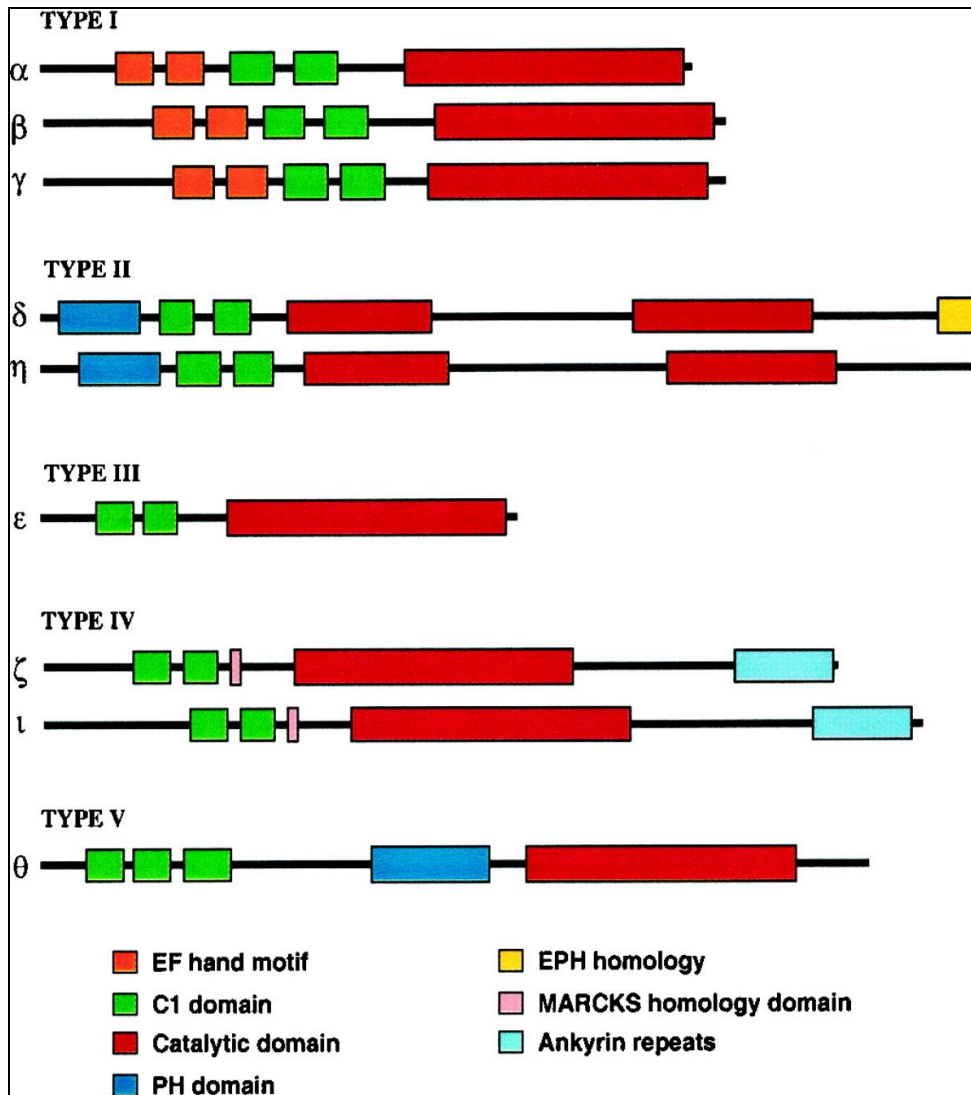


Brignoli Gabriele

Relazione dottorato Anno 2005-2006

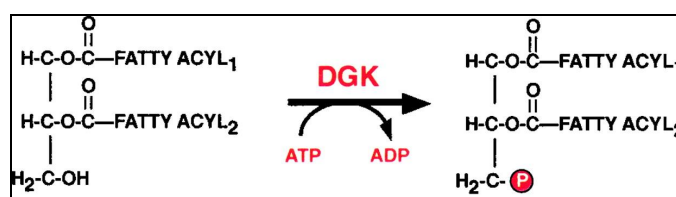
**Produzione di un anticorpo monoclonale
specifico per la
Diacilglicerolo Chinasi Alfa**

INTRODUZIONE



Topham and Prescott, J. Biol. Chem. 1999

Le diacilglicerolo chinasi (Dgk) formano una famiglia composta di nove distinti enzimi, raggruppati in cinque classi; tutti catalizzano la sintesi di Acido Fosfatidico (PA) a partire da Diacilglicerolo (DAG) in modo ATP-Dipendente.



Tutte le Dgk sono enzimi citosolici o nucleari ancorati o alle membrane plasmatiche o alle membrane delle vescicole intracellulari, qua hanno accesso ai loro substrati. La modulazione dell'attività delle Dgk agisce direttamente sull'intensità e sulla cinetica del signalling DAG-Mediato, determinando così una variazione dei livelli di DAG in specifici compartimenti di membrana. Negli ultimi anni nel nostro laboratorio è stato dimostrato che la Diacilglicerolo Chinasi alfa ($Dgk\alpha$) è attivata da recettori tirosina chinasi per fattori di crescita, quali HGF-R, VEGFR-2, EGFR e Alk, mediante un meccanismo dipendente da Src, con cui forma un complesso. Nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato che l'inibizione di $Dgk\alpha$ ottenuta sia trattando le cellule con l'inibitore farmacologico specifico R59949, sia trasfettando le cellule con un $Dgk\alpha$ dominante negativo, sia down-regolando l'espressione della proteina con siRNA specifici, riduce significativamente le diverse risposte biologiche ai rispettivi fattori di crescita, quali l'angiogenesi in vitro da VEGF, la proliferazione da VEGF, HGF e Alk, la chemotassi e l'invasione da HGF e EGF, e infine in cellule epiteliali l'inibizione di $Dgk\alpha$ inibisce lo scatter, EMT e tubulogenesi in vitro da HGF. Inoltre l'inibizione di $Dgk\alpha$ riduce l'attività biologica in vitro di alcuni oncogeni, quali l'attività proliferativi di npm-Alk, , pro-invasiva di v-Src, e la crescita in soft agar indotta da Neu/ErbB2. Questi dati costituiscono quindi un corpus di evidenze generate nel nostro laboratorio, che dimostrano per la prima volta che $Dgk\alpha$ agisce come effettore necessario per la trasduzione del segnale oncogenico/pro-invasivo/proliferativo, suggerendo che costituisca un possibile bersaglio per la farmacologia anti-tumorale. Inoltre dati preliminari nel nostro laboratorio indicano che l'inibizione di $Dgk\alpha$, sia farmacologica che mediante siRNA, promuove la ubiquitinazione e quindi la degradazione di EGFR, suggerendo quindi che $Dgk\alpha$ contribuisca a mantenere l'espressione e la funzione dei recettori tirosina chinasi, e quindi rafforzando la sua "candidatura" a target per la farmacologia anti-tumorale.

Attualmente non vi sono sul mercato anticorpi commerciali in grado di immunoprecipitare e/o rilevare efficientemente in western blotting la DGKa, per tale motivo questo lavoro ha lo scopo di produrre un anticorpo monoclonale specifico per DGKa.

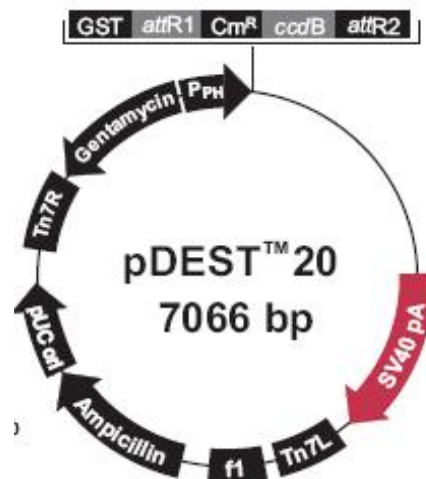
La prima fase di questo progetto consiste nella produzione per via ricombinante e nella purificazione di DGKa nelle quantità necessarie ad una seconda fase in cui verranno immunizzati topi dai quali verrà poi prodotto l'anticorpo monoclonale. Per questo scopo si è optato per l'utilizzo di un sistema di espressione baculovirale.

PRODUZIONE E PURIFICAZIONE DELLA PROTEINA

La generazione di un baculovirus in grado di infettare cellule di insetto e di esprimere con alta efficienza la proteina di interesse con l'opportuno Tag necessario per la purificazione/rilavazione è stata possibile grazie all'utilizzo di due tecnologie brevettate da Invitrogen : Gateway® e Bac-2-Bac®. Nel nostro laboratorio precedentemente è stato clonato il gene codificante la Diacilglicerolo Chinasi Alfa in un vettore pDONR222® secondo la reazione di seguito schematizzata :



Si è optato per la generazione di un vettore in grado di inserire un Tag GST alla porzione N terminale della DGKa, ciò per permettere sia un'efficiente purificazione sia una soddisfacente rilevazione in western blotting; il vettore scelto è il pDEST20®



Il vettore pDEST20 contiene :

- mini-Tn7 contenente l'espressione cassette, necessaria per la trasposizione nel DNA bacmidico propagato in *E. coli* (Craig, 1989; Luckow *et al.*, 1993)
- Il promotore genico AcMNPV per una elevata espressione del gene di interesse in cellule di insetto (Possee and Howard, 1987)
- Gateway cloning cassette formato da attR1, gene resistenza cloramfenicolo, ccdB e attR2. I due siti attR1 e attR2 sono necessario per il clonaggio ricombinante da un vettore donatore
- TAG GST N-terminale per la rilevazione e purificazione della proteina di fusione ricombinante.
- Gene per la resistenza al cloramfenicolo, localizzato tra i due siti attR, necessario per la controselezione
- Segnale di poliadenilazione SV40 necessario per la corretta trascrizione, terminazione e poliadenilazione dell'mRNA

- Gene per la resistenza alla gentamicina necessario per la selezione di trasformanti contenenti bacmide ricombinante
- Gene per la resistenza all'ampicillina necessario per la selezione di trasformanti in *E.coli*
- Sito pUC necessario per una elevata replicazione e mantenimento del plasmide in *E.Coli*.

La tecnologia Gateway è una tecnica di clonaggio basata sulla ricombinazione tra specifici siti del plasmide donatore (pDONR222) e del plasmide accettore (pDEST20). Queste sequenze nucleotidiche sono siti di ricombinazione specifici del genoma del batteriofago lambda che facilitano l'integrazione del fago nel cromosoma di *E.coli* e la sua amplificazione mediante via litica (Ptashne, 1992). La ricombinazione avviene tra siti specifici di attacco (att site) sulle molecole di DNA che interagiscono ed è conservativa (non c'è perdita o acquisto di nucleotidi) e non è richiesta sintesi di DNA. La ricombinazione tra pDEST20 e pDONR222 è catalizzata da un mix di enzimi che legano sequenze specifiche (siti att), avvicinano i siti target , li uniscono e legano covalentemente il DNA . Le proteine di ricombinazione, che intervengono nella reazione sono Integrasi, XFI e IHF di *E.Coli* (LR Clonase II enzyme mix™).

Dalla reazione tra pDONR222-DGKa e pDEST20 in soluzione con LR Clonase II mix™ si è ottenuto il vettore pDEST20-DGKa(N-GST), successivamente amplificato in batteri DH5a sfruttando la resistenza specifica all'Ampicillina e estratto/purificato attraverso il kit S.N.A.P.™ Midiprep Invitrogen. Il vettore ottenuto è stato sottoposto a digestione enzimatica, la quale ha confermato l'effettiva natura dello stesso.



Lo step successivo è stato quello di generare un bacmide ricombinante contenente la proteina di fusione d'interesse, per tale scopo sono state utilizzate cellule del ceppo di *E.coli* DH10Bac, le quali contengono un vettore baculovirale Bacmid™ con un sito bersaglio per mini-attTn7 e un plasmide helper necessario alla trasposizione. La trasformazione dei batteri DH10Bac con il vettore pDEST20-DGKa determina la trasposizione del segmento mini-Tn7 sul sito bersaglio mini-attTn7 del Bacmide per dare origine ad un bacmide ricombinante. La trasposizione è possibile grazie alle proteine codificate dal plasmide helper.

Il Bacmid™ o bMON14272 (136kb) contiene :

- Replicone mini-F
- Marker di resistenza alla Kanamicina
- Un segmento di DNA che codifica per il peptide LacZα ottenuto da un vettore di clonaggio pUC nel quale è stato inserito il sito di attacco per il trasposone batterico Tn7 (miniattTn7). Questa inserzione non distrugge il frame di lettura del peptide LacZα.

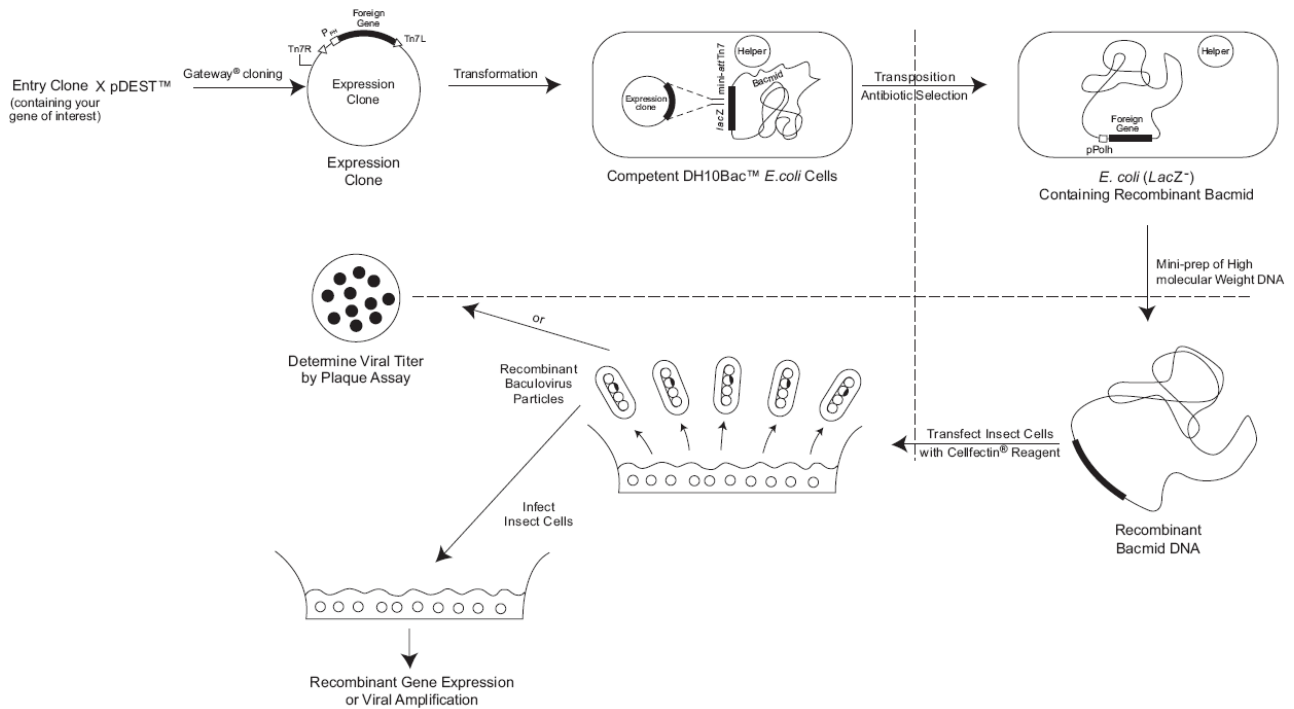
Il Bacmid si propaga in *E. coli* DH10Bac™ come un grosso plasmide che conferisce resistenza alla kanamicina e può sopperire alla delezione di LacZ a livello cromosomiale per formare colonie che sono blu (Lac+) in presenza di un substrato cromogenico, come X-Gal e di un induttore come IPTG.

I Bacmid™ ricombinanti sono generati per trasposizione dell'elemento mini-Tn7 da un vettore pDEST™ donatore al sito di attacco mini-*att*Tn7 sul bacmide. Le funzioni di trasposizione Tn7 sono possibili grazie ad un plasmide helper pMON7124 (13.2 kb), in quale codifica per la traspostasi e conferisce resistenza alla tetraciclina.

La trasposizione del mini-Tn7 dal vettore pDEST™ vector sul sito di attacco mini-*att*Tn7 nel Bacmid distrugge l'espressione del gene *lacZ* α determinando la crescita di colonie bianche di bacmide ricombinante su sfondo blue, costituito da colonie che con il bacmide inalterato.

Cellule DH10Bac™ sono state trasformate con il vettore ottenuto in precedenza in terreno di selezione contenente ampicillina, kanamicina, tetraciclina, X-gal e IPTG. Le colonie bianche (5) su sfondo neutro sono state ripiastrate nello stesso terreno di selezione e le colonie che hanno confermato essere bianche su sfondo neutro sono state fatte crescere overnight in terreno contenente ampicillina, kanamicina, tetraciclina; ottenuta una biomassa soddisfacente il DNA bacmidico ricombinante è stato estratto utilizzando il kit S.N.A.P.™ Midiprep.

Successivamente il DNA bacmidico ricombinante è stato utilizzato per la trasfezione con Cellfectin™ di cellule di insetto SF9 e SF21, per dare origine al primo stock virale P1.

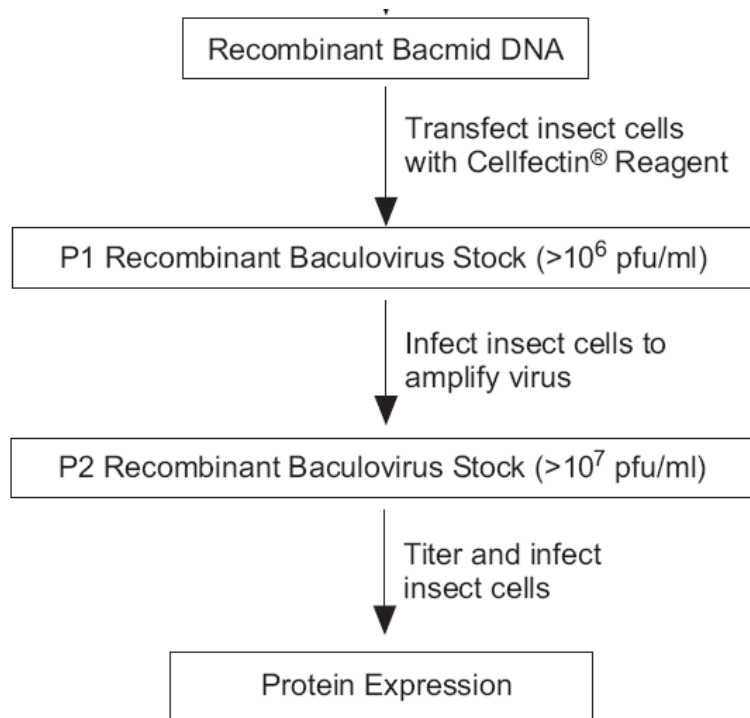


I segni di infezione virale compaiono tra 4 e 7 giorni successivi all'infezione e comprendono in serie :

- Aumento del volume cellulare
- Aumento del volume nucleare (10x)
- Comparsa di cluster virali
- Arresto della crescita in confronto a cellule controllo
- Segni di infezione avanzata, come lisi e distacco dalla piastra
- Liberazione del virus nel mezzo di coltura

Si è poi provveduto a determinare il titolo virale dello stock P1 per poi procedere all'amplificazione. E' stato effettuato un plaque assay per ottenere il corretto valore di pfu e di conseguenza determinare la

molteplicità di infezione ottimale. Ottenuti questi dati lo stock virale è stato amplificato tre volte, fino ad ottenere uno stock P3 ad elevato titolo virale ($1,23 \times 10^8$).



Con lo stock virale P3 sono state infettate cellule di insetto adese al fine di ottimizzare le condizioni di infezione come M.O.I. e tempo di lisi.

Successivamente, ottenuti i dati sopraccitati sono state infettate cellule SF21 adattate a crescere in sospensione su media scala (5l), una volta verificati i segni di infezione avanzata la biomassa è stata prelevata, lisata con opportuno tampone di lisi e sottoposta a trattamento dializzante. Il dializzato ottenuto è stato purificato su colonna cromatografica utilizzando la resina

Glutathione Sepharose™ 4B. La proteina ottenuta è stata confermata sia attraverso comassie, sia attraverso WB anti-GST sia utilizzando un anticorpo Anti-DGKa non commerciale.

La seconda parte di questo progetto prevederà l'inoculo della proteina in topi per generare una risposta immunitaria, una volta confermata la presenza nel siero di componenti anti-DGKa si procederà con la selezione di un clone ibridizzato in grado di produrre anticorpi selettivi adatti sia per immunoprecipitazione sia per visualizzazione tramite western blotting.

SEMINARI E CORSI SEGUITI DURANTE QUESTO ANNO DI DOTTORATO

1-2006/4-2006 Cours of English (of Irving Bell Colin)

12-09-2005 – “Caratteristiche e potenzialità delle cellule isolate dalle membrane fetali umane: amnion e corion” – Dott. O. Parolini

18-10-2005- “Genetica della sordità”- Prof.Paolo Gasparini

22-11-2005 – “HCV-related steatosis: pathogenic mechanisms and clinical implications”- Prof.Adinolfi

25-11-2005 –“ Mechanisms of Transcriptional Regulation and Disease” Prof. Robert Tjian.

19-1-2006 – “ Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation” Dott.ssa Maria Grano.

15-2-2006 – “Anticorpi ricombinanti:un potente tool biotecnologico” Prof. Daniele Sblattero.

13-3-2006 – “Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia”. Dott.ssa Antonia Follenzi.

20-3-2006 –“The natural course of preclinical type 1 diabetes” Prof. Mikael Knip.

6-4-2006 – “Aspetti immunogenici e terapeutici della hairy cell leukemia” Dott. Francesco Forconi.

20-4-2006-“ Terapie molecolari delle malattie mieloproliferative” Dott.Daniela Cilloni.

04-5-2006 –“Il mesotelioma :un modello di terapia traslazionale” Dott. Luciano Mutti.

18-5-2006 –“L'epatite autoimmune” Prof. Marco Lenzi

24/25/26-5-2006 – “Chirality in the Pharmaceutical Industry” Dott. Vittorio Farina

30-5-2006– “Sperm Mediated Gene Transfer. Storia e Applicazioni” Dott.ssa Marialuisa Lavitrano.

15-6-2006 – “Melusin: a Stretch Sensor Molecule Controlling Adapative Cardiac Remodeling to Pressure Overload” Prof. Guido Tarone.

19-6-2006 – “Ruolo eziologico dei papillomavirus umani (HPV) nello sviluppo di lesioni neoplastiche nel distretto genitale” Prof. N. Surico.

22-6-2006 – “Epatite ricorrente da HCV dopo trapianto di fegato” Prof. Pierluigi Toniutto.

27-6-2006– “Osteointegrazione e superfici implantari” Prof.ssa Lia Rimondini.

05-7-2006– “DNA and protein arrays in infection diseases: from basic research to vaccine design”.
Dott.ssa Renata Grifantini.

11-9-2006 – “The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis” Dr Prof. Dieter Brömme, Ph.D.

**PARTECIPAZIONI A CONGRESSI NEL SECONDO ANNO DI
DOTTORATO**

Proteine 2006 della società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare -
Novara 1-3 Giugno 2006.

ELENCO POSTER

*F. Chianale, S. Cutrupi, C. Deantonio, E. Reineri, P. Porporato, G. Baldanzi, **G. Brignoli**, V. Gnocchi, N. Filigheddu and A. Graziani.* Diacylglycerol kinase-alpha regulates HGF-induced epithelial cell motility by acting on focal complexes assembly and RAC1 localization and activation. Convegno Annuale SIB Sezione Ligure-Lombardo-Piemontese. Novara, 20 maggio 2005.

*V. Gnocchi, N. Filigheddu, M. Coscia, F. Chianale, S. Cutrupi, G. Baldanzi, P. Porporato, **G. Brignoli** and A. Graziani.* Ghrelin activity on cardio-vascular and muscular system: an *in vitro* study and *in vivo* perspectives. CNB8: 8th national biotechnology congress, Siena 7-9 settembre 2005.

*P. Porporato, F. Chianale, S. Cutrupi, E. Rainero, R. Taulli, G. Baldanzi, **G. Brignoli**, V. Gnocchi, M. Coscia, N. Filigheddu and A. Graziani.* ShRNA for a constitutive knock down of diacylglycerol kinase alpha expression. CNB8: 8th national biotechnology congress, Siena 7-9 settembre 2005.

G. Brignoli, G. Baldanzi, F. Chianale, P. Porporato, V. Gnocchi, N. Filigheddu, S. Cutrupi and A. Graziani. Role of Diacylglycerol Kinase Alpha in EGF receptor regulation. FISV 2005, Riva del Garda 22-25 settembre 2005

F. Chianale, S. Cutrupi, P. Porporato, G. Baldanzi, **G. Brignoli**, V. Gnocchi, N. Filigheddu and A. Graziani. Alpha Dgk regulates HGF-induced epithelial

cell motility by acting on focal complexes and Rac1 localization and activation. FISV 2005, Riva del Garda 22-25 settembre 2005

P.E. Porporato, F. Chianale, S. Cutrupi, E. Rainero, R. Taulli, G. Baldanzi, **G. Brignoli**,

V. Gnocchi, M. Coscia, N. Filigheddu and A. Graziani. ShRNA for a constitutive knock-down of Diacylglycerol kinase α expression. Riunione nazionale dottorandi ABCD 2005, Castelvecchio Pascoli

V.Gnocchi, N. Filigheddu, M. Coscia, F.Chianale, S.Cutrupi, G. Baldanzi, P.Porporato, **G. Brignoli** and A. Graziani. Ghrelin activity on cardio-vascular and muscular systems: an *in vitro* study and *in vivo* perspectives. Riunione nazionale dottorandi ABCD 2005, Castelvecchio Pascoli.

G. Brignoli, G. Baldanzi, F. Chianale, P. Porporato, V. Gnocchi, N. Filigheddu, S.

Cutrupi and A. Graziani. **Role of Diacylglycerol Kinase α in EGF receptor regulation.**

Riunione nazionale dottorandi ABCD 2005, Castelvecchio Pascoli.

Graziani A, Filigheddu N, Brunelli S, Coscia M, Porporato P, **Brignoli G**, Gallo S, Cossu G, Gnocchi V.

Role of ghrelin in skeletal muscle differentiation and hypertrophy: characterization of its biologic activity *in vitro*; identification of the receptor and *in vivo* patho-physiological implication.

Comitato Telethon Fondazione Onlus - Scientific Convention. Salsomaggiore Terme, Marzo 6-8, 2005

G. Brignoli, G. Baldanzi, F. Chianale, P. Porporato, V. Gnocchi, N. Filigheddu, S. Cutrupi and A. Graziani.

Role of Diacylglycerol Kinase α in RGF receptor regulation.
ABCD 2005 - Certosa di Pontignano (Siena), Marzo , 2005

F. Chianale, S. Cutrupi, C. Deantonio, P. Porporato, G. Baldanzi, **G. Brignoli**, V. Gnocchi, N. Filigheddu and A. Graziani

Diacylglycerol Kinase-Alpha Regulates Hgf-Induced Epithelial Cell Motility By Acting On Focal Complexes Assembly And Rac1 Localization And Activation.
ABCD 2005 - Certosa di Pontignano (Siena), Marzo , 2005