Consiglio Nazionale delle Ricerche
Istituto Scienze dell'Alimentazione
Institute of Food Sciences

RELAZIONE SCIENTIFICA SHORT TERM MOBILITY

Proponente/Fruitore: Gian Luigi Russo

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

Programma di ricerca svolto Effetto di polifenoli presenti nella dieta nell'attivazione e proliferazione linfocitaria

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 chinasica 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). Inoltre, dati di letteratura indicano che alcuni polifenoli quali genisteina e EGCG sono in grado di modulare l'attività chinasica di ZAP-70 nelle CLL (Cancer Immunol Immunother 2007; 56:501–514; J. Biol. Chem. 2008; 283: 28370–9).

Sulla base di queste premesse, l'attività svolta dal Fruitore durante la STM, in accordo con il dr. Carpino, ha riguardato la creazione delle condizioni sperimentali idonee a iniziare un programma di ricerca finalizzato allo 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. Come primo obiettivo si è deciso di misurare i livelli di attività fosfatasica di Sts-1 e Sts-2 nei lisati cellulari derivati da cellule-B isolate da CLL e disponibili presso l'ISA-CNR. Per far questo, è indispensabile possedere anticorpi monoclonali diretti contro le due fosfatasi e capaci di immunopreciptarle per poter monitorare l'attività fosfatasica. Poiché tali anticorpi non sono disponibili in commercio, si è deciso di dedicare le tre settimane della STM alla preparazione di questo reagente chiave seguendo protocolli standard.

Il Fruitore ha quindi proceduto alla preparazione dei due antigeni, Sts-1 e Sts-2, da inviare ad una ditta specializzata (*Precision Antibody*; A&G Pharmaceutical, Inc.) nella produzione di anticorpi monoclonali *on-demand*. Entrambi i cloni degli omologhi umani di Sts-1 e Sts-2 erano disponibili presso il laboratorio del dr. Carpino nel vettore di espressione batterico pMAL™ (New England Biolabs) che genera un prodotto di fusione rappresentata dalla proteina che lega il maltosio (MBP) all'N-terminale e l'antigene d'interesse. Pertanto, i due cloni a disposizione del Fruitore sono stati: pMAL-Sts-1 e pMAL-Sts-2. Entrambe le fosfatasi sono state espresse in *E. coli* dopo induzione con IPTG come riportato in Fig. 1. 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 pMAL-MBP/Sts-1 e pMAL-MBP/Sts-2 sono mostrate in Fig. 2. Le proteine di fusione così ottenute sono state utilizzate come antigeni da somministrare ai topi da parte

della *Precision Antibody*. 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 delle due proteine MBP-Sts-1 e MBP-Sts-2 mostrate 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 sono ottenute le due proteine clonate Sts-1 e Sts-2 "libere" dal *carrier* MBP (Fig. 3), 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 due proteine "libere" Sts e MBP sono state separate nuovamente sulla resina amilosio-agarosio. Questa volta, le due fosfatasi Sts-1 e -2 venivano eluite con "il fronte" poiché prive della porzione MBP, mentre l'MBP libera si legava alla resina d'affinità. Il risultato finale è mostrato in Fig. 4 che evidenzia la purificazione all'omogeneità delle due proteine d'interesse.

Nel dicembre 2010, il dr. Carpino ha inviato i primi due campioni, MBP-Sts-2 (Fig. 2) e Sts-2 (Fig. 4), alla ditta produttrice di anticorpi che ha fornito di recente (gennaio 2011) i primi risultati dello screening (Fig. 5). I topi immunizzati sta producendo anticorpi anti-Sts-2 con un buon titolo. Si procederà presto alla *cell-fusion* per ottenere i cloni cellulari producenti i singoli anticorpi monoclonali. Con una buona approssimazione, entro la prossima primavera questi reagenti potranno essere spediti all'ISA-CNR per dare inizio all'analisi dell'attività di Sts-2 nelle CLL.

In fede,

Gian Luigi Russo

Fig. 1

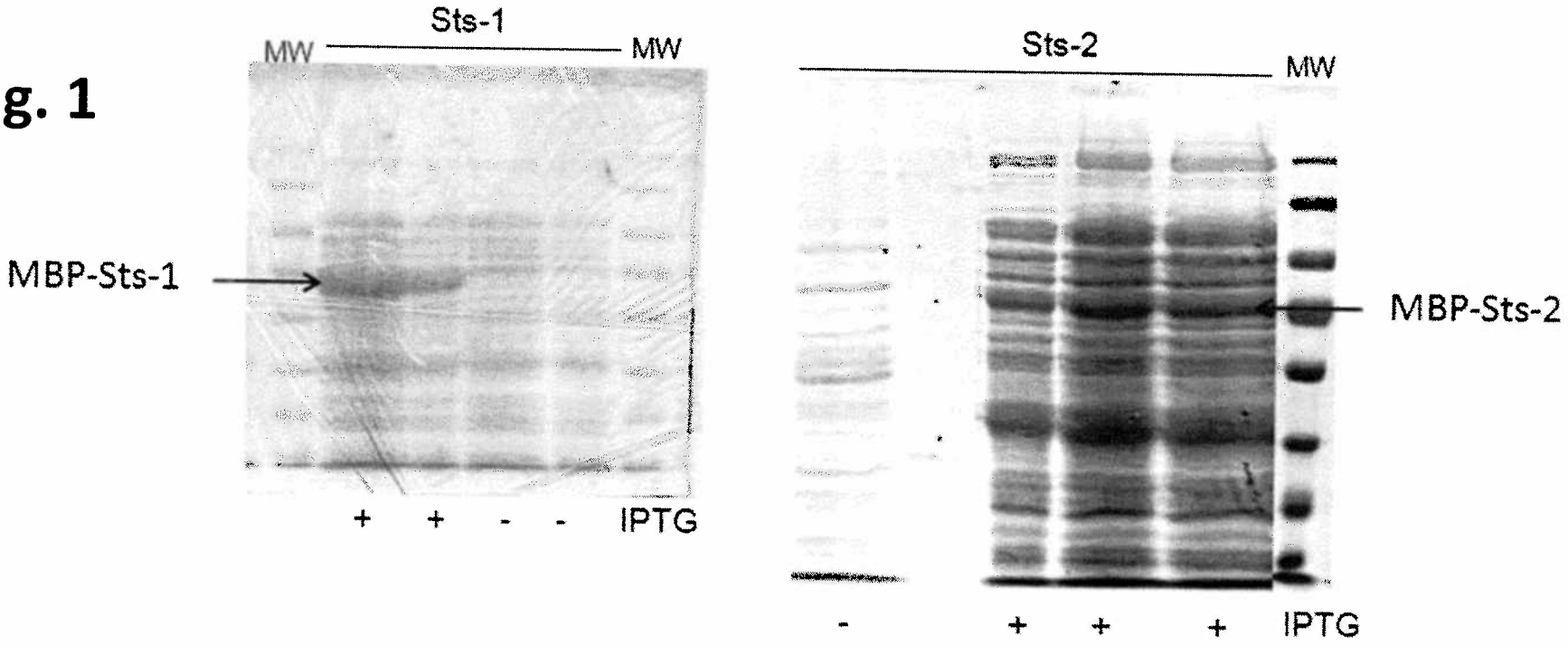
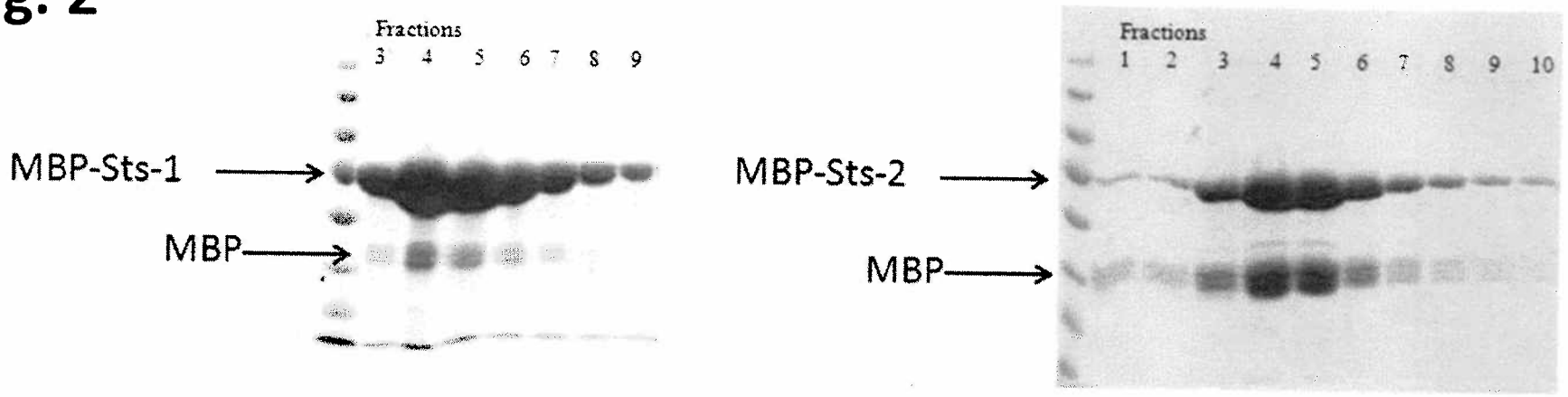

Sts-1
MW
MW
MBP-Sts-1
+ + - - IPTG
Sts-2
MW
MBP-Sts-2
- + + + IPTG

Fig. 2


Fractions
3 4 5 6 7 8 9
MBP-Sts-1
MBP
Fractions
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
MBP-Sts-2
MBP

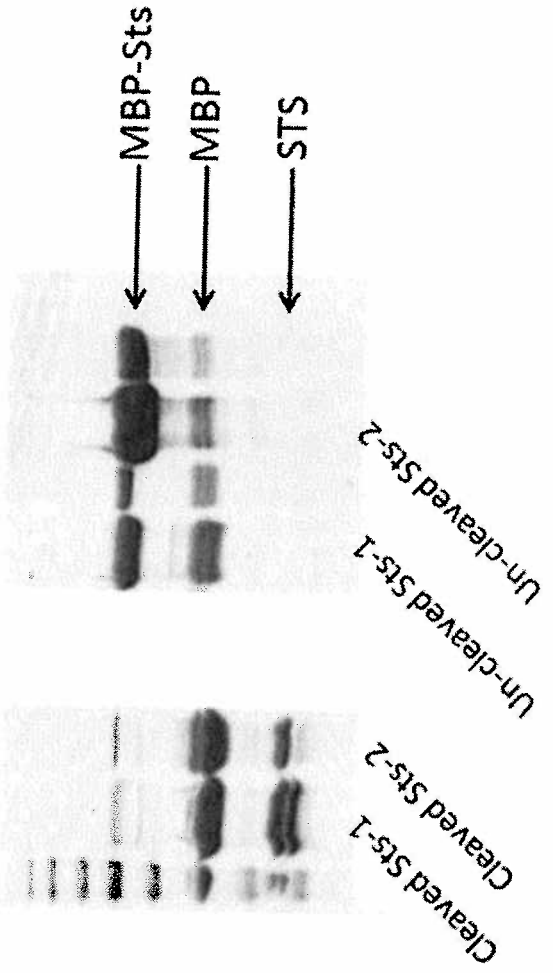

MBP-Sts
MBP
STS
Un-cleaved Sts-2
Un-cleaved Sts-1
Cleaved Sts-2
Cleaved Sts-1

Fig. 3

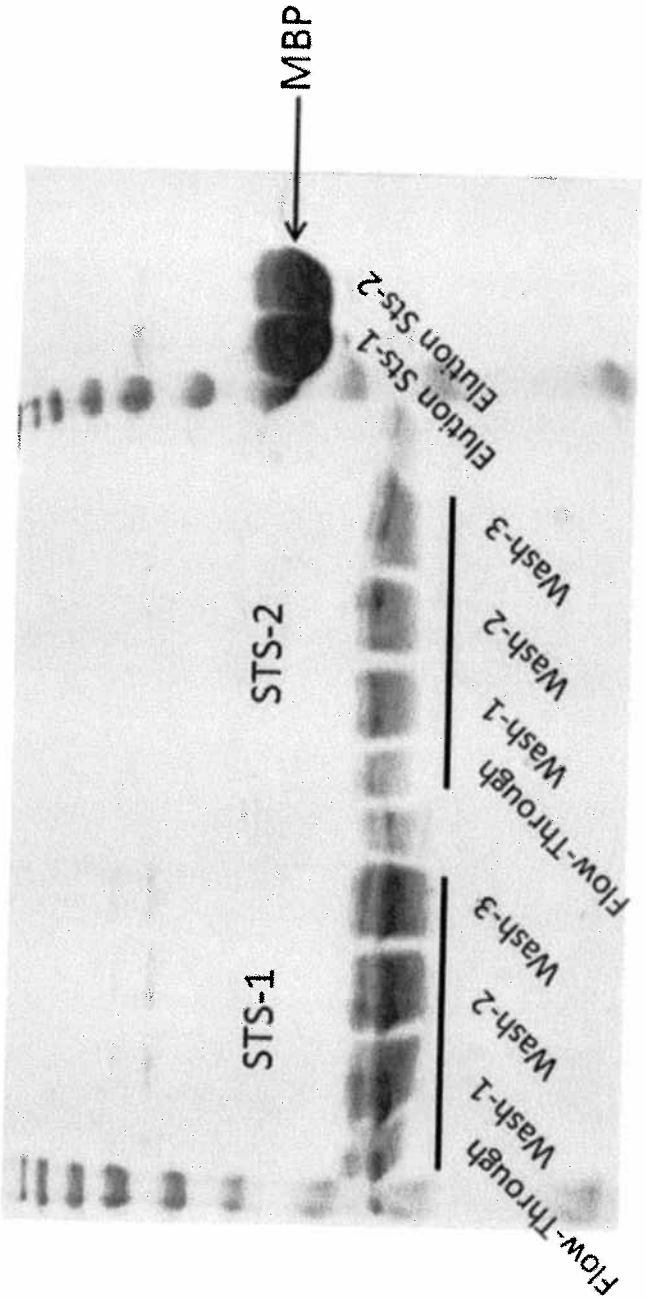

MBP
Elution Sts-2
Elution Sts-1
STS-2
Wash-3
Wash-2
Wash-1
Flow-Through
STS-1
Wash-3
Wash-2
Wash-1
Flow-Through

Fig. 4

Fig. 5

STBU001 TB2 repeat OD Spreadsheet
Date: 01-11-11
Project: STBU001
Antigen 1 = STS2-MBP(PGM) protein [1mg/ml] coated @ 200ng/well
Antigen 2 = STS2 Protein(his-tag, no MBP) [1mg/ml] coated @ 1ug/well

Sample (dilution)	Antigen 1 - OD	Antigen 2 - OD
M#1 TB serum 1:1,000	3,000	3,000
M#1 TB serum 1:5,000	3,000	2,721
M#1 TB serum 1:10,000	3,000	2,077
M#1 TB serum 1:50,000	2,369	0,717
M#1 TB serum 1:100,000	1,661	0,351
Negative Control 5%Milk-PBS	0,051	0,044
M#2 TB serum 1:1,000	3,000	3,000
M#2 TB serum 1:5,000	3,000	1,944
M#2 TB serum 1:10,000	3,000	1,912
M#2 TB serum 1:50,000	2,100	0,507
M#2 TB serum 1:100,000	1,339	0,374
Negative Control 5%Milk-PBS	0,048	0,049
M#3 TB serum 1:1,000	3,000	3,000
M#3 TB serum 1:5,000	3,000	2,682
M#3 TB serum 1:10,000	3,000	1,850
M#3 TB serum 1:50,000	2,328	0,462
M#3 TB serum 1:100,000	1,739	0,204
Negative Control 5%Milk-PBS	0,051	0,055