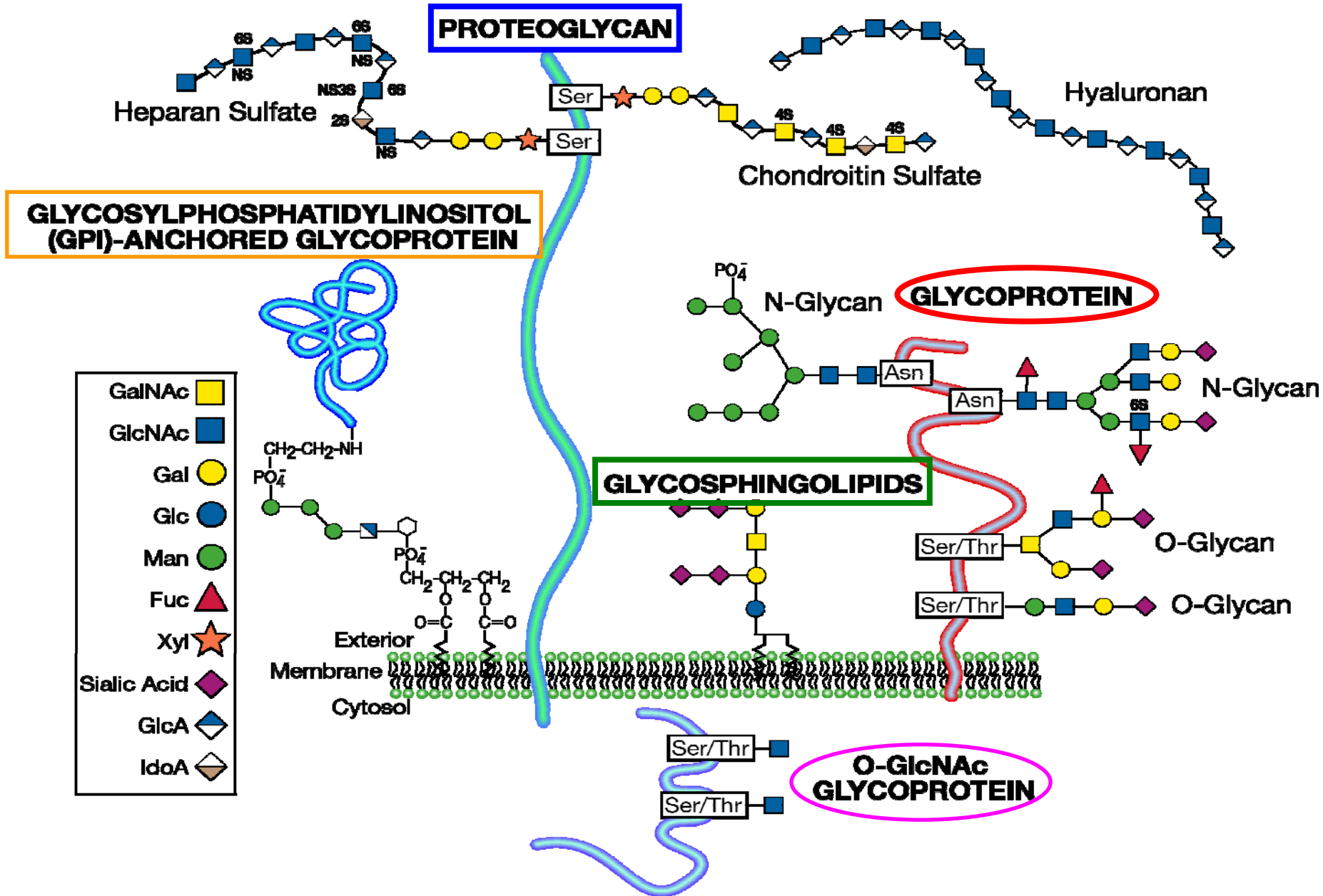


GLICOCONIUGATI



GLICOCONIUGATI

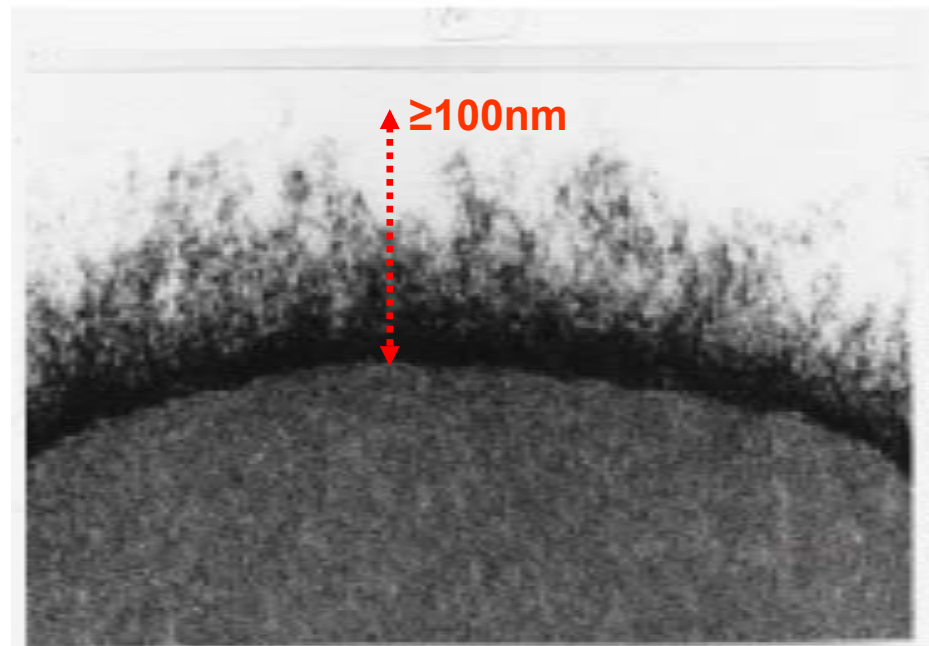
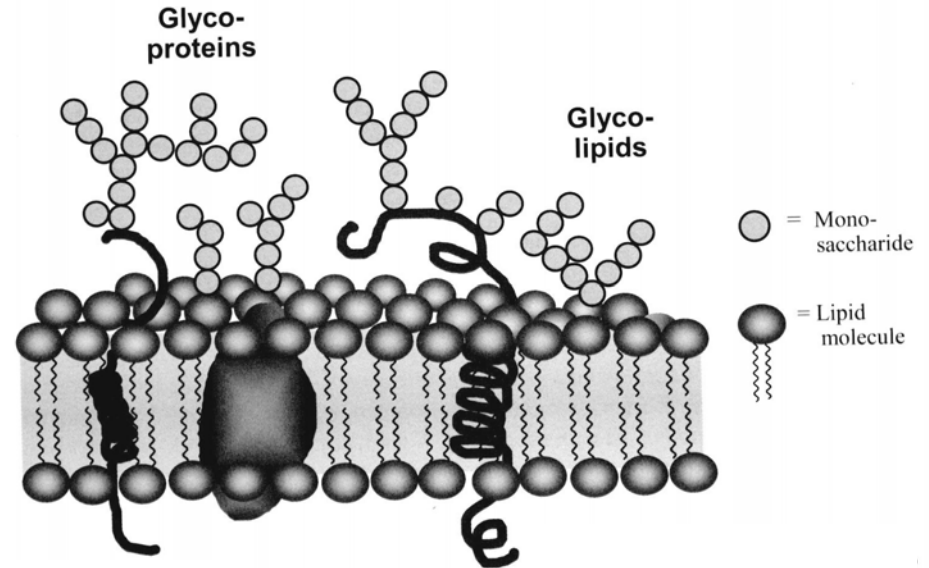
✓ GLICOLIPIDI

✓ Lipooligo- e lipopolisaccaridi

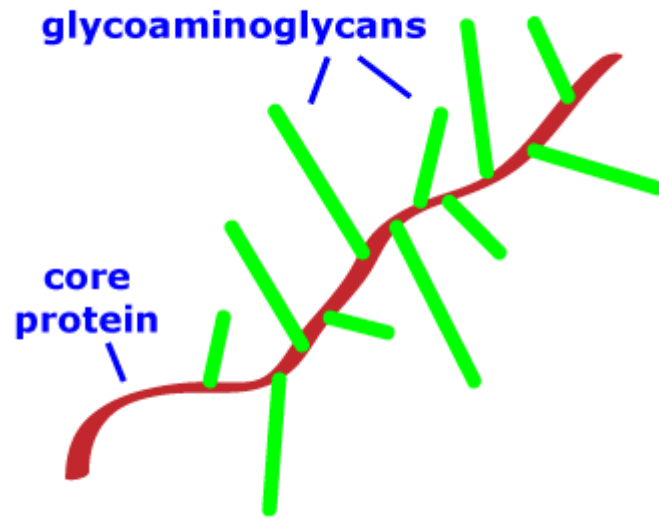
✓ GLICOPROTEINE

Proteoglicani

Peptidoglicani

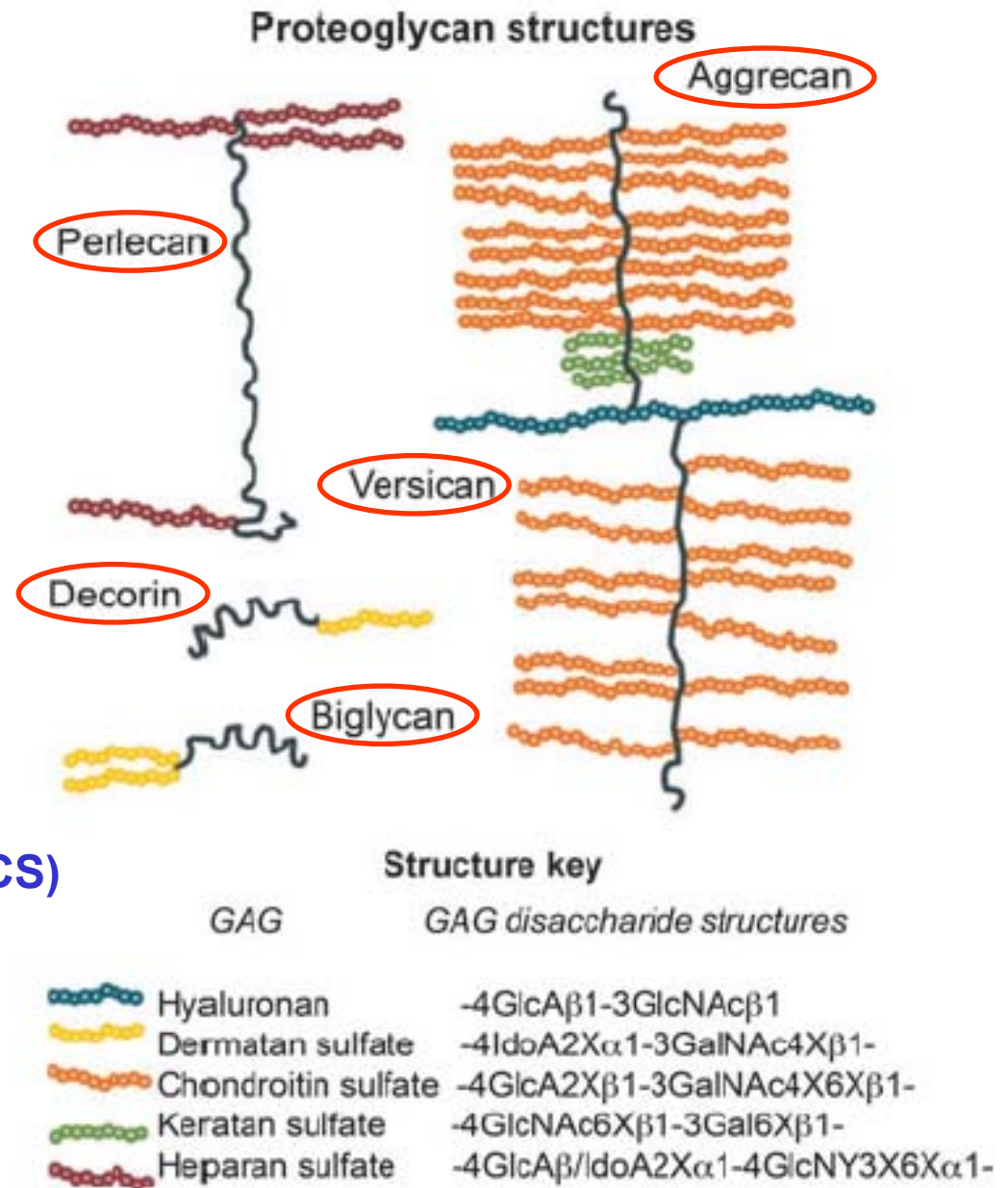


PROTEOGLICANI



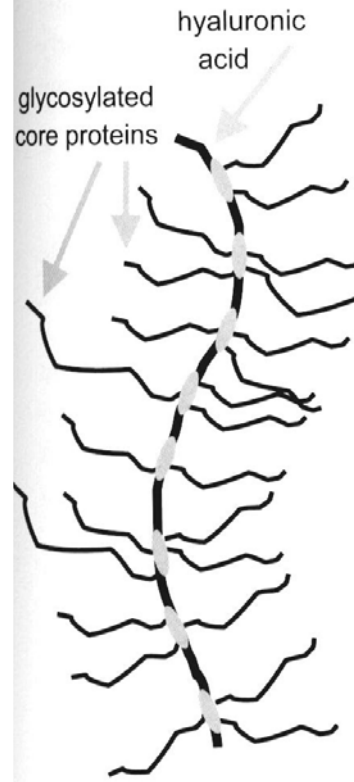
GLICOSAMMINOGLICANI (GAG)

- ❖ Acido ialuronico (HA)
- ❖ Condroitina solfato (CS)
- ❖ Condroitina solfato fucosilata (fCS)
- ❖ Dermatan solfato (DS)
- ❖ Eparan solfato (HS)
- ❖ Eparina (HP)
- ❖ Keratan solfato (KS)

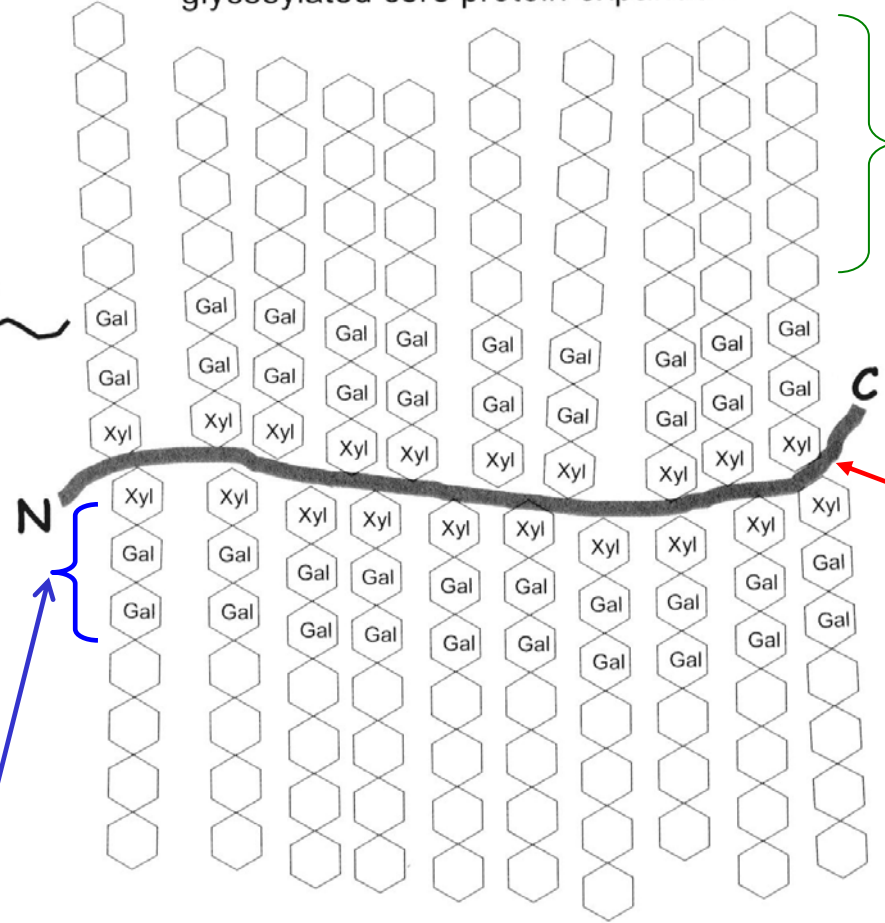


PROTEOGLICANI

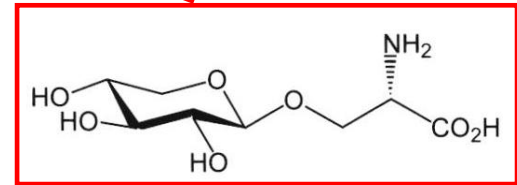
AGGREGANO



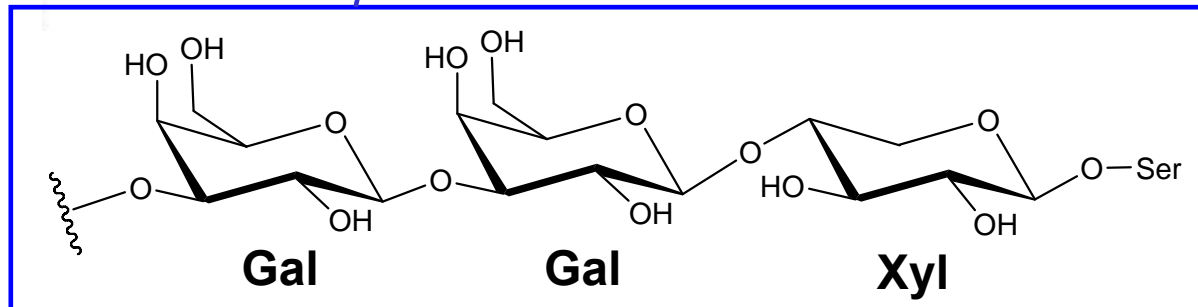
glycosylated core protein expandend



catene polisaccaridiche di glicosamminoglicani



legame β -D-Xyl-Ser

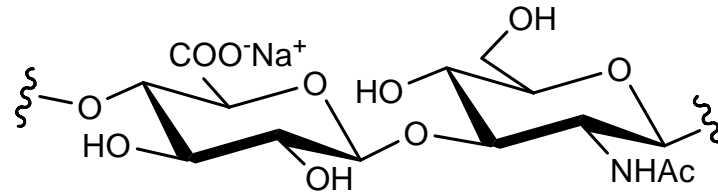


giunzione oligosaccaridica (può essere variamente solfatata o fosforilata)

Acido ialuronico (HA)

PROTEOGLICANI

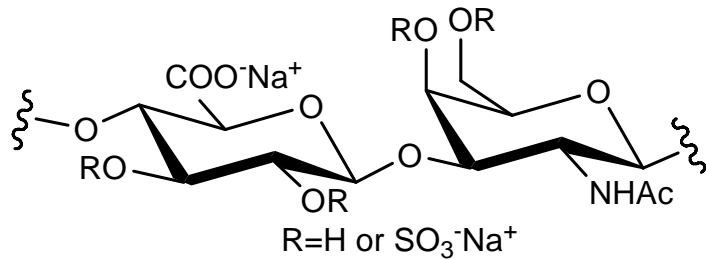
4)- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow



- Privo di porzione proteica
- Grado di polimerizzazione: 500-25000 (unità ripetitive)
- Elevato peso molecolare, facilmente depolimerizzato per agitazione meccanica, elevata temperatura, o in presenza di radicali liberi
- Polisaccaride capsulare di alcuni batteri
- Distribuzione nei mammiferi (ubiquitario):
 - Corpo vitreo dell'occhio (0.1-0.4 mg/ml peso umido)
 - Cordone ombelicale (4 mg/ml)
 - Pareti arteriose
 - Cartilagine (< 1%)
 - Cresta del gallo (7.5 mg/ml)
- Importanza biologica: componente fondamentale della matrice extracellulare (ECM)
 - Interazione con particolari proteine e altri proteoglicani
 - Modula il comportamento delle cellule durante i processi di morfogenesi, rimodellamento dei tessuti, infiammazione, cancro e arteriosclerosi
- Uso terapeutico:
 - Trattamento del glaucoma
 - Degenerazione delle giunture

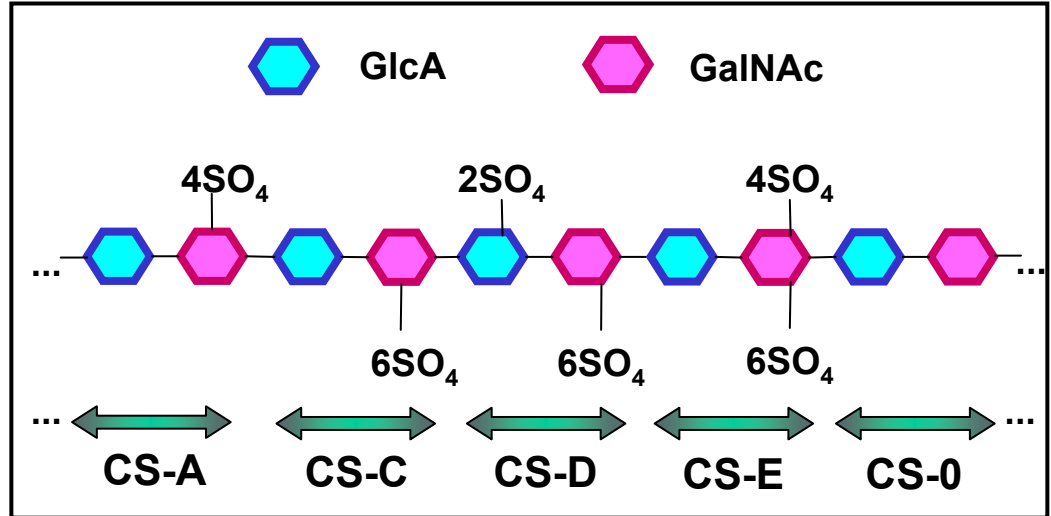
Condroitina solfato (CS)

PROTEOGLICANI



4)-β-D-GlcA-(1→3)-β-D-GalNAc-(1→
variamente solfatata

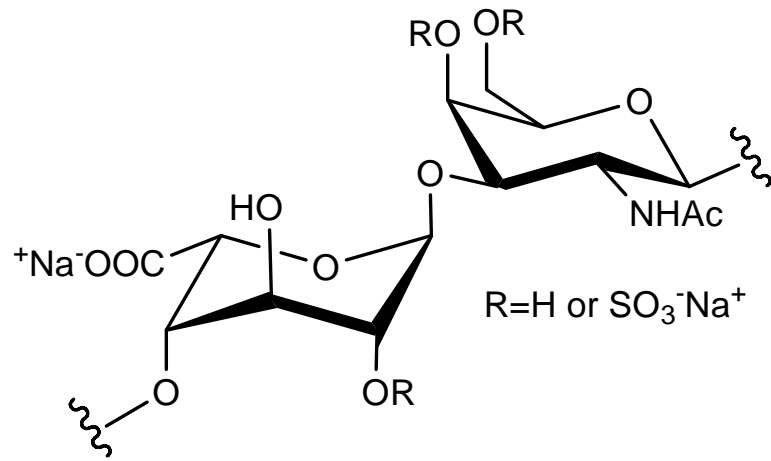
- Natural sulfation patterns*
- 0: GlcA-GalNAc
 - A: GlcA-GalNAc(4S)**
 - B: GlcA(2S)-GalNAc(4S)
 - C: GlcA-GalNAc(6S)**
 - D: GlcA(2S)-GalNAc(6S)
 - E: GlcA-GalNAc(4,6S)
 - K: GlcA(3S)-GalNAc(4S)
 - L: GlcA(3S)-GalNAc(6S)
 - M: GlcA(3S)-GalNAc(4,6S)
 - R: GlcA(2,3S)-GalNAc



	Cartilagine bovina	Cartilagine suina	Cartilagine aviaria	Cartilagine squalo	Cartilagine razza	Cartilagine seppia	Aorta bovina	Ossa storione	Midollo coniglio	Piastrine umane	Plasma umano
CS-0	6%	6%	8%	3%	3%	13%	--	7%	--	--	40-60%
CS-A	61%	80%	72%	32%	43%	50%	<5%	38%	--	>98%	60-40%
CS-B	--	--	--	1%	1%	--	--	--	--	--	--
CS-C	33%	14%	20%	44%	39%	15%	>95%	55%	100%	<2%	1-5%
CS-D	--	--	--	18%	13%	--	--	--	--	--	--
CS-E	--	--	--	2%	1%	22%	--	--	--	--	--

Dermatan solfato (DS)

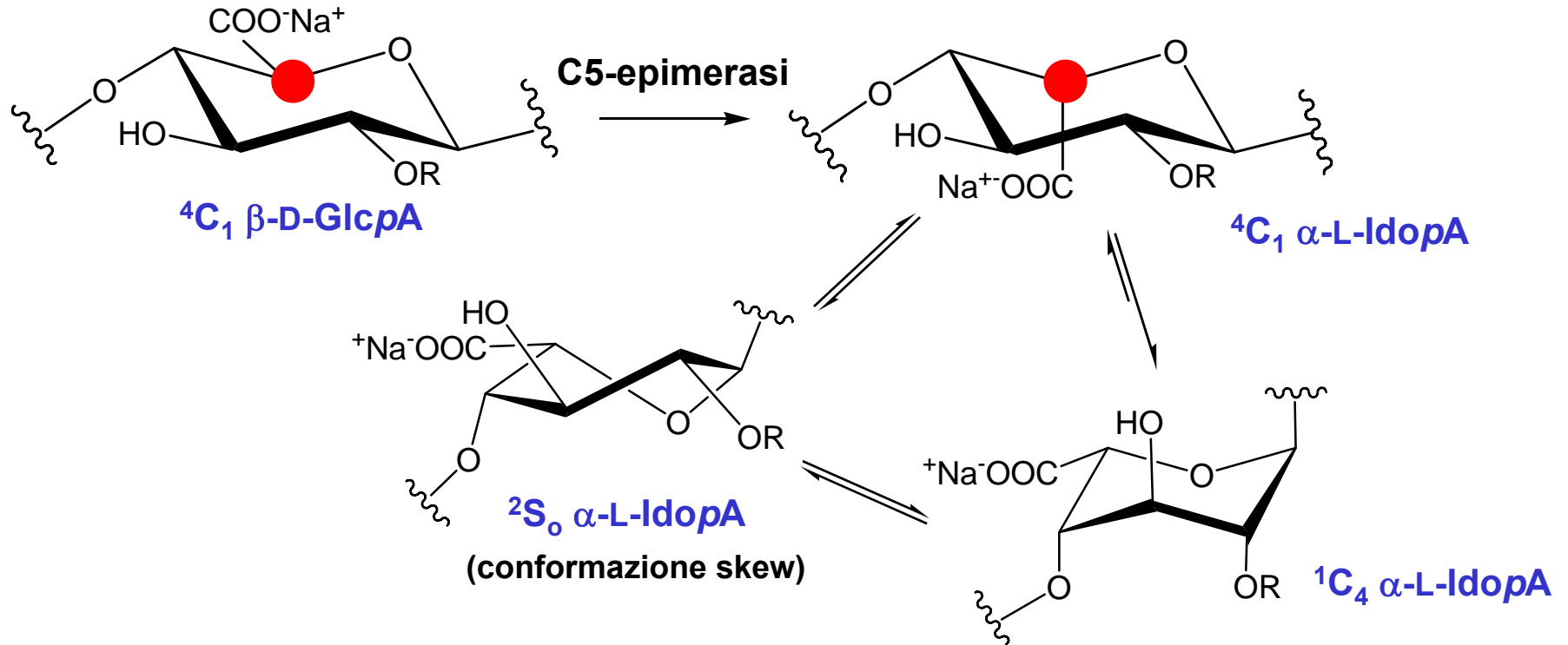
PROTEOGLICANI



4)- α -L-IdoA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow variamente solfatata

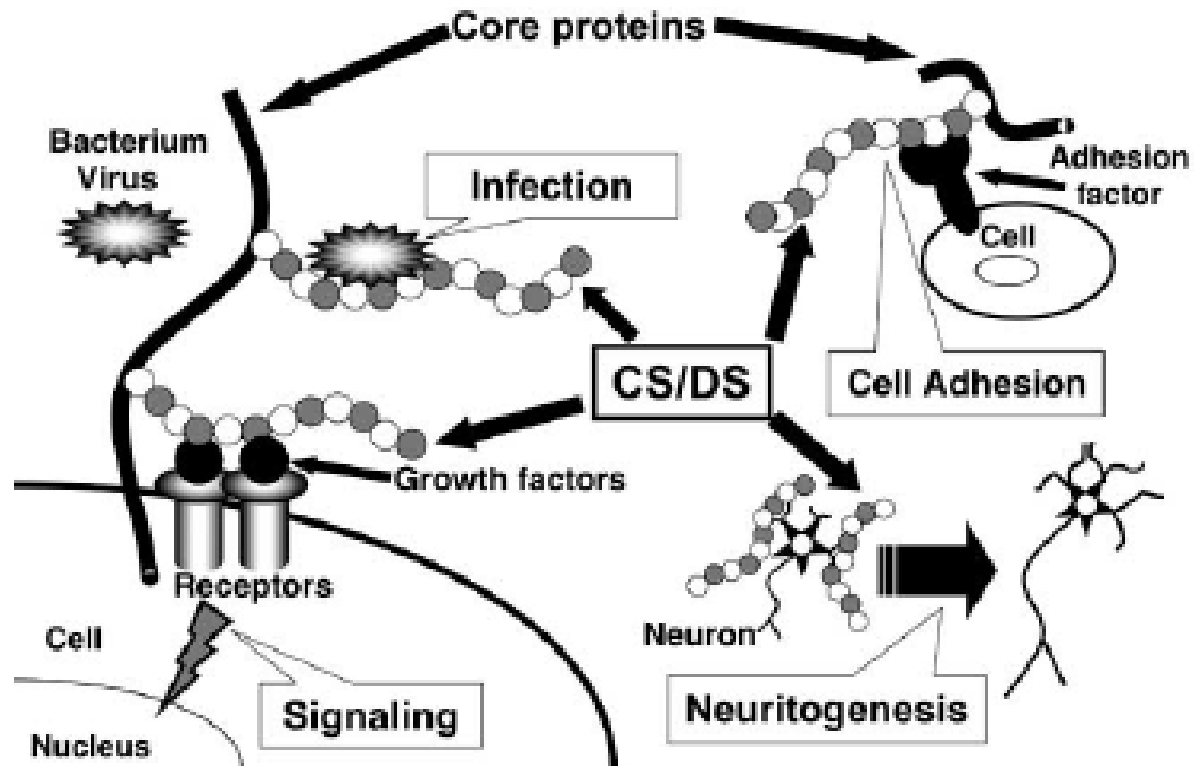
Natural sulfation patterns

- i0: IdoA-GalNAc
- iA: IdoA-GalNAc(4S)
- iB: IdoA(2S)-GalNAc(4S)
- iC: IdoA-GalNAc(6S)
- iD: IdoA(2S)-GalNAc(6S)
- iE: IdoA-GalNAc(4,6S)



PROTEOLICANI

Ruoli biologici proteoglicani contenenti CS e DS



- ❑ Componenti della matrice extracellulare
- ❑ Regolazione del signaling dei fattori di crescita
- ❑ Regolazione della neuritogenesi
- ❑ Coinvolti nei meccanismi di adesione cellulare
- ❑ Riconoscimento di microorganismi e fattori d'infezione

PROTEOGLICANI

CS come farmaco e nutraceutico

- ❑ Ingrediente biomedico per il trattamento dell'**osteoartrite** e come **nutraceutico** per prevenire la degenerazione delle cartilagini
 - ❑ Mercato globale: ~ 600 tonnellate
 - ❑ Commercio globale: > $1 \cdot 10^9$ US\$/anno
- ❑ Impiegato per il trattamento delle **ustioni** e come componente di **soluzioni viscoelastiche** utilizzate come supporto chirurgico
- ❑ Potenziali ulteriori applicazioni farmaceutiche proposte come anticancro, antimalarico, antivirale, **fattore di rigenerazione tissutale**



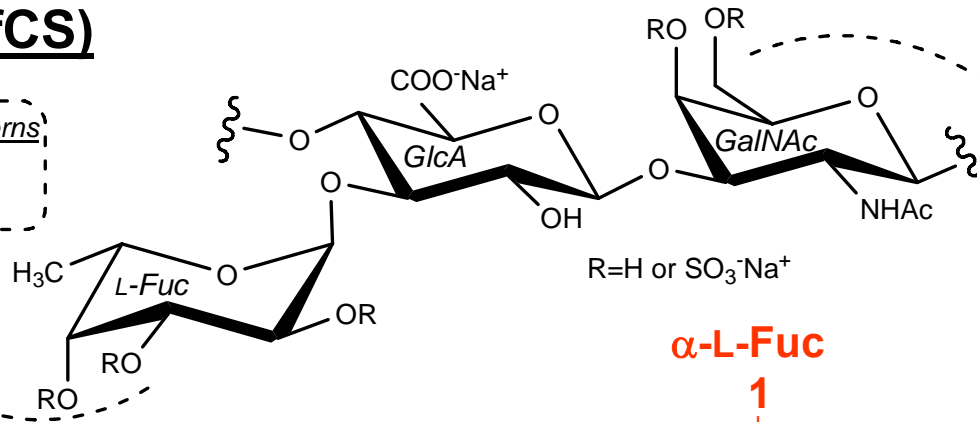
Condroitina solfato

fucosilata (fCS)

PROTEOGLICANI

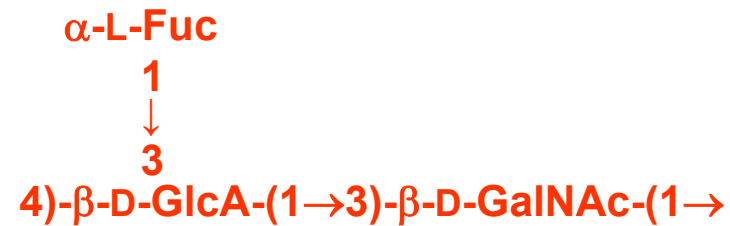
Natural Fuc sulfation patterns

monosulfate: O-3; O-4
disulfate: O-2,4; O-3,4



Natural GalNAc sulfation patterns

monosulfate: O-4; O-6
disulfate: O-4,6



variamente solfatata

□ Attiva in vari eventi biologici relazionati ad angiogenesi, processi infiammatori, metastasi, crescita cellulare, arteriosclerosi, iperglicemia

□ La maggior parte degli studi biomedici sulla fCS sono concentrati **sull'attività anti-trombotica**

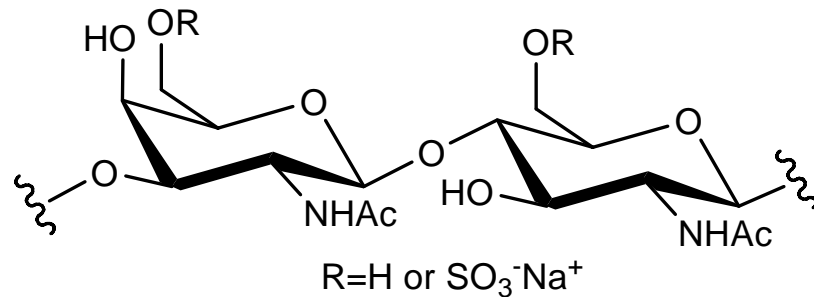
□ fCS parzialmente depolimerizzata è in fase di clinical trials come nuovo agente antitrombotico



fCS isolata esclusivamente dal cetriolo di mare (*Echinoidea, Holothuroidea*)

Keratan solfato (KS)

PROTEOGLICANI



3)-β-D-Gal-(1→4)-β-D-GlcNAc-(1→
con solfatazione su C-6(GlcNAc)
più frequente che su C-6(Gal)

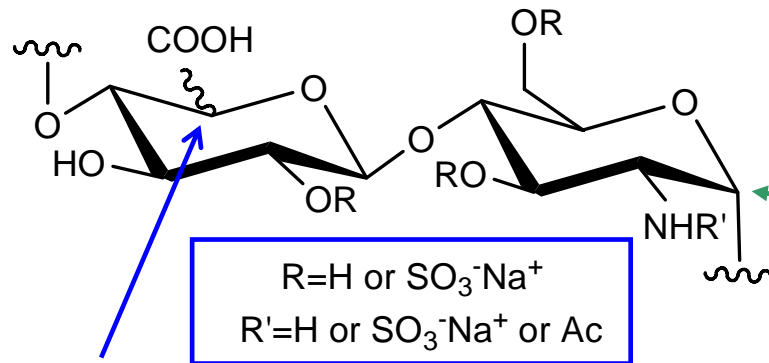
Physiopathological roles and medical functions of KS.

System	Function
Cornea physiopathology	KS, as constitutive component of cornea, when administrated as functional ingredient in eye drops, allows health improvement in macular corneal dystrophy and keratoconus.
Neural development and pathology	While in certain conditions, KS impairs neurite growth <i>in vitro</i> , in other conditions directs axons in neural development and regeneration <i>in vivo</i> . KS impairs plasticity and recovery of spinal cord injury. Its degradation using keratanase suggests a therapeutic avenue.
Inflammation	KSPGs control chemokine gradient formation and regulate neutrophil migration. Administration of KS leads to amelioration in inflammatory processes, especially in rheumatoid arthritis and chronic obstructive pulmonary disease. KS is seen fairly diminished in microglia of spine cord (main tissue of the central nervous system responsible for KS synthesis) during auto-immune neuritis.
Cancer biology	KS can be used as a biomarker in carcinomas of female genital tract. KS and its sulfation content reduce radio-induced apoptotic process in human Burkitt's lymphoma cells. Enzymatic therapy using KS-related degrading enzymes is a route to fight this pathology.
Mucopolysaccharidosis	In MPS IVA, the enzyme galactose 6-sulfate sulfatase is somewhat compromised. This leads to deposition of KS in chondrocytes. Enzymatic therapy using KS-related degrading enzymes is a route to fight this pathology.
Cartilage physiopathology	KS, as constitutive component of cartilage, when intraperitoneally administered in rat models can impair or delay cartilage damage.
Amyotrophic lateral sclerosis	The clinical use of KS leads to suppression of the early developing stages of this disease.

Eparina (HP) & eparan solfato (HS)

PROTEOGLICANI

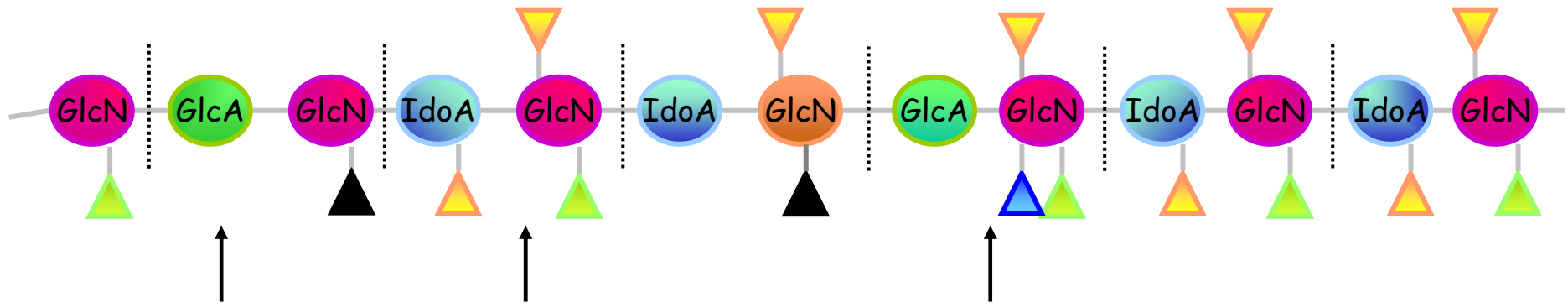
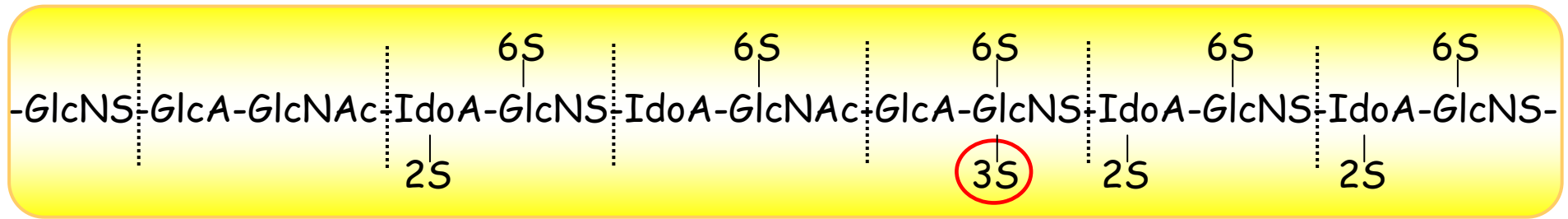
4)-β-D-GlcA [o α-L-IdoA] -(1→4)-α-D-GlcNAc-(1→
variamente solfatata



unico caso di legame α-glicosidico nei GAG

D-GlcA o L-IdoA

Ritrovate 48 strutture disaccaridiche diverse!



unità disaccaridica più comune in HS

unità disaccaridica più comune in HP

unità disaccaridica rara ma molto importante in HP

Eparina (HP) & eparan solfato (HS)

PROTEOGLICANI

HS vs. eparina

- ❑ Catene polisaccaridiche più corte in HS che eparina
- ❑ Rapporto GlcNS/GlcNAc
 - ❑ Eparina: 4:1
 - ❑ HS: 1:1
- ❑ Minore solfatazione del polisaccaride
 - ❑ Eparina: 2.4 solfati per disaccaride
 - ❑ HS: 0.2-0.7 solfati per disaccaride

Eparina: attività biologica

- ❑ Scoperta nel 1916 ed usata come anticoagulante dal 1935
- ❑ Agente terapeutico di origine naturale più usato dopo l'insulina
- ❑ Prodotta dai mastociti del tessuto connettivo in prossimità del sistema sanguigno

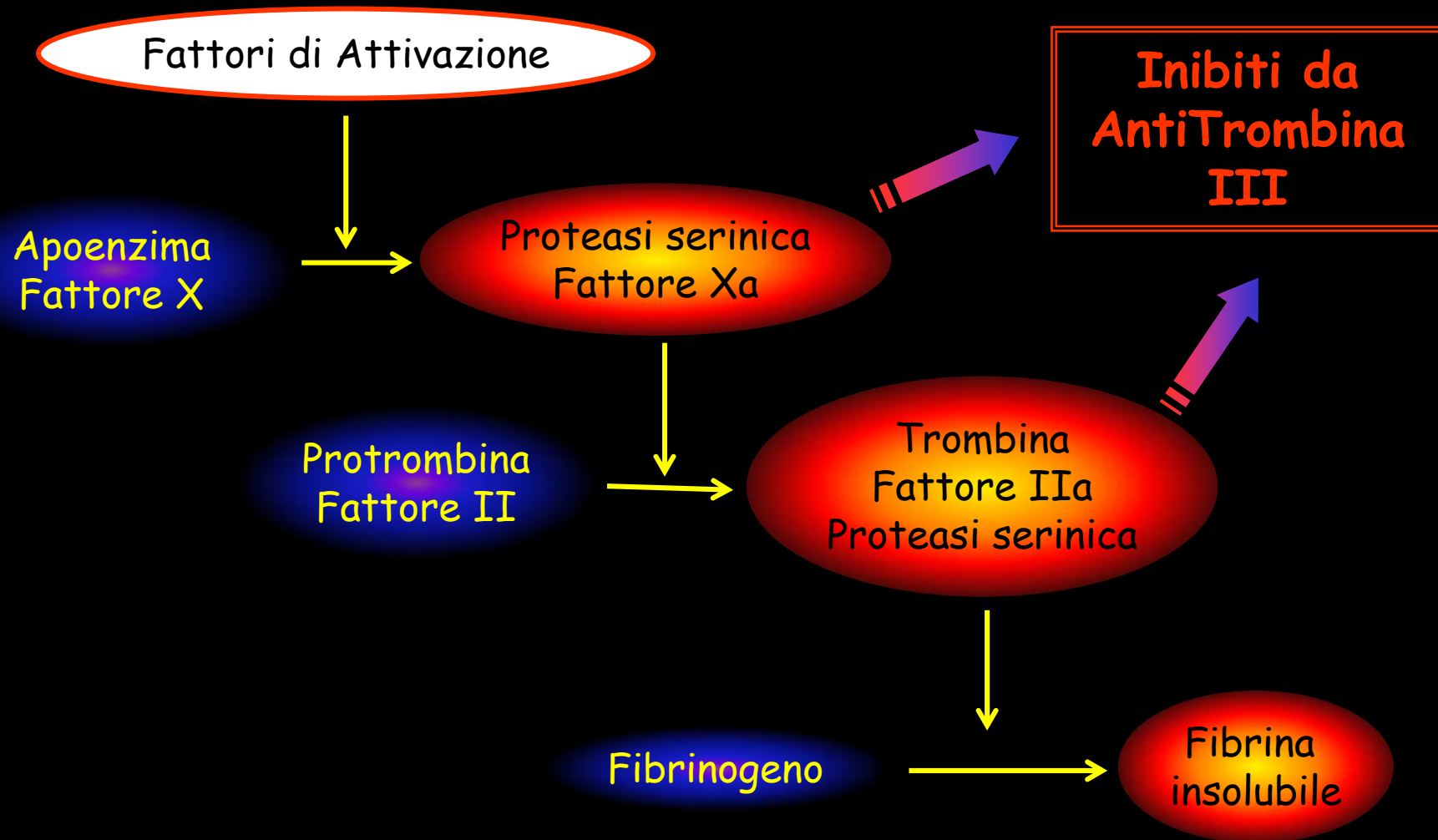
Eparan solfato: attività biologica

- ❑ Adesione cellulare
- ❑ Regolazione di crescita e proliferazione cellulare: interazione con diversi fattori di crescita (GF)
- ❑ Coagulazione del sangue
- ❑ Ancoraggio di lipoproteine (lipasi e altre) sulle membrane cellulari

La cascata di coagulazione del sangue

Meccanismo

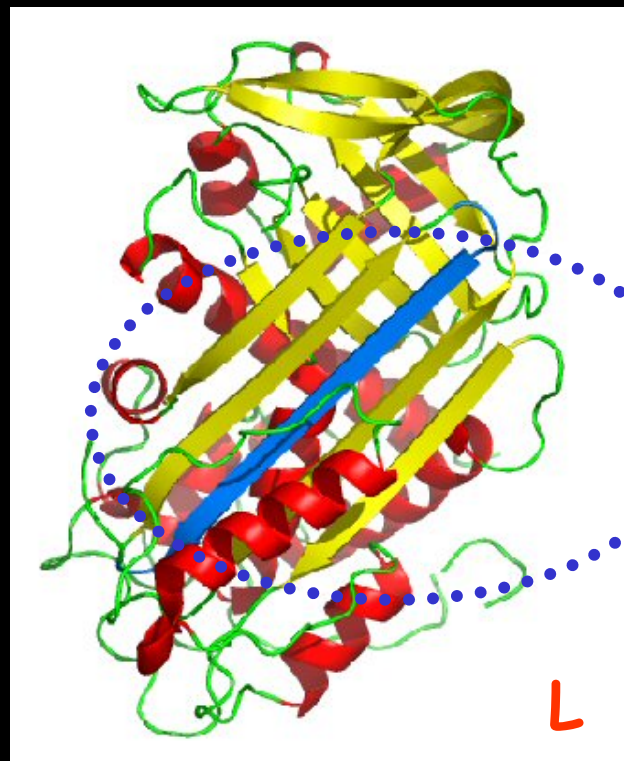
Attivazione a causa di fattori intrinseci del sangue o estrinseci (lesione tessuti)



Antitrombina III

- Membro delle Serpine (Serine Protease Inhibitors)
- Inibitore delle proteasi seriniche
- Equilibrio: Forma Latente/ Forma Inibitrice

Loop: ruolo chiave nel processo di inibizione

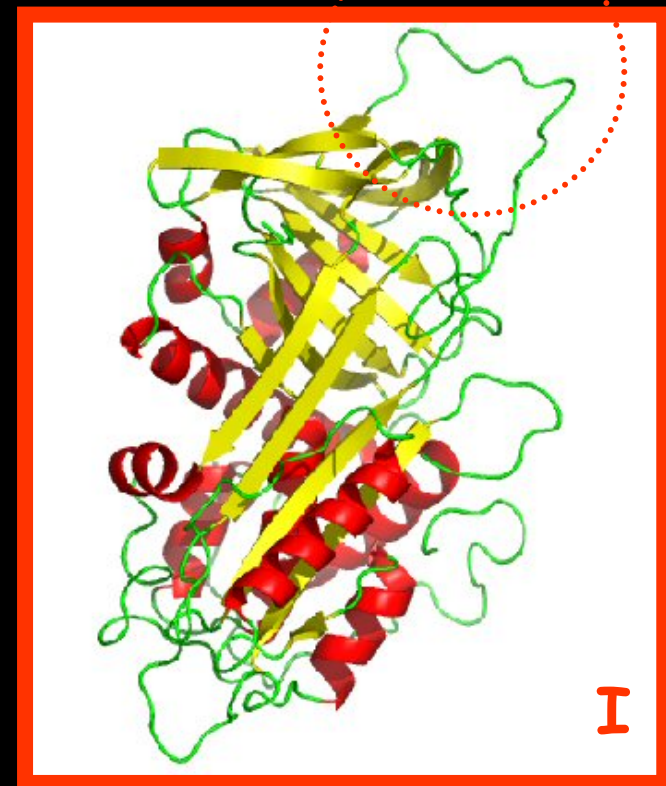


Forma Latente

Eparina



Zona detta
sheet-A



Forma Inibitrice

Meccanismo

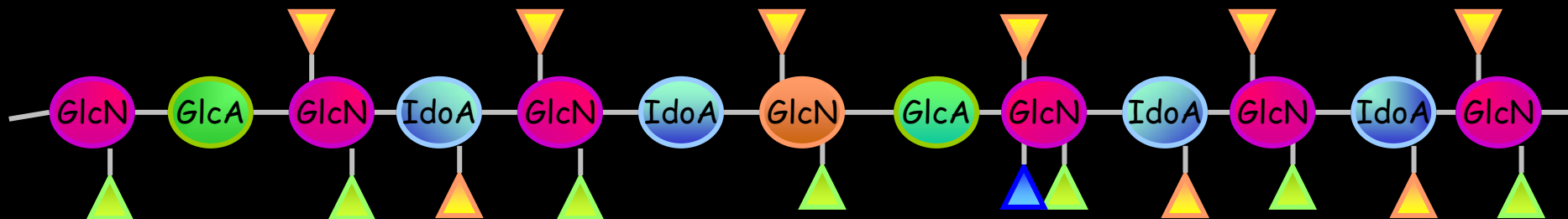
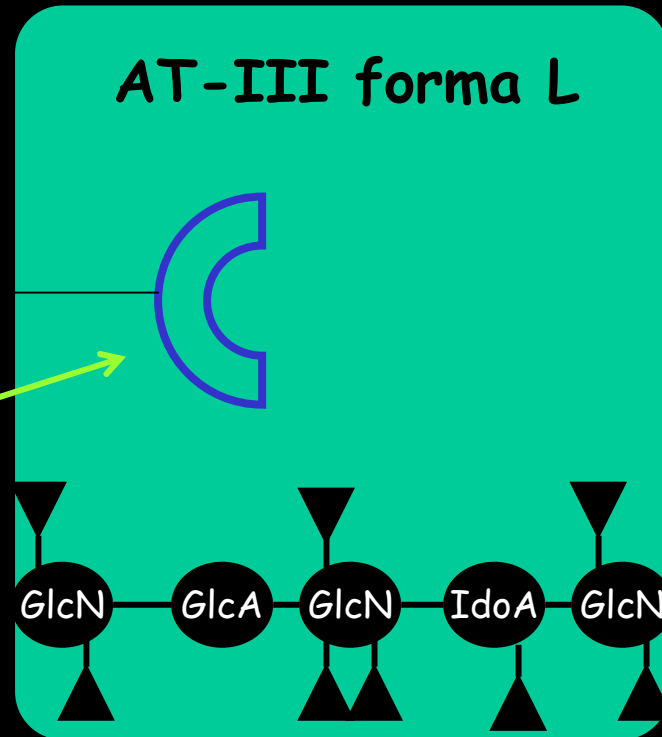
AT-III riconosce una sequenza pentasaccaridica ben precisa

sulla catena di Eparina: $\text{GlcNS6S} \rightarrow \text{GlcA} \rightarrow \text{GlcNS3,6diS} \rightarrow \text{IdoA2S} \rightarrow \text{GlcNS6S}$

Antitrombina III

LOOP nascosto

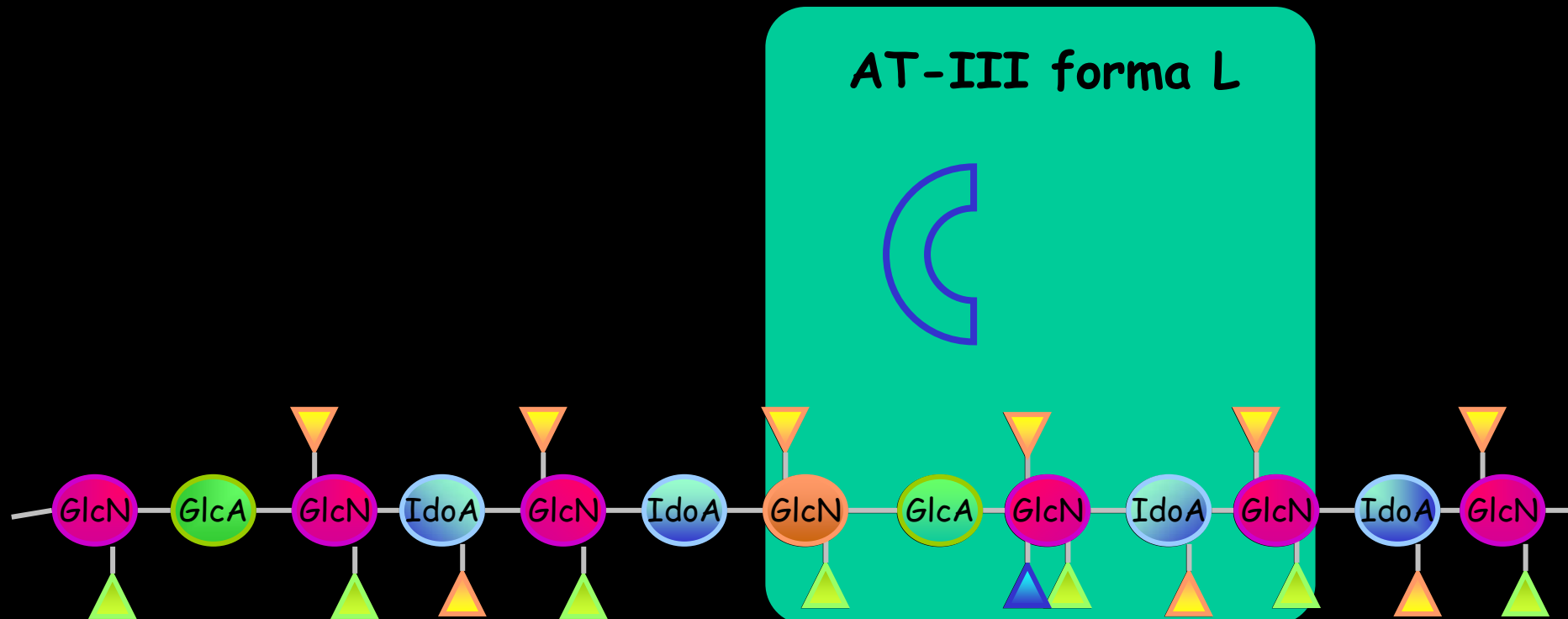
AT-III forma L



Antitrombina III

Meccanismo

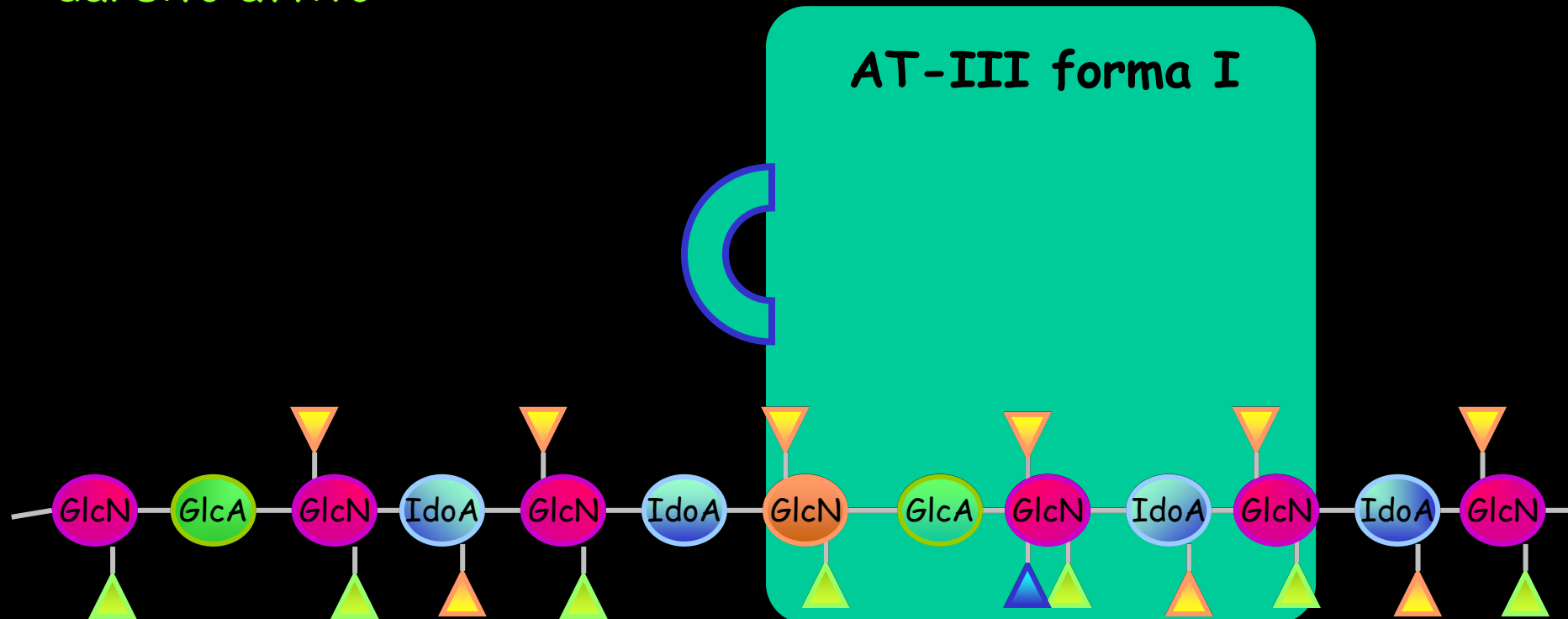
- Formazione di un primo complesso di bassa affinità
- AT-III ancora forma L
- $K_d \sim 10^{-5}$
- IdoA2S in equilibrio tra 1C_4 e 2S_0



Antitrombina III

Meccanismo

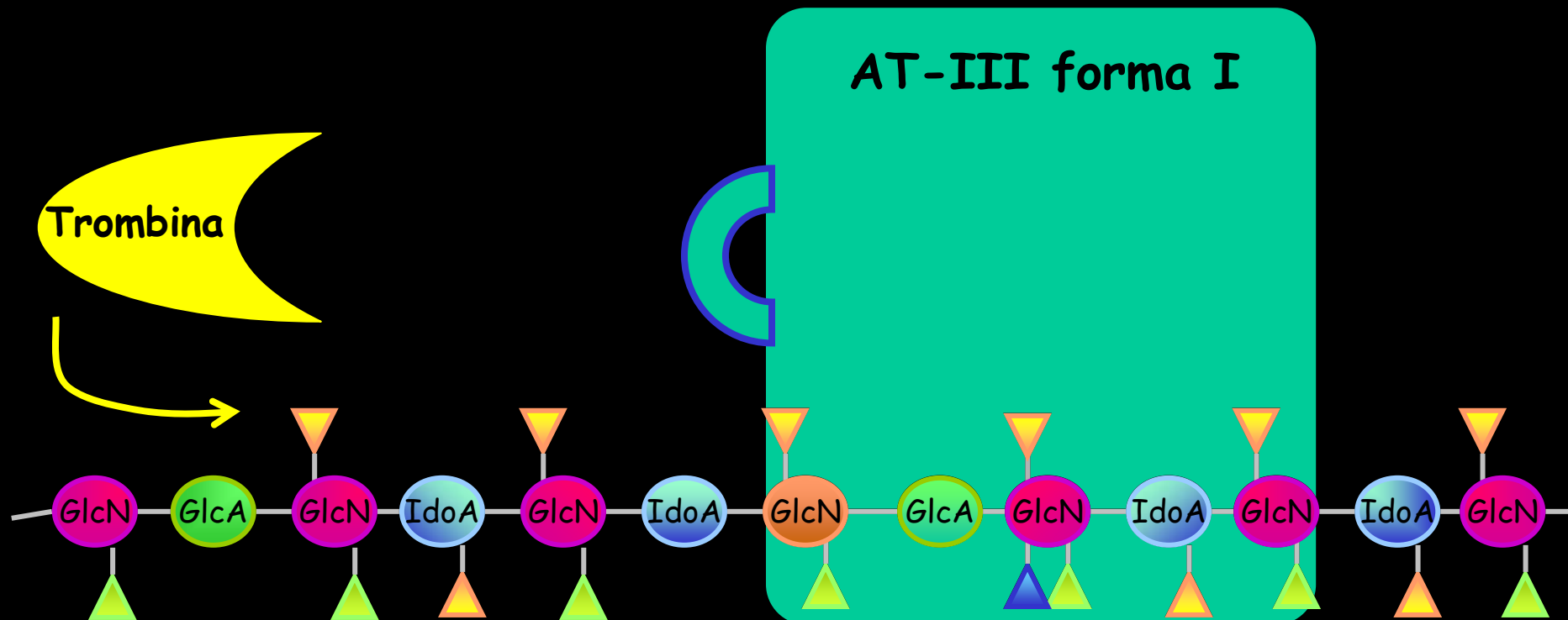
- Variazione conformazionale di AT-III
- forma I
- $K_d \sim 10^{-8}$
- IdoA2S presente solo in conformazione 2S_0
- AT-III (I) è in grado di inattivare il Fattore Xa
- È sufficiente il pentasaccaride riconosciuto dal sito attivo



Meccanismo

Antitrombina III

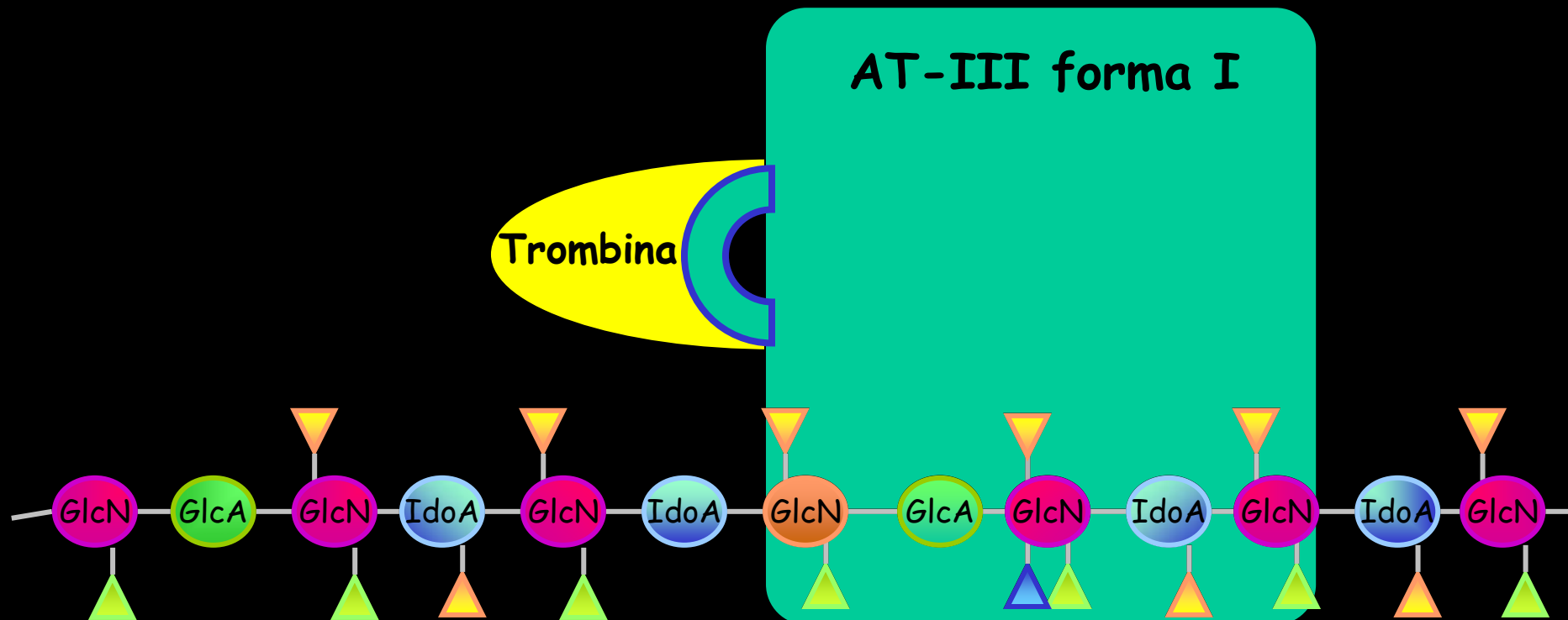
- La Trombina presenta interazioni aspecifiche con l'eparina
- Si avvicina a AT-III "camminando" lungo il polisaccaride
- Direzione di provenienza: estremità terminale NON riducente dell'eparina
- Lunghezza minima catena polisaccaridica 12-18 residui totali
- Residui extra devono essere carichi



Meccanismo

Antitrombina III

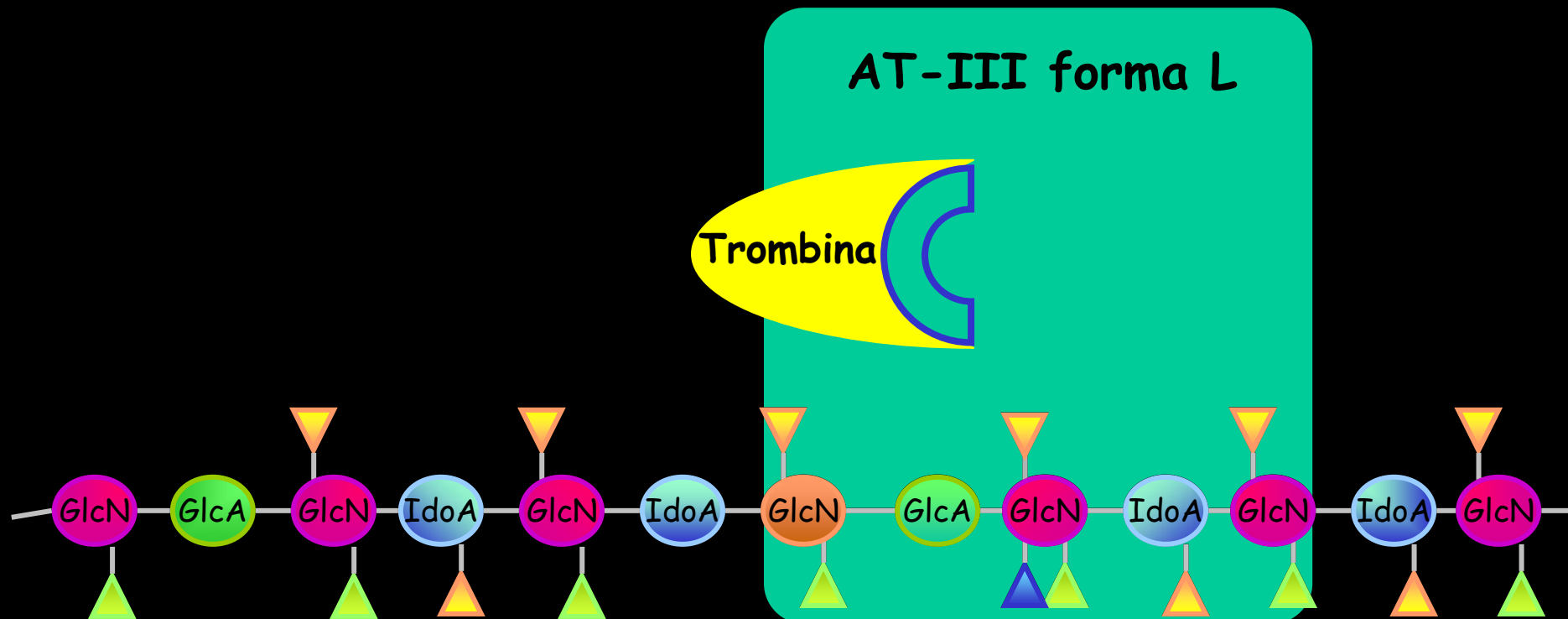
- Azione della Trombina sul Loop esposto di AT-III
- Formazione del legame covalente tra la Trombina ed il Loop
- INIBIZIONE della Trombina



Meccanismo

Antitrombina III

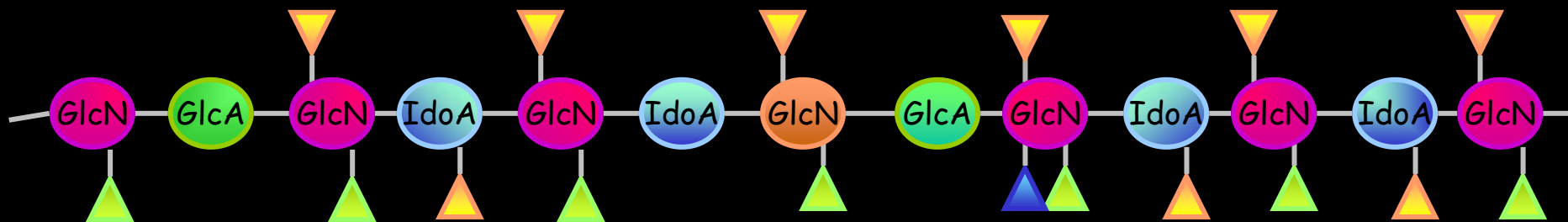
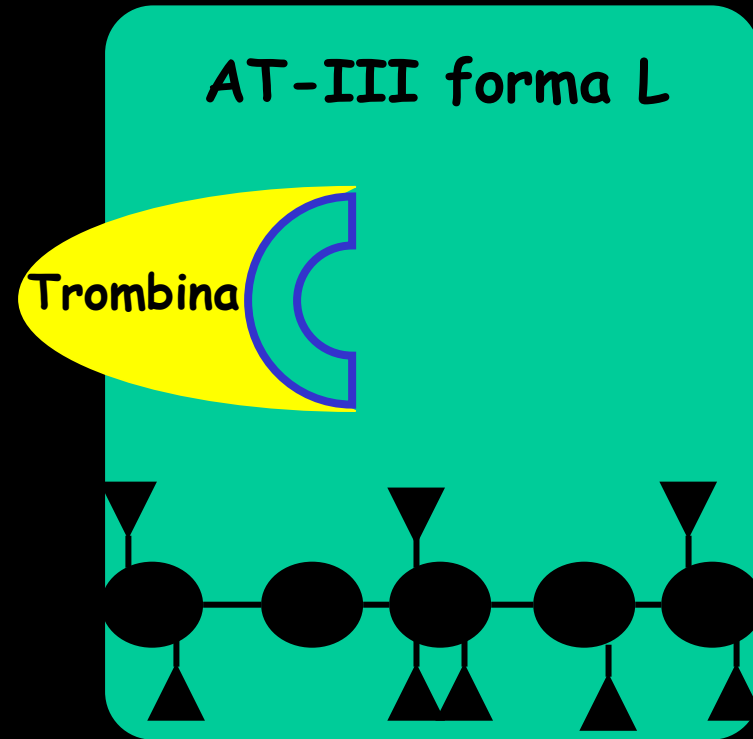
- Variazione conformazionale di AT-III
- Forma L
- Trombina "sequestrata" all'ambiente e parzialmente inclusa in AT-III
- Complesso di bassa affinità AT-III/Eparina
- IdoA2S da 2S_0 si ri-equilibra con la sua forma 1C_4



Meccanismo

- Complesso di bassa affinità
AT-III/Eparina
- Rottura complesso
At-III (L)/Eparina
- AT-III si allontana con la
Trombina inattivata

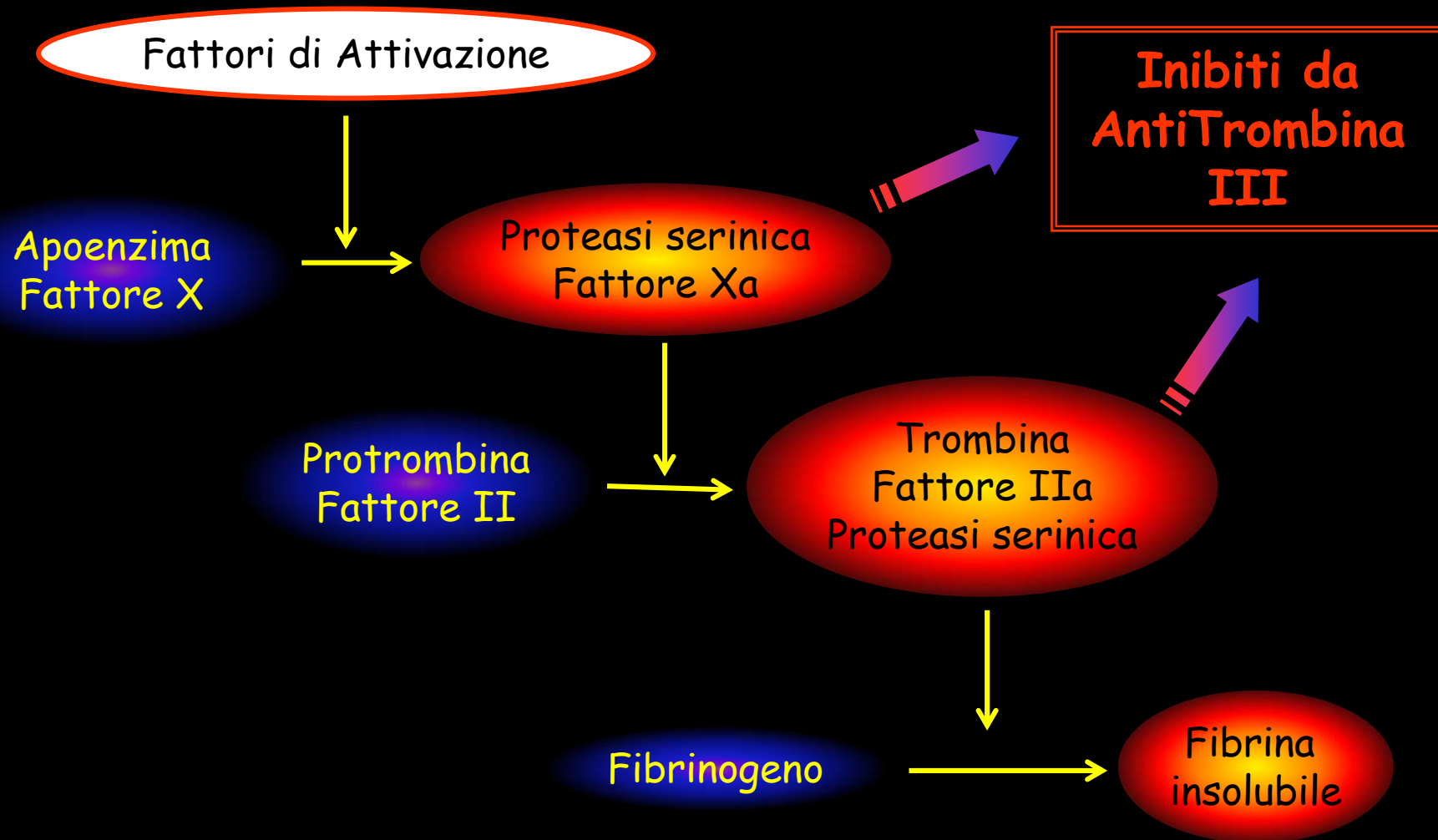
Antitrombina III



La cascata di coagulazione del sangue

Meccanismo

Attivazione a causa di fattori intrinseci del sangue o estrinseci (lesione tessuti)



Eparina (HP)

PROTEOGLICANI

Inibizione della trombina (fattore IIa)

- ❑ è necessaria un'eparina con il pentasaccaride chiave per l'attivazione di AT-III
- ❑ sono necessari ulteriori residui solfati nella porzione non riducente del polimero

Problemi

- ❑ Complicazioni emorragiche per trombocitopenia (perdita immunologica delle piastrine)
- ❑ Effetti molto ridotti in pazienti con deficienza da AT-III congenita o acquisita
- ❑ Circolazione del sangue extracorporea (dialisi) → anticoagulante ad azione rapida e breve
- ❑ Prevenzione di tromboembolismi venosi → anticoagulante ad azione a lunga durata

Inibizione del fattore Xa

- ❑ è necessario solo il pentasaccaride chiave per l'attivazione di AT-III →

- uso Low Molecular Weight Heparin (LMWH): Pm ~ 3000-7000 kDa
- uso pentasaccaride chiave (Fondaparinux™)
- risoluzione complicazioni emorragiche
- modulazione effetti farmacocinetici

