

**BORSA DI STUDIO PER ATTIVITÀ DI RICERCA, BANDITA CON DECRETO
RETTORALE n. 42/2019, FINALIZZATA ALLO SVOLGIMENTO DI UNA RICERCA
DAL TITOLO:**

BASI DI BIOCHIMICA CLINICA INERENTI ALLA CARATTERIZZAZIONE DELLE
ISOFORME DELLE METALLOPROTEASI DI MATRICE IN LIQUIDI BIOLOGICI A SCOPI
DIAGNOSTICI, PROGNOSTICI E COME TARGET TERAPEUTICI.

INTRODUZIONE

Il progetto di ricerca che intendo svolgere nell'ambito della borsa di studio che mi è stata assegnata prende in esame la caratterizzazione delle metalloproteasi di matrice e delle loro isoforme in diversi liquidi biologici.

Le Metalloproteasi di matrice (Matrix Metalloprotease, MMP), rappresentano una famiglia di endopeptidasi calcio e zinco dipendenti, funzionanti a pH neutro e sintetizzate in forma zimogenica, inattiva, come pre-pro-enzimi. La loro attivazione, in ambiente intra o extracellulare avviene mediante la rimozione del pro-peptide N-terminale ed esposizione del sito attivo dell'enzima, che quindi diventa cataliticamente attivo (es. ad opera di altre proteasi incluse le MMP). Una volta attive sono in grado di degradare numerose componenti delle matrici extracellulare e modulare l'attività di diverse molecole segnale implicate nei processi infiammatori.

In base al tipo di substrato su cui agiscono, le Metalloproteasi vengono suddivise in cinque classi principali: matrilisine, collagenasi, stromelisine, gelatinasi e MMP di membrana. Un'altra classificazione è basata invece sulla loro differente struttura e prevede otto classi delle quali cinque secrete e tre legate alla membrana cellulare.

A livello strutturale presentano: un peptide segnale che dirige l'enzima verso il Reticolo Endoplasmatico; un pro-peptide contenente un gruppo -SH che interagisce con lo zinco mantenendo l'enzima in forma zimogenica; e un dominio catalitico con un sito legante lo zinco. Tutte le MMP, ad eccezione delle matrilisine 1 e 2, rispettivamente MMP-7 e MMP-26, sono caratterizzate oltre che da questa struttura base anche da un dominio hemopexin-like, legato mediante un ponte disolfuro al dominio catalitico. La funzione di tale dominio, noto anche come struttura archetipo, è quella di mediare le interazioni con gli inibitori tissutali, con le molecole di superficie e con i substrati proteolitici.

Sebbene le MMP svolgano un ruolo fondamentale in svariati processi fisiologici, quali embriogenesi, angiogenesi e rimodellamento tissutale, numerosi dati in letteratura, da anni ne evidenziano un'importanza rilevante in differenti condizioni patologiche, ad esempio quelle che interessano il sistema cardiovascolare, dove un aumento dell'espressione e dell'attività proteolitica delle MMP (es. MMP-2 e MMP-9) in associazione ad un'alterazione della risposta infiammatoria contribuiscono all'evoluzione e progressione delle stesse patologie.

In questo contesto, la MMP-2 è una proteina non glicosilata di 72 kDa che in seguito all'attivazione, con rimozione del pro-peptide, diventa di 66 kDa. È espressa prevalentemente da fibroblasti, cellule endoteliali e cellule epiteliali. Nel plasma circola come monomero, e la sua attivazione è promossa da TNF- α mentre è inibita da INF- τ . Tra i substrati specifici della MMP-2, comuni anche alla MMP-9, troviamo ad esempio la gelatina, l'elastina e il collagene di tipo IV.

La MMP-9 è una glicoproteina di 92 kDa, presentante siti di N- e O-glicosilazione. È espressa da numerosi tipi cellulari, tra cui leucociti, cellule endoteliali e cellule trasformate. La sua attivazione avviene ad opera della MMP-3 oppure può essere attivata mediante un processo autocatalitico. Nel plasma circola come monomero (92 kDa), o complessata alla lipocalina neutrofila - NGAL (130 kDa), o come dimeri e multidimeri che avranno un differente peso molecolare.

Lo studio delle MMP in campioni biologici (sangue intero, siero, plasma, essudato ulceroso, e liquido interstiziale/linfa), rappresenta uno step fondamentale per la comprensione dei loro specifici meccanismi di azione, e di tutte le possibili modificazioni post-traduzionali (attivazione/inibizione, de/glicosilazione, de/fosforilazione) che potrebbero modularne l'attività sia in condizioni fisiologiche, sia patologiche.

OBIETTIVI DELLA RICERCA

L'obiettivo del progetto di ricerca prevede:

1. Studio di una nuova metodica di estrazione delle MMP-2 e MMP-9 e relative isoforme da sangue intero capillare di soggetti sani basata sulla tecnica originale di Makowski GS., et al. 1996, sfruttando l'elettroforesi su substrato di gelatina (zimografia).
2. Valutazione delle modificazioni post-traduzionali delle gelatinasi MMP-2 e MMP-9 mediante saggi di attivazione/inibizione da 4-amminofenilmercurio acetato/chelanti del calcio e zinco; deglicosilazione enzimaticamente indotta dal trattamento con neuraminidasi, PNGasi F, O-glicosidasi; de/fosforilazione da PKC/fosfatasi alcalina.
3. Isolamento delle MMP da campioni biologici sfruttando la metodica della cromatografia di affinità su mini-colonna cromatografica.
4. Determinazione quantitativa dei livelli di MMP in campioni biologici da pazienti affetti da diverse malattie cardiovascolari (es. malattia venosa cronica, linfedema) prima e dopo specifici trattamenti terapeutici. La determinazione delle MMP verrà eseguita attraverso la tecnica MULTIPLEX, immunodosaggio magnetico multiplo in sospensione.

METODI

La zimografia su substrato di gelatina rappresenta il gold standard per la determinazione qualitativa e semi-quantitativa delle isoforme di gelatinasi MMP-2 e -9. Si tratta di una tecnica elettroforetica su gel di poliacrilamide che permette di determinare la presenza di proteasi in un campione, mediante

l'idrolisi del substrato specifico incorporato nel gel. La corsa elettroforetica viene condotta in condizioni denaturanti (uso di un detergente anionico, l'SDS), non riducenti (non viene utilizzato il β -mercaptoetanolo) e senza sottoporre i campioni a bollitura. Al termine della corsa elettroforetica il gel viene sottoposto a lavaggi con un detergente non ionico, TRITON X-100, per rimuovere l'SDS presente e rinaturare parzialmente l'enzima; il gel viene successivamente incubato a 37 °C, per 18-24 h in uno specifico refolding buffer, creando le condizioni ottimali per l'attività delle proteasi.

La cromatografia con mini-spin è una tecnica cromatografica di affinità che utilizza delle mini-colonne cromatografiche impaccate con un substrato specifico per gli enzimi che si intendono isolare (gelatina, nel caso delle gelatinasi).

L'immunodosaggio magnetico multiplo in sospensione è una tecnologia che consente il dosaggio in sospensione di analiti multipli, utilizzando delle beads magnetiche in polistirene dotate all'interno di uno specifico marcatore fluorescente e coniugate con anticorpi monoclonali specifici per le proteine target, alle quali si legheranno anticorpi secondari biotinilati. Il segnale di fluorescenza che si ottiene è dovuto all'interazione tra streptavidina-ficoeritrina e biotina, e sarà inoltre proporzionale alla concentrazione di analita presente.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Altieri P, Brunelli C, Garibaldi S, Nicolino A, Ubaldi S, Spallarossa P, Olivotti L, Rossettin P, Barsotti A, Ghigliotti G. Metalloproteinases 2 and 9 are increased in plasma of patients with heart failure. *Eur J Clin Invest.* 2003; 33(8):648-56.

Andrew C. Newby. Metalloproteinase Expression in Monocytes and Macrophages and its Relationship to Atherosclerotic Plaque Instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28(12):2108-14

Hu X, Beeton C. Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. *J Vis Exp.* 2010;(45). pii: 2445

Makowski GS, Ramsby ML. Calibrating Gelatin Zymograms with Human Gelatinase Standards. *Anal Biochem.* 1996;236(2):353-6.

Opdenakker G, Masure S, Proost P, Billiau A, van Damme J. Natural human monocyte gelatinase and its inhibitor. *FEBS Lett.* 1991; 284:73-78.

Rossano R, Larocca M, Riviello L, Coniglio MG, Vandooren J, Liuzzi GM, Opdenakker G, Riccio P. Heterogeneity of serum gelatinases MMP-2 and MMP-9 isoforms and charge variants. *J Cell Mol Med.* 2014; 18(2):242-52.

Sariahmetoglu M, Skrzypiec-Spring M, Youssef N, Jacob-Ferreira ALB, Sawicka J, Holmes C, Sawicki G, Schulz R. Phosphorylation status of matrix metalloproteinase 2 in myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Heart*. 2012;98(8):656-62.

Sbardella D1, Fasciglione GF, Gioia M, Ciaccio C, Tundo GR, Marini S, Coletta M. Human matrix metalloproteinases: an ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. *Mol Aspects Med*. 2012; 33(2):119-208.

Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2002; 37(6): 375-536.

Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013; 48(3):222-72.

Visse R., Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.*;92(8):827-39. (2003)

LUOGO E DATA

URBINO 18/02/19