



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Istituto Scienze dell'Alimentazione

Institute of Food Sciences

RELAZIONE SCIENTIFICA SHORT TERM MOBILITY

Dal 25/06/2011 al 18/07/2011

Proponente/Fruitore: Gian Luigi Russo

Istituto di afferenza del Fruitore: Istituto Scienze dell'Alimentazione, CNR

Programma di ricerca svolto Espressione della chinasi ZAP-70 e delle fosfatasi Sts-1 e Sts-2 nella leucemia linfocitica cronica: ruolo regolativo di composti fenolici presenti nella dieta

Istituzione ospitante: School of Medicine, Department of Molecular Genetics and Microbiology, Stony Brook State University of New York, New York, USA

Ricercatore Ospitante: dr. Nicholas Carpino

Il gruppo del Dr. Carpino è leader nello studio della del T-cell receptor (TCR) la cui attivazione/deattivazione regola la risposta immunitaria. Di recente, il dr. Carpino ha descritto una nuova regolazione del TCR ad opera di fosfatasi che agirebbero a livello della chinasi ZAP-70 (Mol Immunol. 2009; 46:3224-31). Le due fosfatasi coinvolte in tale processo sono Sts-1 and Sts-2 (Suppressor of TCR Signaling) appartenenti a una famiglia di proteine caratterizzata da una struttura tripartita unica composta da una regione N-terminale UBA che lega l'ubiquitina, un dominio centrale SH3 (*Src* omologia 3) per l'interazioni proteina-proteina, e un dominio PGM (fosfoglicerato mutasi) C-terminale trovato in un gruppo di enzimi strutturalmente correlati che sono noti agire come fosfatasi o phosphotransferasi. Il gruppo del dr. Carpino ha dimostrato che entrambe le fosfatasi sono in grado di defosforilare residui di tirosina che regolano l'attività chinastica di ZAP-70. Inoltre, linfociti-T periferici isolati da topi ingegnerizzati per mancanza di entrambe le fosfatasi Sts-1 e Sts-2 (Sts-1/2^{-/-}) mostrano aumentata fosforilazione di ZAP-70 con conseguente iper-stimolazione del TCR, a conferma del ruolo di regolatore negativo di Sts-1 e Sts-2 nelle vie di trasduzione del segnale dipendenti dal TCR (Immunity 2004; 20:37-46; Mol. Cell 2007; 27:486-497).

La leucemia linfocitica cronica (CLL) è un tumore maligno delle cellule B causata da accumulo di linfociti B CD5+ nel sangue, midollo osseo, linfonodi e milza. Il livello di mutazione delle catene pesanti delle immunoglobuline (IgV_H) nelle B-CLL rappresenta un importante fattore prognostico nell'evoluzione della patologia. Pazienti con geni IgV_H non mutati presentano una significativa ridotta sopravvivenza (9 anni), rispetto a soggetti con mutazione nei geni IgV_H (più di 24 anni). Si è quindi tentato di individuare potenziali marcatori da associare allo stato di mutazione delle IgV_H. Studi di espressione genica

hanno evidenziato che l'elevata espressione di ZAP-70 è associata ad una più rapida progressione della malattia e una ridotta sopravvivenza (Blood Reviews 2009; 23:25–47).

Il gruppo di ricerca presso l'ISA-CNR di Avellino diretto dal Fruitore della presente STM si occupa da tempo del ruolo di molecole naturali nella terapia di forme leucemiche resistenti alla chemioterapia tradizionale (Leukemia. 2007; 21:1130-3; Oncogene. 2003; 22:3330-4). Recentemente, lo stesso gruppo ha dimostrato che la quercetina, un flavonoide largamente presente in frutta, verdura ed alcune bevande, è capace di migliorare l'effetto terapeutico di farmaci tradizionali (fludarabina) o innovativi (induttori dei recettori TRAIL e CD95) in un modello sperimentale rappresentato da cellule B isolate da pazienti affetti da CLL (British J Cancer 2010; 103:642-648; British J Cancer 2011; 105:221-30). Inoltre, dati di letteratura indicano che alcuni polifenoli quali genisteina e EGCG sono in grado di modulare l'attività chinasi di ZAP-70 nelle CLL (Cancer Immunol Immunother 2007; 56:501–514; J. Biol. Chem. 2008; 283: 28370–9).

Sulla base di queste premesse, nel novembre 2010 il Fruitore ha beneficiato di una STM finalizzata ad esprimere in batteri (*E. coli*) i domini PGM (*phosphoglycerate mutase-like domain*) delle fosfatasi Sts-1 e Sts-2 al fine di produrre anticorpi monoclonali. Tale reagente è di primaria importanza per lo studio della regolazione di ZAP-70 ad opera di Sts-1 e Sts-2 nelle CLL anche in relazione al trattamento con quercetina ed altri polifenoli. Infatti, la misura dei livelli di attività fosfatasi di Sts-1 e Sts-2 nei lisati cellulari derivati da cellule-B isolate da CLL e disponibili presso l'ISA-CNR richiede l'immunoprecipitazione, utilizzando anticorpi specifici diretti contro le due fosfatasi. Purtroppo, sebbene gli obiettivi della precedente STM sono stati ampiamente conseguiti (si veda relazione scientifica presentata a conclusione del soggiorno), gli anticorpi monoclonali ottenuti dalla *Precision Antibody*; A&G Pharmaceutical, Inc., ditta statunitense specializzata, si sono mostrati efficaci nell'immunoprecipitare la proteina Sts-2 murina, ma non l'omologo umano (Fig. 1A), né i due cloni 3D3 e 4D5 riconoscevano i due antigeni, umano e murino, nei rispettivi lisati cellulari (immunoblotting; Fig. 1B).

Nei mesi intercorsi tra la due STM, i colleghi della Stony Brook University presso il laboratorio del dr. Carpino hanno completato il clonaggio del dominio PGM umano della fosfatasi Sts-2 nel vettore di espressione batterico pMALTM (New England Biolabs) che genera un prodotto di fusione rappresentata dalla proteina che lega il maltosio (MBP) all'N-terminale dell'antigene d'interesse. Pertanto, il clone a disposizione, pMAL-*HuSts-2*_{PGM} è stato espresso in *E. coli* dopo induzione con IPTG. La purificazione è avvenuta mediante resina di affinità rappresentata da amilosio legato covalentemente ad una matrice di agarosio (New England Biolabs). Il sistema sfrutta la capacità dell'MBP di legare l'amilosio. La proteina di fusione è rilasciata mediante eluizione con maltosio che "spiazza" il legame MBP-amilosio. Le frazioni purificate contenenti MBP-*HuSts-2*_{PGM} sono mostrate

in Fig. 2. Poichè, lo screening degli anticorpi prodotti dai topi richiede antigene “puro” da utilizzare nei saggi ELISA, l'ultima parte del soggiorno è stata dedicata ad ottenere antigeni “liberi” dall'MBP. Pertanto, un'aliquota della proteina MBP-*HuSts-2_{PGM}* mostrata in Fig. 2 è stata sottoposte a digestione enzimatica con la proteasi *Factor Xa* in grado di scindere il legame covalente esistente tra l'MBP e l'antigene d'interesse. Ciò è possibile in quanto il vettore pMAL è ingegnerizzato in maniera tale da porre a valle del gene codificante per l'MBP e a monte di quello d'interesse una sequenza di *cleavage* per il *Factor Xa* (New England Biolabs). In tal modo, si è ottenuta la proteina clonata *HuSts-2_{PGM}* “libera” dal *carrier* MBP, la cui purificazione finale dall'MBP ha richiesto due cromatografie in successione. Nella prima, si è utilizzata una resina di idrossiapatite (BioRad) per eliminare il maltosio presente nelle frazioni eluite dalla resina di affinità amilosio-agarosio sottoposte a digestione con il *Factor Xa*. Le frazioni contenenti le proteine “libere” *HuSts-2_{PGM}* e MBP sono state separate nuovamente sulla resina amilosio-agarosio. Questa volta, *HuSts-2_{PGM}* è stata eluita con “il fronte” poiché priva della porzione MBP, mentre l'MBP libera si legava alla resina d'affinità. Il risultato finale è mostrato in Fig. 3 che evidenzia la purificazione all'omogeneità di *HuSts-2_{PGM}*. L'assenza di MBP residua nelle frazioni contenenti *HuSts-2_{PGM}* purificata è stata verificata via immunoblotting utilizzando uno anticorpo policlonale specifico (New England Biolabs) in grado di riconoscere con alta affinità l'antigene MBP. Come evidenziato in Fig. 4, nelle frazioni contenenti *HuSts-2_{PGM}* purificata all'omogeneità si evidenziava, alla massima esposizione (Fig. 3, pannello centrale), un leggero segnale attribuibile allo *spillover* dell'MBP puro dalla frazione 6M caricata nel pozzetto di destra.

Le proteine MBP-*HuSts-2_{PGM}* e *HuSts-2_{PGM}* saranno utilizzate nei prossimi mesi rispettivamente per essere iniettati nei topi e come probe nello screening degli anticorpi monoclonali prodotti dagli ibridomi.

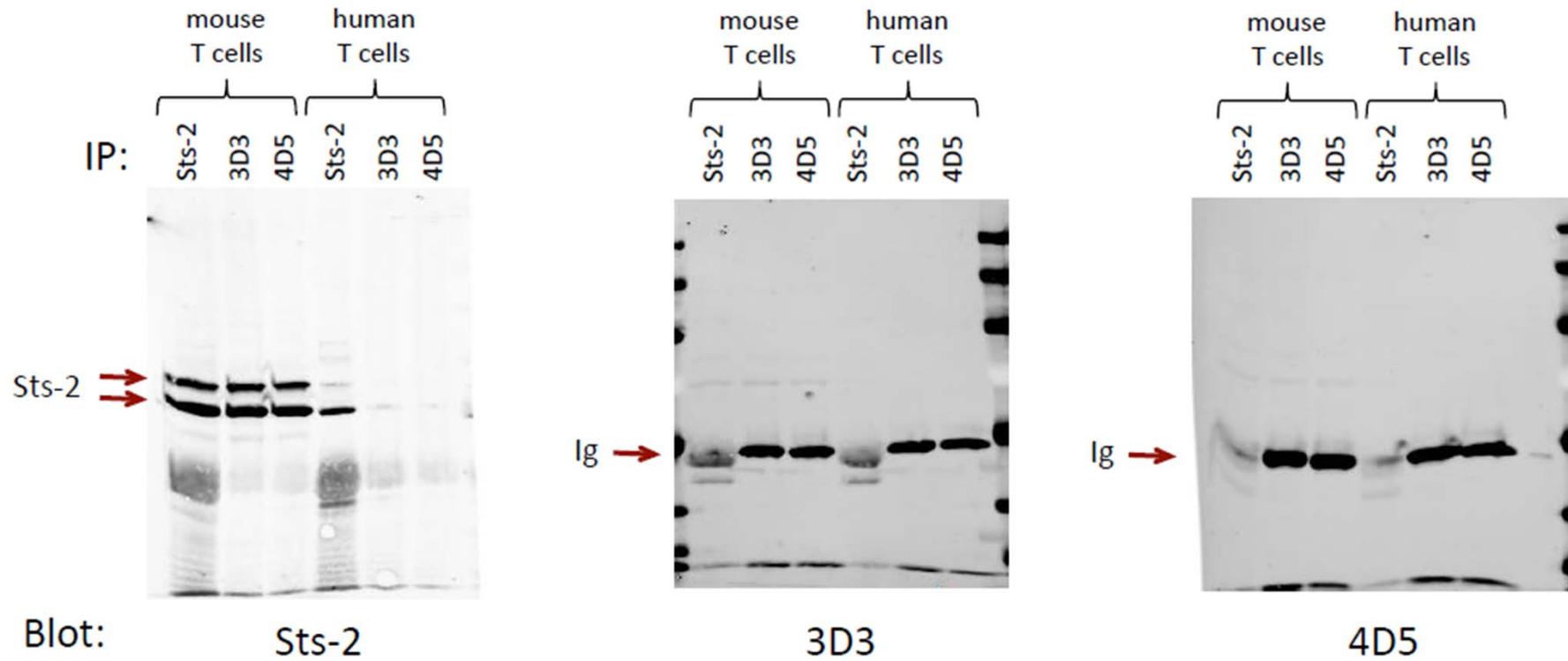
In fede,

Gian Luigi Russo

Fruitore STM



Fig. 1A



Come controllo positivo è stato utilizzato un anticorpo policlonale anti-Sts-2 indicato come **Sts-2** nella riga IP e in Blot del pannello di sinistra.

Fig. 1B

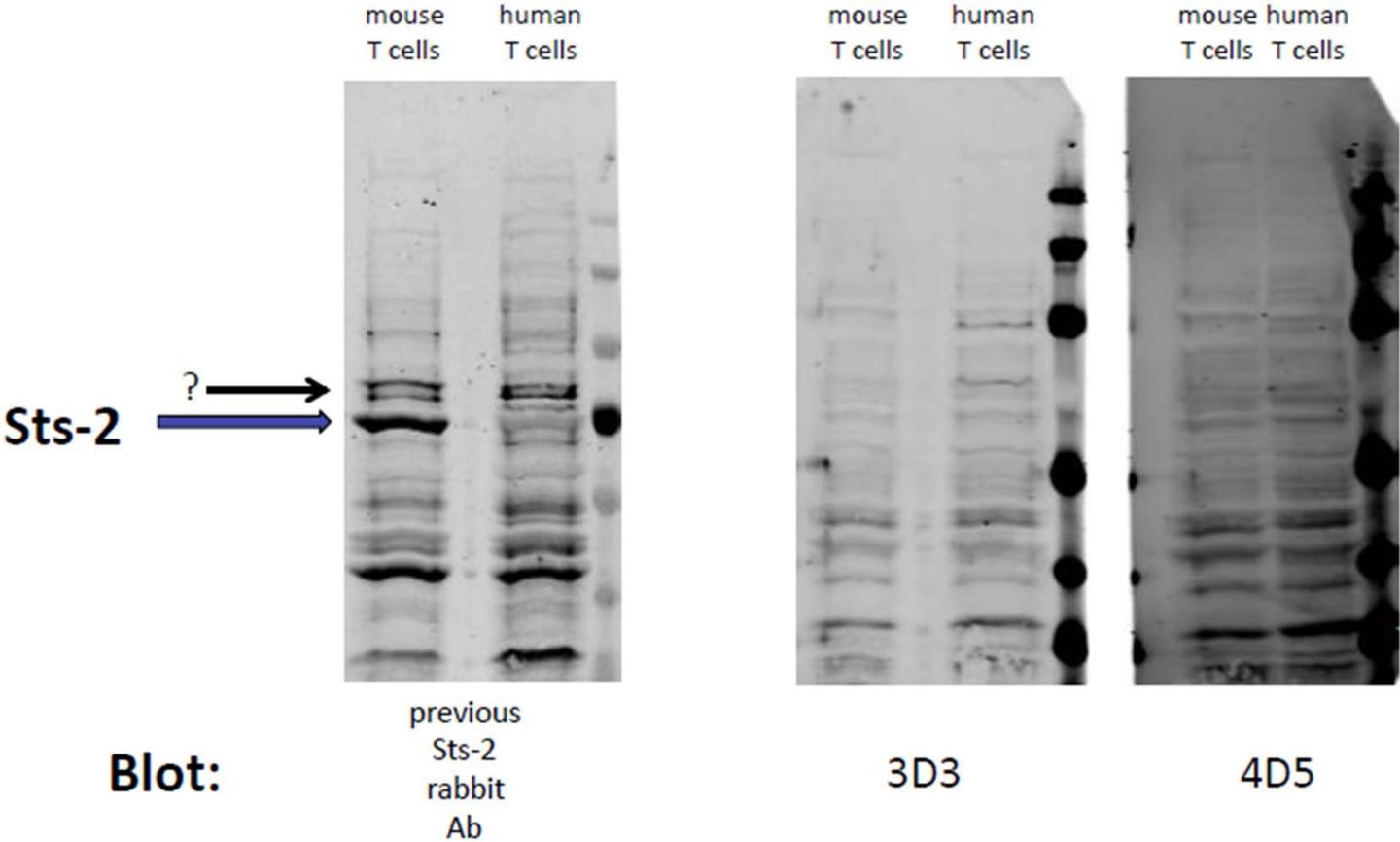


Fig. 2

MBP-*hu*STS-2_{PGM} Fusion protein
Purified on amylose resin from NEB

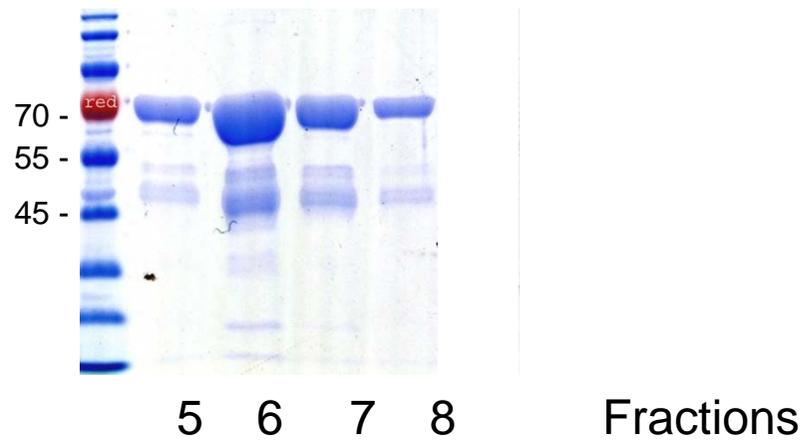


Fig. 3

Purification *huSTS-2*_{PGM} from MBP (NEB protocol: hydroxyapatite followed by amylose resin)

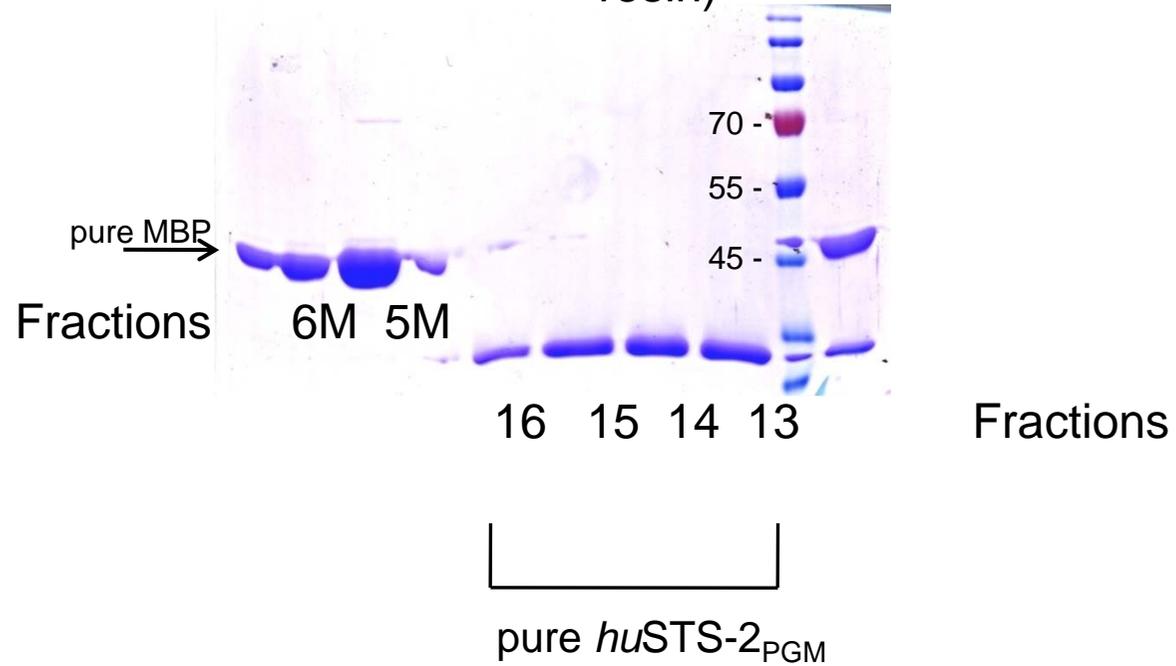


Fig. 4

