



STUDI STRUTTURALI E FUNZIONALI DEL RECETTORE CD93

CD93 è una proteina transmembrana espressa prevalentemente sulle cellule endoteliali. Recentemente è stato dimostrato che l'inibizione della funzione di CD93 è una strategia utile per trattamenti anti-angiogenici e oncoterapia. I nostri studi hanno chiarito la struttura 3D di CD93 e dimostrato che la proteina in forma di dimero aumenta il suo legame per la matrice extracellulare.

Introduzione

CD93 è una proteina transmembrana del gruppo 14 della superfamiglia C-type lectin-like domain (CTLD), che include anche endosialin/CD248, trombomodulina e CLEC14A [1]. CD93, dall'N- al C-terminale, è costituita da un dominio CTLD, un dominio sushi, cinque domini EGF-like, una regione mucin-like fortemente glicosilata, un dominio transmembrana e un breve dominio citoplasmatico (Fig. 1) [2].

CD93 svolge un ruolo chiave nel regolare la funzione delle cellule endoteliali e, di conseguenza,

l'angiogenesi [3-5]. CD93 regola una via di segnalazione che promuove selettivamente il rimodellamento del citoscheletro e la migrazione delle cellule endoteliali [6, 7]. Questo recettore è inoltre iper-espresso nei vasi tumorali ma non nei vasi quiescenti dei tessuti sani [4, 8, 9]. Pertanto, bloccare l'attivazione del segnale mediata dal CD93 è una strategia potenzialmente sfruttabile in trattamenti anti-angiogenici e in oncoterapia [10-13].

CD93 interagisce con la glicoproteina Multimerin-2 della matrice extracellulare e questa interazione promuove la migrazione delle cellule endoteliali e il rimodellamento vascolare [2, 10, 14-16]. Tuttavia, i meccanismi molecolari con cui CD93 interagisce con la matrice extracellulare attivando le vie di segnalazione coinvolte nell'angiogenesi non sono stati ancora completamente chiariti. I nostri studi si sono focalizzati sulla struttura 3D di CD93 e hanno dimostrato che nelle cellule endoteliali CD93 forma un dimero che è funzionale all'interazione con la proteina Multimerin-2 [17]. Inoltre è stata descritta per la prima volta la struttura della regione CTLD-sushi di CD93 e valutato il ruolo fondamentale di questi domini nella dimerizzazione [17].

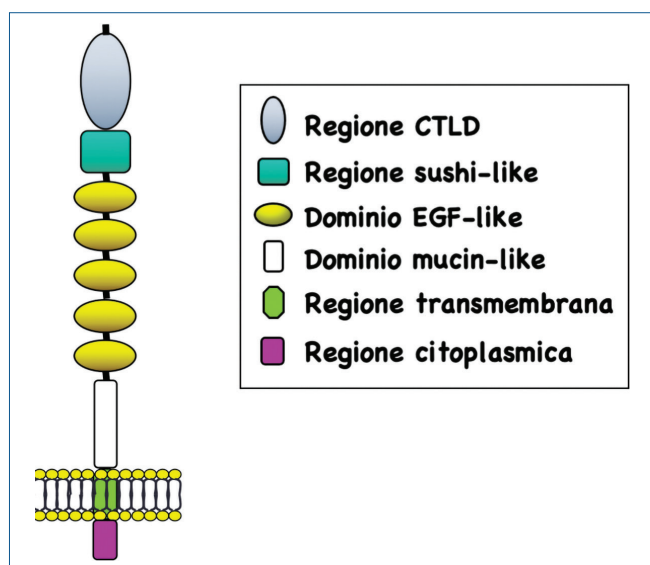


Fig. 1 - Struttura schematica dei domini di CD93

Dimerizzazione di CD93 ed interazione con Multimerin-2

Alcuni membri della superfamiglia CTLD sono in grado di formare dimeri funzionali attraverso l'interazione delle loro regioni CTLD [1]. Il processo

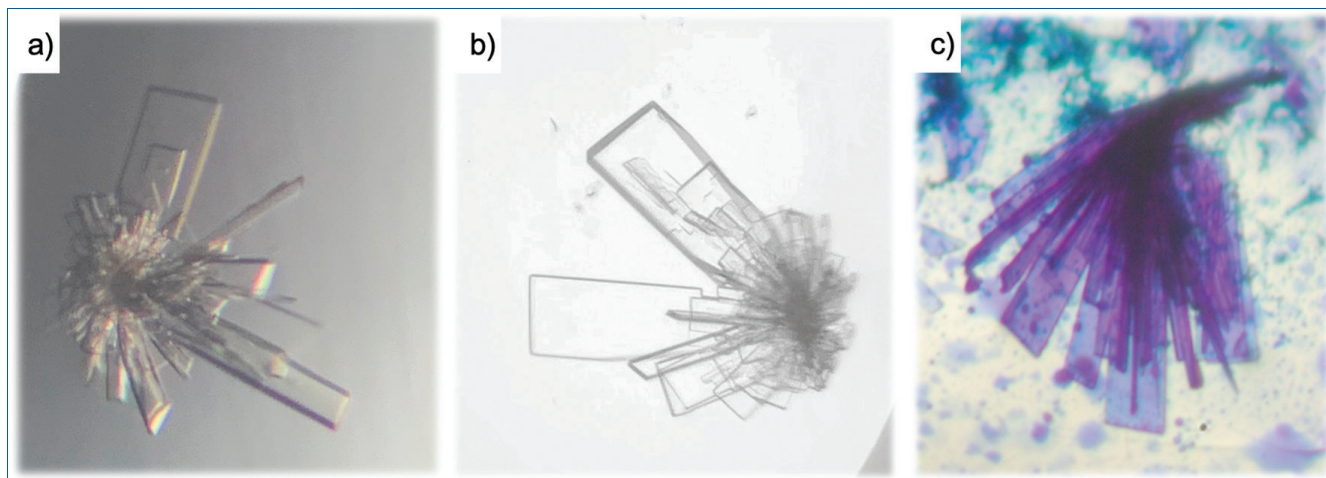


Fig. 2 - a,b) Cristalli della proteina ricombinante D1X-pr; c) cristalli sottoposti a colorazione con IZIT (Hampton Research), colorante selettivo per cristalli di macromolecole biologiche

di dimerizzazione e il suo ruolo funzionale è stato quindi valutato anche per il recettore CD93 [2, 17]. In particolare, i nostri studi hanno dimostrato che CD93 è in grado di formare dimeri sulla superficie delle cellule endoteliali, funzionali all'interazione con la proteina Multimerin-2 [17]. Analisi di Western blotting hanno infatti mostrato che CD93 forma dimeri e che la regione CTLD è necessaria per la dimerizzazione in quanto, in seguito alla sua delezione, i mutanti perdono completamente la capacità di dimerizzare. Questi risultati sono stati anche confermati da analisi di FRET che hanno dimostrato che CD93 forma dimeri non solo in soluzione ma anche sulla superficie delle cellule endoteliali [17]. Poiché l'interazione fra CD93 e Multimerin-2 è fondamentale per la corretta migrazione delle cellule endoteliali [2], il nostro studio si è focalizzato sulla caratterizzazione del ruolo della dimerizzazione di CD93 e l'interazione con Multimerin-2 [17]. La regione extracellulare di CD93 è stata prodotta in cellule eucariotiche e purificata mediante cromatografia di affinità a metalli (IMAC) e cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC), ottenendo un'efficace separazione di monomeri e dimeri. I nostri studi hanno quindi dimostrato che i dimeri di CD93 hanno un'affinità molto più elevata per Multimerin-2 rispetto alla forma monomerica.

Produzione delle regioni CTLD-sushi di CD93 in cellule procariotiche

Per ottenere maggiori informazioni strutturali e funzionali su CD93 e sul processo di dimerizzazione,

la sequenza codificante per le regioni funzionali CTLD-sushi è stata espressa in cellule batteriche (D1X-pr) e grandi quantità di proteina ricombinante pura e omogenea sono state ottenute dalle successive fasi di purificazione mediante IMAC e SEC [17]. L'analisi Western blotting, utilizzando un anticorpo che riconosce un epitopo conformazionale, ha dimostrato che D1X-pr assume la stessa struttura della proteina espressa in cellule eucariotiche (D1X-His). Inoltre, è stato osservato che entrambe le proteine D1X formano strutture dimeriche e, mediante co-immunoprecipitazione, è stato confermato il riconoscimento di Multimerin-2 da parte di D1X-pr, soprattutto nella sua forma dimerica, analogamente a quanto mostrato dalla proteina espressa in cellule eucariotiche (D1X-His). I risultati di questi studi hanno permesso di validare l'utilizzo della proteina ricombinante D1X-pr per studi strutturali.

Caratterizzazione strutturale della regione CTLD-sushi di CD93

La proteina ricombinante D1X-pr è stata impiegata per studi strutturali che ci hanno permesso di descrivere per la prima volta la struttura della regione CTLD-sushi di CD93 [17]. D1X-pr è stata cristallizzata a temperatura ambiente con il metodo di diffusione di vapore (sitting drop), utilizzando ammonio e litio solfato come agenti precipitanti [17]. I cristalli ottenuti (Fig. 2), sono stati sottoposti ad esperimenti di diffrazione a raggi X presso il sincrotrone Diamond Light Source (UK).

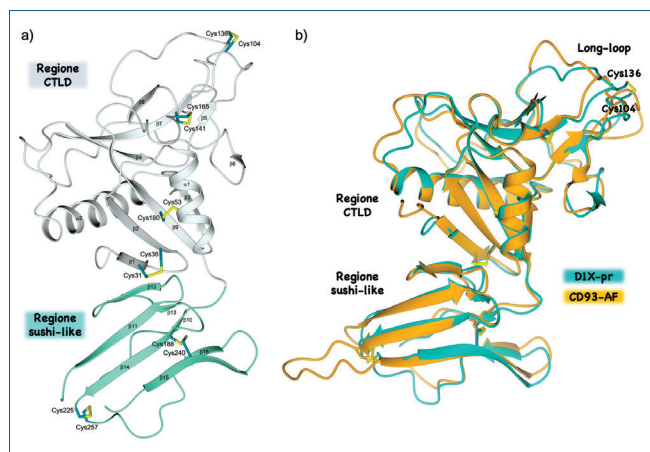


Fig. 3 - a) Struttura cristallografica di D1x-pr (codice PDB: 8A59 [17]). La regione CTLD è colorata in grigio e la regione sushi in azzurro. I residui di cisteina responsabili della formazione di quattro ponti disolfuro nella regione CTLD e due nella regione sushi sono evidenziati in sticks; b) confronto strutturale fra la struttura cristallografica di D1x-pr e il modello predetto da AlphaFold2 (CD93-AF) [19, 20]. La regione con maggiori differenze è il long-loop, che svolge un ruolo chiave nell'interazione con Multimerin-2. La conformazione del long-loop è stabilizzata dal ponte disolfuro C104-C136

La struttura di D1X-pr è stata determinata ad una risoluzione di 1,92 Å [17], attraverso la suite CCP4 [18]. La mancanza di modelli strutturali omologhi a CD93 (nessuna struttura di proteine del gruppo 14 era stata precedentemente riportata in letteratura) è stata superata mediante un approccio alternativo basato sull'utilizzo del modello strutturale di CD93 previsto da AlphaFold2 (codice: AF-Q9NYP3-F1) [19, 20]. La struttura ottenuta è stata infine affinata e validata ed è pubblicamente accessibile attraverso il Protein Data Bank (PDB; www.rcsb.org), codice 8A59 [17]. L'analisi cristallografica mostra che l'unità asimmetrica cristallina (ASU) contiene una singola catena di D1X-pr, completamente ricostruita dall'amminoacido 26 al 257, ad eccezione dei segmenti 193-196 e 226-234 che sono altamente flessibili (Fig. 3a). La regione CTLD (residui 1-186) si ripiega in due foglietti-β antiparalleli e due alfa-eliche, presentando la struttura tipica di questi domini [1] (Fig. 3a). La regione sushi (residui 187-257) ha una struttura interamente β, ripiegata in due foglietti β (Fig. 3a). La struttura di D1X-pr è caratterizzata da sei ponti disolfuro intramolecolari distribuiti su entrambi i domini della proteina. Nella regione CTLD sono presenti sei residui di cisteina che formano tre ponti disolfuro altamente conservati (C31-C36, C53-C180 e C141-C165). La re-

gione CTLD di CD93 è inoltre caratterizzata da un quarto ponte disolfuro, formato dai residui C104 e C136, che blocca la porzione apicale del long-loop fra i filamenti β5, β6 e β7 (Fig. 3a). La regione sushi include i rimanenti quattro residui di cisteina che formano due ponti disolfuro (C188-C240 e C225-C257) peculiari di questo dominio (Fig. 3a). La struttura cristallografica di D1x-pr è stata successivamente confrontata con il modello strutturale della regione CTLD-sushi predetto da AlphaFold2 (CD93-AF) [19, 20]. Il confronto mostra che il modello predetto è abbastanza coerente con l'osservazione strutturale (Fig. 3c), anche se differenze rilevanti sono state osservate nella conformazione del *long-loop* che collega i filamenti β5, β6 e β7 (Fig. 3b). Il *long-loop* è una regione caratterizzante le proteine di classe 14 e svolge un ruolo fondamentale nell'interazione con la proteina Multimerin-2.

Evidenze strutturali della dimerizzazione di CD93

L'analisi strutturale mostra che D1X-pr acquisisce una struttura dimerica, generata da simmetria binaria (Fig. 4a) [17]. Le metà del dimero sono disposte in modo antiparallelo con il CTLD di una subunità rivolto verso la regione sushi della partner (Fig. 4a). L'area di contatto fra le subunità si estende sull'intera struttura di D1X-pr, creando un'interfaccia di ~1003 Å² caratterizzata da aree esterne di natura idrofobica e da una regione centrale idrofila (Fig. 4a).

Per convalidare la rilevanza funzionale dell'assemblaggio dimerico osservato nella struttura cristallografica, abbiamo costruito un potenziale modello del dimero dell'intero dominio extracellulare di CD93, utilizzando la struttura predetta da AlphaFold2 [19, 20], CD93-AF (Fig. 4b). Il modello CD93-AF ha una buona confidenza di predizione nelle regioni CTLD-sushi e nei cinque domini EGF-like, mentre la successiva regione mucin-like ha scarsa confidenza e non è stata pertanto considerata. Il modello del dimero di CD93-AF è stato costruito sovrapponendo due unità proteiche alla struttura cristallografica del dimero di D1X-pr (Fig. 4b). Il modello risultante evidenzia che la regione extracellulare di CD93 può generare un dimero mediante l'interazione antiparallela tra il CTLD e la

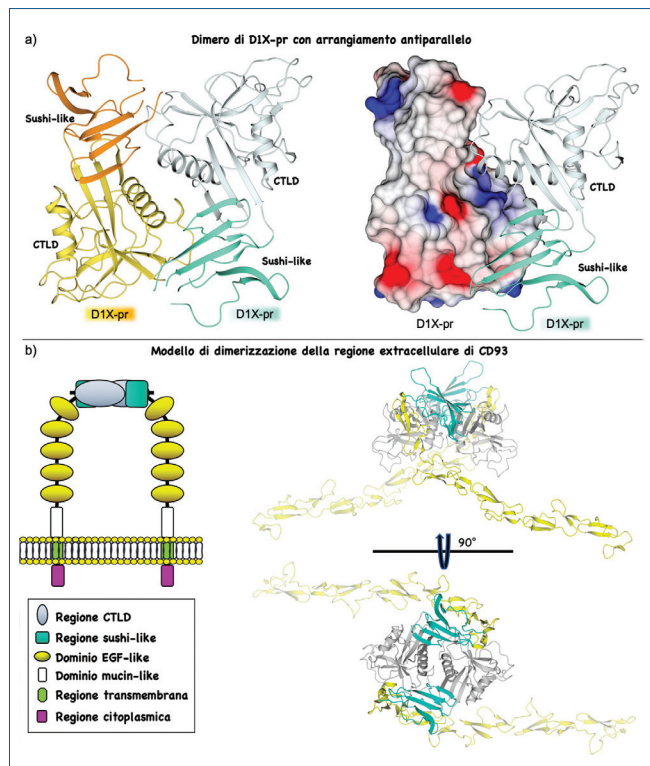


Fig. 4 - a) Struttura dimerica di D1X-pr con arrangiamento antiparallelo delle subunità: il CTLD di una subunità (in grigio e giallo) è rivolto verso la regione sushi (in azzurro e arancione) della partner. L'interfaccia è caratterizzata da aree esterne di natura idrofobica e da una regione centrale idrofila; b) modello di dimerizzazione dell'intero dominio extracellulare di CD93. Il modello strutturale dimerico è stato costruito sovrapponendo due unità proteiche del dominio extracellulare del modello predetto da AlphaFold2 (CD93-AF) [19, 20] alla struttura cristallografica del dimero di D1X-pr (codice PDB: 8A59 [17]), avente arrangiamento antiparallelo delle subunità. Il modello del dominio extracellulare include solo le regioni CTLD-sushi e i cinque domini EGF-like, aventi buona confidenza di predizione

regione sushi di due unità adiacenti (Fig. 4b), consolidando il ruolo funzionale del dimero osservato nella struttura cristallografica di D1X-pr. I risultati ottenuti forniscono pertanto nuove informazioni chiave per la caratterizzazione funzionale di CD93 e per la futura progettazione di nuovi farmaci che possano bloccare la funzione.

BIBLIOGRAFIA

- [1] A.N. Zelensky, J.E. Gready, *FEBS J.*, 2005, **272**, 6179.
- [2] F. Galvagni, F. Nardi *et al.*, *Matrix Biol.*, 2017, **64**, 112.
- [3] K.A. Khan, J.L. McMurray *et al.*, *FEBS J.*, 2019, **286**, 3299.

- [4] E. Langenkamp, L. Zhang *et al.*, *Cancer Res.*, 2015, **75**, 4504.
- [5] M. Orlandini, F. Galvagni *et al.*, *Oncotarget*, 2014, **5**, 2750.
- [6] S. Barbera, R. Lugano *et al.*, *Matrix Biol.*, 2021, **99**, 1.
- [7] S. Barbera, L. Raucci *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, **22**, 12417.
- [8] R.S. Olsen, M. Lindh *et al.*, *Int. J. Colorectal Dis.*, 2015, **30**, 883.
- [9] L. Bao, M. Tang *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2016, **476**, 467.
- [10] Y. Sun, W. Chen *et al.*, *Sci. Transl. Med.*, 2021, **13**, eabc8922.
- [11] W. Tong, G. Wang *et al.*, *Front. Mol. Biosci.*, 2022, **8**, 793445.
- [12] Z. Zhang, M. Zheng *et al.*, *Front. Cell. Dev. Biol.*, 2022, **10**, 817965.
- [13] G.M. Tosi, E. Caldi *et al.*, *J. Cell. Physiol.*, 2017, **232**, 1767.
- [14] K.A. Khan, A.J. Naylor *et al.*, *Oncogene*, 2017, **36**, 6097.
- [15] R. Pellicani, E. Poletto *et al.*, *Matrix Biol.*, 2020, **87**, 11.
- [16] R. Lugano, K. Vemuri *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 2018, **128**, 3280.
- [17] S. Barbera, L. Raucci *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2023, **224**, 453.
- [18] Collaborative Computational Project, Number 4, *Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr.*, 1994, **50**, 760.
- [19] J. Jumper, R. Evans *et al.*, *Nature*, 2021, **596**, 583.
- [20] M. Varadi, S. Anyango *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2022, **50**, D439.

Structural and Functional Studies of the Receptor CD93

CD93 is a transmembrane protein preferentially expressed on the surface of endothelial cells. Recently, it has been demonstrated that blocking the signal activation by CD93 is a useful tool in antiangiogenic treatment and oncotherapy. Our studies unveil the 3D structure of CD93 and demonstrate that CD93, arranged as dimer, increases its binding to the extracellular matrix.