

Dott.ssa FEDERICA ALCIATO

Studiante al primo anno del dottorato di ricerca in Medicina Molecolare

Laboratorio di Medicina Interna

Responsabile Prof. Gian Carlo Avanzi

Il progetto

Il progetto parte dalla messa a punto di un sistema ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) per dosare la proteina Gas6 (Growth arrest specific protein 6) per poi articolarsi in due parti distinte ma parallele, svolte su linee cellulari macrofagiche ed endoteliali. Lo scopo è di dosare il livello di proteina Gas6 prodotta da cellule in assenza di siero e rilasciata nel terreno di coltura e contemporaneamente si vuole verificare quale via di trasduzione del segnale sia attivata negli stessi modelli cellulari con differenti concentrazioni di Gas6.

Gas6 è una proteina vitamina K dipendente la cui struttura prevede un dominio ricco in acidi glutammici, nella porzione N-terminale, una regione epidermal growth factor (EGF)-like nella porzione centrale e una regione steroid hormone binding globulina (SHBG)-like in C-terminale. Nella sua forma γ -carbossilata, in presenza di calcio, è il ligando di tre recettori tirosin chinasi, Axl, Sky e Mer. E' già stata dimostrata la sua funzione anti-apoptotica (Healy et al., 2001, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol; Hansabasic et al., 2004, Am J Physiol Heart Circ Physiol) oltre che il suo ruolo nel rimodellamento vascolare (Korshunov et al., 2006, Circ Res) e nella trombosi (Angelillo-Scherrer et al., 2001, Nat Med). Il nostro scopo è di verificare se le linee cellulari da noi esaminate producano Gas6 e quanto, quali pathway di trasduzione del segnale siano attivati in seguito all'interazione del Gas con i propri recettori e quali siano le variazioni, indotte dalla stimolazione con diverse concentrazioni di Gas esogeno, su queste vie, il tutto inserito nel contesto di uno stato infiammatorio. Ci proponiamo quindi di verificare quale sia il meccanismo molecolare innescato dalla nostra proteina partendo dagli studi passati che dimostrano che Gas6 è coinvolto nell'infiammazione (Avanzi et al., 1998, Blood), inibendo l'interazione dei polimorfonucleati con la parete vasale ed impedendo quindi la loro extravasazione e il raggiungimento del sito d'infiammazione, oltre che spegnendo il segnale infiammatorio innescato da macrofagi e cellule dendritiche. A questo proposito sono stati anche creati modelli murini mutanti singoli, doppi e tripli per i recettori e ciò che ne è risultato è stato un aumento dei livelli di TNF- α , un'aumentata suscettibilità allo shock endotossico e un'insorgenza di autoimmunità grave (Lemke et al., 2003, Curr opin immunol).

Il metodo ELISA su cui ci concentriamo è di tipo a sandwich, poiché questo è sicuramente il sistema più sensibile e specifico per il rilevamento di basse quantità d'antigene (il Gas6 è stato stimato nel plasma ad una concentrazione di 20-50 ng/ml circa e le concentrazioni che noi testeremo saranno poco distanti da questi livelli) (Borgel et al., 2006, Crit Care Med; Balogh et al., 2005, Arterioscler Thromb Vasc Biol). Questo significa che la proteina da dosare rimarrà imprigionata tra due anticorpi, un primario legato alla plastica della piastra di dosaggio, detto di cattura, e un secondario che permetta la rilevazione. La rilevazione sarà possibile grazie alla coniugazione dell'anticorpo secondario con biotina, una vitamina riconosciuta e legata in modo specifico dalla streptavidina, molecola che ha invece natura proteica. Questa, a sua volta, sarà coniugata con un enzima (perossidasi) che causerà un viraggio da bianco a blu del cromoforo tetrametil-benzidina (TMB). Tale colore avrà un'intensità proporzionale alla concentrazione della proteina da dosare. Dopo bloccaggio della reazione con acido solforico sarà possibile, tramite lettura delle assorbanze a 450 nm con reference value a 570 nm e confronto con una curva standard, risalire alla concentrazione di Gas6. La messa a punto del metodo prevede di testare diversi anticorpi presenti sul mercato a varie concentrazioni e a più tempi d'incubazione, di determinare quale sia la matrice migliore da utilizzare come diluente dei campioni e degli anticorpi e quale sia il range ottimale per gli standard. Ci proponiamo inoltre di validare il metodo seguendo le direttive della Food and Drug Administration (FDA 2001) che prevedono di verificare i seguenti parametri:

- Precisione e accuratezza intra-assay: dopo avere effettuato otto replicati di quattro campioni di validazione a concentrazione nota nella stessa piastra di dosaggio, determinerò la precisione come coefficiente di variazione percentuale ($\%CV < 20\%$) e l'accuratezza come differenza percentuale dal valore nominale (i valori ottenuti dovranno essere entro il 20% del valore nominale)
- Precisione e accuratezza inter-assay: i campioni di validazione dovranno essere dosati in questo caso in quattro diverse piastre
- Lower Limit of Quantification (LLOQ) e Upper Limit of Quantification (ULOQ): dovranno essere stabilite la più alta e la più bassa concentrazione di Gas6 determinabili mantenendo un $\%CV < 20\%$
- Recovery: dopo aver addizionato dieci campioni di due diverse quantità note di Gas6 dovrò ottenere una concentrazione misurata che sia compresa in un range di variabilità minore del 20% rispetto all'atteso
- Freeze-thaw stability: dovrà essere determinata la stabilità della proteina effettuando tre cicli successivi di congelamento e scongelamento

Per quanto riguarda le colture cellulari, ci proponiamo di utilizzare la linea cellulare stabilizzata U937, derivata da un linfoma con caratteristiche istiocitiche e cellule HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) isolate da cordone ombelicale umano presso il nostro laboratorio.

La linea cellulare U-937 è stata caratterizzata nel 1976 da Sundrom e Nilsson (Sundstrom, Nilsson, 1976, Int J Cancer), che ne hanno definito le caratteristiche di crescita, la citochimica, il pattern di recettori di superficie, il cariotipo. Hanno escluso la produzione di Immunoglobuline e di β_2 -microglobulina. Ne hanno inoltre dimostrato l'origine istiocitica dalla capacità di queste cellule di produrre lisozima e dalla forte attività esterasica.

Le HUVECs vengono isolate da cordoni ombelicali ottenuti grazie alla collaborazione con la Clinica Ginecologica dell'Ospedale Maggiore della Carità di Novara seguendo un protocollo che prevede lavaggi con soluzione fisiologica del materiale e distacco delle cellule dalla vena tramite tripsina. Dopo bloccaggio della tripsina con siero fetale bovino e la centrifugazione sarà possibile ottenere cellule endoteliali isolate. La natura delle cellule verrà verificata tramite western blot su lisati cellulari utilizzando l'anticorpo anti-vWF (von Willebrand Factor).

Entrambe le linee cellulari verranno testate in condizioni ottimali di crescita ed in condizioni di stress, al fine di verificare i livelli di produzione di proteina Gas6 che, essendo tra l'altro una molecola anti-apoptotica (Hansabasic et al., 2004, Am J Physiol Heart Circ Physiol), dovrebbe risultare aumentata nel secondo caso. Parallelamente le cellule verranno coltivate in presenza ed in assenza di Gas6 esogeno, sempre mantenendo le due condizioni di crescita ottimale e di stress; verranno prodotti lisati cellulari per ognuna delle condizioni testate e tramite esperimenti di western blot si cercheranno i pathway di attivazione della cascata del segnale a valle dei recettori tirosin chinasi di Gas6. Ci si attende che vi siano variazioni del tipo di proteine fosforilate e dei livelli di fosforilazione a seconda delle condizioni analizzate. Gli stessi esperimenti di stimolazione cellulare e di produzione di lisati per western blot verranno condotti in presenza di lipopolisaccaride (LPS), al fine di mimare uno stato infiammatorio. In tali condizioni inoltre verranno testate varie concentrazioni di Gas6 e valutato l'eventuale effetto sulla modulazione di citochine infiammatorie comunemente prodotte dai macrofagi (TNF- α , IL-6, IL-1, ecc...) utilizzando kit ELISA commerciali.

Conclusa questa prima fase si cercherà di dimostrare quali dei tre recettori siano coinvolti nelle diverse condizioni testate. Per fare ciò si alternerà l'uso, a livello di coltura cellulare, di anticorpi specifici per i tre recettori tirosin chinasi a cui si lega il Gas6. Anche in questo caso si verificheranno condizioni ottimali di crescita e condizioni di stress, varie concentrazioni di Gas6 esogeno e gli effetti dell'aggiunta di LPS. Si procederà alla produzione dei relativi lisati cellulari e

si eseguiranno esperimenti di western blot al fine di verificare, anche in queste nuove condizioni, quale sia lo stato di fosforilazione delle proteine a valle dei recettori.

Risultati ottenuti fino ad oggi

Gli esperimenti condotti fino ad ora vedono conclusa la messa a punto del sistema di dosaggio ELISA. Abbiamo stabilito le concentrazioni degli anticorpi per avere un buon rapporto tra sensibilità, specificità e background (anticorpo legante 350 ng/ml in PBS; anticorpo biotinilato 15 ng/ml in albumina). Al fine di ridurre il più possibile il background abbiamo determinato inoltre la diluizione migliore e la matrice più adatta in cui diluire i campioni (diluizione 1:50 in albumina bovina). Sono stati definiti i tempi e le condizioni d'incubazione:

- Fissaggio dell'anticorpo legante alla piastra overnight a temperatura ambiente;
- Incubazione dei campioni 2 ore a temperatura ambiente su agitatore a 300 rpm.
- Anticorpo biotinilato 90 minuti a temperatura ambiente;

La streptavidina viene diluita fino a 400 ng/ml in albumina e viene lasciata a temperatura ambiente per un tempo piuttosto breve (15 minuti), mentre il TMB sviluppa una colorazione ottimale se lasciato 30 minuti a temperatura ambiente. La curva standard viene preparata in albumina, poiché questa risulta essere la matrice prevalente in cui si trova il Gas6 nei campioni durante il dosaggio e risulta inoltre una proteina inerte, il che riduce drasticamente i rischi di avere falsi positivi dovuti a reazioni aspecifiche. La reazione immuno-enzimatica viene bloccata tramite acido solforico 1.8 M e le concentrazioni vengono determinate per confronto con gli standard (interpolazione tramite regressione logistica a 4 parametri) dopo lettura delle assorbanze a 450 nm.

La linea cellulare U-937 può essere utilizzata per gli esperimenti solo dopo averne indotto il differenziamento in senso macrofagico. A questo scopo abbiamo testato acido retinoico e forbole miristil-acetato (PMA) a diverse concentrazioni e ciò che è emerso è che il miglior trattamento differenziante è con PMA alla concentrazione di 5 ng/ml per 5 giorni a 37°C e 5% CO₂. In seguito abbiamo introdotto l'LPS e anche in questo caso il trattamento ottimale ne prevede l'utilizzo ad una concentrazione di 5 ng/ml. I tempi d'incubazione sono per ora mantenuti tra i 45 minuti e le 48 ore, anche se ci proponiamo di restringere il campo fino a determinare un massimo di tre tempi sperimentali ottimali. Lo stesso vale per l'utilizzo di Gas6; attualmente stiamo sperimentando la proteina a diverse concentrazioni comprese tra i 30 e i 500 ng/ml ma l'obiettivo è di ridurre il range fino ad arrivare ad una concentrazione a cui sia evidente un picco di attività.

Per quanto riguarda le HUVEC abbiamo ottimizzato il sistema di isolamento da cordone ombelicale che prevede l'utilizzo di 100 ml di soluzione fisiologica per i lavaggi, l'incubazione a 37°C e 5%

CO₂ del cordone ombelicale con tripsina allo 0.5% in PBS 1X per 15 minuti, il bloccaggio della tripsina con siero fetale bovino e, dopo aver centrifugato per 10 minuti a 500xg, la crescita delle cellule isolate a 37°C, 5% CO₂ in Medium 199 addizionato di siero fetale bovino al 20% e di FGF (Fibroblast growth factor) 100 ng/ml. Tramite questa procedura ci è stato possibile congelare un numero piuttosto elevato di aliquote di cellule al secondo passaggio. Ciò risulta indispensabile poiché le cellule tendono a diminuire drasticamente la loro entità di crescita dopo pochi passaggi imponendoci di utilizzare una nuova aliquota ad ogni esperimento.

Bibliografia

Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, Arnout J, Dewerchin M, Hoylaerts M, Herbert J, Collen D, Dahlback B, Carmeliet P.

Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis
Nat Med. 2001 Feb;7(2):215-21.

Avanzi GC, Gallicchio M, Bottarel F, Gammaitoni L, Cavalloni G, Buonfiglio D, Bragardo M, Bellomo G, Albano E, Fantozzi R, Garbarino G, Varnum B, Aglietta M, Saglio G, Dianzani U, Dianzani C.

GAS6 inhibits granulocyte adhesion to endothelial cells.

Blood. 1998 Apr 1;91(7):2334-40.

Balogh I, Hafizi S, Stenhoff J, Hansson K, Dahlback B. Related Articles, Links

Analysis of Gas6 in human platelets and plasma.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Jun;25(6):1280-6. Epub 2005 Mar 24.

Borgel D, Clauser S, Bornstain C, Bieche I, Bissery A, Remones V, Fagon JY, Aiach M, Diehl JL.

Elevated growth-arrest-specific protein 6 plasma levels in patients with severe sepsis.

Crit Care Med. 2006 Jan;34(1):219-22.

Food and Drug Administration (2001) Guidance for Industry: Bioanalytical Method validation.

Hasanbasic I, Cuerquis J, Varnum B, Blostein MD.

Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Axl-mediated survival of endothelial cells.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Sep;287(3):H1207-13. Epub 2004 May 6.

Healy AM, Schwartz JJ, Zhu X, Herrick BE, Varnum B, Farber HW. Related Articles, Links

Gas 6 promotes Axl-mediated survival in pulmonary endothelial cells.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001 Jun;280(6):L1273-81

Korshunov VA, Mohan AM, Georger MA, Berk BC.

Axl, a receptor tyrosine kinase, mediates flow-induced vascular remodeling

Circ Res. 2006 Jun 9;98(11):1446-52. Epub 2006 Apr 20.

Lemke G, Lu Q. Related Articles, Links

Macrophage regulation by Tyro 3 family receptors.

Curr Opin Immunol. 2003 Feb;15(1):31-6.

Sundstrom C, Nilsson K.

Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937).

Int J Cancer. 1976 May 15;17(5):565-77.

Seminari

“Mechanism of osteolytic lesion in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation”

Relatrice: Prof. Maria Grano

Dipartimento di Anatomia e Istologia, Facoltà di Medicina,
Università di Bari

“Il carcinoma del colon”

Relatrice: Dr. Furlan

Organizzatore: Prof. Guido Monga

“New perspectives in metabotropic glutamate receptors neurobiology”

Relatore: Prof. Ferdinando Nicoletti

Ordinario di Farmacologia

Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia, I Facoltà di Medicina e Chirurgia,
Università “La Sapienza”, Roma

“Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico”

Relatore: Prof. Daniele Sblattero

Dipartimento di Scienze Mediche

Università del Piemonte Orientale

“Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare genica dell'emofilia”

Relatrice: Dr. Antonia Follenzi

“The natural course of preclinical type 1 diabetes”

Relatore: Prof. Mikael Knip

Professor of Pediatrics

Hospital for Children and Adolescents

University of Helsinki, Finland

“La prevenzione della trasmissione verticale di HIV in Africa Sub Sahariana. L’esperienza del programma DREAM (Drug Resource Enhancement against AIDS and Malnutrition)”

Relatrice: Dr. Susanna Ceffa

Dpt. Of Oncology, Div. Of Surgical, Molecular and Ultrastructural Pathology

University of Pisa and Pisa University Hospital

Comunità di Sant’Egidio – DREAM Program

“Terapie molecolari nelle malattie mieloproliferative”

Relatrice: Dr. Daniela Cilloni

Divisione di Ematologia

Università degli Studi di Torino (Polo San Luigi – Orbassano)

“Sperm mediated gene transfer: storia e applicazioni”

Relatrice: Marialuisa Lavitrano

Università di Milano Bicocca

“DNA and protein arrays in infection diseases: from basic research to vaccine design”

Relatrice: Dr. Renata Grifantini

Research Director

Novartis – Vaccines

Siena

“The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis”

Relatore: Prof. Dieter Bromme, Ph.D.

University of British Columbia

Faculty of Dentistry

Canada

Corsi

Corso di inglese tenuto dal Prof. Colin Irving-Bell (30 ore)

Pubblicazioni

“DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ELISA METHOD FOR DETECTION OF GAS6
PROTEIN IN HUMAN PLASMA”

Federica Alciato, Pier Paolo Sainaghi, Luigi Castello, Luca Bergamasco, Stefania Carnieletto, Gian
Carlo Avanzi.

sottomesso per pubblicazione a “Journal of Immunological Methods”

Congressi

“L’influenza aviaria”

Organizzatore: dott. Ferri Marco

Presso Albergo Italia, Novara

2 Febbraio 2006

“AIDS: il silenzio continua”

Organizzazione: Health Data, Torino

Chairman Dott. Giovanni Rizzo

Direttore Scientifico Prof. Di Perri

Presso Auditorium BPN, Novara

4 Ottobre 2005