

SVILUPPO DI BIOSENSORI CELLULARI RICOMBINANTI BIOLUMINESCENTI PER ANALISI MULTIPLEXED DI INTERFERENTI ENDOCRINI IN CAMPIONI AMBIENTALI, ALIMENTARI E CLINICI

Luca Cevenini, Elisa Michelini, Laura Mezzanotte, Aldo Roda
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna

Una delle priorità della Commissione Europea riguarda lo sviluppo di nuove metodologie analitiche di screening, sia *in vitro* che *in vivo*, idonee per un efficiente monitoraggio ambientale e una più approfondita conoscenza dei meccanismi d'azione e della tossicità degli interferenti endocrini. Tale classe di composti è estremamente eterogenea dal punto di vista strutturale e ciò complica la messa a punto di metodi analitici convenzionali di screening rapidi e nello stesso tempo sensibili in grado di determinarne la concentrazione in matrici reali.

A questo scopo è stato sviluppato un biosensore cellulare bioluminescente che prevede l'impiego di cellule di lievito *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificate in modo da esprimere il recettore umano per gli androgeni, nelle quali è stato inoltre inserito un plasmide reporter in cui la sequenza *Androgen Responsive Element* (ARE) controlla l'espressione del gene reporter luciferasi (1). L'interazione del recettore con l'analita o con classi di composti con attività simil-ormonale causa la dimerizzazione del recettore con attivazione della sequenza specifica ARE e come conseguenza l'attivazione trascrizionale del gene reporter con produzione della proteina reporter luminescente. L'espressione della proteina reporter viene poi misurata tramite rivelazione luminescente mediante un fotomoltiplicatore o CCD. Per ingegnerizzare le cellule sono state utilizzate due luciferasi (2) con emissioni a diverse lunghezza d'onda (λ_{\max} 556 e λ_{\max} 613): una che consente di misurare l'attività androgenica del campione e l'altra utilizzata come controllo di vitalità cellulare.

Il biosensore consente di misurare l'attività delle luciferasi direttamente in piastra microtiter da 96 pozzetti semplicemente aggiungendo il substrato D-luciferina. L'inserimento di un controllo interno consente una correzione del segnale in presenza di stimoli aspecifici che possono alterare la vitalità cellulare, eliminando quindi la necessità di pre-trattare il campione e aumentando la robustezza del biosensore (variabilità intra-saggio 13% e variabilità inter-saggio 18%). Il biosensore è caratterizzato da un limite di rivelazione pari a 0,05 nM di testosterone, inoltre esso permette di effettuare analisi direttamente sul siero e campioni di urine utilizzando un volume di campione pari a 10 μ L, con applicazioni anche nelle analisi anti-doping.

Le cellule sono state successivamente immobilizzate con altri biosensori cellulari ricombinanti specifici per estrogeni e altri distruttori endocrini (es. diossine e metalli pesanti) per ottenere un sistema di arrays con rivelazione ultra-sensibile mediante imaging a contatto con CCD o CMOS per consentire il monitoraggio sul campo e in tempo reale di campioni clinici, alimentari e ambientali.

Bibliografia

1. Michelini E, Magliulo M, Leskinen P, Virta M, Karp M, Roda A. *Clin Chem.* 2005;51(10):1995-8.
2. Michelini E, Cevenini L, Mezzanotte L, Ablamsky D, Southworth T, Branchini B, Roda A. *Anal Chem.* 2008;80(1):260-7.