

## S.S. Biopolimeri e Proteomica

**Proprietà in soluzione e modelli a media risoluzione di proteine coinvolte nell'interazione cellula-matrice extracellulare, nella coagulazione del sangue, nelle metastasi tumorali e nell'angiogenesi**

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni ospite-tumore

*Programma:* e – Angiogenesi

*Responsabile:* Mattia Rocco

*Partecipanti:* Aldo Profumo, Barbara Cardinali

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* angiogenesi; struttura delle proteine; modelli idrodinamici; integrine; fibrinogeno

*Altre strutture IST:* S.C. Nanobiotecnologie (C. Rosano)

*Altri Enti coinvolti:* Università dell'Insubria, Como (F. Ferri); Wake Forest University, Winston-Salem, NC, USA (R. Hantgan); University of Glasgow, Glasgow, UK (O. Byron); University of Nottingham, Nottingham, UK (S. Harding); EMBL-Hamburg, DE (M. Roessele); The Burnham Institute, La Jolla, Ca, USA (N. Volkmann)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

### *Background*

L'interazione cellula-matrice extracellulare ha un ruolo fondamentale in molti processi fisiologici ed associate patologie, tra cui l'invasione e la migrazione di cellule tumorali metastatizzanti e l'angiogenesi. Tra le proteine coinvolte nell'interazione cellula-matrice extracellulare e nell'angiogenesi ci sono fibrinogeno/fibrina e le integrine alfaIIb beta3 (GPIIb-IIIa) e alfa-v beta3. Di queste proteine non sono disponibili strutture ad alta risoluzione dell'intera molecola, ma solo di moduli o domini anche estesi, a volte provenienti da varie molecole omologhe. Questa mancanza impedisce una comprensione più approfondita dei meccanismi che regolano le interazioni tra recettori cellulari e proteine della matrice, un aspetto fondamentale per esempio per poter sviluppare farmaci selettivi. Lo scopo del progetto era di costruire modelli di queste proteine attraverso l'uso congiunto di tecniche ad alta e bassa risoluzione, utilizzando anche una serie di programmi al computer da noi sviluppati. In particolare, le proprietà idrodinamiche e conformazionali in soluzione delle proteine misurate tramite tecniche di diffusione della luce, di velocità di sedimentazione all'ultracentrifuga analitica e di viscosimetria, possono essere confrontate con quelle calcolate a partire da modelli ad alta risoluzione utilizzando il programma SOMO (Rai et al., Structure, 13, 723-734, 2005) ed il sistema BEAMS (Spotorno et al., Eur. Biophys. J. 25, 373-384, 1997). Il programma SOMO (SOLUTION MOdeller) genera modelli a media risoluzione di proteine a partire dalla loro struttura tridimensionale, mentre BEAMS calcola i parametri dei modelli. I vari modelli vengono generati a partire da strutture tridimensionali ad alta risoluzione adattate in mappe a minor risoluzione derivate da microscopia elettronica o small-angle X-ray scattering (SAXS).

### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

Sviluppare e rifinire modelli del fibrinogeno e delle integrine alfa-v beta3 e alfa-IIb beta3, in modo che i parametri calcolati per ciascun modello siano il più possibile in accordo con i dati sperimentali. I modelli ottenuti per le singole proteine saranno poi impiegati in un progetto successivo per lo studio delle loro interazioni, applicando la stessa metodologia, con l'obiettivo di definire un modello del complesso e dei cambi conformazionali necessari a formarlo. Questi modelli saranno di utilità per lo sviluppo di farmaci mirati a modulare od impedire le interazioni tra queste proteine in diversi scenari biologici, quali la coagulazione del sangue e l'angiogenesi.

### *Beneficiari*

Comunità scientifica.

### *Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008*

Lo sviluppo dei modelli del fibrinogeno e delle integrine è stato condotto in parallelo nel triennio 2006-2008. Per il fibrinogeno, sono stati condotti studi di SAXS al sincrotrone presso il DESY di Amburgo su frazioni altamente purificate di fibrinogeno umano in cui le catene alfa sono integre per l'80-90% (HMW) e sul frammento X, derivato proteolitico del fibrinogeno in cui le estremità C-terminali delle stesse catene alfa sono praticamente assenti. L'analisi è stata condotta anche su fibrinogeno di pollo (gentilmente preparato e fornito dal Prof. R.D. Doolittle, UCSD, La Jolla, CA, USA) che presenta le catene alfa di lunghezza intermedia. Le analisi delle curve di scattering condotte sul frammento X con il programma Dammin (Svergun D.I., Biophys J, 76:2879-86,1999) in collaborazione con il Prof. M. Roessele del EMBL-Amburgo, e più recentemente con metodi di deformazione elastica in collaborazione con il Dr. Niels Volkmann del Burnham Institute, La Jolla, CA (USA), ci hanno permesso di ottenere un nuovo modello del corpo centrale del fibrinogeno, caratterizzato da una conformazione di tipo elicoidale in cui i due domini laterali si affacciano su lati opposti rispetto al dominio centrale. E' tuttora in corso l'analisi delle curve di scattering relative al fibrinogeno HMW e sul fibrinogeno di pollo per la collocazione spaziale delle catene alfa C-terminali. Contemporaneamente, in collaborazione con la Dr.ssa O. Byron dell'Università di Glasgow e il Prof. S. Harding dell'Università di Nottingham (UK), abbiamo eseguito misure di velocità di sedimentazione all'ultracentrifuga analitica e di viscosità intrinseca sugli stessi campioni. Tale analisi ha permesso di ottenere informazioni supplementari sulla forma globale del corpo base del

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

fibrinogeno in soluzione, rigettando modelli non conformi a questi dati. Un manoscritto che descrive la preparazione del fibrinogeno HMW e del frammento X, la loro caratterizzazione anche con spettroscopia di massa, e le misure idrodinamiche, è in fase avanzata di preparazione e sarà sottomesso a breve (Cardinali et al., to be submitted to Arch. Biochem. Biophys., 2008). La descrizione dei modelli tridimensionali del frammento X e del fibrinogeno sarà oggetto di una pubblicazione che contiamo di sottomettere nei primi mesi del 2009.

Per le integrine, abbiamo recentemente pubblicato sulla rivista Structure (Rocco et al., Structure 16, 954-964, 2008) un lavoro che riporta i grandi progressi ottenuti nel triennio. Sono stati infatti definiti modelli per il dominio extracellulare di alfa-v beta3 che dimostrano come essa sia più estesa (di circa 20°) rispetto al modello cristallografico, supportato anche da mappe EM 3D, in cui le due "metà" erano completamente ripiegate su se stesse. Inoltre, abbiamo confermato l'importante cambio conformazionale a livello della "testa", con lo "swing-out" dell'hybrid domain in beta3, che però avviene senza separazione delle "code". A partire da questo modello, è stato anche sviluppato quello per l'intera alfaIIb beta3 (solubilizzata da octyl glucoside), che è quasi completamente esteso ed è in ottimo accordo con una mappa 3D da tomografia elettronica. Anche in questo modello confermiamo lo swing-out in seguito ad attivazione, sempre senza separazione delle eliche transmembrana, che cambiano semplicemente conformazione. Infine, in un lavoro precedente, sempre di questo triennio (Hantgan et al., Protein Science, 15, 1893-1906, 2006), avevamo dimostrato come le interazioni tra alfaIIb beta3 ed i suoi ligandi sono accompagnate da un rimodellamento del sito di legame.

In conclusione, abbiamo definito modelli funzionali avanzati di queste due importanti proteine, correggendo le strutture cristallografiche presenti in letteratura. Siamo quindi adesso in ottima posizione per modellare i complessi tra fibrinogeno ed integrine nel successivo progetto triennale.

### *Elenco pubblicazioni:*

Hantgan R.-Stahle M.-Connor J.-Horita D.-Rocco M.-Mclane M.-Yakovlev S.-Medved L.  
Integrin alphaIIb beta3: ligand interactions are linked to binding site remodeling.  
Protein Sci. 15: 1893/1906, 2006

Rocco M.-Rosano C.-Weisel J.-Horita D.-Hantgan R.  
Integrin conformational regulation: uncoupling extension/tail separation from changes in the head region by a multiresolution approach.  
Structure 16: 954/964, 2008

### **Sviluppo dei gel di fibrina come veicoli per il rilascio locale di chemioterapici**

*Linea di ricerca:* 3 - Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

*Programma:* b - Valutazione dell'efficacia di nuovi approcci terapeutici: studio di nuovi farmaci, di nuove associazioni, di nuove tecniche, tecnologie o strategie terapeutiche

*Responsabile:* Aldo Profumo

*Partecipanti:* Mattia Rocco, Anna Aprile

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* gel di fibrina; cancro; chemioterapia; rilascio localizzato; HPLC; LAELS

*Altre strutture IST:* S.C. Terapia Immunologica (M. Viale); S.C. Immunologia (A. Poggi); Animal Facility (M. Cilli)

*Altri Enti coinvolti:* Università dell'Insubria, Como (F. Ferri); Università di Genova, DCCI (C. Cuniberti); Università di Genova, DIFI (A. Diaspro)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

### *Background*

La rimozione chirurgica di lesioni neoplastiche è spesso il trattamento d'elezione, ma un'eradicazione totale non sempre può essere ottenuta, con conseguenti recidive e formazione di metastasi. Il ricorso a chemioterapia sistemica è quindi spesso obbligato, con severi effetti collaterali e problemi nel raggiungere il bersaglio desiderato. Gel a base di fibrina sono potenzialmente degli ottimi veicoli per il rilascio locale di una varietà di agenti, quali farmaci, proteine e cellule, data la loro totale biocompatibilità, la possibilità di modularne forma, porosità, elasticità e degradazione e la facilità di preparazione. Film, adesivi, spugne e colle a base di fibrina sono in uso chirurgico da decenni, mentre il loro impiego quali carriers è ancora in fase di sviluppo e rappresenta un campo in forte espansione. Nonostante la formazione della fibrina sia studiata da molto tempo, parecchi punti rimangono ancora oscuri. Una conoscenza più approfondita della cinetica di formazione e delle proprietà strutturali dei gel di fibrina potrebbe portare a correlare queste caratteristiche con le capacità di rilascio di agenti in essi inglobati. Su questa linea in nostro gruppo è impegnato da tempo, e l'abbiamo sviluppata ulteriormente in questo progetto. Questo ci consentirà, nel prosieguo del progetto, di esplorare la fattibilità tecnica e valutare vantaggi e svantaggi della veicolazione locale di agenti chemioterapici in alcuni tipi di tumore, impiegando modelli animali in cui verranno impiantati tumori di origine umana.

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

L'obiettivo generale del progetto è verificare la fattibilità tecnica e valutare vantaggi e svantaggi della veicolazione locale di agenti chemioterapici utilizzando gel di fibrina in almeno un modello animale di tumore umano. Propedeutica e complementare a questa attività vi è la caratterizzazione cinetica e strutturale dei gel di fibrina, in modo da poter tenere sotto controllo alcuni parametri fondamentali dei gel, quali dimensioni dei pori e delle fibre, loro resistenza, elasticità e degradabilità in vivo. Per ragioni principalmente di budget, solo questa seconda parte del progetto è stata perseguita nel triennio 2006-2008, rimandando lo studio del rilascio di farmaci in vivo e in vitro al triennio successivo.

### *Beneficiari*

In questa fase, la comunità scientifica.

### *Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008*

Nel triennio 2006-2008 abbiamo cominciato gli studi relativi alla caratterizzazione dei gel di fibrina da impiegare come veicoli per il rilascio locale dei chemioterapici. In particolare, la nostra attenzione si è focalizzata sull'analisi della struttura dei gel di fibrina tramite immagini di microscopia elettronica a scansione e di microscopia ottica confocale su gel marcati con sonde fluorescenti. Tale approccio, finalizzato a stabilire come forma, porosità e dimensione delle fibre potessero essere modulati allo scopo di ottenere gel idonei ad un impiego come carriers di farmaci, è stato possibile grazie ad una collaborazione con il laboratorio di microscopia elettronica del DCCI dell'Università di Genova ed ha compreso la messa a punto della metodica di preparazione del campione per tale analisi. I dati di microscopia elettronica a scansione sono stati quindi confrontati con immagini ottenute utilizzando il microscopio confocale a scansione laser, in collaborazione con il dott. A. Poggi della S.C. Immunologia dell'IST. Anche in questo caso la messa a punto dei parametri di analisi ha richiesto parecchio lavoro: sono state infatti testate diverse sonde per evidenziare l'architettura dei gel, dalle particelle di oro colloidale alle sonde fluorescenti. Per ottenere un'analisi quantitativa dei dati sulla dimensione delle fibre e dei pori del gel, si è resa necessaria la messa a punto di una specifica metodica di elaborazione delle immagini, svolta dal gruppo del Prof. Ferri dell'Università dell'Insubria di Como in collaborazione con il LAMBS al DIFI dell'Università di Genova: molto tempo è stato dedicato alla determinazione delle specifiche condizioni di acquisizione. Sono stati preparati ed analizzati diversi gel variando la concentrazione di fibrinogeno, il rapporto fibrinogeno/trombina e la forza ionica del tampone: il complesso di informazioni derivanti da tale studio ha permesso di valutare gli effetti di questi parametri sulla struttura finale del gel di fibrina. I risultati ottenuti saranno di estrema utilità nell'individuazione della formulazione più idonea alla realizzazione di gel da impiegarsi come veicoli per il rilascio locale di chemioterapici.

Inoltre, sempre in collaborazione con il Prof. Ferri, è stato messo a punto uno strumento non commerciale dedicato all'analisi delle caratteristiche strutturali dei gel (porosità, diametro e densità delle fibre). Tale strumento è in grado di realizzare, contemporaneamente, misure turbidimetriche (in funzione della lunghezza d'onda) e misure di diffusione della luce a piccoli angoli (in funzione del tempo). Questa operazione consentirà l'analisi di gel di fibrina ottenuti dalla polimerizzazione del fibrinogeno a bassa concentrazione in cui il diametro delle fibre, avendo una dimensione inferiore alla risoluzione massima della microscopia ottica, non è valutabile attraverso questa tecnica. Questo approccio consentirà inoltre di evitare i problemi legati alla preparazione del campione per microscopia elettronica. Due manoscritti che riportano i nostri avanzamenti in questo campo sono in fase di preparazione, e contiamo di sottoporli nei primi mesi del 2009.

In parallelo sono proseguiti i nostri studi sulla cinetica di attivazione della molecola del fibrinogeno, passaggio chiave nella formazione del reticolo di fibrina. Il dosaggio dei fibrinopeptidi rilasciati rappresenta un comodo strumento per la valutazione della velocità di attivazione del fibrinogeno. Sino ad oggi erano stati descritti tre possibili forme di fibrinopeptide A e due forme di fibrinopeptide B. Grazie ai nostri studi di HPLC-MS, realizzati in collaborazione con il Dott. G. Damonte del DIMES dell'Università di Genova, è stato possibile individuare una terza forma di fibrinopeptide B, derivante da una nuova forma di fibrinogeno circolante mai descritta in precedenza, mancante dei primi due aminoacidi all'estremità N-terminale. Tale scoperta, descritta in una pubblicazione (Cardinali et al., *Thromb. Haemost.* 96, 302-308, 2006) consentirà d'ora in avanti una più precisa quantificazione dei fibrinopeptidi rilasciati che tenga conto di tutte le forme presenti.

Vogliamo infine ricordare che i risultati ottenuti negli anni dal nostro laboratorio sono stati riconosciuti internazionalmente sia dall'affidamento dell'organizzazione del XXth International Fibrinogen Workshop, che si è svolto a Venezia nel luglio 2008 con una partecipazione di circa 100 scienziati (a fronte di 70 previsti) ed un notevole successo, sia dalla richiesta da parte dell'importante rivista del settore *Blood* di un commento dedicato a recenti avanzamenti nel campo dello studio della formazione dei gel di fibrina (Rocco, *Blood* 111, 4839, 2008).

### *Elenco pubblicazioni:*

Cardinali B.-Damonte G.-Melone L.-Salis A.-Tosetti F.-Rocco M.-Profumo A.

Identification of a new truncated form and deamidation products of fibrinopeptide B released by thrombin from human fibrinogen.

*Thromb. Haemost.* 96:302/308, 2006

Rocco M.

Fibrin formation on fast forward.

*Blood* 111:4839, 2008