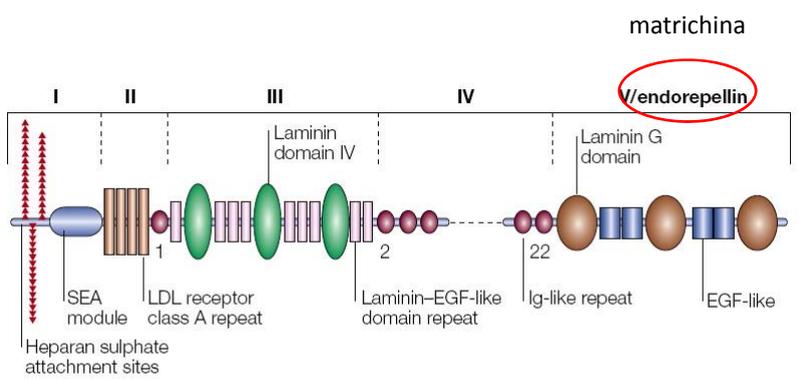
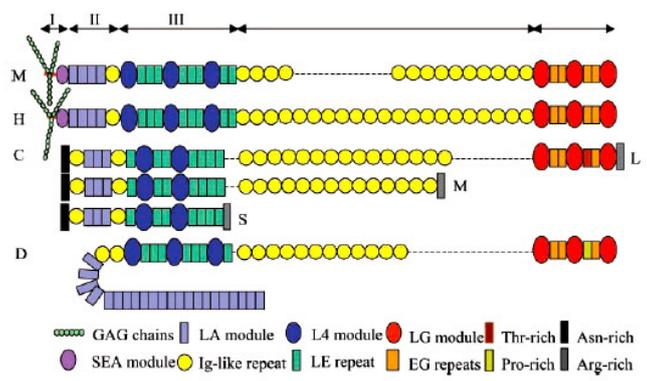


Perlecano (1)

- ✚ Proteoglicano **multidominio** ad **eparan solfato** (HSPG) **essenziale per lo sviluppo dei vasi sanguigni**, del cuore, del cervello e nella condrogenesi.
- ✚ 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.

PERLECANO

Jiang & Couchman. J Histochem Cytochem. 51:1393-1410, 2003



Structural domains of human perlecan.

Iozzo RV. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. Nat Rev Mol Cell Biol. 6:646-656, 2005

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.

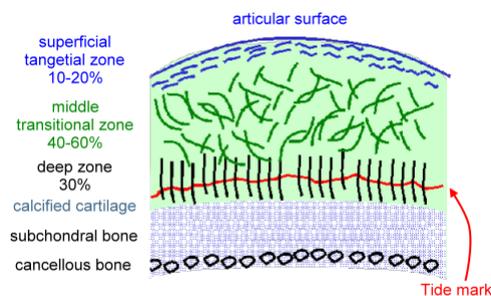
Seminario

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.



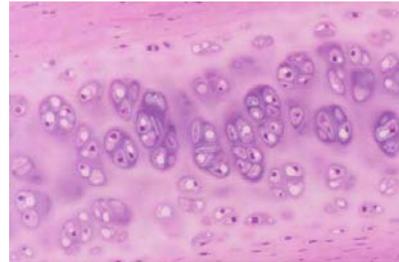
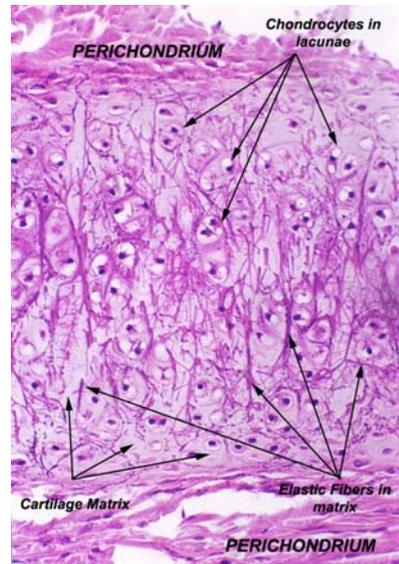
Collagen Arrangement of the Articular Cartilage

Proteoglicani

CARTILAGINE - AGGREGANO

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

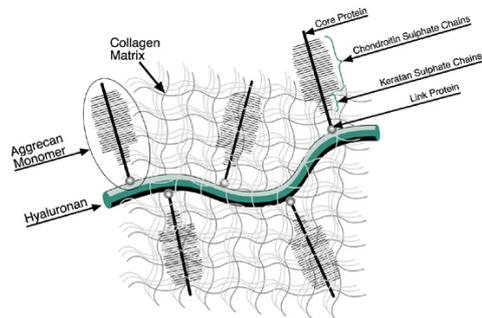
Cartilagine



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].

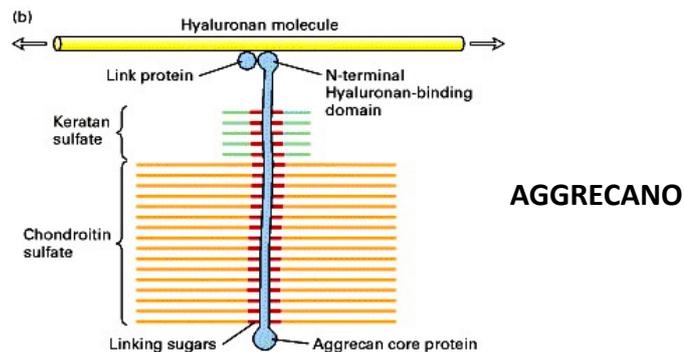
Cartilagine



Schematic Presentation of Cartilage Extracellular Matrix.

- ✚ La matrice della cartilagine è un materiale omogeneo principalmente composto da proteoglicani.
- ✚ I GAGs irraggiano dalla “core protein” come le setole di una spazzola.
- ✚ I principali GAGs della cartilagine sono condroitin solfato (CS) e cheratan solfato (KS).
- ✚ Un altro GAG della matrice della cartilagine è l'acido ialuronico, che funge da collante legando i PGs gli uni agli altri in grandi aggregati.

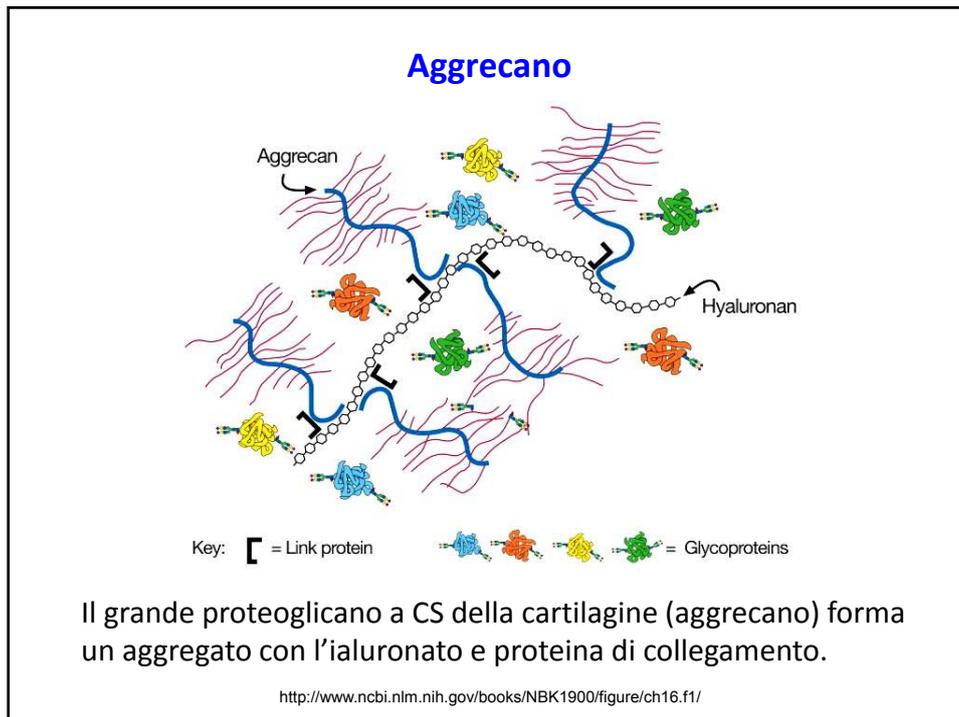
Struttura dell'aggregato di proteoglicani della cartilagine



AGGREGANO

- ✚ Il dominio N-terminale della “core protein” si lega 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'aggregano.
- ✚ Ogni “core protein” dell'aggregano 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/>



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.

