



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Istituto Scienze dell'Alimentazione

Institute of Food Sciences

## RELAZIONE SCIENTIFICA SHORT TERM MOBILITY

Dal 27/06/2015 al 19/07/2015

**Proponente/Fruitore:** Gian Luigi Russo

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

**Programma di ricerca svolto** Inibizione delle fosfatasi Sts-1 e Sts-2 da parte di composti fenolici derivati da alimenti

**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. Il dr. Carpino ha descritto per primo nel 2009 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<sup>-/-</sup>) 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).

Più di recente lo stesso gruppo di ricerca ha dimostrato che l'inattivazione funzionale di entrambi gli enzimi Sts-1/2 causa una significativa resistenza all' infezioni sistemiche da *Candida albicans*, con più del 80% di topi privi di STS-1 e -2 che mostravano una sopravvivenza a una dose di *C. albicans* ( $2,5 \times 10^5$  CFU / topo ) normalmente letale per topi wild-type entro 10 giorni (Infect Immun. 2015; 83:637-45).

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<sub>H</sub>) nelle B-CLL rappresenta un importante fattore prognostico nell'evoluzione della patologia. Pazienti con geni IgV<sub>H</sub> non



mutati presentano una significativa ridotta sopravvivenza (9 anni), rispetto a soggetti con mutazione nei geni IgV<sub>H</sub> (più di 24 anni). Si è quindi tentato di individuare potenziali marcatori da associare allo stato di mutazione delle IgV<sub>H</sub>. 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 di *death receptors*, ABT-737) 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; Biochem Pharmacol. 2013;85:927-36). 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), per cui, paradossalmente, flavonoidi naturali potrebbero risultare più efficaci nel trattamento di CLL più aggressive che presentano elevati livelli di ZAP-70. Questa condizione potrebbe essere favorita da inibitori di Sts-1/2.

Per quanto sopra detto, la ricerca di inibitori di Sts-1 e Sts-2 potrebbe trovare risvolti applicativi sia nella cura da infezioni da *C. albicans* che nelle terapie della CLL.

A tal fine, nel corso della presente STM, si è eseguito uno screening iniziale di estratti arricchiti in polifenoli da diversi alimenti (olio, vino rosso, tè verde, mela, cioccolato, cipolla rossa, melograno, ecc.) preparati presso l'ISA-CNR-Avellino valutandone la capacità di inibire l'attività di Sts-1 e Sts-2 espressi e purificati in *E. coli*. Come fonte di attività enzimatica si è utilizzato il dominio PGM (*phosphoglycerate mutase-like domain*) delle fosfatasi Sts-1 e Sts-2 clonato nel vettore di espressione batterico pMAL<sup>TM</sup> (New England Biolabs) che genera un prodotto di fusione rappresentata dalla proteina che lega il maltosio (MBP) all'N-terminale dell'antigene d'interesse. Il cloni a disposizione, pMAL-*HuSts-1*<sub>PGM</sub> e pMAL-*HuSts-2*<sub>PGM</sub>, sono stati espressi 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 (Fig. 1).

I saggi di attività fosfatasi sono stati eseguiti come descritto (J. Biol. Chem. 2011; 286: 15943–15954; Molecular Cell 2007; 27:486–497) utilizzando il PNPP (p-nitrofenil fosfato; assorbanza a 405 nm) come substrato per Sts-1 e l'OMFP (3-O-metilfluoresceina fosfato; assorbanza a 450 nm) come substrato per Sts-2.

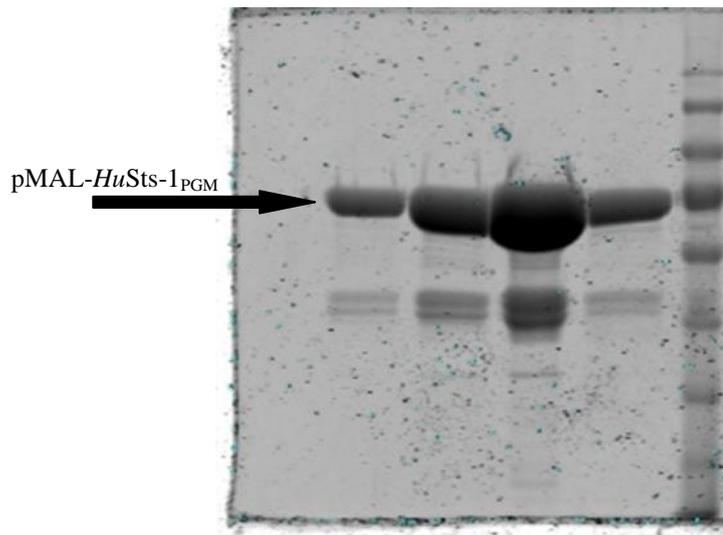
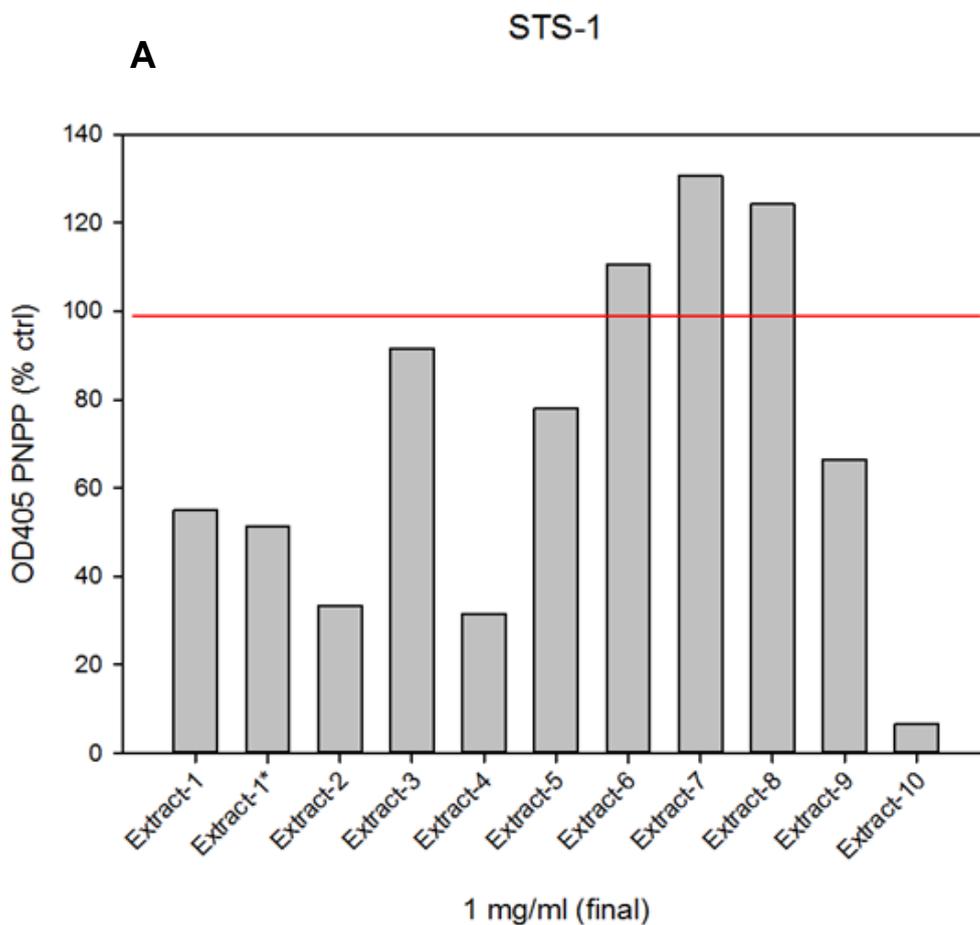


Fig. 1. Gel SDS-PAGE di frazioni eluite da resina di affinità che mostra la purificazione della proteina di fusione pMAL-*HuSts-1*<sub>PGM</sub>. Colorazione con blu di Coomassie. Analogo risultato è stato ottenuto per pMAL-*HuSts-2*<sub>PGM</sub>.

I risultati dello screening iniziale sono presentati nelle Figure 2A e 2B, rispettivamente per Sts-1 e Sts-2.



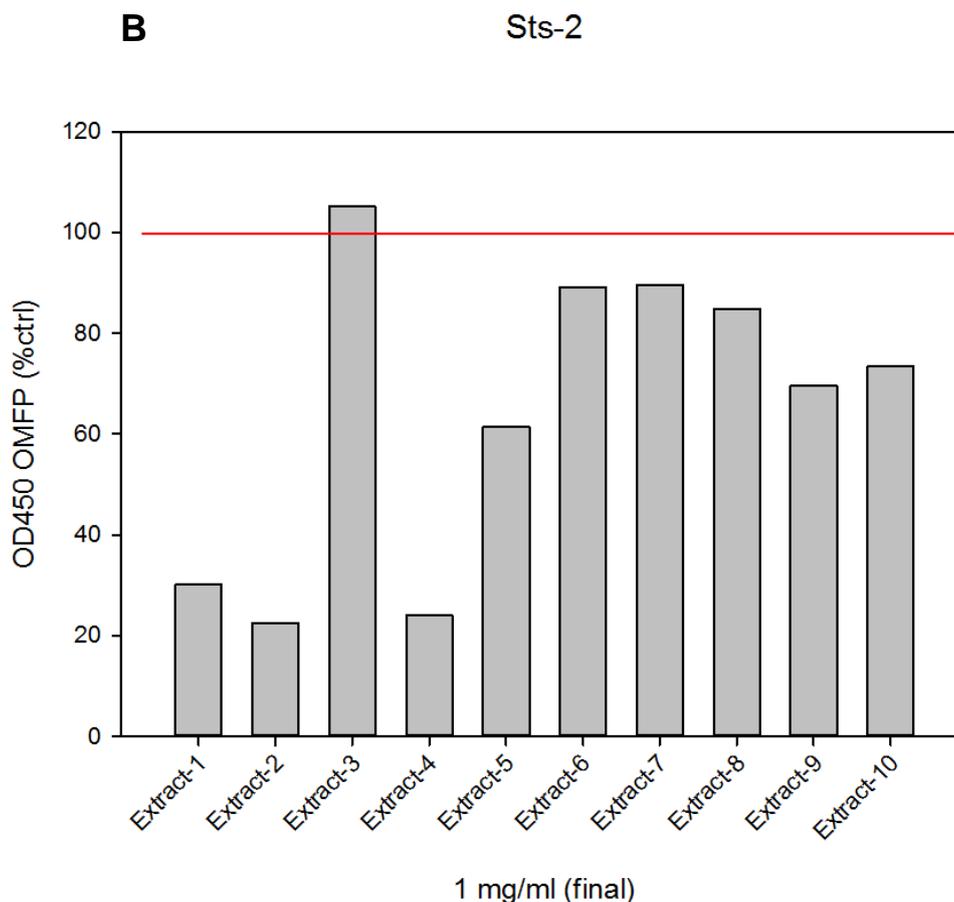


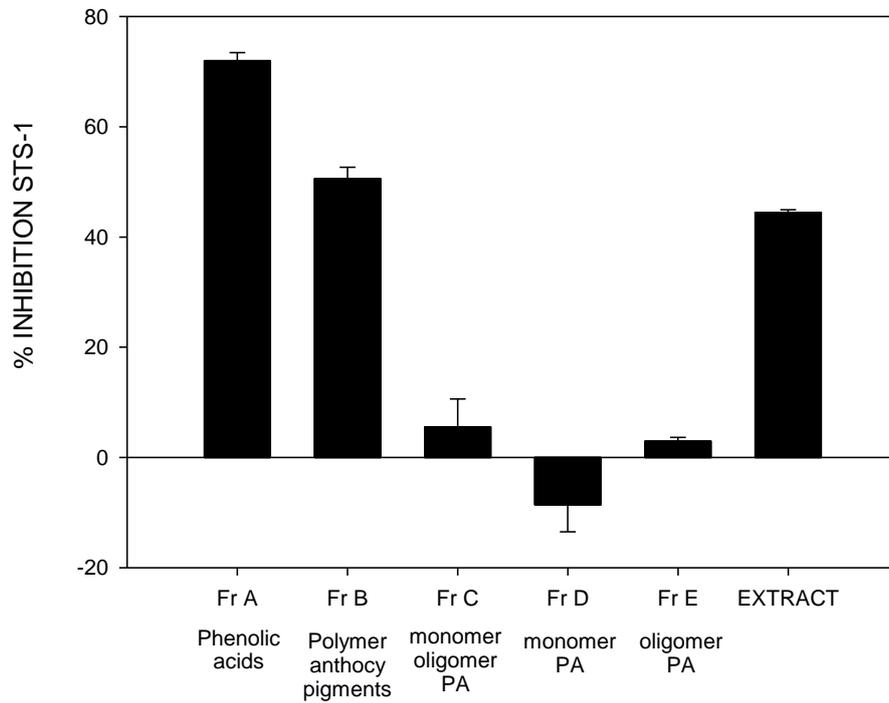
Fig. 2. Saggi *in vitro* di attività enzimatica per Sts-1 (pannello A) e Sts-2 (pannello B) in cui si è misurata la capacità di vari estratti polifenolici di inibire l'attività delle due fosfatasi. Vino rosso (Extract-1); Melograno (Extract-2); Cipolla (Extract-3); Cacao (Extract-4); Fejoia (Extract-5); Sambuco (Extract-6); Birra (Extract-7); Capperi (Extract-8); Olio d'oliva (Extract-9); Tè verde (Extract-10).

Alcuni di questi estratti sono stati selezionati per un'ulteriore purificazione. Ad esempio, utilizzando il metodo descritto da Sun et al. (J. Chromatography A, 2006; 1128:27–38), l'estratto di vino rosso che, come evidenziato in Fig. 2, era in grado di inibire l'attività di Sts-1 di circa il 65% e quella di Sts-2 di circa il 70%, è stato frazionato su colonnine Sep-Pak ottenendo una serie di frazioni arricchite nelle vari classi di composti fenolici. L'attività inibitoria di tali frazioni è stata misurata sia per Sts-1 che per Sts-2 ed è riportata in Fig. 3.

Le frazioni che hanno mostrato la più elevata attività inibitoria, ovvero la Fr. A contenente acidi fenolici e la Fr. B contenente polimeri di antocianine sono state trasferite nei laboratori dell'ISA-CNR, presso il Centro di Spettrometria di Massa e Proteomica dove nei prossimi mesi si procederà alla caratterizzazione chimica dei composti presenti al fine di identificare la/le singole molecole responsabili dell'attività inibitoria.



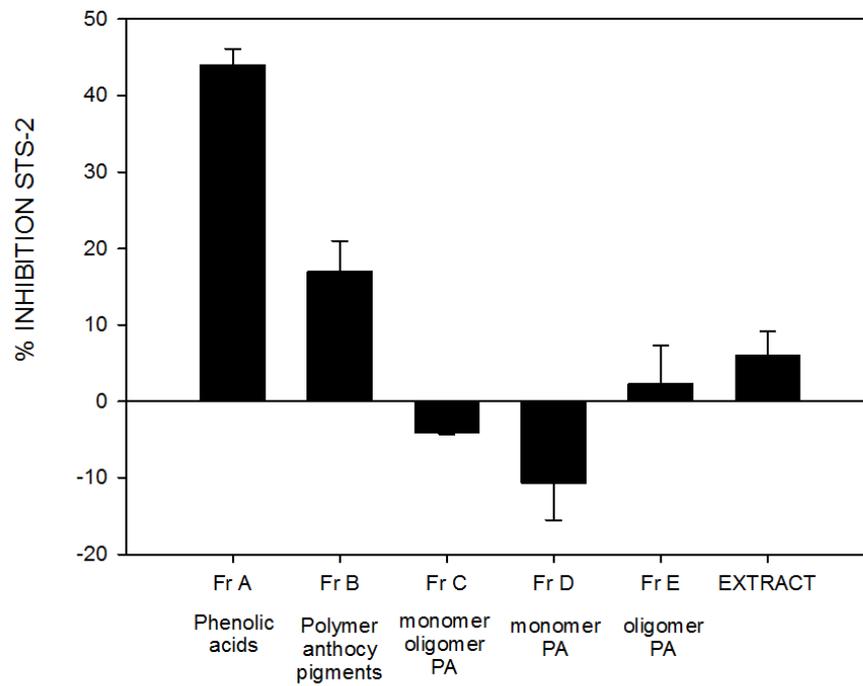
**A**



DOUBLE SEP-PAK C18 SEPARATION RED WINE

PA= proanthocyanidins

**B**



DOUBLE SEP-PAK C18 SEPARATION RED WINE

PA= proanthocyanidins

Fig. 3. Saggi *in vitro* di attività enzimatica per Sts-1 (pannello A) e Sts-2 (pannello B) su frazioni fenoliche ottenute dall'estratto di vino rosso dopo purificazione su Sep-Pak utilizzando il metodo descritto da Sun et al., 2006.

In fede,

Gian Luigi Russo

Fruitore STM

