

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITA' DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: BIO10

NUOVE SONDE FLUORESCENTI PER LO STUDIO E LA
QUANTIFICAZIONE DEL MAGNESIO TOTALE
INTRACELLULARE

Presentata da:

Chiara Marraccini

Coordinatore Dottorato

Prof. Giorgio Lenaz

Relatore

Prof. Stefano Iotti

Esame finale anno 2012

SOMMARIO

1. IL MAGNESIO	4
1.1 Introduzione	4
1.2 Proprietà chimiche del magnesio	5
1.3 Contenuto e distribuzione intracellulare del magnesio	8
1.4 Meccanismi di trasporto del Mg^{2+}	9
1.5 Regolazione del trasporto e dell'omeostasi del Mg^{2+}	14
1.6 Ruolo del Mg^{2+} nella trasduzione del segnale	16
1.7 Mg^{2+} e proliferazione cellulare	16
1.8 Mg^{2+} nel danno ossidativo e nell'apoptosi	18
1.9 Il Mg^{2+} come secondo messaggero	19
1.10 Fisiologia e funzioni del Mg^{2+}	20
1.11 Ipomagnesemia e ipermagnesemia: cause ed effetti	22
2. TECNICHE DI DETERMINAZIONE DEL MAGNESIO	24
2.1. Introduzione	24
2.2. Principali tecniche di determinazione del magnesio	25
2.3. Indicatori fluorescenti	26
2.4 Sonde fluorescenti di ultima generazione	28
2.4.1 <i>Sonde KMG</i>	28
2.4.2 <i>AMg1 e AMg1-AM</i>	29
2.5 DCHQ1 e suoi derivati	31
3. SCOPO DELLA TESI	34
4. MATERIALI E METODI	37
4.1 Sintesi dei derivati dell'8-idrossichinolina.	37
4.1.1 <i>Sintesi delle 8-idrossichinoline funzionalizzate</i>	37
4.1.2 <i>Sintesi alle microonde dei DCHQ-derivati</i>	40
4.2 Metodi spettroscopici generali	40
4.3 Caratterizzazione fotofisica	42
4.4 Colture cellulari	42
4.4.1 <i>Differenziamento terminale di cellule HL60 con DMSO:</i>	43
4.4.2 <i>Marcatura con sonda DCHQ3:</i>	43
4.5 Analisi Citofluorimetriche	43
4.5.1 <i>Valutazione della mortalità cellulare indotta dai DCHQ-derivati</i>	44
4.5.2 <i>Valutazione della mortalità cellulare in campioni trattati con cAMP</i>	44
4.5.3 <i>Saggio citofluorimetrico del contenuto di DNA</i>	45
4.6 Spettroscopia di fluorescenza	46
4.6.1 <i>Uptake e ritenzione cellulare dei DCHQ-derivati</i>	46
4.6.2 <i>Analisi spettrofluorimetrica del rilascio di Mg^{2+} indotto da cAMP</i>	47
4.6.3 <i>Determinazione del Mg totale cellulare con la sonda DCHQ5 mediante spettrofluorimetria</i>	47
4.6.4 <i>Quantificazione del rilascio di Mg^{2+} indotto da cAMP</i>	47
4.7 Determinazione del Mg totale intracellulare con spettroscopia di assorbimento atomico	48
4.8 Microscopia confocale	49
5. RISULTATI E DISCUSSIONE	50
5.1 Sintesi dei derivati dell'8-idrossichinolina	50

5.1.2 Ottimizzazione della sintesi della sonda DCHQ1:	51
5.1.3 Progettazione e sintesi dei DCHQ-derivati	52
5.2 Caratterizzazione fotofisica dei DCHQ-derivati	55
5.3 Distribuzione intracellulare dei DCHQ-derivati	62
5.3.1 Valutazione del contenuto di Mg cellulare in citofluorimetria con la sonda DCHQ5	64
5.4 Determinazione della stabilità della fluorescenza dei DCHQ-derivati	67
5.4.1 DCHQ1	67
5.4.2 DCHQ3	69
5.4.3 DCHQ4	70
5.4.4 DCHQ5	70
5.4.5 DCHQ6	71
5.5 Uptake e ritenzione intracellulare	73
5.5.1 Misure in spettrofluorimetria	73
5.5.2 Misure in citofluorimetria	75
5.6 Determinazione della distribuzione intracellulare di Mg con microscopia confocale a doppio fotone	79
5.7 Analisi quantitativa del Mg totale cellulare con la sonda DCHQ5	83
5.7.1 Retta di taratura con DCHQ5	83
5.7.2 Quantificazione del Mg totale cellulare con retta di taratura	86
5.8 Uso della sonda DCHQ5 nell'analisi dell'efflusso di Mg ²⁺ indotto da cAMP	88
5.8.1 Analisi fluorimetrica dell'efflusso di Mg ²⁺ indotto da cAMP	89
5.8.2 Analisi citofluorimetrica della mortalità cellulare indotta dal trattamento con cAMP	90
5.8.3 Analisi citofluorimetrica dei movimenti di Mg ²⁺ libero citosolico in seguito al trattamento con cAMP	92
5.8.4 Quantificazione del Mg ²⁺ rilasciato dalle cellule in seguito a stimolazione con cAMP	93

CONCLUSIONI

96

BIBLIOGRAFIA

102

1. IL MAGNESIO

1.1 Introduzione

Il magnesio (Mg) è un metallo alcalino-terroso (numero atomico 12) che appartiene al Gruppo II della tavola periodica degli elementi.

Il nome prende probabilmente origine dal greco Magnesia, che indicava il nome di una prefettura della Tessaglia. Il termine *magnesia* veniva in passato attribuito dagli alchimisti a numerose sostanze, chimicamente diverse ma simili per consistenza e colore, estratte nel territorio di questa città.

Il magnesio come elemento fu riconosciuto per la prima volta nel 1755 dall'inglese Joseph Black, mentre fu Sir Humphrey Davy, attorno al 1810, a ottenere per primo il magnesio metallico dalla preparazione di un'amalgama di magnesio con mercurio.¹ Il metallo puro è altamente reattivo e tutto il magnesio presente nella biosfera si trova come catione libero Mg^{2+} in soluzione acquosa oppure in forma solida come sale o come minerale (ad esempio dolomite, olivina, amianto).

L'idrosfera rappresenta la più abbondante fonte di magnesio disponibile per i sistemi biologici: la concentrazione di questo metallo negli oceani è mediamente 55 mM. Poiché molti sali di Mg^{2+} sono altamente solubili in acqua, il Mg^{2+} è immediatamente disponibile per le cellule, a differenza dei sali di alcuni metalli di transizione o del Ca^{2+} , che generalmente precipitano in soluzione acquosa a concentrazioni molto più basse dei sali di Mg^{2+} corrispondenti.²

L'abbondanza di magnesio in natura e le sue particolari proprietà chimico-fisiche ne hanno favorito l'utilizzo in un'ampia varietà di funzioni biologiche: il magnesio è quindi da considerare, a tutti gli effetti, un elemento essenziale.³ La quantità di magnesio assunta mediamente dall'uomo è di 0.5 g/die, che corrisponde ad un accumulo medio di circa 25g/70 kg di peso corporeo. Circa il 60-65% del magnesio totale si trova mineralizzato nell'osso, il 32-35% è complessato a proteine e acidi nucleici, e solo l'1-2% nel plasma e in altre forme minori di deposito.⁴

1.2 Proprietà chimiche del magnesio

Le proprietà chimiche del Mg^{2+} lo rendono unico tra i cationi cellulari e sono indispensabili per comprenderne il ruolo biologico. Rispetto ad altri cationi d'importanza biologica quali il K^+ , il Na^+ e il Ca^{2+} , ad esempio, il Mg^{2+} ha un raggio ionico relativamente piccolo ma allo stesso tempo il raggio idrato maggiore (Tabella 1): ne risulta che il volume della forma idrata del Mg^{2+} sia estremamente più grande di quello della corrispondente forma ionica (circa 400 volte), mentre per gli altri cationi il rapporto tra i volumi è relativamente piccolo.

Inoltre, il suo legame con le molecole di acqua è particolarmente stabile: ciò significa che, per attraversare le membrane biologiche e passare attraverso i canali ionici, il Mg^{2+} deve necessariamente subire una parziale o totale deidratazione.⁵

Tabella 1. Proprietà chimiche dei cationi biologici più comuni (adattata da M. E. Maguire e J. A. Cowan, 2002).²

Ione	Raggio ionico (Å)	Raggio idrato (Å)	Raggio idrato/Raggio ionico	Volume ionico (Å ³)	Volume idrato (Å ³)	Volume idrato/Volume ionico (Å ³)	Numero di coordinazione	Velocità scambio acqua (sec ⁻¹)
Na⁺	0.95	2.75	2.9	3.6	88.3	24.5	6	8 x 10 ⁸
K⁺	1.38	2.32	1.7	11.0	52.5	4.8	6-8	10 ⁹
Ca²⁺	0.99	2.95	3.0	4.1	108	26.3	6-8	3 x 10 ⁸
Mg²⁺	0.65	4.76	7.3	1.2	453	394	6	10 ⁵

Per le sue caratteristiche il Mg^{2+} è simile al Ca^{2+} , ma rispetto a quest'ultimo forma complessi dalla struttura molto più rigida. Infatti, il Mg^{2+} è un catione invariabilmente esa-coordinato, mentre il Ca^{2+} è relativamente promiscuo e può adottare arrangiamenti di legame 6-, 7- o 8-coordinati; il Ca^{2+} mostra una maggiore flessibilità rispetto al Mg^{2+} anche per quanto riguarda gli angoli (*range* di circa 50°-130° per il Ca^{2+} rispetto a 70°-110° per il Mg^{2+}) e le lunghezze di legame (2.2-2.7 Å per il Ca^{2+} , 2.05-2.25 Å per il Mg^{2+}).⁶ Questa maggiore rigidità di struttura dei complessi di Mg^{2+} si riflette sul ruolo spesso molto diverso che i due cationi svolgono nei processi biochimici. Il Ca^{2+} , infatti, agisce generalmente da molecola segnale che lega un gran numero di proteine e ne modula i cambiamenti conformazionali: la geometria del sito di legame del Ca^{2+} deve perciò necessariamente esibire una flessibilità tale da consentire il legame dello ione ad almeno due diversi stati conformazionali della proteina in questione.⁷ Al contrario, il più comune ruolo biologico del Mg^{2+} è quello di legare l'ATP o altri nucleotidi trifosfato nel sito catalitico di un enzima: in questo caso, delle sei normali posizioni di coordinazione dei ligandi sul Mg^{2+} , una o due

restano sempre occupate da molecole di acqua. Lo scopo del legame del Mg^{2+} all'ATP sembra, infatti, essere quello di attivare l'estere fosfato mediante idrolisi. Per gli enzimi non-ATP-dipendenti che legano il Mg^{2+} come cofattore, invece, questo ione serve probabilmente a mantenere una molecola d'acqua in una specifica posizione, per favorire un cambio conformazionale oppure per partecipare direttamente alla catalisi enzimatica.² Una caratteristica chimica fondamentale del Mg^{2+} è la sua natura di acido di Lewis, cioè la sua capacità di accettare un doppietto elettronico da una specie donatrice (detta, appunto, base di Lewis). Grazie all'elevata densità di carica, induce una polarizzazione di gruppi funzionali quali ad esempio gruppi carbonilici, e stabilizza la carica di anioni organici.⁵

Interazione con gli enzimi:

Poiché la concentrazione intracellulare di Mg^{2+} è molto alta (Tabella 2), la sua affinità di legame nei confronti dei tipici ligandi biologici è generalmente bassa o moderata (10^2 - 10^5 M^{-1}).⁸ Circa il 90% del Mg^{2+} intracellulare è legato ai ribosomi o a polinucleotidi. Le sue funzioni biologiche includono la stabilizzazione strutturale delle proteine, degli acidi nucleici e delle membrane cellulari, ma anche la promozione di specifiche attività strutturali o catalitiche di proteine, enzimi e ribosomi.^{3,4c}

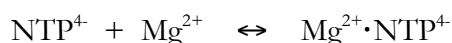
Il Mg^{2+} può intervenire come cofattore di reazioni enzimatiche:

- stabilizzando l'intermedio di reazione;
- stabilizzando il prodotto in uscita;
- legando contemporaneamente due substrati allo scopo di facilitare la reazione per effetto di prossimità.⁹

Le interazioni Mg^{2+} -enzima a oggi conosciute comprendono oltre 300 esempi (es. ribonucleasi H, esonucleasi e topoisomerasi II):¹⁰ molti di questi enzimi possono essere attivati anche dal legame con altri ioni metallici, ma gli effetti di questi ioni sull'efficienza e/o sulla specificità di substrato non sono comparabili con quelli del Mg^{2+} .

Sebbene il Mg^{2+} influenzi le reazioni enzimatiche in vari modi, il suo ruolo principale è sicuramente legato alle reazioni ATP-dipendenti, in cui l'ATP può servire come substrato (es. ATPasi e adenilato ciclasti) o come donatore di gruppi fosfato (es. chinasi e proteine G). I nucleotidi trifosfato (NTPs) sono presenti a livello cellulare in varie forme, tra le quali quella con quattro cariche negative (NTP^{4-}) è la più importante e con l'affinità maggiore per il Mg^{2+} . In condizioni fisiologiche, quando il Mg^{2+} libero intracellulare è intorno a 0,1-0,5 mM, gli NTP^{4-} non sono saturati dal Mg^{2+} . L'equilibrio dei nucleotidi tra le forme libera e

complessata è quindi cruciale per la cellula, in quanto la forma complessata col Mg^{2+} è quella biologicamente attiva:³



Complessi con gli acidi nucleici:

Lo scheletro ribosio-fosfato degli acidi nucleici, carico negativamente, mostra un'affinità per gli ioni metallici ($K_a = 10^2-10^4 M^{-1}$) che determina l'instaurarsi di facili interazioni con molti di questi. Poiché la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} e Na^+ è bassa, la chimica del legame degli acidi nucleici con i metalli in vivo è essenzialmente dominata dai più abbondanti K^+ e Mg^{2+} , sebbene quest'ultimo prevalga sul K^+ in virtù della maggiore carica positiva.

I metalli stabilizzano le catene di acidi nucleici neutralizzando la carica negativa dei fosfati e minimizzando quindi le repulsioni elettrostatiche.¹¹ Se e come il Mg^{2+} eserciti un ruolo sulla regolazione genica attraverso interazioni dirette col DNA non è ancora stato chiarito.

In ogni caso, il Mg^{2+} interviene sul ciclo cellulare in molti modi, ad esempio competendo con le poliammine (potenziali regolatori del ciclo) per il legame al DNA, oppure influenzando reazioni chinasiche cruciali in forma di $Mg \cdot ATP^{2-}$. In alternativa, grazie alla sua capacità di interagire direttamente con le proteine, il Mg^{2+} potrebbe costituire un fattore chiave nella fosforilazione degli istoni.¹² Indipendentemente dal meccanismo coinvolto, il Mg^{2+} è essenziale per il nucleo nel suo complesso, perché partecipa ad attività enzimatiche importanti per il mantenimento del DNA (es. esonucleasi per il riparo del DNA),¹³ per la duplicazione (topoisomerasi II, polimerasi I) o per la trascrizione (ribonucleasi H).¹⁴

Interazione con le membrane:

Il Mg^{2+} e il Ca^{2+} stabilizzano le membrane biologiche neutralizzando la carica sulle teste carbossilate e fosforilate dei lipidi. Il legame di uno ione metallico causa l'aumento della temperatura di transizione di fase, con un effetto tanto più evidente quanto maggiore è la carica del catione.^{4c} In questo contesto, quindi, gli ioni metallici sono in grado di regolare endo- ed esocitosi influenzando la fluidità e la stabilità delle membrane.

1.3 Contenuto e distribuzione intracellulare del magnesio

La mancanza di tecniche analitiche sensibili in grado di distinguere tra le forme libera e complessata del Mg^{2+} ha impedito, negli anni, uno studio dettagliato della sua distribuzione intracellulare: ne consegue che in letteratura si trovano una quantità di dati spesso contraddittori riguardo al contenuto e alla distribuzione intracellulare di Mg^{2+} .¹⁵

In base ai risultati ottenuti da misure di determinazione del Mg totale e libero/ionizzato con tecniche di *electron probe X-ray microanalysis* (EPXMA), ³¹P NMR, elettrodi Mg^{2+} -selettivi o indicatori fluorescenti, è emerso che la concentrazione totale di Mg nelle cellule è dell'ordine millimolare, con valori che variano tra 14 e 20 mM nella maggior parte dei tessuti animali considerati.^{3,15,16} A differenza di Na^+ , Ca^{2+} e Cl^- , che si accumulano principalmente a livello extracellulare, il Mg^{2+} , come il K^+ , è molto più abbondante all'interno delle cellule e si può perciò considerare un catione intracellulare (Tabella 2).

Tabella 2. Distribuzione di alcuni tra i principali ioni in un tipico tessuto animale.³

Ione	[Ione] _{in} (mM)	[Ione] _{out} (mM)
Na^+	10	145
K^+	140	5
Mg^{2+}	30 (totale) <1 (libero)	1 (0.5 complessato, 0.5 libero)
Ca^{2+}	0.1	4 (totale)
H^+	5×10^{-4}	5×10^{-4}
Cl^-	4	110

Le caratteristiche chimiche, che lo rendono capace di legare fosfolipidi, proteine, acidi nucleici, cromatina e nucleotidi, ne spiegherebbero la scarsa differenza di concentrazione (15-18 mM) tra mitocondri, nucleo e reticolo endoplasmatico. Solo una minima frazione del contenuto di Mg nel lumen di questi organelli si troverebbe in forma libera ionizzata (15-20%), come già dimostrato da misure effettuate sulla matrice di mitocondri isolati da fegato e cuore di topo; valori simili sono stati misurati anche nel citoplasma e nello spazio extracellulare di queste cellule.^{17,18} Gli effettivi livelli di Mg^{2+} libero nel nucleo e nel reticolo endoplasmatico sono ad oggi ancora solo teorizzati, sebbene sia probabile che anche in questi organelli non ci sia un gradiente di concentrazione rispetto al citoplasma.¹⁹

Il Mg^{2+} citoplasmatico rappresenta il *pool* più grande e facilmente rilevabile nella cellula: la maggior parte di questo (4-5 mM) è presente in forma di complessi con ATP, nucleotidi fosfati in genere e fosfometaboliti. Grazie alla sua abbondanza (circa 5 mM) e all'elevata

affinità di legame con il Mg^{2+} (K_d circa $78 \mu M$), l'ATP ne rappresenta il maggior ligando sia nel citoplasma che nella matrice mitocondriale. La presenza di ATP, nucleotidi fosfato, proteine e ligandi di varia natura, mantiene la concentrazione citosolica del Mg^{2+} libero tra 0.5 e 1 mM, circa il 5% del totale.¹⁶

La concentrazione di Mg^{2+} nel plasma e nei fluidi extracellulari è circa 1.2-1.4 mM, di cui un terzo si trova legato a proteine (esempio albumina) o altro. Se si confrontano questi valori con quelli misurati per il Mg^{2+} intracellulare, risulta evidente come, in condizioni normali, il gradiente chimico del Mg^{2+} libero attraverso le membrane plasmatica e intracellulari delle cellule di mammifero sia vicino a zero. Poiché il potenziale di equilibrio elettrochimico del Mg^{2+} cellulare è circa 50 mV,²⁰ devono necessariamente esistere meccanismi che operano a livello della membrana plasmatica per mantenere la concentrazione citosolica del Mg^{2+} libero e il Mg totale cellulare entro i livelli misurati. Questi meccanismi di trasporto sono alla base del mantenimento e del controllo dell'omeostasi del Mg^{2+} cellulare (Figura 1).¹⁹

1.4 Meccanismi di trasporto del Mg^{2+}

Cellule animali di varia origine mantenute in coltura in presenza di quantità molto basse (o addirittura in totale assenza) di Mg^{2+} esterno, non mostrano perdite significative nel contenuto di Mg^{2+} intracellulare.^{15,21} Questa osservazione ha contribuito per molto tempo ad alimentare l'erronea convinzione che il contenuto di Mg^{2+} cellulare resti invariato, o perlomeno che le sue variazioni non siano fisiologicamente rilevanti. Negli ultimi anni, infatti, questa idea è stata ribaltata da una gran quantità di esperimenti in cui sono stati osservati consistenti flussi di Mg^{2+} attraverso la membrana plasmatica in risposta a stimoli ormonali o metabolici.^{21,22,23} Linfociti,²⁴ cardiomiociti²⁵ ed epatociti²⁶ sono solo alcuni esempi di cellule animali in cui è stata misurata una diminuzione del 10-20% del Mg totale cellulare in risposta a stimoli adrenergici. La rapidità di questi flussi suggerisce la presenza di potenti meccanismi di trasporto sulla membrana plasmatica. Tuttavia, questi flussi non sono quasi mai accompagnati da variazioni del Mg^{2+} libero intracellulare: questo significa che i meccanismi di trasporto sono probabilmente accoppiati ad altrettanto efficaci sistemi tampone che rapidamente rimediano alla perdita o accumulo di Mg^{2+} cellulare.^{27,28}

Come avviene per altri cationi, il trasporto di Mg^{2+} attraverso le membrane plasmatiche e degli organelli avviene tramite canali (accumulo) o sistemi antiporto (estrusione). La

maggior parte dei meccanismi di accumulo di Mg^{2+} identificati è localizzata a livello della membrana plasmatica, ad eccezione di un canale per il trasporto al mitocondrio e uno al Golgi: quasi tutti presentano una modesta selettività per il Mg^{2+} rispetto ad altri cationi (Tabella 3). Attualmente non si dispone di informazioni strutturali riguardo alla natura dei meccanismi di trasporto al reticolo endo-sarco-plasmatico, e nemmeno dei meccanismi di estrusione.

Tabella 3. Trasportatori di Mg^{2+} nelle cellule animali (l'antiporto AtMHX è stato identificato solo in cellule di lievito e piante).¹⁹

	Famiglia	Membri	K_m apparente	Tipo di trasportatore
Meccanismi di influsso				
Membrana plasmatica	TRPM	TRPM6	0.7 mM	Canale
		TRPM7	0.7 mM	Canale
	Claudine	Claudina-16 (PCLN-1)	0.7 mM	Canale
		Claudina-19	0.7 mM	Canale
	MagT1	MagT1	0.2 mM	Canale
	SLC41	SLC41A1	0.7-3 mM	Carrier (?)
		SLC41A2	0.7-3 mM	Carrier (?)
	ACDP	ACDP1	0.7 mM	Carrier
		ACDP2	0.5 mM	Carrier
	NIPA	NIPA1 (SPG6)	0.7 mM	Carrier
		NIPA2	0.7 mM	Carrier
	Huntingtin	Huntingtin1 (HIP14)	0.87 mM	Carrier
		HIP14L	0.74 mM	Carrier
	Mitocondrio	Mrs2	Mrs2/AtMrs2, Lpe10	1.5 mM
Golgi	MMgt	MMgtT1	1.5 mM	Canale
		MMgtT2	0.6 mM	Canale
Meccanismi di efflusso				
Membrana plasmatica	Antiporto Na^+/Mg^{2+}	ND	15-20 mM	Antiporto
	Na^+ -indipendente	ND	20 mM	Scambiatore (?)
	SLC41	SLC41A1	0.7 mM	Carrier (?)
	Antiporto H^+/Mg^{2+}	AtMHX	15 mM	Scambiatore

I meccanismi di efflusso di Mg^{2+} attraverso la membrana plasmatica si distinguono principalmente in Na^+ -dipendenti e Na^+ -indipendenti (Figura 1):

- *Efflusso Na^+ -dipendente.* Si basa sull'antiporto Na^+/Mg^{2+} : dipende quindi dal gradiente di concentrazione del Na^+ ed è legato all'attività della pompa Na^+/K^+ ATPasi. L'attivazione di questo sistema di efflusso risponde all'aumento dei livelli di cAMP che si osservano in seguito a stimolazione da parte di vari ormoni e citochine.²⁹ E' stato

dimostrato, però, che l'efflusso Na^+ -dipendente può essere attivato anche dalla stimolazione dei recettori $\alpha 1$ -adrenergici in maniera indipendente dalla concentrazione di cAMP;³⁰

- *Efflusso Na^+ -indipendente.* In assenza di Na^+ extracellulare, o in presenza di molecole che bloccano l'attività dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ (amiloride, imipramide o quinidina), l'efflusso di Mg^{2+} avviene secondo un meccanismo alternativo ancora sconosciuto. Sembra che diversi cationi (Ca^{2+} o Mn^{2+}) e anioni (HCO^{3-} o Cl^-) siano mobilizzati in associazione all'efflusso di Mg^{2+} , ma non è ancora chiaro se si tratti di trasportatori distinti o piuttosto di sistemi antiporto o sinporto.^{31,32} Nel 2002, Ebel et al.³² hanno suggerito che un efflusso di Mg^{2+} Na^+ -indipendente possa avvenire, in eritrociti ed epatociti, attraverso il trasportatore della colina, la cui inibizione, infatti, blocca l'estruzione di Mg^{2+} .

Recentemente sono stati identificati numerosi meccanismi d'influsso di Mg^{2+} attraverso la membrana plasmatica delle cellule eucariotiche (Figura 1). Alcuni di questi sono canali che mostrano una relativamente alta specificità per il Mg^{2+} , sebbene siano permeabili anche ad altri cationi divalenti:

- *TRPM6 e 7 (Transient Receptor Potential Melastatin).* Sono stati i primi canali per il Mg^{2+} ad essere stati identificati nelle cellule animali.^{33,34} L'attività del canale TRPM6 è regolata dai livelli intracellulari di Mg^{2+} o da quelli di MgATP^{2-} . E' espresso soprattutto a livello dell'epitelio intestinale e nei tubuli renali: ciò suggerisce un suo probabile ruolo chiave nell'assorbimento e nell'omeostasi del magnesio corporeo. TRPM7 invece è ubiquitario: in cellule TRPM7^{-/-} sono stati osservati arresto della crescita cellulare e riduzione della vitalità. Tuttavia, una supplementazione di Mg^{2+} nel mezzo di coltura si è dimostrata sufficiente per ristabilire un fenotipo normale.³⁰ Nonostante la sua attivazione sia anch'essa regolata dai livelli intracellulari di Mg^{2+} o di MgATP^{2-} , TRPM7 non è comunque un canale selettivo per il Mg^{2+} , ma è in grado di legare anche altri ioni (calcio, zinco, nichel, bario e cobalto). Il dominio C-terminale dei trasportatori TRPM6 e TRPM7 presenta una caratteristica attività chinastica che li ha portati ad essere definiti anche *chanzymes*;³⁵
- *MagT1.* Questa proteina transmembrana, il cui gene è over-espresso in condizioni di bassi livelli di Mg^{2+} nel mezzo di coltura, è stata isolata per la prima volta in cellule

epiteliali umane.³⁶ A differenza degli altri trasportatori di Mg^{2+} finora identificati, questo canale sembra avere un'alta specificità per il Mg^{2+} e non risponde a concentrazioni fisiologiche di altri cationi cellulari (Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}). Sembra, quindi, probabile che MagT1 giochi un ruolo essenziale nell'omeostasi del Mg^{2+} cellulare;

- *Mrs2*. E' ad oggi l'unico trasportatore mitocondriale del Mg^{2+} conosciuto. E' stato isolato per la prima volta in lieviti³⁷ e sembra operare come canale per l'influsso del Mg^{2+} all'interno della matrice mitocondriale. E' modulato dal $\Delta\Psi$ mitocondriale e da inibitori dell'ATPasi e di ANT (*Adenine Nucleotide Translocator*).³⁸ La deprivazione di *Mrs2* in cellule HEK293 ha come conseguenze la perdita del complesso I e la diminuzione del Mg^{2+} mitocondriale: non è chiaro, tuttavia, se questa diminuzione sia dovuta all'assenza di *Mrs2* o piuttosto all'assenza del complesso I.³⁹ L'omologo di *Mrs2* nell'uomo media l'ingresso del Mg^{2+} al mitocondrio in modo simile. In condizioni di assenza o mancato funzionamento di *Mrs2* è stato osservato un meccanismo di ingresso del Mg^{2+} alternativo, ma molto più lento, che in solo in parte ripristina la condizione normale ma garantisce la sopravvivenza cellulare.⁴⁰ E' possibile, quindi, che *Mrs2* sia essenziale ma non indispensabile per la regolazione dei flussi di Mg^{2+} al mitocondrio.

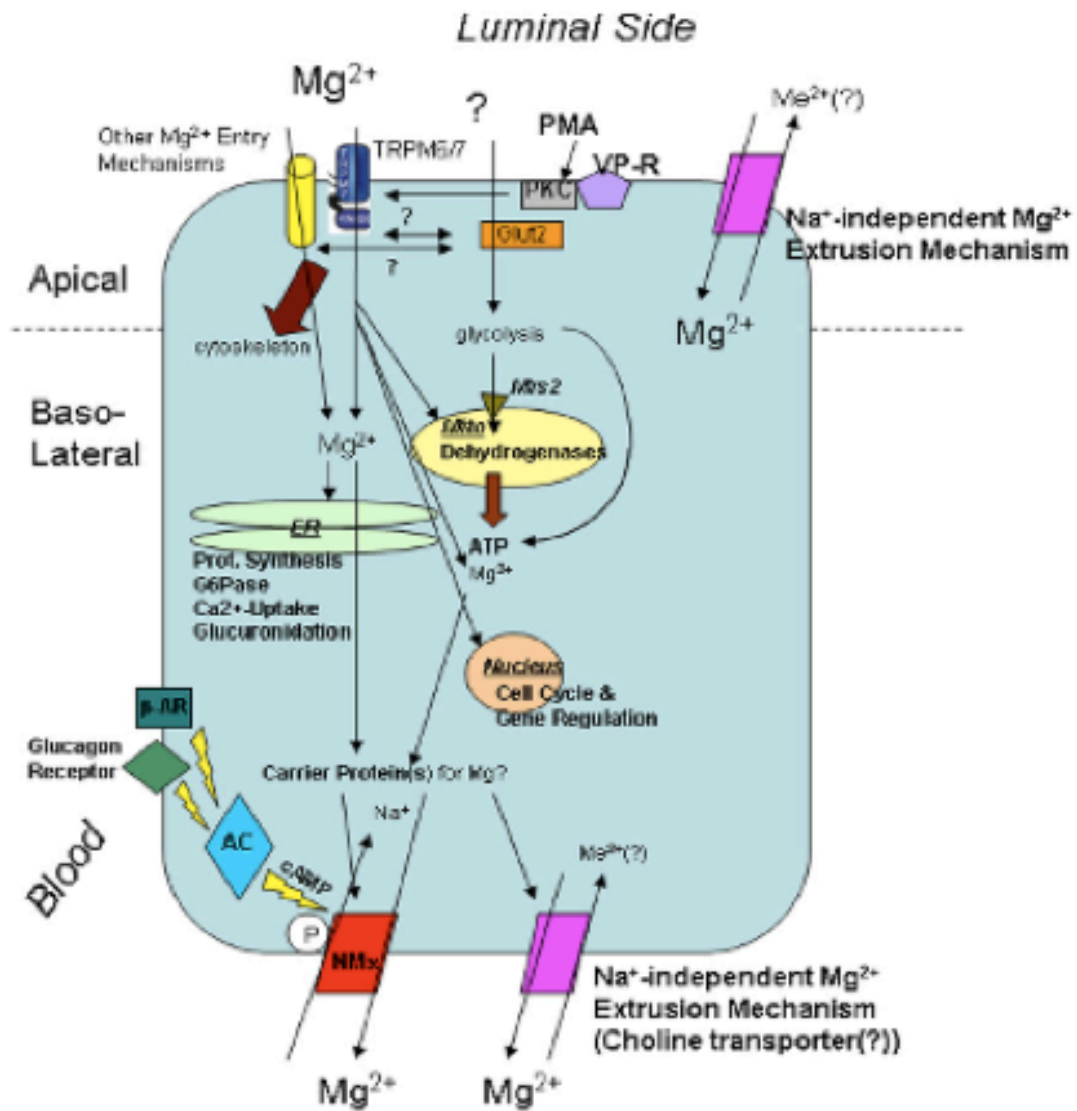


Figura 1. Regolazione dell'omeostasi cellulare del Mg²⁺. Lo schema riassume i principali meccanismi di controllo dell'omeostasi del Mg²⁺, la compartimentalizzazione e il trasporto attraverso la membrana plasmatica, così come le principali funzioni cellulari regolate da modificazioni del contenuto di Mg²⁺ nei diversi compartimenti. Immagine tratta da A. Romani, 2011.¹⁹

1.5 Regolazione del trasporto e dell'omeostasi del Mg^{2+}

I meccanismi di efflusso del Mg^{2+} dalla membrana plasmatica (Figura 1) possono essere regolati in vari modi:

Efflusso di Mg^{2+} cAMP-dipendente. Nella maggior parte delle cellule eucariotiche, gli ormoni e le molecole che agiscono inducendo un aumento dei livelli cellulari di cAMP (es. catecolamine, glucagone, acido arachidonico o forskolina), promuovono un significativo efflusso di Mg^{2+} nello spazio extracellulare. Questo effetto è stato osservato, tra gli altri, in cardiomiociti,²⁵ epatociti,²⁶ eritrociti⁴¹ e linfociti.⁴² In ognuno dei casi osservati, l'efflusso di Mg^{2+} è un processo rapido che raggiunge il massimo nell'arco di 8 minuti dalla stimolazione. Ad esso non si accompagnano mai variazioni significative della concentrazione di Mg^{2+} libero citosolico: ciò potrebbe indicare che il Mg^{2+} venga rapidamente liberato dai siti di legame citoplasmatici o dai *pool* contenuti negli organelli intracellulari per essere poi fatto uscire attraverso la membrana plasmatica secondo un meccanismo di efflusso che sembra essere principalmente Na^+ -dipendente (antiporto Na^+/Mg^{2+});^{31,43}

Efflusso cAMP-indipendente. Anche la stimolazione ormonale del recettore $\alpha 1$ -adrenergico causa un efflusso di Mg^{2+} dalla cellula. In particolare, in cardiomiociti ed epatociti è stato osservato che il rilascio di Mg^{2+} indotto da stimolazione con fenileprina è strettamente dipendente da un ingresso consistente di Ca^{2+} . Sembra, infatti, che il raggiungimento di un livello ottimale di Ca^{2+} citoplasmatico sia necessario per favorire il rilascio di Mg^{2+} ;^{44,45}

Omeostasi del Mg^{2+} e glucosio. Numerosi studi supportano l'ipotesi dell'esistenza di uno stretto legame funzionale tra l'omeostasi del Mg^{2+} e del glucosio. Ad esempio, ormoni quali le catecolamine e il glucagone, che inducono l'efflusso di Mg^{2+} dalla membrana plasmatica, attivano allo stesso tempo la glicolisi e promuovono il rilascio di glucosio epatico nel flusso sanguigno. Del resto, l'inibizione del trasportatore di glucosio nelle cellule epatiche ha come conseguenza una simile inibizione della fuoriuscita di Mg^{2+} .^{31,43} Allo stesso modo, la diminuzione della concentrazione intracellulare di Mg^{2+} è accompagnata da una riduzione della quantità di glucosio cellulare.^{44,46} Il ruolo del Mg^{2+} nella regolazione dell'omeostasi del glucosio è sottolineato dal fatto che numerosi enzimi glicolitici, inclusi l'esochinasi, la fosfofruttochinasi, l'enolasi e la piruvato chinasi, sono attivati a bassa concentrazione di Mg^{2+} , mentre alti livelli di Mg^{2+} ne inibiscono l'attività.⁴⁷

E' stato dimostrato che il contenuto cellulare di Mg^{2+} è significativamente più basso negli individui affetti da diabete di tipo I e II rispetto ai controlli sani: la carenza di Mg^{2+} in questi

soggetti è associata anche a un diminuito efflusso cAMP-dipendente e a una ridotta sintesi proteica e produzione di ATP.⁴⁸ La somministrazione di insulina esogena non solo è in grado di ristabilire sia la sintesi proteica e la produzione di ATP, ma anche i livelli normali di Mg^{2+} e il suo efflusso in risposta a vari stimoli: sembra, quindi, che il ruolo dell'insulina nella modulazione dell'omeostasi del Mg^{2+} non si esaurisca con il controllo del glucosio e l'accumulo o il rilascio di ormoni pro-glicemici come il glucagone, ma si estenda anche a una modulazione diretta dell'efflusso mediato dall'antiporto Na^+/Mg^{2+} ;⁴⁸

Omeostasi del Mg^{2+} e ATP. L'esposizione delle cellule a vari agenti o condizioni che inducono una marcata diminuzione del contenuto e della produzione di ATP (es. disaccoppianti mitocondriali,²⁸ fruttosio⁴⁹ o ipossia⁵⁰) induce una contemporanea fuoriuscita di Mg^{2+} dalla membrana plasmatica. Poiché l'ATP rappresenta il maggior ligando intracellulare del Mg^{2+} , una sua perdita o degradazione ad ADP o AMP determina un aumento della quota libera citosolica di Mg^{2+} , che viene poi eliminato tramite i sistemi di efflusso della membrana plasmatica. E' possibile, tuttavia, che l'ATP possa regolare l'efflusso di Mg^{2+} anche secondo meccanismi alternativi al semplice *buffering* (ad esempio esercitando un'azione diretta sull'attività dell'antiporto Na^+/Mg^{2+}), sebbene finora non esistano prove evidenti in tal senso.

Nel caso dei meccanismi di estrusione del Mg^{2+} si hanno molte informazioni riguardanti le vie di segnalazione che li attivano, ma esistono poche informazioni sulla struttura dei meccanismi stessi. Al contrario, per quanto riguarda l'ingresso di Mg^{2+} all'interno della cellula (Figura 1) si conoscono bene le strutture di molti dei trasportatori coinvolti, ma le informazioni riguardanti la loro regolazione sono poche e lacunose:

Ruolo della PKC. L'accumulo di Mg^{2+} intracellulare in risposta all'attivazione della proteina chinasi C (PKC) è un evento osservato in numerosi tipi cellulari:^{51,52} allo stesso modo, alterazioni della sua distribuzione o attività sono generalmente associati a ridotti livelli di Mg^{2+} .^{53,54} Negli epatociti, tuttavia, è stato osservato l'effetto opposto, cioè l'estrusione di Mg^{2+} :⁴⁵ una possibile spiegazione è che l'isoforma di PKC presente nel fegato abbia un ruolo diverso e che, quindi, le diverse isoforme tissutali della PKC attivino meccanismi diversi per controllo dei flussi di Mg^{2+} cellulare.

Ruolo delle MAPKs e dell'EGF. L'inibizione della segnalazione che coinvolge le MAPKs inibisce l'accumulo di Mg^{2+} e influenza l'attività delle cicline in cellule del muscolo liscio,

impedendone la progressione nel ciclo cellulare.⁵⁵ L'EGF sembra, invece, controllare l'espressione del canale TRPM6 delle cellule dell'epitelio renale, promuovendo l'accumulo di Mg^{2+} .⁵⁶ I meccanismi alla base di queste e altre osservazioni sono ancora tutti da chiarire.

1.6 Ruolo del Mg^{2+} nella trasduzione del segnale

La maggior parte delle reazioni di transfosforilazione richiedono Mg^{2+} : questo ione è, quindi, fondamentale per tutti i processi di trasduzione del segnale che coinvolgono le chinasi.¹⁵

L'esempio più conosciuto di domini regolabili dal Mg^{2+} , a livello della membrana plasmatica, è costituito dai recettori N-metil-D-aspartato (NMDA), inibiti dal Mg^{2+} intracellulare ed extracellulare.^{57,58} I recettori NMDA sono implicati nel danno neuronale post-trauma e sono attivati dal glutammato, che determina l'apertura dei canali del Ca^{2+} con conseguente aumento dei livelli citoplasmatici di Ca^{2+} e di Na^+ . L'attivazione Ca^{2+} -mediata della cascata di eventi successiva culmina con la morte neuronale.¹⁵ Alti livelli di Mg^{2+} bloccano l'attività del recettore NMDA riducendo il danno neuronale: il Mg^{2+} può essere, quindi, considerato un regolatore endogeno del recettore NMDA.¹⁵

L'azione del Mg^{2+} nella trasduzione del segnale si estende anche ad altri meccanismi, come l'attivazione della fosfolipasi C, che a sua volta determina la scissione del fosfatidilinositolo (PI) e dei suoi derivati. In seguito ad una serie di fosforilazioni successive del PI e all'idrolisi del PIP2 (fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato), vengono generati i secondi messaggeri diacilglicerolo (DAG) e inositolo-1,4,5-trifosfato (IP3); l'IP3 determina l'ingresso del Ca^{2+} nella cellula. Il Mg^{2+} sembra avere un ruolo nella prevenzione dell'attivazione della fosfolipasi C, e quindi del conseguente aumento dei livelli intracellulari di Ca^{2+} .⁵⁹

1.7 Mg^{2+} e proliferazione cellulare

Il ciclo cellulare,⁵⁵ la proliferazione⁶⁰ e il differenziamento^{61, 62} sono associati al mantenimento di livelli ottimali di Mg^{2+} e, in condizioni in cui l'accessibilità al Mg^{2+} cellulare

è ridotta o impedita, risultano significativamente compromessi. I meccanismi secondo cui la diminuzione del contenuto di Mg^{2+} cellulare influenza questi processi ruotano attorno a difetti nella segnalazione via MAPKs⁵⁵ e p27,⁶³ aumento dello stress ossidativo⁶⁴ e diminuzione dei livelli di $MgATP^{2-}$.⁶⁵ Poiché in condizioni normali la concentrazione cellulare di $MgATP^{2-}$ è mantenuta a livelli ottimali per la sintesi proteica, qualsiasi alterazione di questo parametro metabolico ha gravi ripercussioni sul normale funzionamento della cellula.⁶⁵ In più, il Mg^{2+} extracellulare regola la segnalazione mediata dalle integrine, *de facto* modulando l'interazione cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare. Alcuni anni fa H. Rubin ha proposto un'affascinante teoria per spiegare la possibilità di coinvolgimento attivo del Mg^{2+} nella cascata di eventi che portano alla proliferazione cellulare.⁶⁶ Secondo il modello del *Membrane Magnesium Mitosis* (MMM), il legame dei fattori di crescita ai recettori presenti sulla membrana plasmatica causerebbe una perturbazione di quest'ultima con conseguente diminuzione dell'affinità per gli ioni Mg^{2+} ad essa associati: il Mg^{2+} "liberato" si riverserebbe nel citoplasma e nel nucleo legandosi a vari bersagli e innescando una cascata di eventi culminanti nella sintesi proteica, nella sintesi del DNA e, infine, nella divisione cellulare (Figura 2).

La via di segnalazione attivata dalla PI-3K in seguito al legame dell'insulina col suo recettore potrebbe essere un esempio di questo modello: il cambio conformazionale e i movimenti lungo la membrana del recettore per l'insulina indurrebbero una perturbazione che diminuirebbe l'affinità di legame del Mg^{2+} e il suo rilascio nel citosol. L'autofosforilazione dei recettori attiva a sua volta la segnalazione PI-3K-mediata, che culmina nella fosforilazione di mTOR e nell'innescare della sintesi proteica.⁶⁷ Il Mg^{2+} sembrerebbe coinvolto, inoltre, nel riarrangiamento del citoscheletro per formare il fuso mitotico.

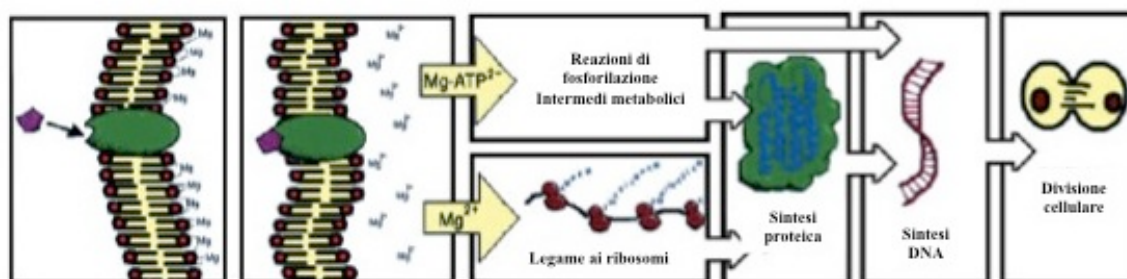


Figura 2. Ipotetico modello per il ruolo del Mg^{2+} come regolatore primario del ciclo cellulare. La perturbazione della membrana causa un incremento del Mg^{2+} libero intracellulare, che promuove la sintesi proteica e accelera la sintesi del DNA.⁶⁶

1.8 Mg²⁺ nel danno ossidativo e nell'apoptosi

La carenza di Mg²⁺ nell'organismo è generalmente associata a stress ossidativo: nei roditori, ad esempio, si è visto che una dieta povera di Mg²⁺ causa infiammazione e aumento della risposta immunitaria allo stress.⁶⁸ Sembra, inoltre, che una forte carenza di Mg²⁺ nel plasma sia accompagnata da diminuzione delle difese antiossidanti enzimatiche e non-enzimatiche (glutazione, vitamina E) nel fegato.¹⁵ I microsomi del fegato, infatti, diventano più suscettibili alla perossidazione lipidica, e si osserva un aumento il danno ossidativo anche a livello cardiaco.^{69,70}

Lo stress ossidativo gioca un ruolo importante nel processo d'invecchiamento, nell'aterosclerosi e in altre affezioni vascolari. Sembra esistere una correlazione diretta tra carenza di Mg²⁺ e attivazione del sistema immunitario nelle disfunzioni endoteliali: le cellule endoteliali che rivestono la superficie interna dei vasi sanguigni hanno il compito di sostenere e garantire l'integrità vascolare e una loro disfunzione può portare all'aterosclerosi o ad un'alterazione del flusso sanguigno.⁷¹

Inoltre, in ambito clinico è stato osservato che il Mg²⁺ influenza l'equilibrio tra sostanze ossidanti e antiossidanti: i livelli plasmatici di Mg²⁺ e quelli degli antiossidanti e dei marcatori biochimici dello stress ossidativo sembrano, infatti, essere strettamente correlati. Studi controllati hanno messo in evidenza come la sindrome da fatica cronica, gli stress emotivi e i danni da ischemia-riperfusionem potrebbero essere ridotti da un adeguato apporto di Mg²⁺.⁷²

In vitro, bassi livelli di Mg²⁺ cellulare indurrebbero danno ossidativo al DNA secondo due possibili meccanismi: incrementando i livelli intracellulari di ROS (specie reattive dell'ossigeno) e influenzando il meccanismo di riparazione del DNA.^{73,74} Ma la reale sequenza di eventi che porta al danno ossidativo dovuto alla carenza di Mg²⁺ nelle cellule rimane ancora in gran parte sconosciuta.

In letteratura vi sono dati contrastanti in merito alla correlazione tra morte cellulare per apoptosi e livelli di Mg²⁺; ciò può essere dovuto alla complessità delle diverse vie d'innescamento dell'apoptosi e della natura multifattoriale della modalità di azione del Mg²⁺ nelle cellule. Lo stress ossidativo è la causa principale della morte cellulare per apoptosi, un meccanismo attivo che richiede MgATP²⁻ per la sintesi e attivazione di proteasi ed endonucleasi specifiche. Essendo il Mg²⁺ un modulatore delle difese antiossidanti, è possibile che la

carenza o la supplementazione di Mg^{2+} esercitino effetti rispettivamente pro- e anti-apoptotici, ma la letteratura disponibile è frammentaria e in alcuni punti contraddittoria.⁷⁵ Tuttavia dobbiamo considerare che il Mg^{2+} ha effetti pleiotropici non sempre confinati alla modulazione dello stress ossidativo. Ad esempio è un cofattore essenziale della topoisomerasi II, l'enzima coinvolto nei processi di replicazione del DNA, trascrizione e riparazione; questo può aiutare a spiegare la scoperta che la carenza di Mg^{2+} ha effetti anti-apoptotici in cellule esposte all'etoposide o al teniposide, sostanze che hanno come bersaglio proprio la topoisomerasi II.⁶⁴ Il Mg^{2+} può, inoltre, agire regolando i livelli di espressione, e quindi il rapporto, di proteine pro- e anti-apoptotiche come Bax o Bcl-2, rispettivamente,⁷⁶ e può indurre, interagendo con le proteine Bax e Bid, il rilascio di citocromo c che porta all'attivazione di alcune caspasi effettrici.⁷⁷ Sembra, quindi, probabile che, nel determinare l'apoptosi o la sopravvivenza in condizioni di carenza o abbondanza di Mg^{2+} , possa avere un ruolo chiave la via mitocondriale.⁷⁵

1.9 Il Mg^{2+} come secondo messaggero

Nel 2011, da studi sulla natura della Linfocitopenia Idiopatica delle cellule $CD4^+$ (ICL), è sorprendentemente emerso un ruolo del Mg^{2+} come secondo messaggero.⁷⁸ L'ICL è una rara sindrome da immunodeficienza che comporta la drastica diminuzione dei linfociti T circolanti (in particolare $CD4^+$) e difetti nella loro attivazione in assenza di infezioni da HIV o altre cause comuni di linfocitopenia. L'analisi genomica di alcuni pazienti affetti da ICL ha mostrato una delezione a livello del gene codificante per il trasportatore MagT1, che si traduce nell'espressione di una proteina mutata più piccola: inoltre, i livelli di espressione della proteina mutata si sono rivelati molto bassi rispetto ai controlli sani.⁷⁸

Il trasportatore mutato ha mostrato una ridotta capacità d'influsso del Mg^{2+} , che tuttavia non influisce sui livelli totali di Mg^{2+} intracellulare: la mutazione del gene MagT1 comporta, quindi, una modifica dell'attività di trasporto del Mg^{2+} libero senza influire sulla forma legata del catione. Inoltre, in cellule in cui era stata ripristinata l'espressione della forma *wild-type* di MagT1, è stato dimostrato che questo canale è essenziale per l'attivazione del segnale indotto dal TCR (*T-cell Receptor*) e quindi per la normale attivazione dei linfociti T. In particolare, è stato misurato un rapido e transiente influsso di Mg^{2+} libero conseguente al reclutamento dello stesso TCR, i cui effetti si traducono in un aumento della velocità di

attivazione della PLC γ 1 e dei corrispondenti influssi di Ca $^{2+}$ nei linfociti T (Figura 3).⁷⁸

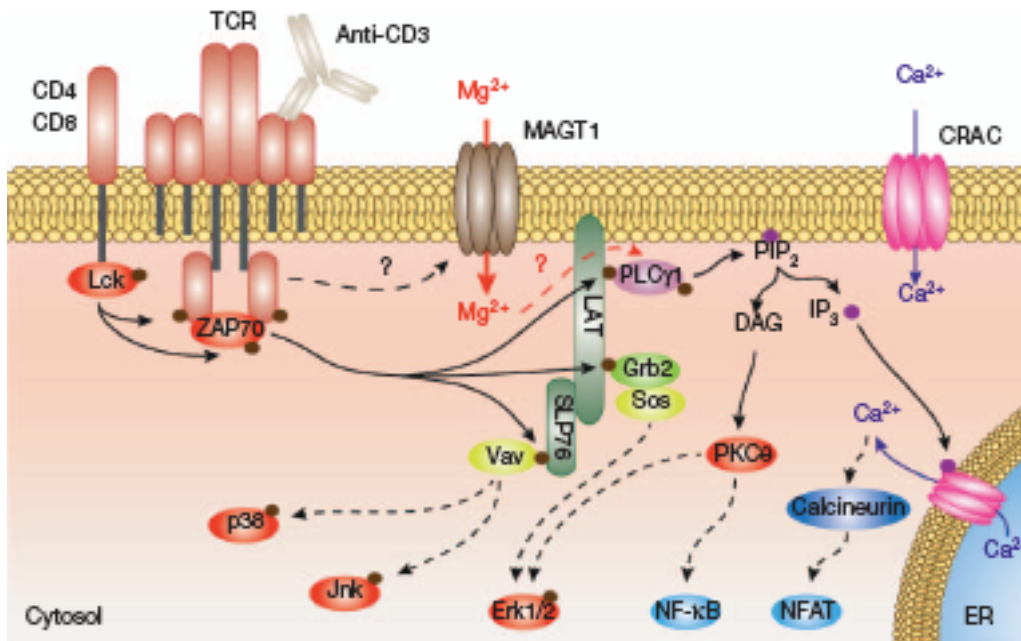


Figura 3. Ipotesi schematico del meccanismo attraverso cui l'influsso di Mg $^{2+}$ mediato da MagT1 partecipa alla segnalazione del TCR nei linfociti T. Le linee continue indicano gli effetti diretti; le linee tratteggiate indicano effetti indiretti. Immagine ripresa da F. Y. Li et al., 2011.⁷⁸

E' stato, quindi, proposto per la prima volta un ruolo di secondo messaggero del Mg $^{2+}$ nella regolazione cinetica della segnalazione nei linfociti T, in quanto questo catione soddisfa le seguenti caratteristiche:

- i suoi livelli crescono rapidamente in risposta a stimolazione;
- è in grado di alterare la velocità di uno o più processi cellulari;
- esercita un'attività specifica per un dato tipo cellulare.

1.10 Fisiologia e funzioni del Mg $^{2+}$

Il Mg $^{2+}$ svolge ruoli importanti nell'organismo ed è fondamentale per il normale funzionamento neuronale e muscolare. Infatti, una sua carenza porta ad ipereccitabilità dei tessuti, dovuta per lo più a maggior ingresso di Ca $^{2+}$ nella cellula ed all'attivazione di segnali da esso mediati.^{77,79}

In generale il Mg^{2+} compete con il Ca^{2+} regolandone l'assorbimento: insieme al Ca^{2+} è un componente importante di ossa e denti, regola la contrattilità del muscolo cardiaco, rilassa la muscolatura liscia, diminuisce la coagulazione, agisce come bloccante dei canali del Ca^{2+} e partecipa alla trasmissione neuromuscolare.¹⁵

Diversi fattori, quali un eccesso di Ca^{2+} , di fibre o di fosfati, sono in grado di variare, anche in maniera considerevole (24-85%), l'assorbimento di Mg^{2+} a livello cellulare.⁸⁰ Il Mg^{2+} è assorbito principalmente sotto forma di ione nell'ileo e nel colon per mezzo di un meccanismo mediato da un antiporto Na^+/Mg^{2+} e tramite un processo di diffusione passiva determinata dal gradiente elettrochimico.⁸¹

L'escrezione di Mg^{2+} plasmatico avviene invece a livello renale, dove il 75% è filtrato dalla membrana glomerulare: il 15% del filtrato è poi riassorbito attraverso i tubuli prossimali, mentre il 50-60% è riassorbito dall'ansa di Henle, cosicché in condizioni normali solo il 3-5% del filtrato viene escreto nell'urina.⁸² Tuttavia ci sono alcuni fattori che possono incidere in particolar modo sull'escrezione di Mg^{2+} , come ad esempio la mutazione del gene che codifica per la paracellina-1 (proteina trasportatrice di magnesio nei tubuli renali)⁸³ o l'assunzione di farmaci ad azione diuretica (tiazide),⁸⁴ antibiotici (gentamicina), aminoglicosidi, ciclosporina, cisplatino e digitalici, che provocano una perdita di Mg^{2+} attraverso l'urina per inibizione del suo riassorbimento.⁸⁵

In generale, l'omeostasi del Mg^{2+} è garantita dalla funzionalità renale e dall'assorbimento intestinale; infatti, basse concentrazioni plasmatiche di Mg^{2+} inducono un maggior assorbimento intestinale e una minor escrezione a livello renale, mentre alte concentrazioni plasmatiche di Mg^{2+} portano all'inibizione del riassorbimento nel tubulo contorto distale.⁸⁶

I livelli di Mg^{2+} sono sottoposti anche a un controllo endocrino, simile a quello del Ca^{2+} , Na^+ e K^+ . Diversi ormoni, quali l'ormone paratiroideo (PTH), l'insulina, il glucagone e gli ormoni steroidei, sono in grado di regolare l'equilibrio del Mg^{2+} ,⁸⁷ anche se il loro meccanismo d'azione è ancora per molti aspetti da definire.

Il PTH stimola il riassorbimento renale del Mg^{2+} attivando l'adenilato ciclasi e quindi la produzione di cAMP.⁸⁸ Alcuni studi riportano che l'ormone paratiroideo induce anche il rilascio di Mg^{2+} dall'osso e ne aumenta contemporaneamente l'assorbimento nell'intestino tenue in associazione con la vitamina D.⁸⁹

L'effetto del PTH può essere inibito da ormoni steroidei, estrogeni e progesterone, che variano il rapporto Ca^{2+}/Mg^{2+} soprattutto nelle donne durante il periodo di ovulazione.⁹⁰

L'insulina diminuisce l'escrezione di Mg^{2+} a livello dell'ansa di Henle,⁹¹ ma può anche avere un effetto indiretto regolando i livelli di glucosio: infatti, in pazienti con diabete mellito,⁹² nei quali è più frequente la perdita di Mg^{2+} , l'aumento di glucosio è capace di provocare una sostanziale diminuzione del Mg^{2+} ionizzato intracellulare.⁹³

Invece il glucagone, un ormone i cui effetti sono esattamente opposti a quelli dell'insulina, agisce in modo sinergico con la vasopressina sul tubulo contorto distale stimolando un recupero di Mg^{2+} concentrazione-dipendente.²²

1.11 Ipomagnesemia e ipermagnesemia: cause ed effetti

Nei soggetti adulti l'apporto di magnesio raccomandato (RDA=Razione Giornaliera Raccomandata) è di 350 mg/die per gli uomini e 300 mg/die per le donne, dose aumentabile fino a 450 mg/die nel periodo di gravidanza e allattamento.⁹⁴

Quantità elevate di magnesio sono contenute soprattutto in cereali integrali, legumi, frutta secca; si trova invece in quantità leggermente più basse in ortaggi, banane e acqua (anche se per quest'ultima la composizione varia in base alla zona geografica).⁹⁵ Al contrario, le fibre, l'alcool o un eccesso di fosfato e di calcio diminuiscono l'assorbimento del magnesio, presumibilmente rendendo più bassa la sua concentrazione nel lumen intestinale. La cottura dei cibi in acqua, inoltre, ne riduce drasticamente il contenuto di magnesio.

L'importanza di assumere ogni giorno alimenti ricchi di magnesio deriva dalla perdita, attraverso le urine, le feci e il sudore, di quantità cospicue di questo minerale (fino a 100 mg/giorno), che l'individuo deve assolutamente reintegrare per mantenere stabile il bilancio del magnesio nell'organismo.⁹⁶

La reale introduzione del magnesio stimata nella dieta dei paesi occidentali è attorno a 200 mg per le donne e 260 mg per l'uomo, come conseguenza del consumo prolungato di alimenti a basso contenuto di magnesio.⁹⁷ Tale razione quotidiana è comunque ancora sufficiente per evitare una condizione di carenza di magnesio (ipomagnesemia), ma non è abbastanza alta da stabilire una normale concentrazione plasmatica di magnesio che risulti protettiva nei confronti di varie patologie.⁹⁸

L'ipomagnesemia è una condizione patologica caratterizzata da bassi livelli di Mg^{2+} nel siero, sotto i 1,2mg/dL. Quando l'ipomagnesemia è lieve, i sintomi più comuni sono anoressia, nausea, vomito, vertigini, letargia, stanchezza mentale e fisica. Le deficienze di Mg^{2+} più

severe si manifestano con parestesia, crampi muscolari, tremori, irritabilità, riduzione della durata di attenzione e confusione mentale.⁹⁹ Le cause che determinano l'ipomagnesemia sono, ovviamente, un inadeguato apporto dietetico, l'abuso di lassativi, ma anche difetti di assorbimento intestinale come la malattia di Crohn, la sindrome da malassorbimento, la steatorrea e l'insufficienza cronica pancreatica, in cui l'eccesso di acidi grassi saponifica il Mg^{2+} riducendone l'assorbimento.⁹⁸

Un'altra causa d'ipomagnesemia è connessa a disfunzioni renali che portano ad un incremento dell'escrezione di magnesio. Infatti, diversi studi dimostrano che il mancato riassorbimento renale è dovuto a disordini genetici ereditari che coinvolgono i meccanismi di trasporto del magnesio (es. mutazione del gene della paracellina-1, alterazione della subunità γ della pompa Na^+-K^+ ATPasi, alterazione del recettore del PTH sensibile a Ca^{2+}/Mg^{2+})^{100,101}, e quasi tutti provocano ipomagnesemia frequentemente associata a ipocalcemia; anche disfunzioni endocrine come iperaldosteronismo,⁸⁶ iperglicemia,⁹³ in particolare nel diabete mellito¹⁰² e nell'ipoparatiroidismo,⁸⁹ interessano direttamente il riassorbimento del magnesio a livello renale.

La carenza di magnesio sembra avere un ruolo fondamentale in diverse patologie, quali patologie cardiache e vascolari (ischemia miocardica, aritmie cardiache, ipertensione, aterosclerosi),¹⁰³ osteoporosi¹⁰⁴ ed asma.¹⁰⁵ E', infatti, emerso che la somministrazione di magnesio contribuisce a ridurre il rischio di tali patologie: in particolare, è stata scoperta un'associazione inversa tra l'apporto alimentare di magnesio e il rischio d'infarto, fenomeno reso ancora più evidente nei soggetti ipertesi rispetto a quelli normotesi.¹⁰³

Se la funzionalità renale è corretta, il magnesio non risulta essere tossico. Stati d'ipermagnesemia, caratterizzata appunto da elevati livelli di magnesio nel sangue (>4 mEq/L), si manifestano raramente poiché, essendo il magnesio idrosolubile, il suo eccesso viene eliminato nelle urine. In ogni caso i sintomi più frequenti sono nausea, vomito, ipotensione, bradicardia, sonnolenza, diarrea e crampi addominali.¹⁰¹ La tossicità del magnesio come conseguenza di somministrazioni molto elevate, si manifesta con una depressione del sistema nervoso centrale fino all'eventuale morte. I livelli plasmatici di Mg^{2+} che portano questi sintomi devono, però, essere superiori alle 3,5-5 mmol/L.

2. TECNICHE DI DETERMINAZIONE DEL MAGNESIO

2.1. Introduzione

Nonostante le numerose funzioni che il magnesio svolge a livello cellulare, ad oggi si conosce ancora poco del suo coinvolgimento nelle funzioni cellulari e fisiologiche, soprattutto a causa della mancanza di tecniche analitiche adeguate.

Rispetto, al Ca^{2+} , per esempio, la cui concentrazione citosolica in condizioni basali è bassa ma varia di diversi ordini di grandezza in risposta a vari stimoli (da 10 nM fino a 100 μM), il Mg^{2+} è mantenuto nel citoplasma a concentrazioni dell'ordine millimolare. Questo implica che eventuali fluttuazioni di Mg^{2+} possono essere misurate solo se si dispone di una tecnica sufficientemente sensibile da consentire la rilevazione di piccole variazioni di concentrazione su un consistente *background*.¹⁰⁶ Molte delle tecniche utilizzate per l'analisi del Mg^{2+} cellulare, in particolar modo quelle basate su sensori fluorescenti, mostrano inoltre una certa reattività crociata soprattutto con il Ca^{2+} : diventa, così, difficile stabilire con precisione i reali movimenti e la distribuzione del Mg^{2+} intracellulare.

Un ulteriore problema non ancora risolto è rappresentato dall'identificazione di un tessuto o di un tipo cellulare che possa essere utilizzato come *marker* di ipo- o iper-magnesemia.⁴⁸ L'analisi della concentrazione sierica di Mg^{2+} , infatti, dipende dalla dieta del soggetto, dalla funzionalità intestinale e da quella renale: non c'è, inoltre, una buona correlazione del contenuto di Mg^{2+} sierico con quello tissutale e cellulare.¹⁰⁷

Infine, non è ancora chiaro se la frazione funzionalmente importante sia quella del Mg^{2+} legato o quella libera ionizzata, ed è ovviamente necessario trovare tecniche analitiche sufficientemente sensibili da monitorare variazioni di concentrazione che sono normalmente molto piccole.

2.2. Principali tecniche di determinazione del magnesio

La Spettroscopia di Assorbimento Atomico (AAS) è considerata la tecnica d'elezione per la misurazione del magnesio totale in estratti acidi di campioni biologici.¹⁰⁸ L'analisi di assorbimento atomico consiste nella misura dell'assorbimento della luce da parte di atomi nel loro stato stazionario in campioni vaporizzati: l'intensità del raggio emesso diminuisce con l'aumentare della concentrazione, quindi l'attenuazione viene correlata con la concentrazione dell'elemento nel campione sulla base di opportuni standard. Nonostante sia considerata ancora oggi la tecnica più sensibile per la quantificazione degli elementi in tracce (soprattutto metalli) nelle cellule, e più in generale in matrici di ogni tipo, l'AAS comporta alcuni svantaggi: le misure, infatti, richiedono campioni consistenti che peraltro necessitano di lisi cellulare con acidi forti (HNO_3) per l'estrazione del metallo. Pertanto, non è possibile discriminare tra le forme libera e complessata, e tantomeno ottenere informazioni sulla distribuzione e compartimentalizzazione del Mg^{2+} in cellule intere.¹⁰⁶

In passato i flussi di Mg^{2+} erano misurati soprattutto con isotopi radioattivi (^{27}Mg e ^{28}Mg): tuttavia, le limitazioni tecniche dovute al rischio biologico, la breve emivita degli isotopi e gli alti costi di produzione ne hanno fortemente limitato l'utilizzo. Attualmente gli isotopi radioattivi sono stati sostituiti con la loro controparte stabile (^{25}Mg e ^{26}Mg):¹⁰⁹ si tratta, comunque, di metodiche poco usate a causa dell'alto costo e della necessità di disporre di apparecchi per la spettrometria di massa, generalmente poco diffusi.

La Risonanza Magnetica Nucleare del ^{31}P (^{31}P -NMR) è un metodo indiretto per misurare *in vivo* la concentrazione del Mg^{2+} libero intracellulare in diversi tessuti. Con questa tecnica non invasiva si rivelano i segnali delle molecole fosforilate presenti nel citoplasma, tra cui il fosfato inorganico (P_i), la fosfocreatina (PCr) e l'ATP.¹¹⁰ A queste molecole è naturalmente legato il Mg^{2+} : la quantità dello ione legata all'ATP influenza le frequenze di risonanza dei segnali generati dai tre gruppi fosforici della molecola, per cui si ha il cosiddetto *chemical shift*. In base all'equilibrio chimico tra il Mg^{2+} legato all'ATP e quello libero, le variazioni della frequenza di risonanza dell'ATP sono funzione delle variazioni della concentrazione del $[\text{Mg}^{2+}]$. Tramite opportune curve di calibrazione, che tengono conto sia degli altri ioni citosolici che competono col Mg^{2+} nella complessazione dell'ATP (quali H^+ , Na^+ , K^+), che degli altri leganti (quali ADP, PCr, P_i) che competono con l'ATP nel legare il Mg^{2+} , è possibile misurare *in vivo*, con elevata accuratezza e in modo non invasivo, la concentrazione citosolica cellulare di Mg^{2+} , come dimostrato da analisi effettuate nel

cervello¹¹¹ e nel muscolo scheletrico a riposo, durante contrazione, e nella successiva fase di recupero.¹¹²

Il contenuto di Mg^{2+} nei diversi compartimenti sub-cellulari può essere misurato con l'*Electron Probe Microanalysis*,¹¹³ che si avvale di un microscopio elettronico che irradia le cellule con un fascio elettronico focalizzato. L'eccitazione degli atomi intracellulari che ne consegue, causa un caratteristico rilascio di energia sotto forma di raggi X in base al tipo e al numero di atomi presenti nella cellula. Con questa tecnica si misura il Mg^{2+} totale in sezioni crio-congelate e deidratate: si tratta quindi di un metodo invasivo che non consente misure dinamiche.¹⁰⁶

Per quanto riguarda le tecniche elettrochimiche, l'utilizzo dei micro-elettrodi sensibili a piccole quantità di Mg^{2+} , è limitato ad alcune linee cellulari e solo recentemente si sono sviluppati sistemi di misura sufficientemente sensibili, specifici e attendibili nel misurare il Mg^{2+} intracellulare.¹¹⁴

2.3. Indicatori fluorescenti

Lo studio del ruolo del Mg^{2+} nella fisiopatologia cellulare richiede la possibilità di monitorare le dinamiche della sua concentrazione in cellule vive con una buona risoluzione spaziale e temporale: per questo motivo, negli ultimi anni particolare attenzione è stata dedicata alle sonde fluorescenti, che, grazie alla loro sensibilità, rappresentano il metodo d'elezione per misurare variazioni anche minime nella concentrazione degli ioni cellulari.¹⁰⁶

Negli ultimi 50 anni la ricerca scientifica si è focalizzata soprattutto sullo studio del Ca^{2+} come secondo messaggero; per questo motivo, lo sviluppo di nuove sonde fluorescenti è stato mirato principalmente a mettere a punto indicatori sempre più sensibili per monitorare la concentrazione del Ca^{2+} *in vivo*. Il Mg^{2+} , invece, è stato a lungo un "catione dimenticato": lo sviluppo di sonde per il Mg^{2+} cellulare, quindi, non ha avuto la stessa fortuna, al punto che i primi indicatori fluorescenti per il Mg^{2+} erano semplicemente derivati da sonde Ca^{2+} -specifiche pre-esistenti.¹⁰⁶

Le prime sonde fluorescenti commerciali per il Mg^{2+} sfruttavano le proprietà dell'APTRA (acido o-amminofenol-N,N,O-triacetico) e dei suoi derivati, che sono analoghi strutturali dell'EDTA (acido etilendiaminoacetico).¹¹⁵ La struttura APTRA è stata, poi, modificata per dare origine all'indicatore fluorescente FURAPTRA (mag-fura-2, Figura 4).¹¹⁶ Il sito di

legame della molecola APTRA e dei suoi derivati manca di sufficiente selettività per il Mg^{2+} rispetto al Ca^{2+} e le sonde che ne sfruttano le proprietà, di fatto legano il Ca^{2+} con un'affinità fino a 100 volte maggiore rispetto al Mg^{2+} . Infatti, sebbene negli anni siano state sviluppate e commercializzate molte sonde per il Mg^{2+} , la maggior parte di queste in realtà sono semplicemente analoghi delle corrispondenti sonde per il Ca^{2+} : ad esempio, mag-fura-2 (analogo di fura-2), mag-indo-1 (analogo di indo-1) e magnesium green (analogo di calcium green) (Figura 4).

E' chiaro, quindi, che, anche se con bassa affinità, queste sonde mantengono la capacità di legare il Ca^{2+} : sebbene in condizioni basali il Ca^{2+} libero citoplasmatico sia presente in quantità trascurabile e quindi ininfluente sulla misura del Mg^{2+} , le sonde commerciali non sono in grado di dare risultati attendibili nei casi in cui le fluttuazioni di Mg^{2+} sono accompagnate da un aumento consistente della concentrazione di Ca^{2+} (e cioè ad esempio se il Ca^{2+} interviene come secondo messaggero).

Le sonde fluorescenti sono comunque molto diffuse soprattutto per la facilità ed economicità delle metodiche sfruttate: gli indicatori fluorescenti consentono la determinazione e il *mapping* del Mg^{2+} libero intracellulare mediante la classica spettrometria di fluorescenza,¹¹⁷ la citofluorimetria^{118,119} oppure in singole cellule mediante microscopia di fluorescenza.¹²⁰

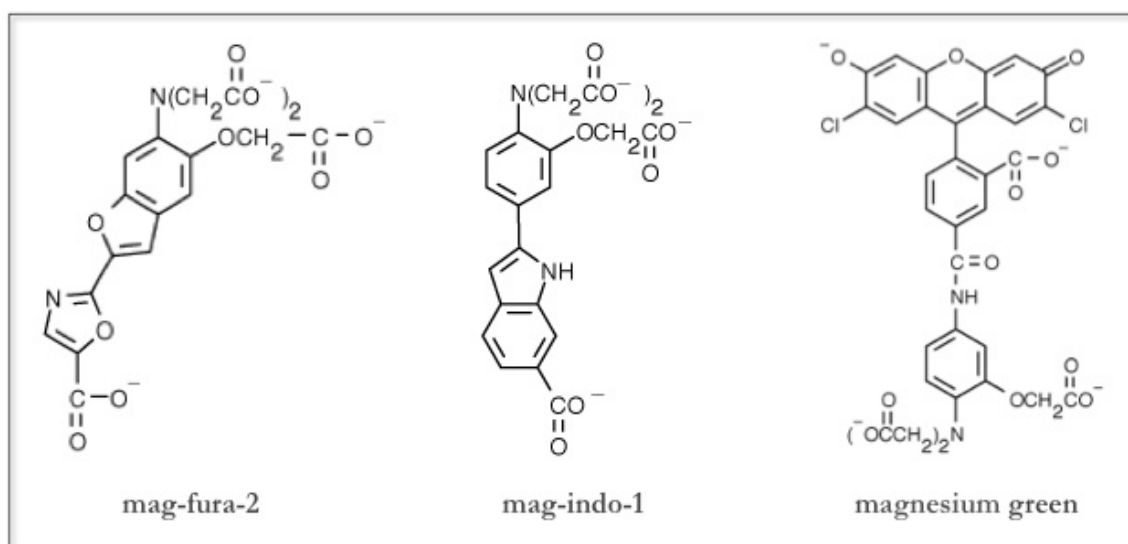


Figura 4. Struttura di alcune delle sonde commerciali per il Mg^{2+} più usate.

2.4 Sonde fluorescenti di ultima generazione

Sfruttando la scia del crescente interesse nei confronti del magnesio da parte della comunità scientifica, negli ultimi anni sono state proposte numerose molecole alternative alle sonde commerciali basate su cromòfori e siti di legame differenti: alcune di queste sono state testate con successo nei sistemi biologici.¹⁰⁶

2.4.1 Sonde KMG

Le sonde della famiglia KMG, proposte da un gruppo di ricerca giapponese, sfruttano un β -dichetone carico come ligando selettivo per il Mg^{2+} . La prima molecola pubblicata, KMG-20, aveva come cromòforo una cumarina e ha mostrato una selettività per il Mg^{2+} rispetto al Ca^{2+} maggiore degli indicatori commerciali ($K_d(Mg^{2+})=10$ mM e $K_d(Ca^{2+})=30$ mM) e si è dimostrata utile per dimostrare l'esistenza di flussi di Mg^{2+} in cellule PC12.¹²¹ L'ottimizzazione di questo composto ha successivamente portato alla sintesi della sonda KMG-104, con un gruppo xantene eccitabile nel visibile come cromòforo, la cui $K_d(Mg^{2+})$ è di circa 2.1 mM:¹²² la sonda, quindi, ha un'affinità per il Mg^{2+} paragonabile a quella delle classiche sonde commerciali, ma con in più il vantaggio di non essere sensibile al Ca^{2+} nelle concentrazioni fisiologiche ($K_d(Ca^{2+})=7.5$ mM). Le caratteristiche in termini di spettro di eccitazione, segnale di fluorescenza e selettività verso il Mg^{2+} , rendono questo sensore una delle più promettenti alternative per l'*imaging* del Mg^{2+} libero.¹⁰⁶

Lo stesso gruppo ha recentemente sviluppato una nuova molecola fluorescente Mg^{2+} -specificità (KMG-301) che si localizza nel mitocondrio:¹²³ la fluorescenza della sonda risponde solo alle variazioni di concentrazione del Mg^{2+} mitocondriale in condizioni fisiologiche ed è stata utilizzata con successo, insieme alla KMG-104, per confrontare le dinamiche del Mg^{2+} citosolico con quello mitocondriale. Infatti, in conseguenza del trattamento con il disaccoppiante mitocondriale FCCP (*carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone*), sono state osservate una diminuzione della concentrazione di Mg^{2+} mitocondriale e il contemporaneo aumento di Mg^{2+} citosolico in cellule PC12 (Figura 5) e neuroni ippocampali.¹²³

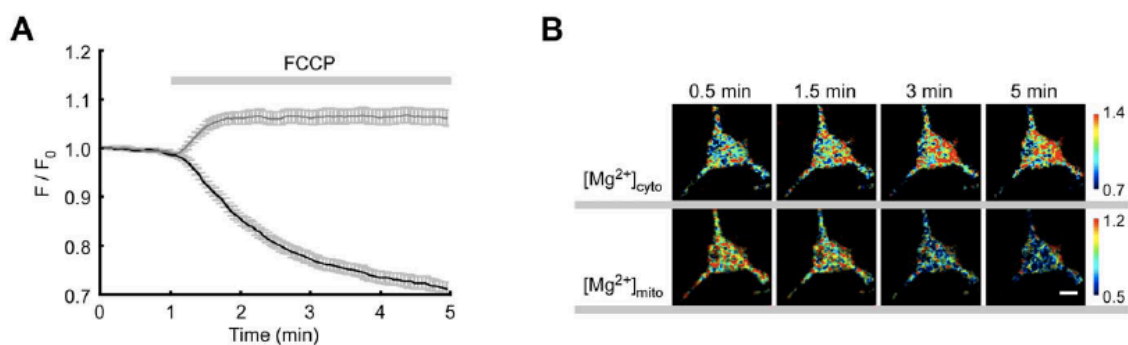


Figura 5. Misure simultanee delle variazioni di concentrazione del Mg^{2+} citosolico e mitocondriale effettuate con le sonde della famiglia KMG in cellule PC12 trattate con FCCP. A) Andamento nel tempo della fluorescenza di KMG-104 (Mg^{2+} citoplasmatico, linea grigia) e KMG-301 (Mg^{2+} mitocondriale, linea nera); B) immagini pseudo-colorate dei cambiamenti di fluorescenza ai tempi indicati. Immagine tratta da Y. Shindo et al., 2011.¹²³

2.4.2 AMg1 e AMg1-AM

I primi a descrivere la sintesi e l'applicazione di sonde per il Mg^{2+} specificamente disegnate per la microscopia confocale a due fotoni (TPM) sono stati H. W. Kim et al. nel 2007.¹²⁴ Sebbene alcune sonde commerciali fossero già state usate in precedenza per l'*imaging* in TPM, la loro bassa *two photon cross section* (TPCS) non ne consentiva l'utilizzo per la visualizzazione dei tessuti in profondità.¹²⁵

La sonda AMg1 (Figura 6) sfrutta un APTRA come sito di legame selettivo per il Mg^{2+} : la sua selettività per questo ione è, quindi, simile a quella riportata per molte sonde commerciali, come ad esempio mag-fura-2. Il cromòforo utilizzato (2-acetil-6-(dimetilamino)naftalene), invece, è specifico per la microscopia a doppio fotone e conferisce alla sonda AMg1 un'elevata TPCS. Gli autori riportano, inoltre, che l'elevato spostamento verso il rosso della forma esterificata della sonda (AMg1-AM) con l'aumento della polarità del solvente, consente di discriminare tra il contributo della forma idrolizzata citosolica (fluorescenza rossa) e di quella non idrolizzata associata alle membrane (fluorescenza blu) (Figura 6).¹²⁴

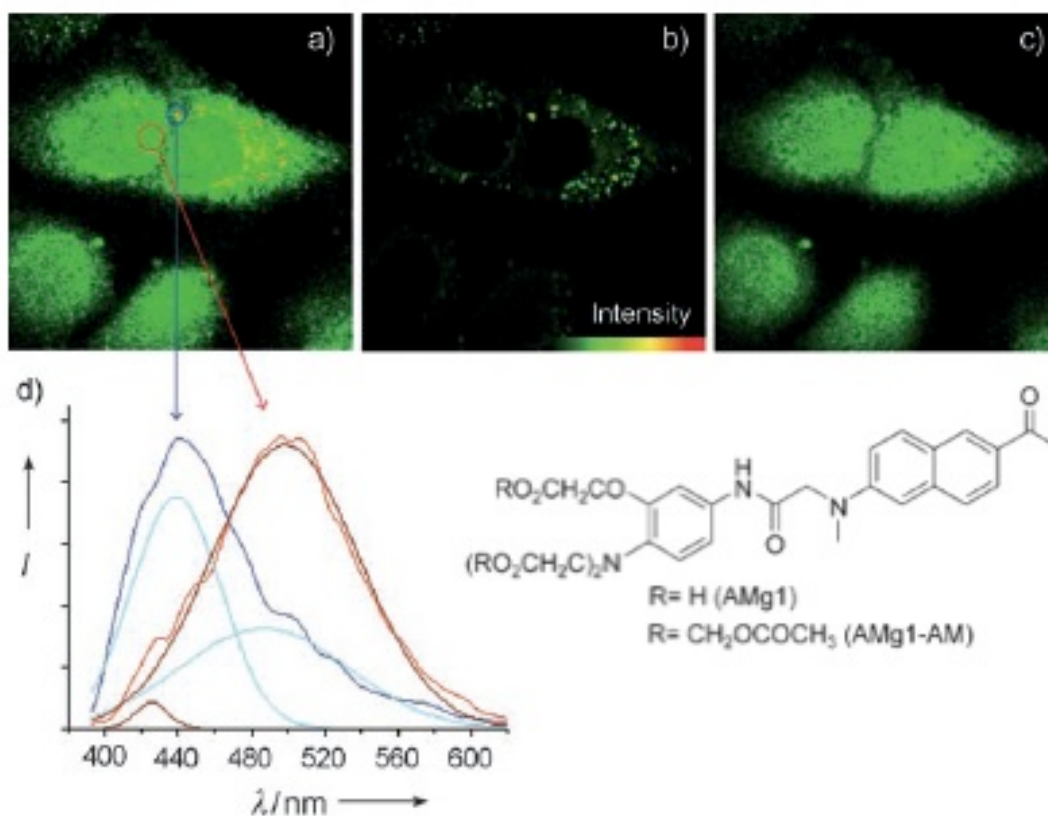


Figura 6. Formula di struttura della sonda AMg1-AM, caratteristiche di fluorescenza e immagini TPM di cellule Hep3B marcate con la sonda AMg1-AM. a) immagine acquisita a 360-620 nm; b) immagine aquisita a 360-460 nm; c) immagine acquisita a500-620 nm; d) spettri di emissione di fluorescenza (normalizzati) provenienti dai domini idrofobico (blu) e idrofilico (rosso) di cellule Hep3B marcate con AMg1-AM. Tratto da H. W. Kim et al., 2007.

I vantaggi della sonda AMg1, quindi, sono:

- l'alta TPCS misurata consente l'*imaging* del Mg²⁺ in profondità nei tessuti (100-300 μm);
- la possibilità di distinguere la sonda localizzata in regioni cellulari a diversa polarità consente di eliminare il contributo della frazione non esterificata, che costituisce invece la maggior fonte di errore nelle quantificazioni del Mg²⁺ libero cellulare con sonde commerciali (es. mag-fura-2).¹⁰⁶

2.5 DCHQ1 e suoi derivati

L'8-idrossichinolina (8-HQ), il secondo maggior chelante per il Mg^{2+} dopo l'EDTA, è essenzialmente non-fluorescente in soluzione acquosa e in solventi organici, ma mostra un'intensa emissione nel giallo-verde in conseguenza del legame con un catione.¹²⁶ Sebbene abbia una scarsa selettività nei confronti di specifici cationi, è stato dimostrato che opportune sostituzioni la rendono altamente selettiva: è il caso delle sonde della famiglia DCHQ (*DiazaCrown 8-HydroxyQuinoline*, Figura 7), ottenute dalla coniugazione di un diaza-18-crown-6 con due derivati dell'8-HQ, che hanno dimostrato un'affinità per il Mg^{2+} maggiore di tutte le sonde commerciali attualmente esistenti.^{127,128} I sensori della famiglia DCHQ sono eccitabili nella regione dell'UV (330-360 nm) ed emettono nel visibile intorno a 500 nm. I complessi con il Mg^{2+} di due di queste molecole (DCHQ1 e DCHQ2) hanno mostrato costanti di dissociazione ($K_d(Mg^{2+})$) nell'ordine micromolare, cioè dello stesso ordine di grandezza dell'ATP: sono, quindi, in grado di competere con il maggiore ligando intracellulare del Mg^{2+} . Inoltre, la fluorescenza di questi sensori non è influenzata dal legame con il Ca^{2+} o con altri cationi divalenti in condizioni fisiologiche.¹²⁷

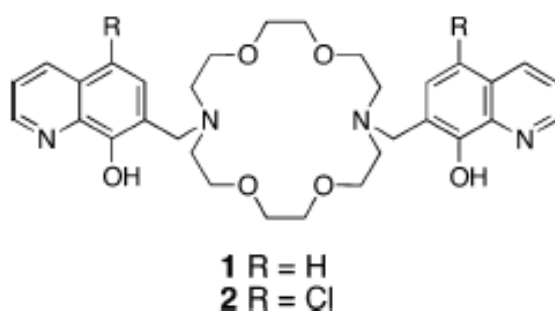


Figura 7. Struttura delle sonde della famiglia DCHQ.

Entrambi i sensori derivati dall'8-HQ marcano selettivamente le cellule vive e mostrano una scarsa citotossicità dopo 30 minuti dallo *staining*, consentendo l'osservazione del campione per periodi prolungati.¹²⁷ Per la DCHQ1, in particolare, è stato dimostrato che il segnale di fluorescenza correla con il contenuto di magnesio cellulare ed è stata usata per mettere a punto un metodo di quantificazione del Mg totale intracellulare alternativo alla spettroscopia di assorbimento atomico.¹²⁸ Come prevedibile, considerate le caratteristiche fotochimiche delle idrossichinoline, la fluorescenza della sonda DCHQ1 in cellule intere si

è rivelata fortemente influenzata dalla presenza delle membrane.¹²⁷ Per questa ragione è stato messo a punto un protocollo di quantificazione del Mg totale in campioni cellulari sottoposti a sonicazione. Sfruttando una semplice tecnica fluorimetrica, infatti, con la sonda DCHQ1 è possibile quantificare il Mg totale in piccoli campioni ($2-5 \times 10^5$ cells/mL) con risultati confrontabili a quelli dell'AAS.¹²⁸

DCHQ1 è stata anche utilizzata con successo per mappare il Mg in cellule vive con tecniche di microscopia confocale (Figura 8, pannello 1).¹²⁷ In analogia con gli esperimenti effettuati da Kubota et al. con la sonda KMG-104, con cui è stata dimostrata l'esistenza di un transiente di Mg^{2+} libero citosolico in conseguenza a depolarizzazione della membrana mitocondriale,¹²¹ è stato riscontrato un simile aumento della fluorescenza anche in un esperimento analogo su cellule marcate con la sonda DCHQ1,¹²⁷ a dispetto delle diverse affinità di legame tra i due sensori (Figura 8, pannello 2). Questi risultati suggeriscono che le caratteristiche fotochimiche della sonda DCHQ1 (in particolare l'*enhancement* di fluorescenza osservato in ambienti lipofili) possano essere sfruttate per monitorare i movimenti del Mg attraverso i compartimenti sub-cellulari.¹⁰⁶

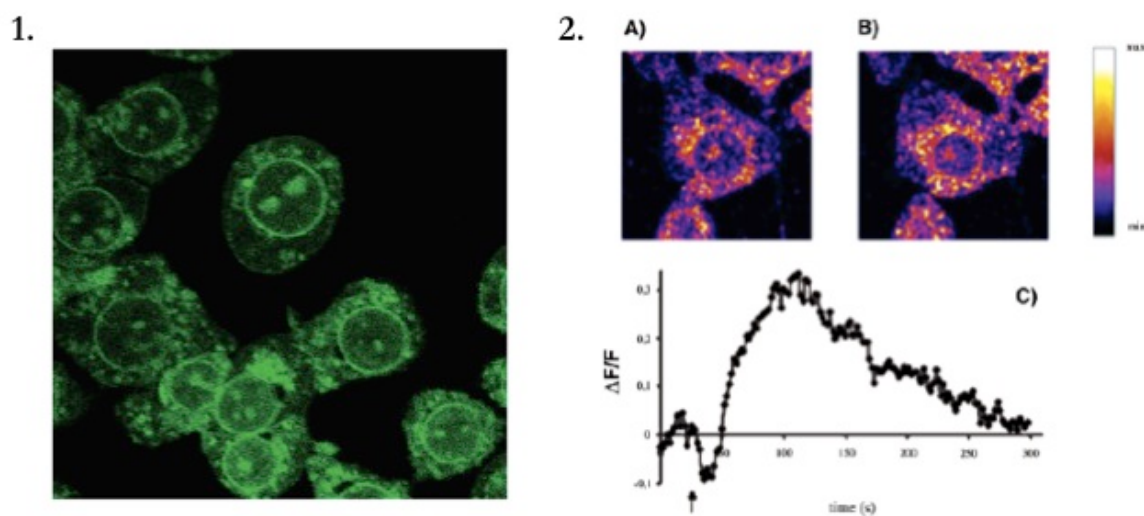


Figura 8. Applicazioni della sonda DCHQ1 allo studio del Mg totale intracellulare. Pannello 1: distribuzione di fluorescenza della sonda DCHQ1 in cellule HC11 osservate al microscopio confocale a doppio fotone. Pannello 2: immagini pseudo-colorate di cellule HC11 marcate con DCHQ1 prima (A) e dopo (B) il trattamento con FCCP; (C) andamento nel tempo della fluorescenza in risposta al trattamento con FCCP. Immagini tratte da G. Farruggia et al., 2006.¹²⁷

Grazie alle loro caratteristiche, le sonde fluorescenti della famiglia DCHQ sono ad oggi le sole ad essersi dimostrate in grado di mappare il Mg totale intracellulare. Le sonde commerciali specifiche per il Mg^{2+} , infatti, sono tutte caratterizzate da $K_d(Mg^{2+})$ nell'ordine millimolare: per questa ragione, sono adatte a monitorare soprattutto il Mg^{2+} libero citosolico, che costituisce meno del 5% del totale, e non forniscono informazioni riguardo al Mg^{2+} legato e/o compartimentalizzato. Tuttavia, è importante sottolineare che l'omeostasi intracellulare del magnesio è caratteristica, in quanto le fluttuazioni del Mg^{2+} libero citosolico sono spesso trascurabili rispetto a quelle del Mg totale.²¹ E' quindi probabile che le modificazioni nella disponibilità di magnesio che influenzano le diverse funzioni biologiche siano determinate da variazioni nella distribuzione del magnesio tra i vari ligandi e/o compartimenti sub-cellulari piuttosto che da variazioni significative della forma libera.¹²⁹ In questa prospettiva, è evidente l'importanza di avere a disposizione sensori capaci di monitorare il Mg totale *in vivo* e, possibilmente, discriminare tra i vari organelli intracellulari.¹⁰⁶

3. SCOPO DELLA TESI

Il magnesio è un catione essenziale per numerosi processi cellulari tra cui la regolazione dei canali ionici, la sintesi di DNA e proteine, la stabilizzazione delle membrane e l'attività del citoscheletro.^{15,21} Molti enzimi richiedono MgATP²⁻ come cofattore o Mg²⁺ come regolatore allosterico: di conseguenza, funzioni cellulari quali la proliferazione e la morte dipendono dalla disponibilità di Mg²⁺.^{2,15} La quantità di magnesio intracellulare è regolata da specifici meccanismi d'influsso ed efflusso (canali ionici e antiporto) alcuni dei quali ormai ben noti.¹⁹ Tuttavia, la distribuzione del magnesio nelle sue forme *free* e *bound* e la sua compartimentalizzazione intracellulare non sono ancora state chiarite, soprattutto a causa dell'inadeguatezza delle tecniche attualmente disponibili per il *mapping* della distribuzione del magnesio intracellulare.¹⁰⁶

Solitamente, il magnesio cellulare totale viene misurato con l'Assorbimento Atomico,¹⁰⁸ una tecnica molto sensibile che tuttavia richiede grandi quantità di campione o tessuto e non è in grado di discriminare tra le forme libera e legata/compartimentalizzata.

Il Mg²⁺ libero, invece, può essere misurato con la spettroscopia ³¹P NMR, un metodo non invasivo con cui sono rilevati i segnali di molecole fosforilate presenti nel citoplasma, tra cui il fosfato inorganico (P_i), la fosfocreatina (PCr) e l'ATP.¹¹⁰ Tramite opportune curve di calibrazione, che tengono conto sia degli altri ioni citosolici che competono col Mg²⁺ nella complessazione dell'ATP, che degli altri leganti (quali ADP, PCr, P_i) che competono con l'ATP nel legare il Mg²⁺, è possibile misurare *in vivo*, con elevata accuratezza e in modo non invasivo, la concentrazione citosolica cellulare di Mg²⁺.^{111,112}

I metodi più diffusi per l'analisi del Mg²⁺ libero cellulare sono, comunque, quelli basati sulle sonde fluorescenti, sia per la facilità e la possibilità di utilizzo con le strumentazioni classiche di laboratorio (microscopio, citofluorimetro, ecc.) che per le informazioni statiche di distribuzione e i monitoraggi dinamici che se ne ricavano. Le sonde commerciali per il Mg²⁺, tuttavia, sono per lo più derivate da sonde preesistenti specifiche per il Ca²⁺ e, seppure con bassa affinità, mantengono la capacità di legare questo catione.¹⁰⁶

Caratteristica peculiare dell'omeostasi del magnesio è che, a differenza per esempio del Ca²⁺, le fluttuazioni della forma libera citosolica sono spesso trascurabili rispetto a quelle del Mg

totale. Proprio per questo motivo, per molto tempo si è pensato che questo catione non avesse un ruolo determinante nella regolazione dei processi metabolici. Le forme citosolica e legata/compartimentalizzata del magnesio, invece, fluttuano in modo indipendente l'una dall'altra ed è probabile che siano i riarrangiamenti tra i vari ligandi e/o compartimenti ad influenzare le funzioni metaboliche, piuttosto che le semplici variazioni della forma libera.¹³⁰ In questa prospettiva, è importante disporre di sensori capaci di monitorare il Mg totale *in vivo*: per questa ragione, attualmente, la ricerca è indirizzata verso lo sviluppo di nuove classi di fluorocromi più sensibili e specifici rispetto a quelli disponibili in commercio.¹⁰⁶

Particolarmente interessante si è recentemente dimostrata una classe di molecole fluorescenti ottenute coniugando a un diaza-18-crown-6, due 8-idrossichinoline (DCHQ) che possono presentare diversi sostituenti.¹²⁷ Due di queste molecole (DCHQ1, con un H in posizione 5, e DCHQ2, con un Cl in 5) hanno infatti mostrato un'affinità e specificità per il magnesio molto maggiori rispetto a qualunque altra sonda commercialmente disponibile (K_d rispettivamente 44 ± 5 e $73 \pm 4 \mu\text{M}$), con in più il vantaggio di non essere influenzate dalla presenza di altri cationi divalenti (compreso il Ca^{2+}) a pH fisiologico. DCHQ1, in particolare, consente non solo di determinare il magnesio totale¹²⁸ (tutte le sonde commerciali misurano invece il magnesio libero), ma anche di monitorarne rapidi transienti intracellulari in risposta a stimoli mitocondriali.¹²⁷ Tale famiglia di biosensori potrebbe quindi rappresentare un interessante strumento alternativo per meglio comprendere l'omeostasi cellulare del magnesio e per studiarne il coinvolgimento in diverse condizioni fisiopatologiche.

Scopo di questa tesi è stato, prima di tutto, quello di individuare nuovi metodi di sintesi chimica delle sonde DCHQ per ottimizzarne la resa, la purezza del prodotto e per apportare modifiche alla struttura di base tramite introduzione di gruppi funzionali di varia natura. A tal fine è stata messa a punto una metodica basata sul riscaldamento alle microonde che ci ha consentito di ottenere le sonde DCHQ pure e con una resa > 99%.

Sfruttando il nuovo protocollo di sintesi è stata sintetizzata una serie di analoghi di DCHQ1 (ciascuno con uno specifico gruppo funzionale in posizione 5 dell'anello 8-idrossichinolinico), cercando di ottimizzarne le caratteristiche analitiche. Infatti, la sonda DCHQ1 è eccitabile solo nella regione dell'UV e manifesta solo una parziale ritenzione intracellulare. I nuovi composti, quindi, sono stati progettati allo scopo di migliorare la fluorescenza in risposta al legame con il Mg^{2+} , la ritenzione e la localizzazione cellulare

preservando, allo stesso tempo, la caratteristica unica di legare selettivamente il magnesio totale intracellulare.

Tra i nuovi DCHQ-derivati sintetizzati sono stati, perciò, scelti quelli che si sono dimostrati promettenti in termini di miglioramento di una o più delle caratteristiche peculiari della sonda capostipite:

- due gruppi AM terminali (acetossimetil estere) sono stati inseriti in posizione 5 delle braccia 8-idrossichinoliniche al fine di ottenere una sonda (DCHQ3) con miglior *uptake* e/o più efficiente ritenzione intracellulare. Il gruppo AM, infatti, viene riconosciuto e idrolizzato dalle esterasi intracellulari;
- lunghe catene alchiliche sulle braccia 8-idrossichinoliniche sono state inserite per conferire alla sonda DCHQ4 maggiore lipofilia e, di conseguenza, maggiore affinità per le membrane;
- infine, allo scopo di aumentare la resa quantica di emissione di fluorescenza, sono state sintetizzate due sonde con gruppi laterali aromatici, che contribuiscono alla delocalizzazione della carica complessiva sulla molecola (DCHQ5 e DCHQ6).

Le sonde selezionate sono state, poi, testate per la loro applicabilità in ambito biologico: di ognuna di esse è stata individuata al citofluorimetro una concentrazione ottimale di utilizzo, che coniuga un segnale di fluorescenza accettabile con una bassa citotossicità (<10% dopo 30 minuti dalla marcatura).

Delle sonde di nuova sintesi sono stati poi valutati l'*uptake* e la distribuzione tra cellule e medium: lo studio di eventuali movimenti di Mg^{2+} attraverso la membrana plasmatica, infatti, rende necessario disporre di sonde fluorescenti altamente ritenute all'interno della cellula.

I nuovi composti sono stati testati anche in microscopia confocale a due fotoni allo scopo di valutarne l'applicabilità nell'analisi della distribuzione del Mg^{2+} in profondità nei tessuti.

Infine, è stato scelto il DCHQ-derivato che aveva mostrato le caratteristiche più interessanti per valutarne la possibilità di utilizzo nell'analisi quantitativa del magnesio totale cellulare in piccoli campioni e, eventualmente, per monitorarne i flussi in risposta a stimolazione.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Sintesi dei derivati dell'8-idrossichinolina.

Le procedure di sintesi con riscaldamento alle microonde dei DCHQ-derivati, così come le sintesi delle relative 8-idrossichinoline funzionalizzate, sono state brevettate¹³⁵ e pubblicate.¹³⁶ Di seguito, sono descritte nel dettaglio le metodiche utilizzate.

4.1.1 Sintesi delle 8-idrossichinoline funzionalizzate

Mentre l'8-idrossichinolinolo (8-HQ), necessario per la sintesi della sonda capostipite DCHQ1, è un prodotto commerciale (Sigma-Aldrich, Svizzera), le 8-idrossichinoline funzionalizzate usate per la sintesi degli altri DCHQ-derivati sono state sintetizzate seguendo procedure descritte in letteratura.^{131,132}

5-fenil-8-idrossi-7-chinolinolo:

La 5-fenil-8-idrossichinolina (HQ5) usata per la sintesi della molecola DCHQ5, è stata sintetizzata mediante una reazione di Suzuki a partire dal prodotto commerciale 5-cloro-8-idrossichinolina (Cl-HQ), secondo quanto riportato da Heiskanen e Hormi nel 2009.¹³² Lo schema di reazione è riassunto in Figura 9.

Nella reazione 1 (Figura 9), la Cl-HQ è sciolta in soluzione acquosa di NaOH 1M a caldo per 30 minuti. Una volta tornata a rt (*room temperature*), il TsCl sciolto in acetone (1.5 mmol/mL) viene fatto gocciolare. La reazione è condotta a rt in agitazione per 3 ore e il prodotto viene filtrato e lavato con H₂O e acetone. La resa finale di prodotto puro è di circa il 75 %.

Nella reazione 2 (Figura 9), la chinolina tosilata è sciolta in DMF con 5 mol % di Pd(PPh₃)₄. K₂CO₃ anidro (2.1 equiv.) e acido arilboronico (1.05 equiv.) sono mescolati insieme in DMF e, dopo 10 minuti, combinati con la miscela contenente la chinolina. La

miscela di reazione ottenuta è portata a riflusso in atmosfera inerte e monitorata mediante TLC. Il solvente residuo è rimosso sottovuoto, il prodotto grezzo è estratto con cloroformio e acqua (3:1) e filtrato. La purificazione è effettuata su colonna cromatografica (cicloesano/acetato di etile). La resa finale di prodotto puro è di circa il 74%.

Nella reazione 3 (Figura 9), la chinolina tosilata è disciolta in una miscela 1:1 di acetone e etanolo, a cui è aggiunto NaOH 1M (3 equiv.). La miscela di reazione è portata a riflusso e monitorata con TLC. Il solvente è rimosso per evaporazione. Il prodotto grezzo è disciolto in acqua distillata (10 mL) e il pH è aggiustato a 6.5 aggiungendo HCl 1M. Il prodotto finale è raccolto per filtrazione e lavato con acqua distillata per dare il prodotto puro con una resa di circa il 68 %.

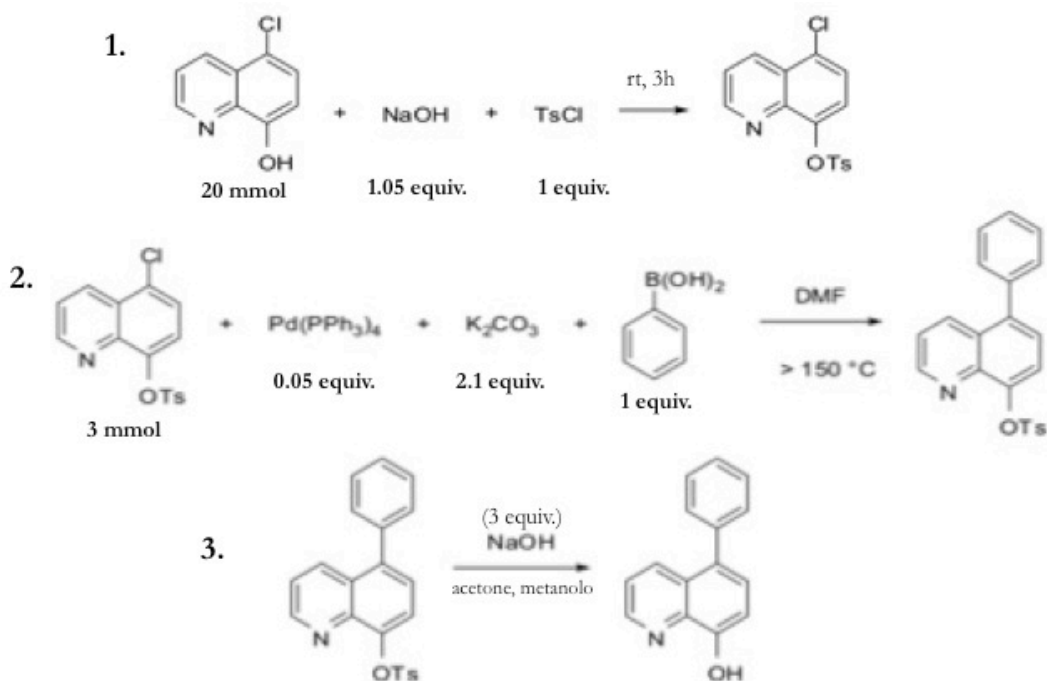


Figura 9. Schema di reazione per la sintesi del 5-fenil-8-idrossi-chinolinolo (HQ5).

5-alchilossimetil-8-idrossichinoline:

Le rimanenti 5-alchilossimetil-8-idrossichinoline sono state sintetizzate a partire dal sale cloruro del 5-clorometil-8-idrossichinolinio seguendo in gran parte le procedure descritte da Burckhalter e Leib nel 1961.¹³¹

Il sale cloro-idrato di partenza è stato sintetizzato seguendo la seguente metodica descritta in letteratura: 0.05 moli di 8-idrossichinolinolo, 8 mL di acido cloridrico al 37 % e 8 mL di formaldeide al 37 % sono stati trattati con HCl gassoso per 90 minuti. Il solido giallo

ottenuto è stato filtrato ed essiccato per dare prodotto puro con una resa del 77 %.

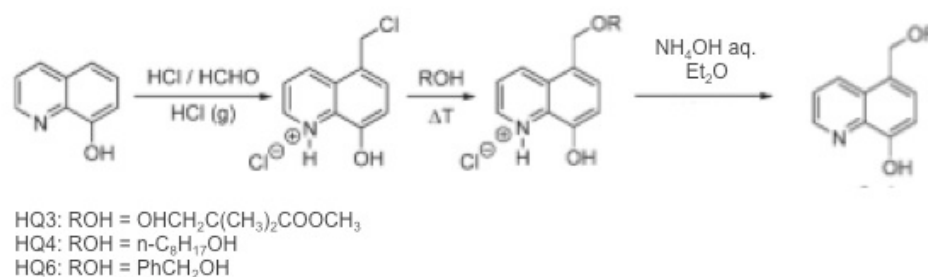


Figura 10. Schema generale di reazione per la sintesi delle 5-alcilossimetil-8-idrossichinoline.

5-(2-carbometossi-2-metil)propilossimetil-8-idrossichinolinolo (HQ3). Il *5-(2-carbometossi-2-metil)propilossimetil-8-idrossichinolinolo*, usato per la sintesi della molecola DCHQ3, è stato sintetizzato secondo la procedura descritta da Burckhalter Leib.¹³¹ Il sale cloro-idrato (3 mmol) è stato fatto reagire con un eccesso di alcol metil-3-idrossi-2,2-dimetilpropionico (45 mmol). La miscela di reazione è stata riscaldata fino alla completa evaporazione dell'alcol, il solido ottenuto è stato disciolto in acqua, trattato con ammoniaca diluita e lasciato precipitare per alcune ore. Il precipitato è stato essiccato per dare circa il 60 % di resa finale di prodotto puro.

5-ottilossimetil-8-idrossi-7-chinolinolo (HQ4). Il *5-ottilossimetil-8-idrossi-7-chinolinolo*, usato per la sintesi della molecola DCHQ4, è stato preparato secondo la procedura descritta in letteratura.¹³¹ Il sale cloro-idrato (3 mmol) è stato fatto reagire con ottanolo (16 equiv.) e la reazione è stata condotta a riflusso per 5 ore. L'ottanolo residuo è stato distillato e il grezzo di reazione residuo è stato lavato con NH₄OH per dare prodotto puro in buona resa (circa 69 %).

5-benzilossimetil-8-idrossi-7-chinolinolo (HQ6). Il sale cloro-idrato (5 mmol) è stato sospeso in 5 equivalenti di alcol benzilico e scaldato a 90° C per 2 ore. L'eccesso di alcol benzilico è stato rimosso a pressione ridotta e il corrispondente sale cloro-idrato è raccolto per filtrazione dopo lavaggio con etere dietilico. Il sale in etere è stato trattato con aggiunte goccia a goccia di una soluzione acquosa di NH₄OH finché la fase acquosa non ha raggiunto un pH basico (8-10). La fase organica è, quindi, stata lavata in acqua ed evaporata per dare prodotto puro con una resa di circa l'85%.

4.1.2 Sintesi alle microonde dei DCHQ-derivati

Le reazioni di sintesi dei DCHQ-derivati sono state tutte condotte allo stesso modo, ciascuna a partire dalla relativa idrossichinolina funzionalizzata, seguendo il seguente schema di reazione:

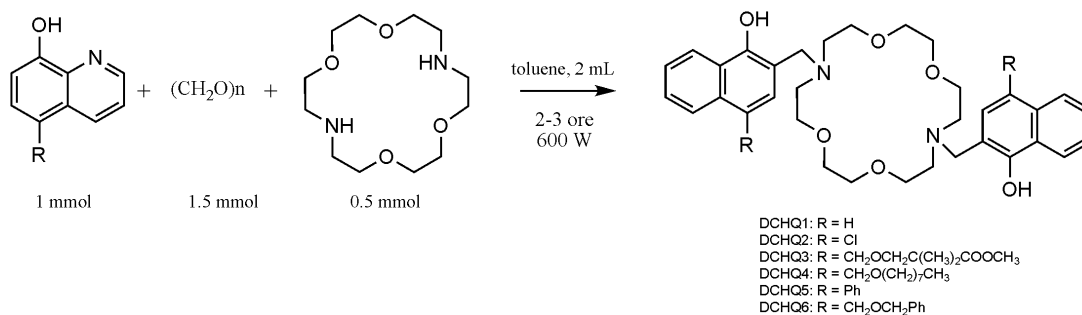


Figura 11. Schema generale della reazione di sintesi alle microonde dei DCHQ-derivati.

Per ogni DCHQ-derivato, 0.5 mmol di diazacrown sono state fatte reagire con 1 mmol della relativa 8-idrossichinolina funzionalizzata e 1.5 mmol di paraformaldeide in 2 mL di solvente (toluene o 1,4-diossano). La miscela di reazione è stata riscaldata per 2 ore a 600 Watt di potenza in un apparecchio per microonde MILESTONE MicroSYNTH Labstation. La temperatura interna è stata monitorata con un sensore di temperatura a fibra ottica. La soluzione è stata, successivamente, raffreddata a temperatura ambiente e il solvente fatto evaporare a pressione ridotta. Il prodotto residuo è stato purificato lavando più volte con dietilere.

4.2 Metodi spettroscopici generali

Tutti i reagenti utilizzati sono Ultrapuri e, se non altrimenti specificato, acquistati presso la Sigma-Aldrich (Svizzera).

Il tampone PBS (*Dulbecco's Phosphate Buffer Saline*) senza Mg²⁺ è stato preparato in acqua bidistillata secondo la seguente ricetta:

- NaCl 8 g/L;
- KCl 0.2 g/L;
- Na₂HPO₄ 0.2 g/L;
- KH₂PO₄ 0.2 g/L, pH 7.2.

Le soluzioni di sali utilizzate per le titolazioni dei DCHQ-derivati, sono state preparate tutte alla concentrazione finale 1M. La soluzione di MgSO₄ utilizzata nella messa a punto delle rette di taratura per la quantificazione del Mg totale cellulare è stata preparata alla concentrazione 1M e verificata tramite spettroscopia di assorbimento atomico.

Le sonde fluorescenti sono state disciolte in dimetil solfossido (DMSO, UVASOL, Merck) alla concentrazione finale di 1 mg/mL, che corrisponde alle seguenti concentrazioni:

- DCHQ1 = 1.7 mM;
- DCHQ3 = 1.4 mM;
- DCHQ4 = 1.4 mM;
- DCHQ5 = 1.4 mM;
- DCHQ6 = 1.3 mM.

La concentrazione delle soluzioni madre è stata verificata spettrofotometricamente misurando l'assorbanza in corrispondenza del relativo massimo di assorbimento in una miscela 1:1 di metanolo e acido N-morfolin-propansulfonico (MOPS, pH 7.4) 20 mM. Per la determinazione della concentrazione sono stati usati i seguenti coefficienti di estinzione molare:

- DCHQ1: ϵ (244nm) = 55284 M⁻¹cm⁻¹;
- DCHQ3: ϵ (246nm) = 76940 M⁻¹cm⁻¹;
- DCHQ4: ϵ (247nm) = 69470 M⁻¹cm⁻¹;
- DCHQ5: ϵ (249nm) = 81100 M⁻¹cm⁻¹;
- DCHQ6: ϵ (246nm) = 82700 M⁻¹cm⁻¹;

Le aliquote sono state conservate al buio a +4° C.

4.3 Caratterizzazione fotofisica

Gli spettri di assorbimento sono stati registrati con uno spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda 45. Per le misure di spettroscopia di fluorescenza, gli spettri di emissione sono stati acquisiti con uno spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS 55.

Le rese quantiche di fluorescenza sono state determinate usando solfato di chinina 0.05 M in una soluzione acquosa di H₂SO₄ ($\Phi = 0.53$). Per consentire il confronto tra le intensità di emissione, sono state fatte correzioni per la risposta strumentale, *inner filter effect* e sensibilità dei fotomoltiplicatori. I valori di logK_a sono stati ottenuti tramite *fitting* dei dati spettrofotometrici e spettrofluorimetrici con il software di analisi globale SPECFIT/32.

4.4 Colture cellulari

HL60 (Human Promyelocytic Leukemia). Le cellule HL60 sono state coltivate in terreno RPMI 1640 addizionato con FBS (*Fetal Bovine Serum*) scomplementato al 10% (v/v), L-glutamina 2 mM, Penicillina 100 U/mL e Streptomicina 100 µg/mL. Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C in atmosfera modificata al 5% di CO₂.

SaOs-2 (Human epithelial-like Sarcoma osteogenic). Le cellule SaOs-2 sono state coltivate in terreno MEM addizionato con FBS al 10% (v/v), L-glutamina 2 mM, Penicillina 100 U/mL e Streptomicina 100 µg/mL e mantenute in incubatore a 37°C in atmosfera modificata al 5% di CO₂.

ROS 17/2.8 (Rat Osteosarcoma). Le cellule ROS sono state coltivate in terreno MEM addizionato con FBS al 10% (v/v), L-glutamina 2 mM, Penicillina 100 U/mL e Streptomicina 100 µg/mL e mantenute in incubatore a 37°C in atmosfera modificata al 5% di CO₂.

4.4.1 Differenziamento terminale di cellule HL60 con DMSO:

Le cellule HL60 di controllo sono state coltivate in terreno RPMI 1640 addizionato con FBS scomplementato al 10% (v/v), L-glutamina 2 mM, Penicillina 100 U/mL e Streptomicina 100 µg/mL. Il differenziamento terminale è stato raggiunto aggiungendo al terreno di coltura l'1.3% di DMSO.

Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C in atmosfera modificata al 5% di CO₂ per 48 ore prima dei successivi esperimenti.

4.4.2 Marcatura con sonda DCHQ3:

Per gli esperimenti di marcatura con la sonda acetometossi-estere DCHQ3, si è resa necessaria la preparazione di un terreno completo senza Mg²⁺. Per tale motivo, è stato utilizzato terreno MEM senza Mg²⁺ (GIBCO Cell Cultures, Invitrogen, USA) addizionato con L-glutamina 2 mM, 1000 unità/mL di penicillina e 1 µg/mL di streptomicina. Il siero senza Mg²⁺ è stato preparato mediante dialisi dell'FCS: sono state utilizzate membrane CelluSep T1 con *Molecular Weight Cut-Off* (MWCO) di 3500 (Membrane Filtration Products Inc., Seguin, TX, USA). Il processo di dialisi è stato effettuato in Soluzione Tampone Puck (NaCl 800 g/L, KCl 4 g/L, NaHCO₃ 3.5 g/L, D-glucosio anidro 5 g/L, pH 7.4) per 5 giorni a 4° C. La soluzione Puck è stata sostituita ogni giorno con tampone fresco e, nei primi 2 giorni di trattamento, è stata addizionata con EDTA 1 mM. Alla fine della dialisi, è stato ristabilito il normale contenuto di Ca²⁺ nel siero aggiungendo CaCl₂ 1.8 mM all'FCS dializzato.

4.5 Analisi Citofluorimetriche

Le misure di citofluorimetria sono state effettuate utilizzando un citofluorimetro Bryte HS (BioRad, UK) equipaggiato con una lampada Xe-Hg e un set di filtri con banda di eccitazione centrata a 360 nm e due bande di emissione centrate rispettivamente a 500 nm (fluorescenza dei DCHQ-derivati) e 600 nm (fluorescenza del propidio ioduro).

Nel caso dell'analisi di cellule HL60 differenziate terminalmente con DMSO, le misure di citofluorimetria con banda di eccitazione centrata a 488 nm e bande di emissione a 500 e 600 nm, sono state effettuate su un citofluorimetro Epics-XL (Beckman Coulter, USA) equipaggiato con un laser ad argon da 15 mW.

4.5.1 Valutazione della mortalità cellulare indotta dai DCHQ-derivati

Prima della marcatura, le cellule HL60 sono state lavate due volte in PBS senza Mg^{2+} e risospese alla concentrazione finale di 10^6 cells/mL. Il protocollo di marcatura seguito per ciascun DCHQ-derivato è il seguente:

- DCHQ3: le cellule sono state incubate per 30 minuti con fluoròforo 5-25 μ M in terreno MEM senza Mg^{2+} supplementato con FCS senza Mg^{2+} , L-glutamina 2 mM, 1000 unità/mL di penicillina e 1 μ g/mL di streptomina. Alla fine dell'incubazione, le cellule sono state lavate 2 volte in PBS senza Mg^{2+} e risospese in PBS senza Mg^{2+} per l'acquisizione;
- DCHQ4: le cellule sono state incubate per 5 minuti in PBS senza Mg^{2+} con fluoròforo alla concentrazione finale 5 μ M;
- DCHQ5 e DCHQ6: le cellule sono state incubate per 20 minuti con fluoròforo 5-25 μ M in PBS senza Mg^{2+} .

Al termine dell'incubazione, le cellule marcate con ciascuno dei DCHQ-derivati sono state trattate con propidio ioduro (PI) 5 μ g/mL per l'identificazione delle cellule morte. I segnali di fluorescenza sono stati acquisiti su scala logaritmica.

4.5.2 Valutazione della mortalità cellulare in campioni trattati con cAMP

Prima della marcatura, le cellule HL60 sono state lavate due volte in PBS senza Mg^{2+} , risospese alla concentrazione finale di 5×10^5 cells/mL e marcate con DCHQ5 15 mM e con una soluzione di PI (5 mg/mL) per 15 minuti al buio.

Prima della lettura le cellule sono state trattate con butiril-cAMP 1.25 mM. I campioni e i relativi controlli, sono stati quindi analizzati al citofluorimetro raccogliendo in scala logaritmica la fluorescenza verde della DCHQ5 a 505 nm e quella rossa del PI a 605 nm.

4.5.3 Saggio citofluorimetrico del contenuto di DNA

Cellule HL60 di controllo e differenziate con DMSO sono state trattate secondo quanto descritto dal protocollo di Nüsse per la valutazione del contenuto cellulare di DNA.¹³³

Le sospensioni cellulari sono state lavate, il terreno residuo è stato accuratamente rimosso e i pellet sono stati risospesi alla concentrazione finale di 2×10^6 cells/mL in Soluzione Nüsse-1 e vortexati vigorosamente. Dopo 30 minuti di incubazione a 4° C è stato aggiunto un uguale volume di Soluzione Nüsse-2. Le soluzioni Nüsse-1 e Nüsse-2 sono state preparate come segue:

Soluzione Nüsse-1:

- 0.584 g/L NaCl;
- 1.139 g/L Citrato Trisodico;
- 10 mg/L RNAsi DNA free;
- Nonidet P-40 0.03 % v/v.

Soluzione Nüsse-2:

- 85.5 g/L Saccarosio;
- 15 g/L Acido Citrico;
- 100 mg/L Proppidio Ioduro.

I campioni sono stati acquisiti con un citofluorimetro Epics-XL (Beckman Coulter, USA) con banda di eccitazione centrata a 488 nm e banda di emissione a 605 nm su scala lineare.

4.6 Spettroscopia di fluorescenza

4.6.1 Uptake e ritenzione cellulare dei DCHQ-derivati

Per le misure di *uptake* e ritenzione intracellulare dei DCHQ-derivati, è stata utilizzata la spettroscopia di fluorescenza. Cellule HL60 sono state lavate due volte in PBS senza Mg^{2+} e risospese alla concentrazione finale di 10^6 cells/mL.

Le sospensioni cellulari sono state incubate al buio con ogni fluoròforo in PBS senza Mg^{2+} alle seguenti condizioni:

- DCHQ1 = 25 μ M, 30 minuti;
- DCHQ3 = 10 μ M, 30 minuti;
- DCHQ4 = 5 μ M, 5 minuti;
- DCHQ5 = 5 μ M, 20 minuti;
- DCHQ6 = 5 μ M, 20 minuti.

Aliquote delle sospensioni cellulari marcate con le sonde DCHQ1, DCHQ3 e DCHQ4 sono state successivamente lavate per centrifugazione (250g, 10 minuti) e sono stati prelevati i surnatanti. Gli spettri di emissione di fluorescenza delle sospensioni cellulari (Fcells) e dei surnatanti dopo il lavaggio (Fsurnatante) sono stati acquisiti con $\lambda_{exc} = 360$ nm in seguito ad aggiunta di una quantità saturante di $MgSO_4$ (8 mM).

Per le misure di *uptake* e ritenzione intracellulare dei composti DCHQ5 e DCHQ6, un'aliquota di ciascuna sospensione cellulare in PBS senza Mg^{2+} è stata messa in cuvetta con un'eguale quantità di MeOH:MOPS (20 mM, pH 7.4) 1:1. Gli spettri di emissione di fluorescenza delle sospensioni cellulari sono stati acquisiti con $\lambda_{exc} = 360$ nm in seguito ad aggiunta di una quantità saturante di $MgSO_4$ (8 mM).

Le restanti sospensioni cellulari sono state lavate per centrifugazione (250g, 10 minuti) e i relativi surnatanti sono stati messi in cuvetta con un'eguale quantità di MeOH:MOPS (20 mM, pH 7.4) 1:1. Gli spettri di emissione di fluorescenza delle sospensioni cellulari sono stati acquisiti con $\lambda_{exc} = 360$ nm in seguito ad aggiunta di una quantità saturante di $MgSO_4$ (8 mM).

4.6.2 Analisi spettrofluorimetrica del rilascio di Mg^{2+} indotto da cAMP

Per monitorare l'efflusso di Mg^{2+} in campioni cellulari trattati con butirril-cAMP e dei relativi controlli, sono state utilizzate sospensioni cellulari di HL60 lavate 2 volte e risospese in PBS senza Mg^{2+} alla concentrazione finale di 5×10^5 cells/mL.

I campioni sono stati incubati al buio con la DCHQ5 15 μ M per 15 minuti e poi trattati con butirril-cAMP 1.25 mM. L'intensità di fluorescenza a 510 nm ($\lambda_{exc} = 360$ nm) dei campioni e dei rispettivi controlli è stata monitorata nel tempo per 10 minuti in continuo.

4.6.3 Determinazione del Mg totale cellulare con la sonda DCHQ5 mediante spettrofluorimetria

Cellule HL60 sono state lavate due volte in PBS senza Mg^{2+} , risospese alla concentrazione finale di 10^6 cells/mL e sottoposte a sonicazione con un sonicatore a immersione Sonicator (Misonix, USA).

Per la determinazione del Mg totale è stato scelto un metodo che prevede la costruzione di una retta di taratura, ottenuta acquisendo la fluorescenza della sonda DCHQ5 (5 μ M) a 510 nm ($\lambda_{exc} = 360$ nm) di campioni a diverse concentrazioni di $MgSO_4$ (0-20 μ M) in una miscela contenente PBS (100 μ L/mL) in una soluzione 1:1 di MeOH:MOPS (20 mM, pH 7.4). La retta di taratura è stata costruita ponendo in ascissa le concentrazioni di $MgSO_4$ in soluzione, e in ordinata le corrispondenti emissioni di fluorescenza registrate a 510 nm.

L'emissione di fluorescenza della sonda a 510 nm nei campioni sonicati è stata acquisita in una miscela contenente 100 μ L/mL di sospensione cellulare in una soluzione 1:1 di MeOH:MOPS (20 mM, pH 7.4): le concentrazioni di Mg^{2+} di ciascuna sospensione cellulare sono state determinate per interpolazione della retta.

4.6.4 Quantificazione del rilascio di Mg^{2+} indotto da cAMP

Il Mg totale dei campioni di controllo di cellule HL60 è stato calcolato seguendo il metodo fluorimetrico sopra descritto.

La valutazione del rilascio di Mg^{2+} nel surnatante dei campioni è stata effettuata nel seguente modo:

- cellule HL60 sono state lavate due volte in PBS senza Mg^{2+} e risospese alla concentrazione finale di 3×10^6 cells/mL al fine di rendere quantificabile l'efflusso del Mg^{2+} secondo la sensibilità del sistema;
- le cellule sono state trattate con cAMP 3.75 mM per 3 minuti, al termine dei quali sono state centrifugate a 250g per 10 minuti insieme ai rispettivi controlli non trattati e sono stati prelevati i surnatanti;
- i surnatanti sono stati centrifugati nuovamente ad alta velocità per rimuovere eventuali depositi cellulari;
- l'emissione di fluorescenza a 510 nm di ogni surnatante (100 μ L/mL in una soluzione 1:1 di MeOH:MOPS) marcato con la sonda DCHQ5 (15 μ M) è stata sostituita all'equazione della retta di taratura per la determinazione della concentrazione di Mg^{2+} .

Dalla differenza tra il contenuto di Mg^{2+} del controllo prima del lavaggio e del surnatante dei trattati dopo il lavaggio, è possibile risalire alle nmoli effettive di Mg^{2+} che fuoriescono in seguito al trattamento con cAMP.

4.7 Determinazione del Mg totale intracellulare con spettroscopia di assorbimento atomico

Campioni di cellule HL60 sono stati lavati due volte in PBS senza Mg^{2+} e risospesi alla quantità finale di 10^6 cells in HNO_3 1 M per essere sottoposti a digestione. I digeriti sono stati vortexati vigorosamente e conservati a $+4^\circ C$ fino al momento della misura.

Prima dell'analisi, i campioni digeriti sono stati centrifugati ad alta velocità per eliminare i residui cellulari e sono stati recuperati i surnatanti. Sono stati preparati degli standard di calibrazione a concentrazioni note di $Mg(NO_3)_2$ (0.1 ppm, 0.3 ppm e 0.6 ppm) al fine di determinare il *range* di concentrazione lineare entro cui poter effettuare le misure e considerarle attendibili.

I campioni sono stati analizzati con uno spettrometro Beckman Coulter utilizzando un'opportuna lampada per il magnesio e la fiamma alimentata ad aria/ acetilene.

4.8 Microscopia confocale

Per le misure di microscopia confocale, cellule ROS sono state seminate in vetrini da 35 mm di diametro specifici per microscopia (*μ -dish*, Ibidi GmbH, Monaco di Baviera, Germania) e coltivate per almeno 24 ore prima degli esperimenti.

Dopo due brevi lavaggi in PBS senza Mg^{2+} addizionato con $CaCl_2$ 1 mM, le cellule sono state marcate con ciascuna delle sonde in PBS senza Mg^{2+} addizionato con $CaCl_2$ 1 mM e incubate a temperatura ambiente al buio. Le condizioni di *staining* utilizzate per ogni fluoròforo sono state le seguenti:

- DCHQ1 = 25 μ M, 30 minuti;
- DCHQ3 = 10 μ M, 30 minuti;
- DCHQ4 = 5 μ M, 5 minuti;
- DCHQ5 = 5 μ M, 20 minuti;
- DCHQ6 = 5 μ M, 20 minuti.

Alla fine dell'incubazione, le cellule sono state poste sul microscopio per l'acquisizione delle immagini.

L'*imaging* è stato effettuato su un microscopio invertito (DM IRE2, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germania) collegato ad un sistema di *scanning* confocale (TSP-SP2, Leica Microsystems GmbH) equipaggiato con un laser Ti:sapphire ultraveloce modulabile tra 715 e 940 nm (Chameleon, Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA). La fluorescenza dei DCHQ-derivati è stata eccitata mediante assorbimento simultaneo di due fotoni a 750 nm e il segnale di emissione è stato registrato da un fotomoltiplicatore attraverso un obiettivo a immersione (40X) in una regione spettrale compresa tra 480 e 530 nm.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Sintesi dei derivati dell'8-idrossichinolina

La sintesi delle molecole della famiglia DCHQ è stata proposta per la prima volta nel 1999:¹³⁴ l'approccio prevede una reazione di Mannich a tre componenti tra un etere diaza-18-crown-6 (0.02-0.045 M in toluene) e un appropriato derivato dell'8-idrossichinolina (1.2 equivalenti) in presenza di un grande eccesso di paraformaldeide. La reazione è portata a riflusso in toluene per 15-20 ore, al termine delle quali si ottiene un prodotto grezzo da sottoporre a purificazione mediante cromatografia su colonna di silice o per cristallizzazione (Figura 12).

Il metodo non consente, tuttavia, di ottenere prodotto puro in alte rese (<20% dopo la purificazione per cristallizzazione): per questo motivo, è stata messa a punto una nuova metodica che prevede il riscaldamento con microonde in sostituzione a quello tradizionale. Il nuovo procedimento di sintesi è stato brevettato¹³⁵ e pubblicato.¹³⁶

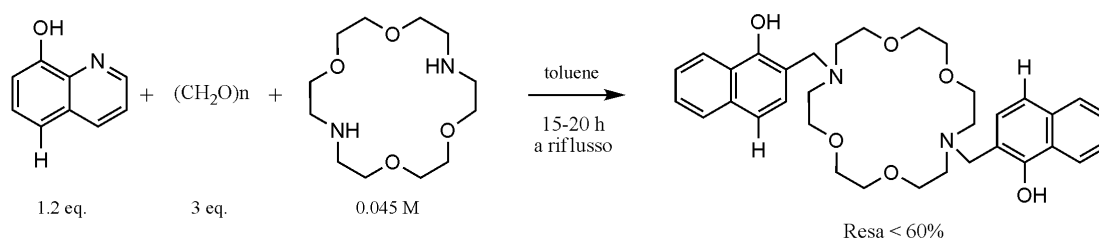


Figura 12. Schema della sintesi della sonda DCHQ1 con riscaldamento tradizionale.¹³⁴

Il riscaldamento tradizionale è un processo in cui il calore è trasferito per convezione dall'esterno all'interno, cioè da una sorgente (generalmente un bagno ad olio riscaldato) alle pareti del pallone di reazione e poi al solvente contenente i reagenti. Questo metodo comporta un dispendio energetico e disomogeneità di temperature, perché la miscela di

reazione più lontana dalla sorgente avrà una temperatura (seppur leggermente) diversa da quella a diretto contatto con la parete del pallone.

Il riscaldamento con microonde, invece, è un riscaldamento dielettrico che ha luogo direttamente all'interno del pallone di reazione. La radiazione elettromagnetica delle microonde induce una polarizzazione dell'ambiente circostante le molecole, che si allineano col campo generato determinando un "super-riscaldamento" e una "super-agitazione" dovuta agli urti molecolari che si verificano in seguito ai movimenti dei dipoli. Di conseguenza, si formano, nella miscela di reazione, degli *Hot Spots* istantanei che possono raggiungere temperature elevatissime.

La *microwave-assisted organic synthesis* (MAOS) è una tecnica relativamente recente che si sta, tuttavia, affermando velocemente:¹³⁷ sebbene i reali effetti delle microonde non siano stati ancora del tutto chiariti, è ormai dimostrato che il riscaldamento con microonde è spesso associate a un aumento della velocità di reazione e a una ridotta formazione di sottoprodotti rispetto al riscaldamento convenzionale. Il riscaldamento con microonde è già stato utilizzato con successo in numerose procedure di sintesi, compresa le reazioni di Mannich e Mannich-*like*.¹³⁸

5.1.2 Ottimizzazione della sintesi della sonda DCHQ1:

La sintesi alle microonde della sonda DCHQ1 è stata ottimizzata valutando prima di tutto l'effetto di diversi solventi. I reagenti necessari per la reazione di sintesi sono commerciali e sono stati acquistati puri presso la Sigma Aldrich (Svizzera).

Per la Reazione 1 (Tabella 4) sono state usate le stesse quantità di reagenti descritte per la sintesi con riscaldamento convenzionale: la reazione di Mannich è stata condotta in microonde a pressione atmosferica per 2 ore a 600 W. Nei casi esaminati (reazione in toluene e in 1,4-diossano) le rese di prodotto sono state molto alte.

E' stato, inoltre, valutato l'effetto di concentrazioni diverse di reagenti sull'efficienza della reazione: nella Reazione 2 (Tabella 4) è stato utilizzato un eccesso di diazacrown (0.25 M) con un eccesso di paraformaldeide e una quantità di 8-HQ doppia rispetto al diazacrown (0.5 M). Le rese di prodotto in questo caso sono state ancora superiori: in particolar modo la reazione in toluene ha dato una resa di prodotto puro del 90%.

In ognuno dei casi considerati, si è ottenuto un prodotto di reazione solido per rimozione del solvente sottovuoto; è stato possibile ottenere il prodotto finale puro semplicemente lavando con dietil-etero.

Tabella 4. Quantità dei reagenti utilizzati e relative rese di prodotto puro nelle reazioni di Mannich effettuate alle microonde (600W, 2 ore) per la sintesi della molecola DCHQ1.

	Diazacrown	8-HQ	Paraformaldeide	Solvente	Q.tà	Resa %
Reazione 1	0.5 mmol	1.2 mmol	1.2 mmol	toluene	11 mL	83
				1,4-diossano		80
Reazione 2	0.5 mmol	1.0 mmol	1.5 mmol	toluene	2 mL	90
				1,4-diossano		88

Possiamo quindi affermare che il maggiore svantaggio della sintesi della molecola DCHQ1 con metodo tradizionale risiede nel fatto che il prodotto di reazione deve essere sottoposto a procedure di purificazione che determinano una resa di prodotto finale molto bassa. Inoltre, risulta estremamente difficile separare completamente il prodotto dai sottoprodotti che si formano nel corso della reazione.

Al contrario, l'utilizzo delle microonde come alternativa al riscaldamento tradizionale ha, invece, consentito la sintesi della molecola DCHQ1 in tempi molto brevi (2 ore rispetto alle 15-20 della reazione a refluxo) e con rese elevate (> 80%). Queste, in particolare, hanno consentito di evitare la fase di purificazione: si è, infatti, potuto ottenere prodotto puro per semplice eliminazione del solvente e con pochi lavaggi in etere. Un ulteriore vantaggio dell'utilizzo delle microonde è il basso impatto ambientale, in quanto ci ha permesso di lavorare con quantità di solvente molto basse.

5.1.3 Progettazione e sintesi dei DCHQ-derivati

Scelta dei gruppi funzionali:

La semplicità del nuovo approccio sintetico alla sonda DCHQ1 ci ha fornito l'opportunità di inserire facilmente gruppi funzionali di varia natura alla struttura base della molecola. Abbiamo, quindi, sfruttato i vantaggi offerti dalla reazione alle microonde per generare una serie di derivati opportunamente funzionalizzati in posizione 5 delle braccia 8-idrossichinoliniche (Figura 13).

I nuovi composti sono stati progettati allo scopo di migliorare la fluorescenza in risposta al legame con il Mg^{2+} , la ritenzione e la localizzazione cellulare preservando, allo stesso tempo, la caratteristica unica di legare selettivamente il magnesio totale intracellulare.

Sono state effettuate, in particolare, le seguenti funzionalizzazioni:

- due gruppi AM terminali (acetossimetil estere) sono stati inseriti in posizione 5 delle braccia 8-idrossichinoliniche al fine di ottenere una sonda (DCHQ3, Figura 13) con miglior *uptake* e/o più efficiente ritenzione intracellulare. Il gruppo AM, infatti, viene riconosciuto e idrolizzato dalle esterasi intracellulari;
- lunghe catene alchiliche sulle braccia 8-idrossichinoliniche sono state inserite per conferire alla sonda DCHQ4 (Figura 13) maggiore lipofilità e, di conseguenza, maggiore affinità per le membrane;
- infine, allo scopo di aumentare la resa quantica di emissione di fluorescenza, sono state sintetizzate due sonde con gruppi laterali aromatici, che contribuiscono alla delocalizzazione della carica complessiva sulla molecola (DCHQ5 e DCHQ6, Figura 13).

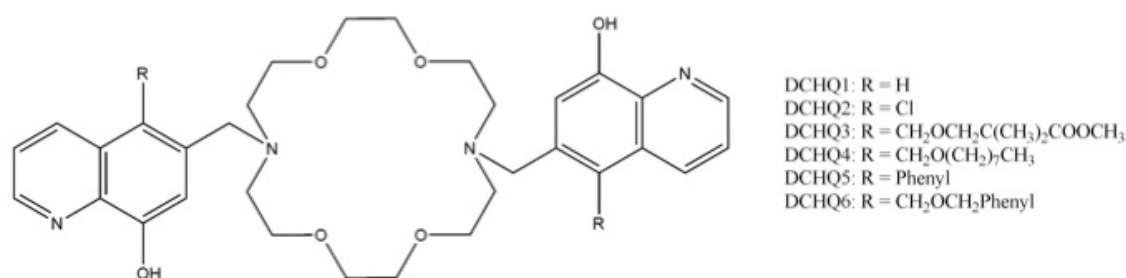


Figura 13. Struttura dei DCHQ-derivati.

Sintesi dei DCHQ-derivati:

La sintesi dei DCHQ-derivati ha reso necessaria una precedente sintesi di 8-idrossichinoline opportunamente funzionalizzate, in quanto solo il composto 8-idrossichinolina è commerciale. Le procedure di sintesi delle idrossichinoline funzionalizzate sono state descritte in dettaglio nella sezione Materiali e Metodi e sono state messe a punto effettuando piccole modifiche a metodiche già presenti in letteratura.^{131,132}

Le molecole DCHQ3-6 sono state sintetizzate a partire dalle rispettive idrossichinoline funzionalizzate seguendo le condizioni descritte per la Reazione 2 (Tabella 4): in tutti i casi

la reazione di sintesi alle microonde è stata condotta a 600 W per 2 ore a pressione atmosferica (Figura 14).

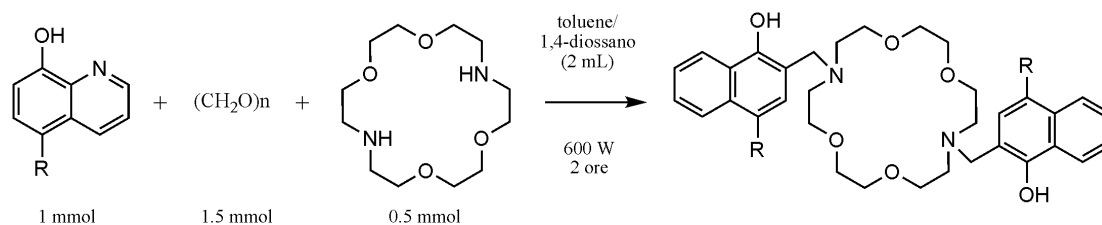


Figura 14. Schema riassuntivo della reazione di sintesi dei DCHQ-derivati con riscaldamento alle microonde.

Anche in questo caso, le rese di prodotto si sono dimostrate molto alte (Tabella 5) e, in seguito alla rimozione del solvente, è stato sufficiente lavare i solidi ottenuti in dietil-etero per ottenere prodotti puri.

Tabella 5. Rese di prodotto dei composti DCHQ3-6 mediante reazione di Mannich alle microonde.

Prodotto	Resa %
DCHQ3	86
DCHQ4	91
DCHQ5	92
DCHQ6	98

Il nuovo approccio sintetico con cui è stato possibile ottimizzare sintesi della sonda DCHQ1 si è rivelato, quindi, altrettanto utile per la sintesi di una serie di derivati della molecola capostipite opportunamente funzionalizzati in posizione 5 delle braccia 8-idrossichinoliniche. Di ciascuno dei composti ottenuti è stata successivamente effettuata la caratterizzazione fotofisica per verificarne le caratteristiche di fluorescenza, la specificità e l'affinità per il Mg^{2+} .

5.2 Caratterizzazione fotofisica dei DCHQ-derivati

La caratterizzazione fotofisica delle molecole DCHQ1-6 è stata effettuata in una miscela 1:1 di MeOH (metanolo) e MOPS (acido 3-(N-morfolino)propansolfonico, 20 mM, pH 7.4). Le sonde sono state preparate tutte alla concentrazione finale 25 μM , a partire da una soluzione madre 1 mg/mL in dimetilsolfossido (DMSO) (DCHQ1 = 1.7 mM; DCHQ3 = 1.4 mM; DCHQ4 = 1.4 mM; DCHQ5 = 1.4 mM; DCHQ6 = 1.5 mM).

Gli spettri di assorbimento delle sonde della famiglia DCHQ (Figura 15) mostrano una prima banda intensa tra 240 e 250 nm ($\epsilon = 70000 - 83000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e una più larga e meno intensa a 310-330 nm ($\epsilon = 5200 - 9000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La prima è dovuta a una transizione $\pi-\pi^*$, mentre la seconda ha principalmente un carattere di trasferimento di carica, con la densità di carica che si muove dall'OH all'atomo di O della chinolina.^{127,139}

La sostituzione dell'H in posizione 5 dell'8-idrossichinolina della struttura della sonda DCHQ1 causa uno spostamento verso il rosso di entrambe le bande per ciascuno dei DCHQ-derivati considerati. Questo effetto è particolarmente evidente per la sonda DCHQ5 (Figura 15, in verde), probabilmente perché la coniugazione dell'anello fenilico all'idrossichinolina contribuisce a una maggiore delocalizzazione della carica.

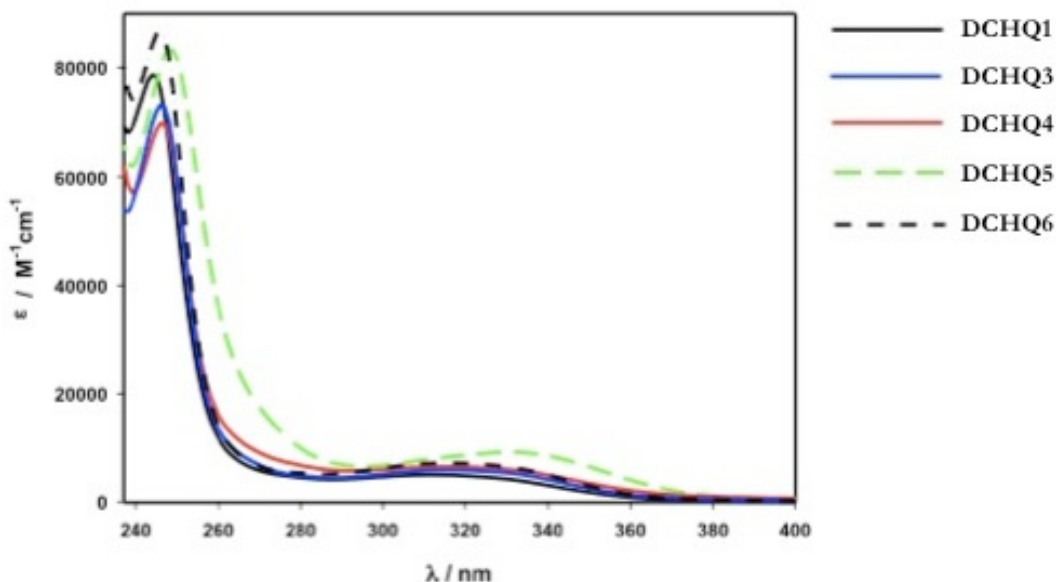


Figura 15. Spettri di assorbimento delle sonde DCHQ1-6 (25 μM) in una miscela 1:1 di MeOH:MOPS (20 mM, pH 7.4) a temperatura ambiente.

Tutti i composti di nuova sintesi mostrano una debole banda di emissione tra 465 e 510 nm (Figura 16), con una resa quantica di fluorescenza compresa tra 6×10^{-5} e 1×10^{-4} (Tabella 4). Dagli studi presenti in letteratura,¹⁴⁰ i bassi valori di resa quantica per questo tipo di molecole sono da ascrivere a due meccanismi principali:

1. *intramolecular photoinduced proton transfer* (PPT) tra il gruppo idrossile e l'atomo di azoto dell'idrossichinolina;
2. *photo-induced electron transfer* (PET) tra l'azoto dell'anello macrociclico e il derivato 8-idrossichinolinico.

Inoltre, nei solventi protici, i processi di *photoinduced proton transfer* possono vedere coinvolte anche le molecole di solvente: ciò contribuisce ulteriormente alla diminuzione della resa quantica di fluorescenza osservata in questo tipo di fluoròfori.

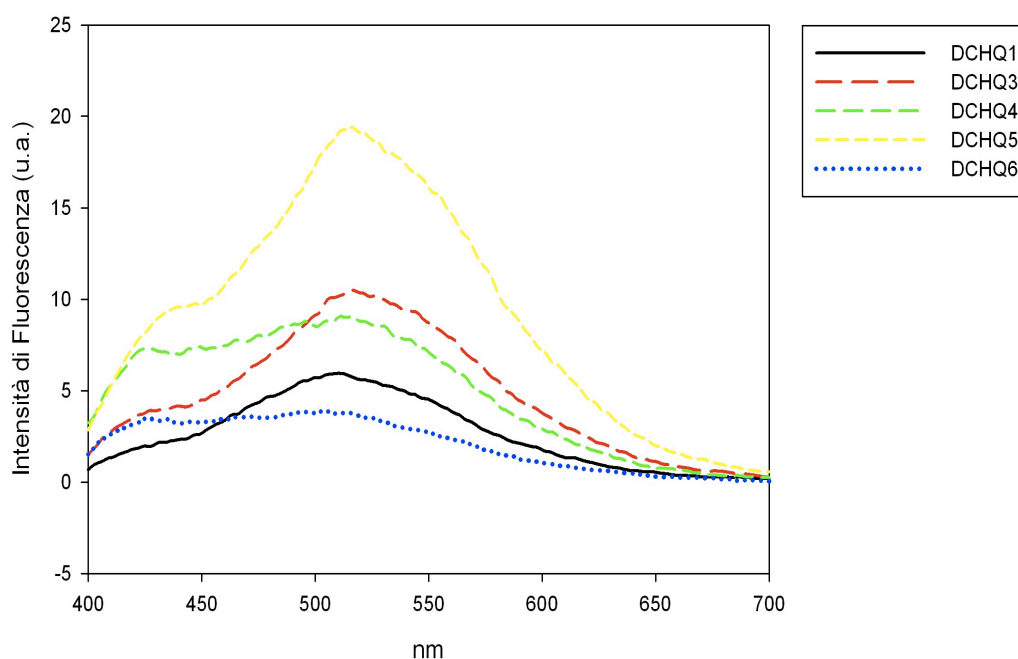


Figura 16. Spettri di emissione di fluorescenza delle sonde DCHQ1-6 (25 μM) in una miscela 1:1 di MeOH:MOPS (20 mM, pH 7.4) a temperatura ambiente.

Complessazione con i metalli:

E' stato condotto uno studio sistematico delle nuove sonde allo scopo di valutarne l'affinità e il comportamento fotofisico in presenza di Mg^{2+} e di altri cationi che possano fungere da possibili competitori nell'ambiente intracellulare (in particolare Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ,

Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺).

Tutti i DCHQ-derivati hanno mostrato simili caratteristiche di capacità complessante. Non sono, infatti, stati osservati cambiamenti né in assorbimento né in emissione in seguito ad aggiunta di Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Fe²⁺ e Fe³⁺ (Tabella 4): ciò indica che questi ioni non sono in grado di formare complessi con le sonde testate. D'altra parte, le titolazioni con Hg²⁺, Cu²⁺ e Ni²⁺ hanno dimostrato che queste specie legano in modo efficiente i DCHQ-derivati, ma non formano complessi luminescenti (Tabella 6). Tra tutti i metalli considerati, solo il Mg²⁺, lo Zn²⁺ e il Cd²⁺ hanno mostrato di indurre un significativo aumento della fluorescenza del sistema.

L'aggiunta di quantità crescenti di Mg²⁺ (Figura 17) induce modificazioni negli spettri di assorbimento di tutte le sonde della famiglia DCHQ: in particolare, si osservano una diminuzione delle bande a 240-250 nm e a 310-330 nm, con la contemporanea comparsa di due nuove bande attorno a 240-265 nm e 370-390 nm (Figura 17, colonna di sinistra). Le nuove bande sono caratteristiche dei derivati dell'8-idrossichinolina quando la complessazione è associata a deprotonazione dell'OH in posizione 8.^{140e,f}

Il legame con il Mg²⁺ causa un notevole incremento dell'intensità di fluorescenza negli spettri di emissione di tutte le sonde, fino a oltre 20 volte l'intensità di fluorescenza della sonda libera (Figura 17, colonna di destra): questo avviene perché la complessazione comporta l'inibizione di entrambi i processi di PPT e PET.^{140e,f}

Le titolazioni con Zn²⁺ (Figura 18, colonna arancione) e Cd²⁺ (Figura 18, colonna azzurra) inducono aumenti di fluorescenza anche maggiori, fino a 3 volte rispetto ai valori ottenuti per la complessazione con il Mg²⁺, e danno simili costanti di dissociazione. Tuttavia, la presenza di questi cationi non può interferire con la determinazione del Mg²⁺ totale nelle cellule, perché:

1. lo Zn²⁺ intracellulare è presente in concentrazioni fino a 100 volte inferiori rispetto a quelle del Mg²⁺ e, inoltre, si trova per lo più strettamente associato a motivi *zinc fingers* con costanti di associazione particolarmente alte;¹⁴¹
2. il Cd²⁺ non è presente all'interno delle cellule, se non in casi di avvelenamento.

Le rese quantiche di fluorescenza dei complessi delle nuove sonde con il Mg²⁺ sono simili, o leggermente più bassi, rispetto a quelli misurati per la capostipite DCHQ1 (0,023), e variano tra 0,024 e 0,027 in solvente idro-organico (Tabella 4). E', tuttavia, da considerare

che la resa quantica di fluorescenza di questo genere di composti dipende molto dall'ambiente e aumenta con l'aumentare della sua lipoficità.¹⁴⁰ I risultati ottenuti in MeOH:MOPS, quindi, non sono da considerarsi rappresentativi degli ambienti cellulari, estremamente complessi e costituiti da membrane aggregate. A livello intracellulare, infatti, come si vedrà in seguito, le molecole aromatiche DCHQ5 e DCHQ6 hanno mostrato una fluorescenza di gran lunga più intensa della DCHQ1.

I risultati della caratterizzazione fotofisica di tutti i DCHQ-derivati sono stati recentemente pubblicati.¹⁴²

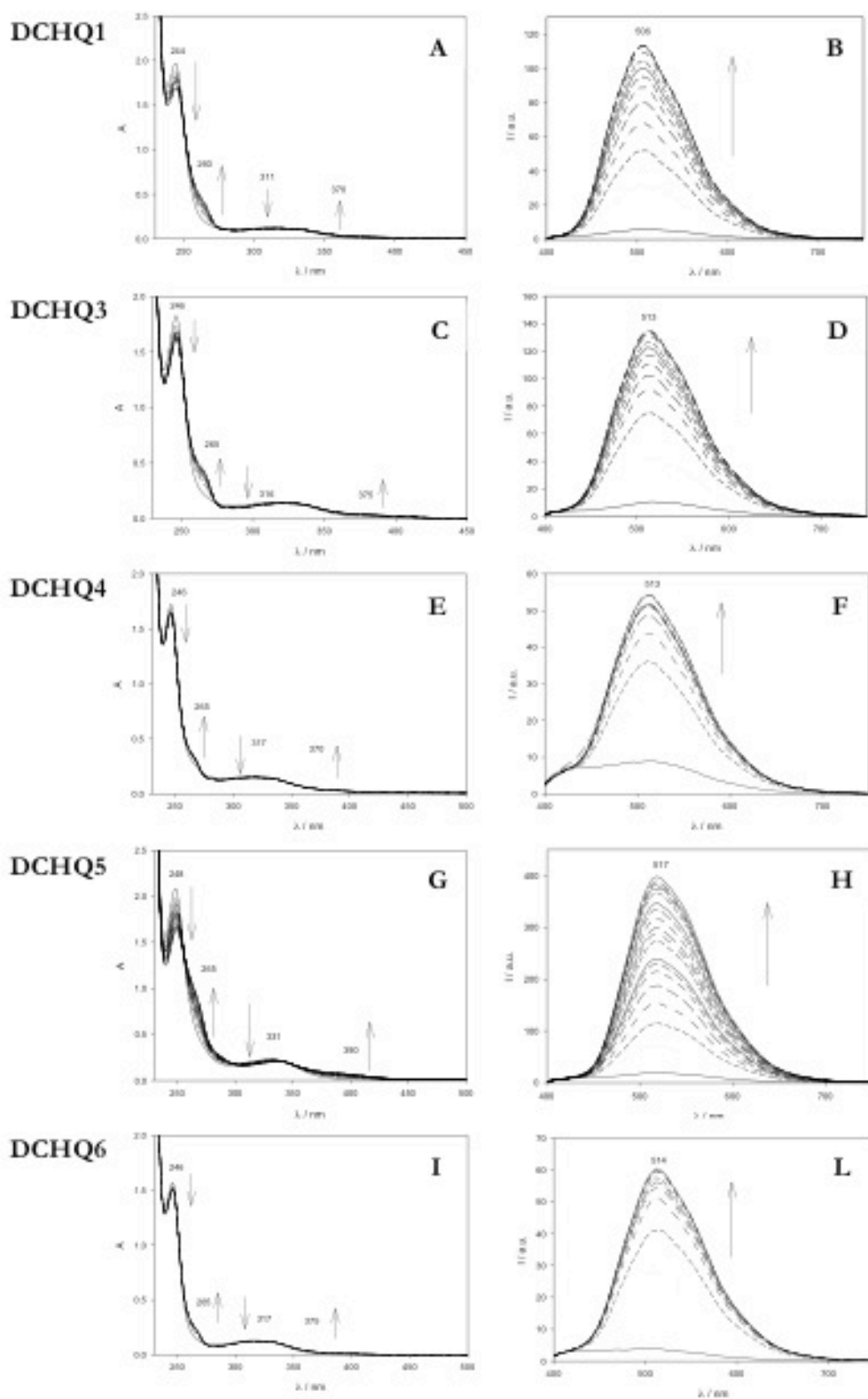


Figura 17. Titolazione dei DCHQ-derivati con Mg^{2+} . Spettri di assorbimento (colonna di sinistra) e di emissione (colonna di destra, $\lambda_{exc} = 324 \text{ nm}$) delle sonde DCHQ1-6 ($25 \mu\text{M}$) in una miscela 1:1 di MeOH:MOPS (20 mM , $\text{pH } 7.4$) a temperatura ambiente, registrati in seguito ad aggiunte crescenti di $MgSO_4$ (fino a 2 equivalenti).

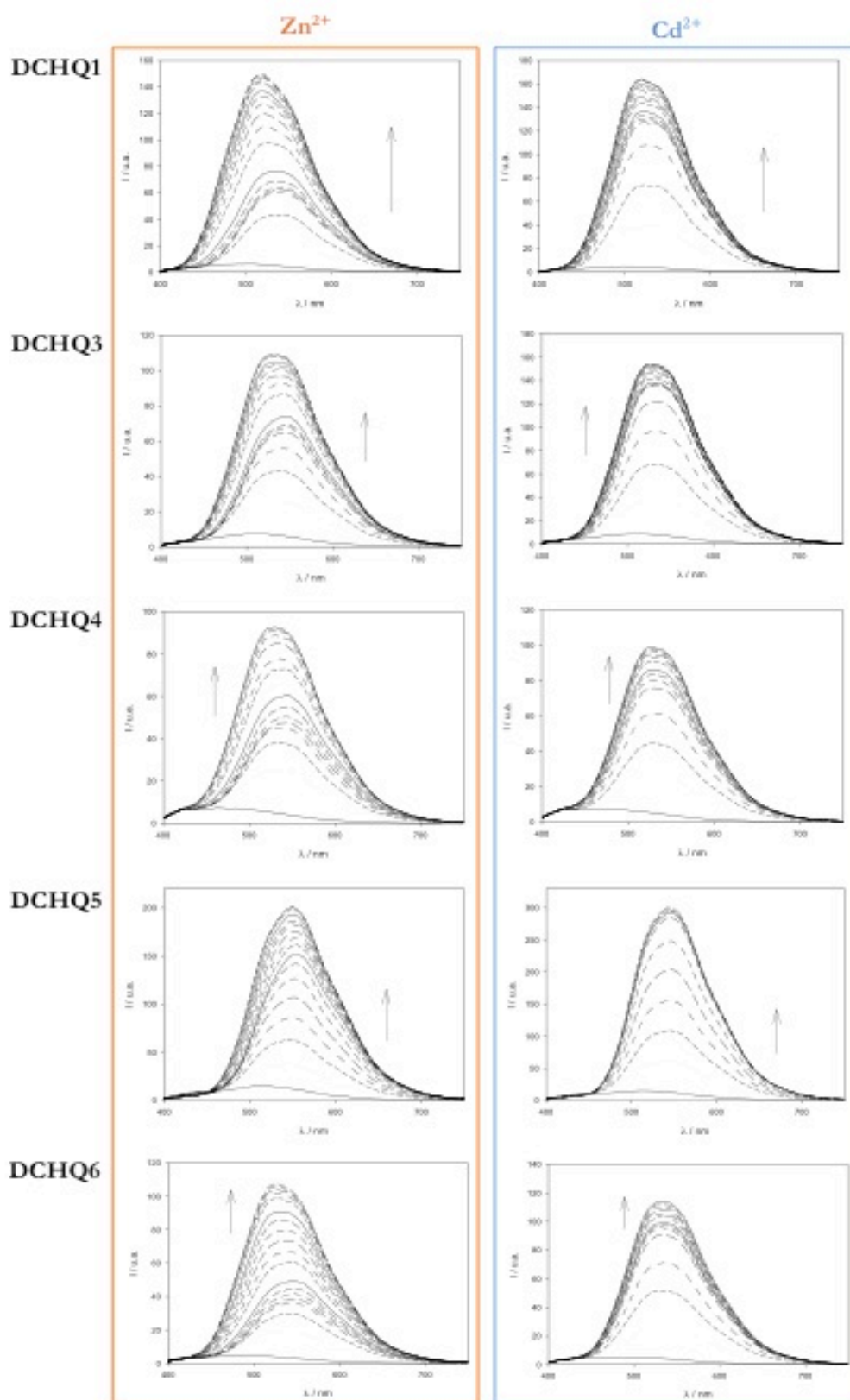


Figura 18. Titolazione dei DCHQ-derivati con Zn^{2+} e Cd^{2+} . Spettri di emissione ($\lambda_{exc} = 324$ nm) delle sonde DCHQ1-6 (25 μ M) in una miscela 1:1 di MeOH:MOPS (20 mM, pH 7.4) a temperatura ambiente, registrati in seguito ad aggiunte crescenti di $Zn(NO_3)_2$ (colonna arancione) e $Cd(NO_3)_2$ (colonna azzurra) (fino a 2 equivalenti).

Tabella 6. Proprietà fotofisiche delle sonde della famiglia DCHQ e dei loro complessi in MeOH:MOPS.

Sonda	log Ka	Assorbimento		Emissione di Fluorescenza	
		$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	Φ	
DCHQ1	—	244, 311	505	6.4×10^{-5}	
DCHQ1 • Mg ²⁺	5.02±0.08 ^a , 10.2±0.2 ^b	244, 318	506	2.3×10^{-2}	
DCHQ1 • Zn ²⁺	5.85±0.06 ^a	261, 370	519	2.0×10^{-2}	
DCHQ1 • Cd ²⁺	9.39±0.05 ^b	263, 375	519	3.2×10^{-2}	
DCHQ1 • Hg ²⁺	9.12±0.07 ^b	264, 375	507	2.7×10^{-4}	
DCHQ1 • Cu ²⁺	7.2±0.4 ^a	261, 381	-	4.9×10^{-4}	
DCHQ1 • Ni ²⁺	9.9±0.2 ^b	263, 381	478	1.9×10^{-2}	
DCHQ1 • Na ⁺	no complessazione				
DCHQ1 • K ⁺	no complessazione				
DCHQ1 • Ca ²⁺	no complessazione				
DCHQ1 • Fe ²⁺	no complessazione				
DCHQ1 • Fe ³⁺	no complessazione				
DCHQ3	—	246, 316	510	1.0×10^{-4}	
DCHQ3 • Mg ²⁺	10.1±0.1 ^b	246, 330	513	7.7×10^{-3}	
DCHQ3 • Zn ²⁺	6.12±0.07 ^a	263, 376	528	1.8×10^{-2}	
DCHQ3 • Cd ²⁺	9.53±0.05 ^b	247, 315	524	2.4×10^{-2}	
DCHQ3 • Hg ²⁺	5.21±0.07 ^a	265, 379	-	1.8×10^{-3}	
DCHQ3 • Cu ²⁺	7.1±0.3 ^a	263, 284	-	1.1×10^{-3}	
DCHQ3 • Ni ²⁺	10.05±0.07 ^b	264, 384	517	2.5×10^{-3}	
DCHQ3 • Na ⁺	no complessazione				
DCHQ3 • K ⁺	no complessazione				
DCHQ3 • Ca ²⁺	no complessazione				
DCHQ3 • Fe ²⁺	no complessazione				
DCHQ3 • Fe ³⁺	no complessazione				
DCHQ4	—	246, 315	463	5.7×10^{-5}	
DCHQ4 • Mg ²⁺	11.2±0.4 ^b	263, 374	513	6.7×10^{-3}	
DCHQ4 • Zn ²⁺	6.5±0.2 ^a	264, 378	528	1.4×10^{-2}	
DCHQ4 • Cd ²⁺	9.30±0.06 ^b	249, 330	524	1.6×10^{-2}	
DCHQ4 • Hg ²⁺	8.94±0.06 ^b	263, 380	-	2.5×10^{-4}	
DCHQ4 • Cu ²⁺	6.2±0.4 ^a	263, 280	-	2.1×10^{-4}	
DCHQ4 • Ni ²⁺	9.76±0.09 ^b	265, 385	-	3.0×10^{-4}	
DCHQ4 • Na ⁺	no complessazione				
DCHQ4 • K ⁺	no complessazione				
DCHQ4 • Ca ²⁺	no complessazione				
DCHQ4 • Fe ²⁺	no complessazione				
DCHQ4 • Fe ³⁺	no complessazione				
DCHQ5	—	249, 330	512	1.0×10^{-4}	
DCHQ5 • Mg ²⁺	5.08±0.06 ^a	249, 338	517	2.4×10^{-2}	
DCHQ5 • Zn ²⁺	6.6±0.2 ^a	263, 386	551	1.4×10^{-2}	
DCHQ5 • Cd ²⁺	9.4±0.2 ^b	265, 388	544	2.1×10^{-2}	
DCHQ5 • Hg ²⁺	10.0±0.1 ^b	266, 390	-	6.0×10^{-4}	
DCHQ5 • Cu ²⁺	24±6 ^b	265, 395	-	6.6×10^{-4}	
DCHQ5 • Ni ²⁺	10.8±0.1 ^b	266, 395	-	5.9×10^{-4}	
DCHQ5 • Na ⁺	no complessazione				
DCHQ5 • K ⁺	no complessazione				
DCHQ5 • Ca ²⁺	no complessazione				
DCHQ5 • Fe ²⁺	no complessazione				
DCHQ5 • Fe ³⁺	no complessazione				
DCHQ6	—	246, 317	504	1.1×10^{-4}	
DCHQ6 • Mg ²⁺	4.8±0.4 ^a , 9.9±0.1 ^b	245, 312	514	9.8×10^{-3}	
DCHQ6 • Zn ²⁺	5.80±0.09 ^a	263, 376	528	1.5×10^{-2}	
DCHQ6 • Cd ²⁺	8.91±0.06 ^b	264, 379	533	1.2×10^{-2}	
DCHQ6 • Hg ²⁺	4.92±0.09 ^a	263, 338	-	6.9×10^{-4}	
DCHQ6 • Cu ²⁺	6.2±0.2 ^a	262, 387	-	6.5×10^{-4}	
DCHQ6 • Ni ²⁺	9.3±0.1 ^b	264, 386	-	4.2×10^{-4}	
DCHQ6 • Na ⁺	no complessazione				
DCHQ6 • K ⁺	no complessazione				
DCHQ6 • Ca ²⁺	no complessazione				
DCHQ6 • Fe ²⁺	no complessazione				
DCHQ6 • Fe ³⁺	no complessazione				

^a Valore ottenuto per stechiometria di legame metallo-ligando 1:1; ^b Valore ottenuto per stechiometria di legame metallo-ligando 1:2. Valori pubblicati.

5.3 Distribuzione intracellulare dei DCHQ-derivati

Per analizzare le caratteristiche di fluorescenza delle nuove sonde in campioni biologici, sono stati prima di tutto utilizzati metodi citofluorimetrici per valutare l'internalizzazione e l'eventuale citotossicità.

Studi precedenti¹²⁷ hanno dimostrato che la sonda capostipite DCHQ1 alla concentrazione 25 μM in PBS non mostra effetti citotossici nell'arco di 30 minuti dallo *staining* e presenta un fluorescenza ottimale per saggi citofluorimetrici, purché eccitata nell'UV: la sonda DCHQ1 è stata usata con successo in microscopia confocale a due fotoni per l'*imaging* del Mg cellulare e, in fluorimetria statica, per la quantificazione del Mg totale intracellulare in campioni sonicati.¹²⁸

Partendo dai dati di citotossicità della DCHQ1 riportati in letteratura, abbiamo valutato l'effetto sulla vitalità cellulare dei nuovi derivati dell'8-idrossichinolina a varie concentrazioni, fino a un massimo di 30 minuti dalla marcatura.

Cellule HL60 (*Human Promyelocytic Leukemia*), marcate con ciascuno dei nuovi DCHQ-derivati a differenti concentrazioni (5-25 μM), sono state analizzate in citofluorimetria per verificare la fluorescenza intracellulare di ognuna delle sonde. Contemporaneamente, i campioni sono stati marcati con propidio ioduro 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (PI), che discrimina le cellule vive da quelle danneggiate/morte, per valutare la citotossicità dei DCHQ-derivati. Per ogni sonda è stata, quindi, identificata una concentrazione ottimale di utilizzo che rappresentava il miglior compromesso tra bassa citotossicità e alto rapporto segnale/rumore.

In Figura 19 è mostrato il citogramma relativo alle condizioni ottimali di utilizzo di ciascuno dei nuovi DCHQ-derivati in cellule HL60. Le cellule positive alla fluorescenza del PI (quadrante A) sono distinte da quelle che mostrano positività alla fluorescenza della sonda (quadrante D): ciò è in accordo con quanto già osservato per la DCHQ1, e cioè che i DCHQ-derivati marcano selettivamente le cellule vive.

Dopo 30 minuti dallo *staining*, la sonda acetossimetilestere-derivata DCHQ3 sembra essere ben tollerata dalle cellule alla concentrazione 10 μM , e mostra anche un discreto segnale di fluorescenza (Figura 19, pannello 1).

La sonda idrofobica DCHQ4 è anche la meno solubile tra tutti i DCHQ-derivati a causa delle lunghe catene alifatiche laterali con cui sono funzionalizzate le due braccia idrossichinoliniche: per questo motivo, non è stato possibile utilizzarla a concentrazioni superiori a 5 μM . In queste condizioni, la DCHQ4 ha mostrato una fluorescenza bassa, ma

comunque ancora chiaramente rilevabile (Figura 19, pannello 2). Si è potuto, inoltre, osservare che la DCHQ4, rispetto agli altri derivati, presenta una coda di fluorescenza verso il segnale positivo al PI, che potrebbe indicare uno spostamento nel rosso dello spettro oppure una parziale permeabilizzazione delle cellule che consentirebbe un, seppur minimo, ingresso del PI. Per tempi di marcatura superiori ai 30 minuti, infatti, si registra un'elevata mortalità cellulare che potrebbe in parte confermare l'ipotesi della permeabilizzazione e che limita la possibilità di un suo utilizzo per tempi più lunghi.

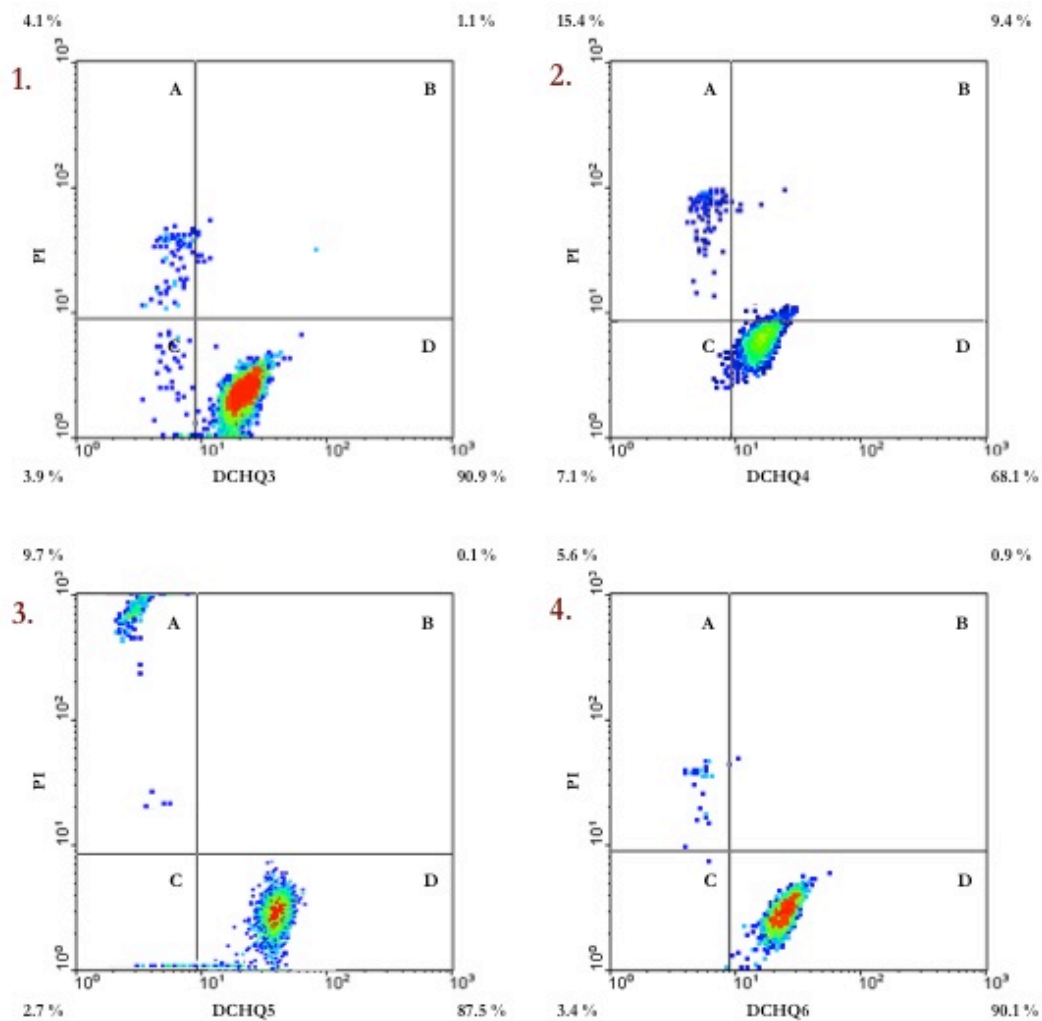


Figura 19. Citogrammi relativi a cellule HL60 (5×10^5 cells/mL) marcate con ciascuno dei DCHQ-derivati alla concentrazione ottimale e PI ($5 \mu\text{g/mL}$), dopo 30 minuti di incubazione al buio. Pannello 1: DCHQ3 $10 \mu\text{M}$; pannello 2: DCHQ4 $5 \mu\text{M}$; pannello 3, DCHQ5 $5 \mu\text{M}$; pannello 4: DCHQ6 $5 \mu\text{M}$. Quadrante A: cellule PI+/danneggiate con bassa fluorescenza da DCHQ; quadrante D: cellule PI-/vive con alta fluorescenza da DCHQ. La percentuale di cellule relativa ad ogni quadrante è riportata a lato. Risultati di un tipico esperimento.

I due composti aromatici DCHQ5 e DCHQ6 si sono dimostrati altamente citotossici, dopo 30 minuti dallo *staining*, per concentrazioni superiori a 10 μM . Entrambe le sonde, tuttavia, hanno mostrato allo stesso tempo una maggiore fluorescenza rispetto agli altri DCHQ-derivati (Figura 19, pannelli 3 e 4 rispettivamente): infatti, è stato possibile ottenere un segnale di fluorescenza cellulare intenso e perfettamente rilevabile a concentrazioni di sonda 5 μM , per le quali la citotossicità dopo 30 minuti resta ancora molto bassa.

Dai risultati ottenuti in citofluorimetria è stata, quindi, stabilita una concentrazione ottimale di utilizzo per ciascuno dei DCHQ-derivati, che è stata mantenuta per tutte le successive analisi biologiche:

- DCHQ3 = 10 μM ;
- DCHQ4 = 5 μM ;
- DCHQ5 = 5 μM ;
- DCHQ6 = 5 μM .

5.3.1 Valutazione del contenuto di Mg cellulare in citofluorimetria con la sonda DCHQ5

A differenza delle altre sonde della famiglia DCHQ, il derivato DCHQ5 ha mostrato un segnale di fluorescenza rilevabile sia con eccitazione nell'UV che nel visibile (488 nm). Abbiamo, quindi, verificato se tale sonda è anche in grado di rispondere a variazioni di Mg totale intracellulare utilizzando due diverse sorgenti di eccitazione (360 nm per l'UV e 488 nm per il visibile).

Sono state confrontate le distribuzioni di fluorescenza relative a cellule HL60 di controllo e trattate con DMSO marcate con la sonda DCHQ5 5 μM . E' noto dalla letteratura che questa linea cellulare va incontro a differenziamento terminale in seguito a trattamento con DMSO 1.3 %. E' stato, inoltre, osservato che, in conseguenza del differenziamento, il Mg totale intracellulare va incontro a un significativo decremento (circa il 50% a 3 giorni dal trattamento).¹⁴³

Il processo di differenziamento delle cellule HL60 trattate con DMSO è stato verificato mediante analisi citofluorimetrica del contenuto di DNA cellulare secondo la metodica di Nüsse (Figura 20).

In seguito al trattamento, è stato osservato che circa l'80% delle cellule trattate con DMSO si trovava in fase G0/G1 rispetto al 45% del controllo.

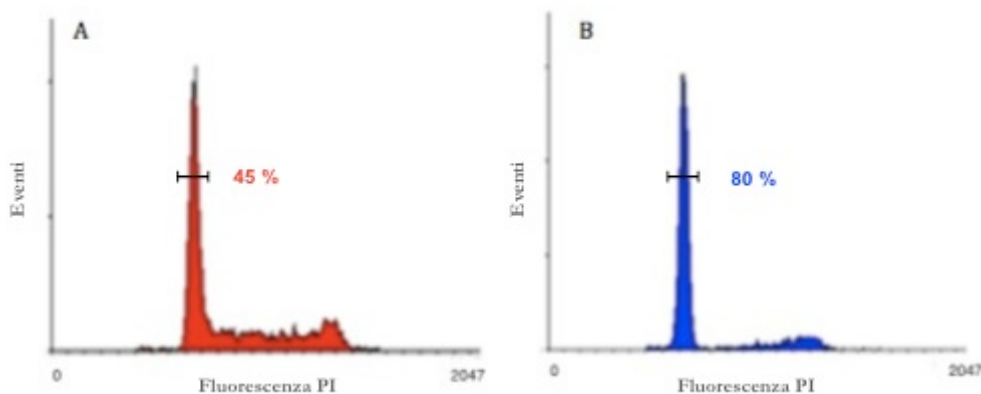
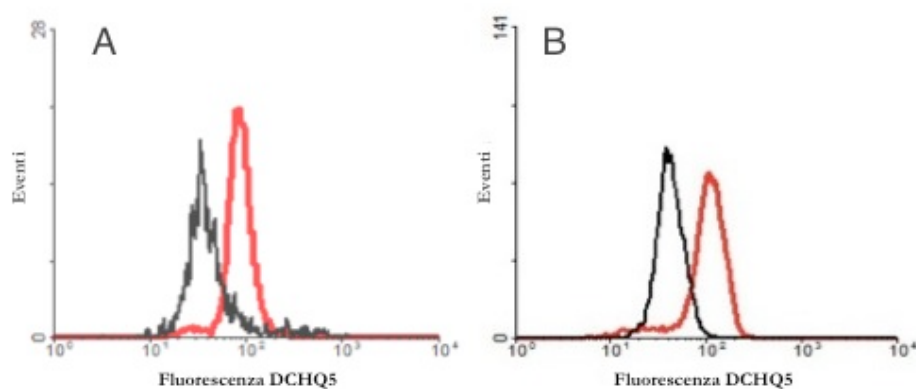


Figura 20. Valutazione del contenuto di DNA totale di cellule HL60 di controllo (pannello A) e differenziate con DMSO (pannello B). Gli istogrammi mostrano la fluorescenza del PI (espressa in canali di fluorescenza) rispetto al numero di eventi acquisiti. La fluorescenza del PI è direttamente proporzionale al contenuto di DNA. Risultati di un tipico esperimento.

Successivamente, è stato valutato il contenuto di Mg cellulare delle cellule di controllo e differenziate terminalmente mediante analisi citofluorimetrica: i campioni sono stati marcati con la sonda DCHQ5 (5 μ M per 20 minuti) e la fluorescenza verde è stata acquisita in seguito ad eccitazione nell'UV (Figura 21, pannello A) e nel visibile (Figura 21, pannello B). L'arresto della crescita indotto dal trattamento con DMSO porta a un decremento della fluorescenza della sonda rilevata sia con eccitazione nell'UV (pannello A) che nel visibile (pannello B). Ciò è in accordo con l'attesa diminuzione del contenuto di Mg cellulare nel corso del differenziamento. L'eccitazione nell'UV e nel visibile ha, inoltre, fornito lo stesso risultato in termini di canali medi della fluorescenza (Figura 21, tabella sottostante), confermando che la sonda DCHQ5 risponde alle variazioni del contenuto di Mg cellulare indipendentemente dalla sorgente di eccitazione utilizzata.

Dai risultati ottenuti, recentemente pubblicati,¹⁴² è emerso che la sonda DCHQ5 potrebbe rivelarsi un valido strumento per l'analisi del Mg totale cellulare in un'ampia varietà di strumenti di fluorescenza: la quasi totalità dei microscopi confocali e la maggior parte dei citofluorimetri, infatti, sono equipaggiati con laser a 488 nm.



HL60	Eccitazione UV	Eccitazione visibile
Controllo	84	93
Differenziate	45	43

Figura 21. Distribuzioni di fluorescenza di cellule HL60 (5×10^5 cells/mL) di controllo (rosso) e differenziate terminalmente con DMSO (nero) marcate con la sonda DCHQ5 ($5 \mu\text{M}$, 20 minuti). Pannello A: distribuzioni di fluorescenza acquisite con eccitazione nell'UV; pannello B: distribuzioni di fluorescenza acquisite con eccitazione nel visibile (488 nm). In tabella sono rappresentati i relativi canali medi della fluorescenza. Risultati di un tipico esperimento.

5.4 Determinazione della stabilità della fluorescenza dei DCHQ-derivati

I chemosensori sono soggetti, a vari livelli, a effetti di diminuzione della fluorescenza dovuti a danneggiamento indotto dai fotoni incidenti oppure da modifiche strutturali con formazione di legami covalenti (di solito indotte dall'ossigeno molecolare). L'entità del *photobleaching* dipende da vari fattori, tra cui l'intensità della luce e il tempo di esposizione.

Sono stati valutati gli effetti eventualmente indotti sui DCHQ-derivati dall'esposizione alla sorgente di eccitazione: le prove di stabilità della fluorescenza sono state effettuate in una soluzione 1:1 di MeOH:MOPS (pH 7.4, 20 mM); poiché la sonda DCHQ1 può essere usata per misure di quantificazione del Mg^{2+} cellulare in PBS,¹²⁸ la sua stabilità è stata valutata anche in questo tampone.

Gli effetti dell'esposizione continua a una sorgente luminosa sono stati valutati monitorando l'andamento nel tempo della fluorescenza a 500 nm eccitando il campione per 30 minuti ($\lambda_{exc} = 360$ nm). La fluorescenza è stata acquisita trattando le sonde con quantità basse di Mg^{2+} ($MgSO_4$ 5 μM) e in condizioni di saturazione di Mg^{2+} ($MgSO_4$ 5 mM).

Gli effetti della diminuzione della fluorescenza per cause diverse dal tempo di esposizione alla luce sono stati valutati registrando l'emissione di fluorescenza delle sonde a 500 nm ogni 5 minuti per 30 minuti totali ($\lambda_{exc} = 360$ nm). Nell'intervallo tra un'acquisizione e l'altra sono state chiuse le fenditure dello spettrofluorimetro, per ridurre al minimo il tempo di esposizione del fluoròforo alla luce.

5.4.1 DCHQ1

Le prove di stabilità all'esposizione alla luce di eccitazione sono state fatte utilizzando la sonda alla concentrazione 25 μM sia in MeOH:MOPS che in PBS.

I risultati relativi all'esposizione a una sorgente luminosa in continuo indicano che, in MeOH:MOPS (Figura 22A, in nero), la sonda trattata con $MgSO_4$ 5 μM mostra un calo percentuale dell'intensità di fluorescenza a 500 nm di circa il 19%. Per la sonda saturata, invece (Figura 22A, in rosso), il calo percentuale di fluorescenza al massimo di emissione è del 4%. DCHQ1 è perciò molto più stabile nel tempo quando si trova in un ambiente con contenuto di magnesio tale da saturarla.

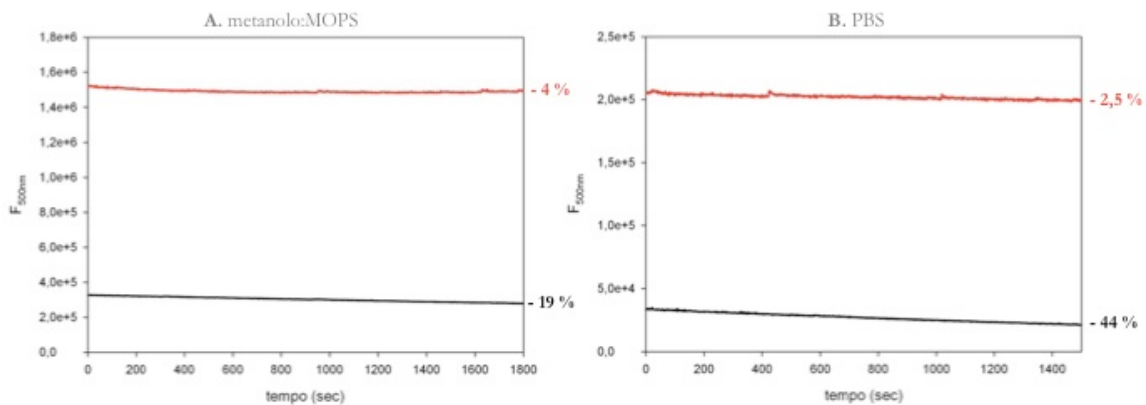


Figura 22. DCHQ1 25 μM in MeOH:MOPS (pannello A) e PBS (pannello B) trattata con MgSO_4 5 μM (in nero) e MgSO_4 5 mM (in rosso). Andamento nel tempo dell'intensità di fluorescenza a 500 nm in eccitazione continua a 360 nm. A destra è riportato il calo percentuale. Risultati di un tipico esperimento.

Anche in PBS la fluorescenza della sonda saturata si è dimostrata più stabile nel tempo: in un tipico esperimento, infatti, i risultati dell'andamento dell'intensità di fluorescenza a 500 nm hanno mostrato che, dopo 30 minuti di esposizione ad una sorgente di luce continua ($\lambda_{\text{exc}} = 360$ nm), la fluorescenza della sonda DCHQ1 cala di circa il 2,5% in presenza di Mg^{2+} saturante (MgSO_4 5 mM), mentre il calo è addirittura del 44% con MgSO_4 5 μM . Successivamente, si è valutato l'effetto dell'esposizione della sonda DCHQ1 ad una sorgente di eccitazione discontinua (Figura 23):

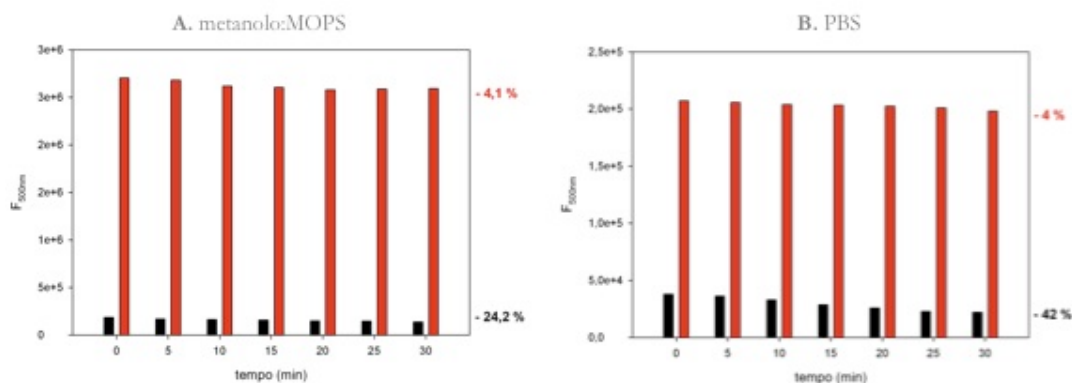


Figura 23. DCHQ1 25 μM in MeOH:MOPS (pannello A) e PBS (pannello B) trattata con MgSO_4 5 μM (in nero) e MgSO_4 5 mM (in rosso). Andamento dell'intensità di fluorescenza a 500 nm in eccitazione discontinua a 360 nm. A destra è riportato il calo percentuale. Risultati di un tipico esperimento.

Il calo percentuale dell'intensità di fluorescenza misurato in entrambi i tamponi è confrontabile con quello ottenuto in eccitazione continua. In particolare, la sonda DCHQ1

in MeOH:MOPS subisce un calo di circa il 4,1% a saturazione (Figura 23A, in rosso), mentre per basse concentrazioni di Mg^{2+} è del 24,2% (Figura 23A, in nero); in PBS la sonda subisce un calo analogo a saturazione (4%, Figura 23B, in rosso), mentre il calo di fluorescenza con $MgSO_4$ 5 μM è di circa il 42% (Figura 23B, in nero).

5.4.2 DCHQ3

Le prove di stabilità all'esposizione alla luce di eccitazione sono state effettuate utilizzando la sonda DCHQ3 alla concentrazione 10 μM (Figura 24).

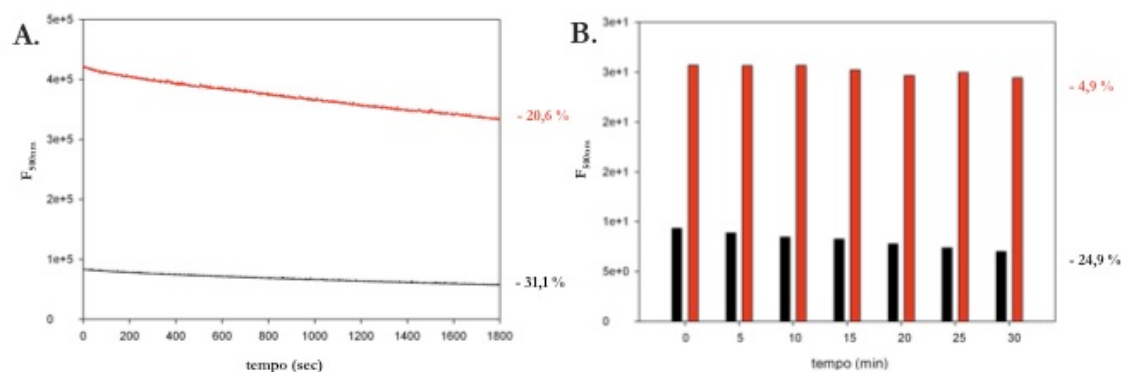


Figura 24. DCHQ3 10 μM in MeOH:MOPS trattata con $MgSO_4$ 5 μM (in rosso) e $MgSO_4$ 5 mM (in nero). Pannello A: andamento dell'intensità di fluorescenza a 500 nm in eccitazione continua a 360 nm; Pannello B: andamento dell'intensità di fluorescenza a 500 nm in eccitazione discontinua a 360 nm. A destra dei pannelli sono riportati i rispettivi cali percentuali. Risultati di un tipico esperimento.

In condizioni di eccitazione continua si osserva che la sonda DCHQ3 subisce un forte calo dell'intensità di fluorescenza nel tempo sia in condizioni di basso Mg^{2+} in soluzione ($MgSO_4$ 5 μM , pannello A, linea nera), che a saturazione (pannello A, linea rossa). A saturazione, infatti, la fluorescenza cala di oltre il 20,6%, mentre il calo in presenza di $MgSO_4$ 5 μM in soluzione è addirittura del 31,1%.

Al contrario, monitorando l'intensità di fluorescenza della sonda eccitata ogni 5 minuti (Figura 24, pannello B) si sono ottenuti risultati migliori. Nell'esempio riportato, infatti, si osserva un calo della fluorescenza a 500 nm di circa il 4,9% a saturazione (in nero), e del 24,9% a basso Mg^{2+} (in rosso).

La sonda DCHQ3, quindi, risulta essere particolarmente sensibile agli effetti della luce ed è necessario assicurarsi di tenerla al buio fino al momento dell'acquisizione ogni volta che viene utilizzata per una marcatura.

5.4.3 DCHQ4

Le prove di stabilità all'esposizione alla luce di eccitazione sono state effettuate utilizzando la sonda DCHQ4 alla concentrazione 5 μM (Figura 25).

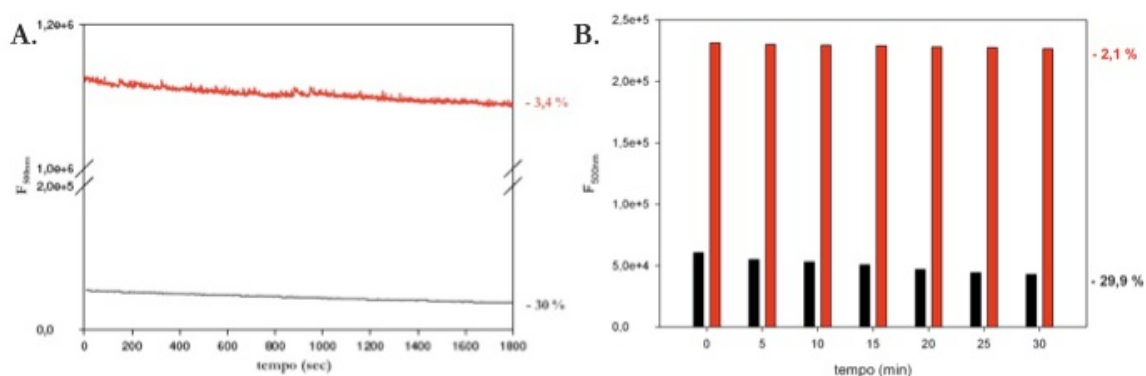


Figura 25. DCHQ4 5 μM in MeOH:MOPS trattata con MgSO_4 5 μM (in nero) e MgSO_4 5 mM (in rosso). Pannello A: andamento dell'intensità di fluorescenza a 500 nm in eccitazione continua a 360 nm. Pannello B: andamento dell'intensità di fluorescenza a 500 nm in eccitazione discontinua a 360 nm. A destra dei pannelli sono riportati i rispettivi cali percentuali. Risultati di un tipico esperimento.

Dai risultati di un tipico esperimento è emerso che il calo d'intensità di fluorescenza registrato con eccitazione continua per la sonda saturata è di appena il 3,4% (Figura 25A, linea rossa). La riduzione dell'intensità di fluorescenza della sonda a basse concentrazioni di Mg^{2+} è invece del 30% (Figura 25A, linea nera). Analogamente, in condizioni di eccitazione discontinua, la riduzione di fluorescenza è del 2,1% a saturazione di Mg^{2+} e del 29,9% con MgSO_4 5 μM (Figura 25B).

5.4.4 DCHQ5

Le prove di stabilità all'esposizione alla luce di eccitazione sono state effettuate utilizzando la sonda DCHQ5 alla concentrazione 5 μM . A questa concentrazione, infatti, la sonda è già

sufficientemente fluorescente e, inoltre, scarsamente citotossica (per dettagli si veda il paragrafo 4.3).

La fluorescenza, in questo caso, è stata acquisita in MeOH:MOPS trattando la sonda con MgSO_4 2,5 μM (Figura 26, in nero) e con MgSO_4 5 mM (Figura 26, in rosso).

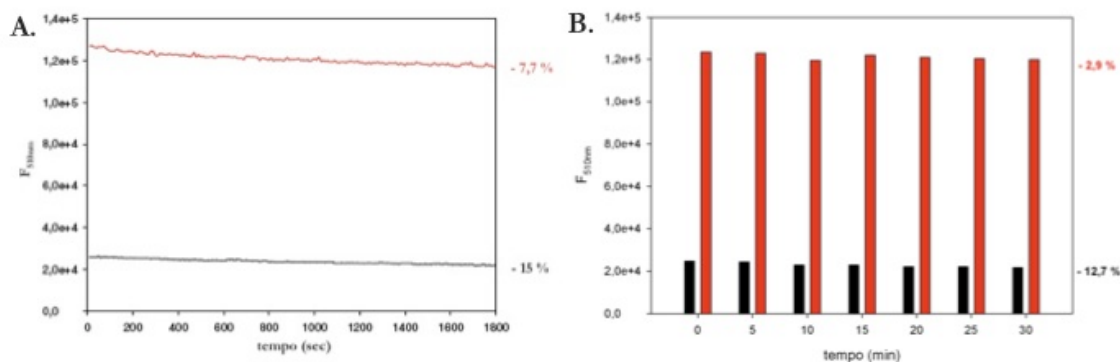


Figura 26. DCHQ5 5 μM in metanolo:MOPS trattata con MgSO_4 2,5 μM (in nero) e MgSO_4 5 mM (in rosso). Andamento dell'intensità di fluorescenza a 500 nm in eccitazione continua a 360 nm. A destra è riportato il calo percentuale. Risultati di un tipico esperimento.

Nell'esempio riportato (Figura 26), l'intensità di fluorescenza a 510 nm in presenza di una bassa concentrazione di Mg^{2+} subisce un calo percentuale di circa il 15% (MgSO_4 2,5 μM , pannello A, linea nera), mentre il calo percentuale in condizioni saturanti è del 7,7% (MgSO_4 5 mM, pannello A, linea rossa).

Cali percentuali anche minori si sono registrati registrando la fluorescenza ogni 5 minuti in eccitazione discontinua (Figura 26B): a saturazione, infatti, il calo è di circa il 2,9 %, mentre con basso Mg^{2+} del 12,7 %.

5.4.5 DCHQ6

Anche per la sonda DCHQ6 le prove di stabilità all'esposizione alla luce di eccitazione sono state effettuate alla concentrazione 5 μM , monitorando la fluorescenza a 500 nm in presenza di MgSO_4 5 μM e con MgSO_4 5 mM.

I risultati di un tipico esperimento (Figura 27) riportano, in presenza di MgSO_4 5 μM , un calo dell'intensità di fluorescenza della sonda a 500 nm di circa il 17,6 % (pannello A, linea

nera), mentre per la sonda saturata il calo registrato è di circa il 5,4 % (pannello A, linea rossa).

L'eccitazione discontinua del campione causa, invece, un calo di circa l'11,2 % a saturazione (B, in rosso) e del 26,9 % in condizioni di basso Mg^{2+} (B, in nero).

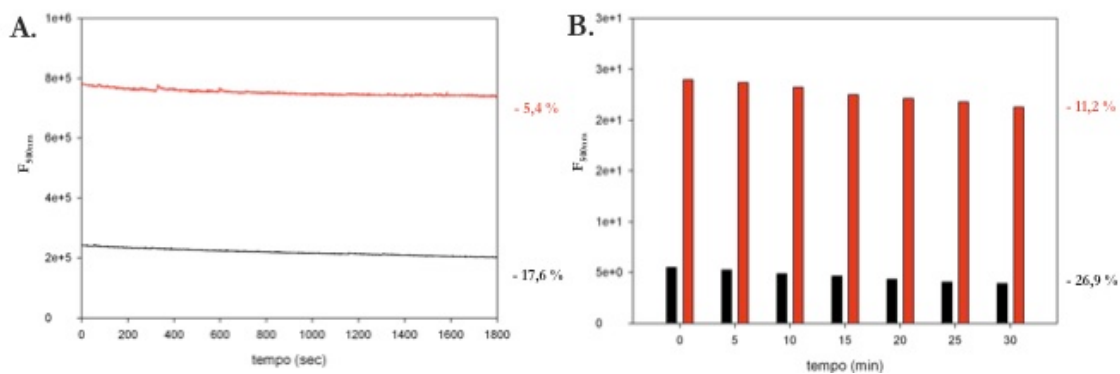


Figura 27. DCHQ6 5 μM in metanolo:MOPS trattata con $MgSO_4$ 5 μM (in rosso) e $MgSO_4$ 5 mM (in nero). Andamento dell'intensità di fluorescenza a 500 nm in eccitazione continua a 360 nm. A destra è riportato il calo percentuale. Risultati di un tipico esperimento.

5.5 Uptake e ritenzione intracellulare

5.5.1 Misure in spettrofluorimetria

Per valutare se il diverso segnale di fluorescenza osservato sia legato a un differente *uptake* dei DCHQ-derivati e se questi vengono efficacemente ritenuti all'interno delle cellule, è stata valutata in fluorimetria statica la fluorescenza di campioni di cellule HL60, prima e dopo il lavaggio in PBS e dei rispettivi surnatanti (Figura 28). La scelta del PBS è stata motivata dalla necessità di mantenere le cellule in un ambiente il più simile possibile a quello fisiologico.

La quantità di ognuna delle sonde di nuova sintesi ritenuta all'interno delle cellule è stata calcolata per differenza tra l'intensità di fluorescenza di ciascuna sonda nella sospensione cellulare (F_{cells}) e la fluorescenza residua dei surnatanti dopo centrifuga (F_{surnatante}). La distribuzione della sonda tra le cellule e l'ambiente extracellulare di ciascun DCHQ-derivato è stata valutata alla concentrazione ottimale osservata nelle misure citofluorimetriche (paragrafo 5.3). I risultati ottenuti sono stati pubblicati.¹⁴²

Dall'esempio riportato in Figura 28 si osserva che circa il 75% della sonda DCHQ1 viene ritenuto all'interno della cellula dopo il lavaggio. I dati raccolti con la DCHQ1 sintetizzata con metodo tradizionale mostravano, invece, un'uguale ridistribuzione della sonda tra le cellule e il mezzo extracellulare: questo dato può, quindi, essere imputato alla minore impurezza della sonda ottenuta con la nuova metodica di sintesi.

Solo il 60% del derivato idrofobico DCHQ4, invece, rimane intrappolato dopo il lavaggio (Figura 28), mentre tutte le altre sonde mostrano un aumento della ritenzione rispetto alla capostipite DCHQ1. Questo risultato, insieme all'osservazione che le cellule marcate con DCHQ4 subiscono uno spostamento verso il quadrante PI-positivo nelle analisi citofluorimetriche (Figura 19 pannello 2, paragrafo 5.3), è in accordo con l'ipotesi che la DCHQ4 induca una permeabilizzazione della membrana che ne limita la possibilità di utilizzo per tempi lunghi.

Con l'inserimento di gruppi AM sulle braccia idrossichinolinarie, invece, si è ottenuto un consistente aumento della ritenzione cellulare, perché circa l'85% della sonda DCHQ3 resta intrappolato nella sospensione cellulare dopo i lavaggi (Figura 28).

Come discusso in precedenza (paragrafo 5.2), la risposta al Mg²⁺ delle due sonde

aromatiche DCHQ5 e DCHQ6 in soluzione acquosa e in PBS è bassa. Pertanto, allo scopo di ottenere un buon segnale di fluorescenza nella sospensione cellulare e nel surnatante, le intensità di fluorescenza totale dei campioni marcati con queste sonde sono state misurate aggiungendo direttamente in cuvetta un'uguale quantità di soluzione 1:1 di MeOH:MOPS (pH 7,4, 20 mM). In questo modo è stato possibile calcolare che circa l'80% della sonda DCHQ6 e oltre il 95% della DCHQ5 sono ritenuti nelle cellule dopo il lavaggio (Figura 28).

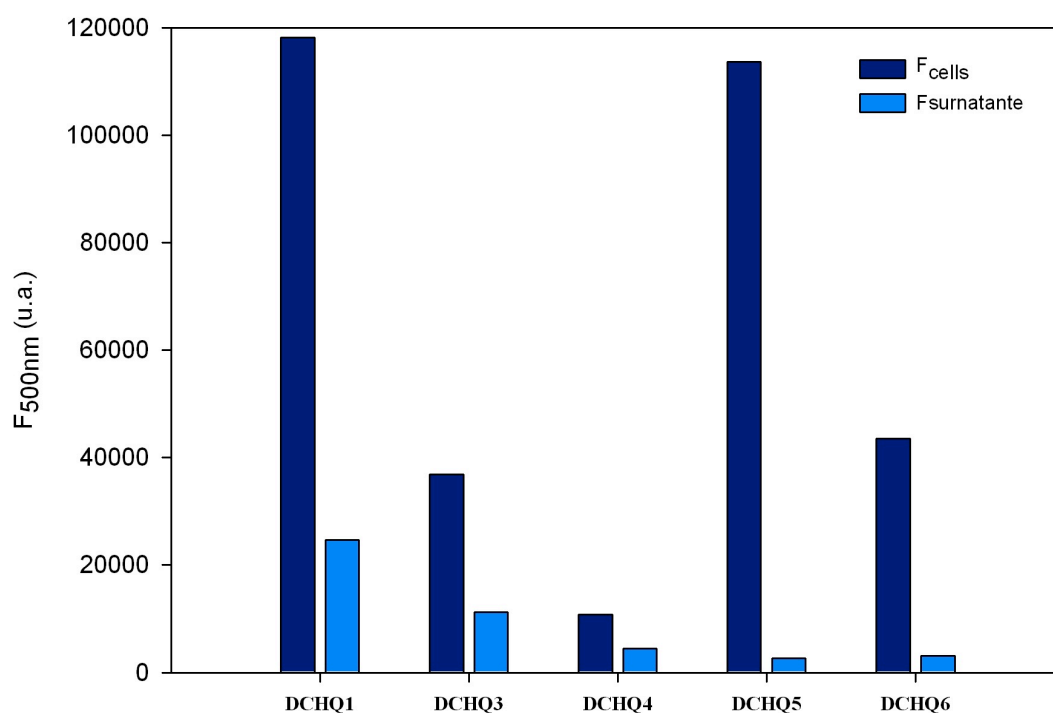


Figura 28. Intensità di fluorescenza a 500 nm di cellule HL60 intere (10^6 cells/mL) marcate con ciascuno dei DCHQ-derivati (DCHQ1 25 μ M, DCHQ3 10 μ M, DCHQ4 5 μ M, DCHQ5 5 μ M, DCHQ6 5 μ M). F_{cells} (in blu) rappresenta la fluorescenza totale della sonda nella sospensione cellulare, registrata dopo l'aggiunta di MgSO₄ 8 mM; F_{urnatante} (azzurro) rappresenta la fluorescenza totale della sonda che non è stata ritenuta dalle cellule dopo il lavaggio, registrata dopo l'aggiunta di MgSO₄ 8 mM ai surnatanti. Dati raccolti in PBS per le sonde DCHQ1, DCHQ3 e DCHQ4; dati raccolti in PBS con aggiunta di una stessa quantità di MeOH:MOPS per le sonde DCHQ5 e DCHQ6. Risultati di un tipico esperimento

Nel loro complesso, i dati di esposti in Figura 28 indicano che la funzionalizzazione dei DCHQ-derivati con gruppi AM non è di per se' necessaria ad aumentarne la ritenzione cellulare, perché è sufficiente l'introduzione di sostituenti aromatici. Generalmente, le

sonde funzionalizzate con gruppi AM, compresa la DCHQ3, esistono all'interno delle cellule in due diverse forme (idrolizzata e non idrolizzata), in quanto è poco probabile che le esterasi cellulari agiscano sull'intera quota di fluoròforo entrato: questo rappresenta uno svantaggio nell'ottica di una corretta quantificazione del Mg totale intracellulare. Le sonde aromatiche DCHQ5 e DCHQ6, invece, esistono a livello cellulare in un'unica forma non idrolizzabile: il segnale di fluorescenza rilevato è, perciò, dovuto al contributo di un'unica specie complessata con il Mg^{2+} .

5.5.2 Misure in citofluorimetria

Gli stessi esperimenti, ripetuti in citometria a flusso su cellule HL60, hanno dato risultati simili a quanto osservato in fluorimetria statica. Questo tipo di analisi presenta l'indubbio vantaggio di discriminare la marcatura delle cellule vive dall'eventuale interferenza dovuta alla presenza di cellule morte e/o danneggiate; nell'analisi di fluorescenza in fluorimetria statica, invece, è considerato il contributo dell'intera popolazione presente nel campione.

DCHQ3.

L'analisi citofluorimetrica di cellule HL60 marcate con la sonda DCHQ3 alla concentrazione 10 μM mostra che, come osservato in spettrofluorimetria, l'intensità di fluorescenza delle cellule vive diminuisce dopo i lavaggi (Figura 29).

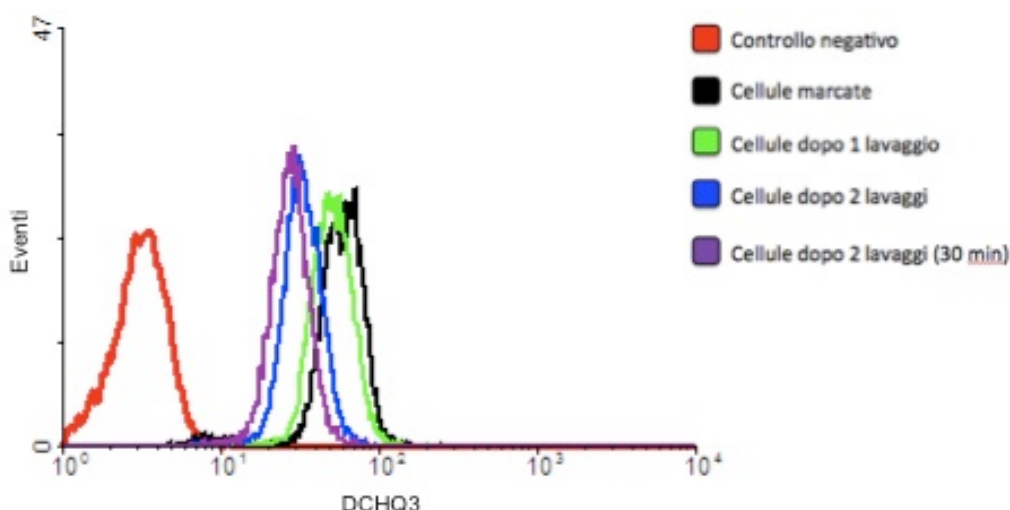


Figura 29. Distribuzione dell'intensità di fluorescenza di cellule HL60 marcate con la sonda DCHQ3 10 μM . In rosso sono rappresentate le cellule non marcate, in nero le cellule marcate prima del lavaggio, in verde le cellule dopo il primo lavaggio, in blu dopo il secondo lavaggio e in viola queste ultime dopo 30 minuti di marcatura. Risultati di un tipico esperimento.

Risulta, quindi, evidente che ad ogni lavaggio c'è un rilascio di sonda dall'interno delle cellule.

La sonda DCHQ3 è funzionalizzata con gruppi acetometossi-estere (AM) allo scopo di ottenere, rispetto alla capostipite DCHQ1, un sensore fluorescente che sia riconosciuto e idrolizzato dalle esterasi cellulari. Tuttavia, la sintesi ha portato a un prodotto che non mostra nessuna differenza spettrale tra la forma esterificata e quella anionica/idrolizzata. Questo rende problematico discriminare tra le due forme e comprendere se la fuoriuscita di sonda osservata sia imputabile alla sola forma esterificata o se l'idrofobicità (e quindi la possibilità di muoversi attraverso la membrana cellulare) sia mantenuta nonostante l'idrolisi dell'estere.

DCHQ4.

In Figura 30 sono riportate le distribuzioni di fluorescenza di cellule HL60 marcate con la sonda DCHQ4 5 μM prima e dopo i lavaggi:

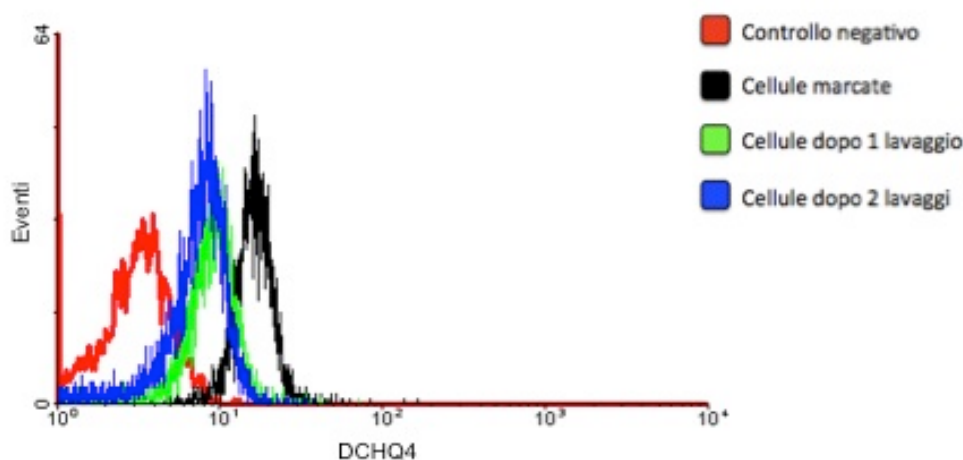


Figura 30. Distribuzione dell'intensità di fluorescenza di cellule HL60 marcate con la sonda DCHQ4 5 μM . In rosso sono rappresentate le cellule non marcate, in nero le cellule marcate prima del lavaggio, in verde le cellule dopo il primo lavaggio, in blu dopo il secondo lavaggio. Risultati di un tipico esperimento.

Come precedentemente osservato nell'analisi fluorimetrica, la sonda DCHQ4 è poco fluorescente e scarsamente ritenuta. Non è, quindi, indicata per studi dinamici e per monitorare eventuali flussi di Mg^{2+} attraverso la membrana plasmatica.

DCHQ5.

In Figura 31 sono riportate le distribuzioni della fluorescenza nelle cellule vive dopo la marcatura con la sonda DCHQ5 5 μM e dopo il lavaggio. Nel grafico è riportata anche l'autofluorescenza di un campione di cellule non marcate (controllo negativo).

Come evidenziato dall'esempio riportato, la marcatura dopo i lavaggi non risulta diminuita. La mortalità dei campioni analizzati rimane intorno al 5% della popolazione anche dopo 2 lavaggi e 60 minuti di marcatura.

Come già osservato in fluorimetria statica, quindi, si può concludere che la sonda DCHQ5 è altamente ritenuta all'interno delle cellule, anche se non è una molecola carica e non è ipotizzabile una sua trasformazione da parte degli enzimi che la intrappoli all'interno della cellula.

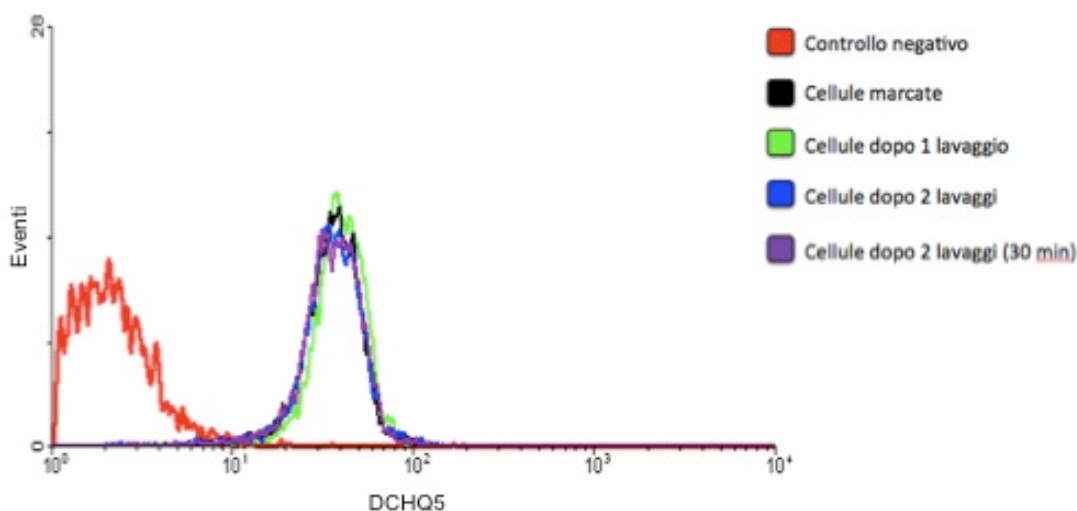


Figura 31. Distribuzione dell'intensità di fluorescenza di cellule HL60 marcate con la sonda DCHQ5 5 μM . In rosso sono rappresentate le cellule non marcate, in nero le cellule marcate prima del lavaggio, in verde le cellule dopo il primo lavaggio, in blu dopo il secondo lavaggio e in viola queste ultime dopo ulteriori 30 minuti di marcatura. Risultati di un tipico esperimento.

DCHQ6.

Infine, in Figura 32 è riportata la distribuzione della fluorescenza di cellule HL60 marcate con la sonda DCHQ6 5 μM . Questa sonda non ha mostrato nessun effetto citotossico, con una mortalità nei campioni che si mantiene entro il 10% della popolazione anche dopo i lavaggi. Come già osservato per la sonda DCHQ5, anche in questo caso le analisi

citofluorimetriche confermano i dati di fluorimetria statica: la sonda è altamente ritenuta dopo il primo lavaggio, sebbene la fluorescenza diminuisca leggermente dopo un ulteriore secondo lavaggio.

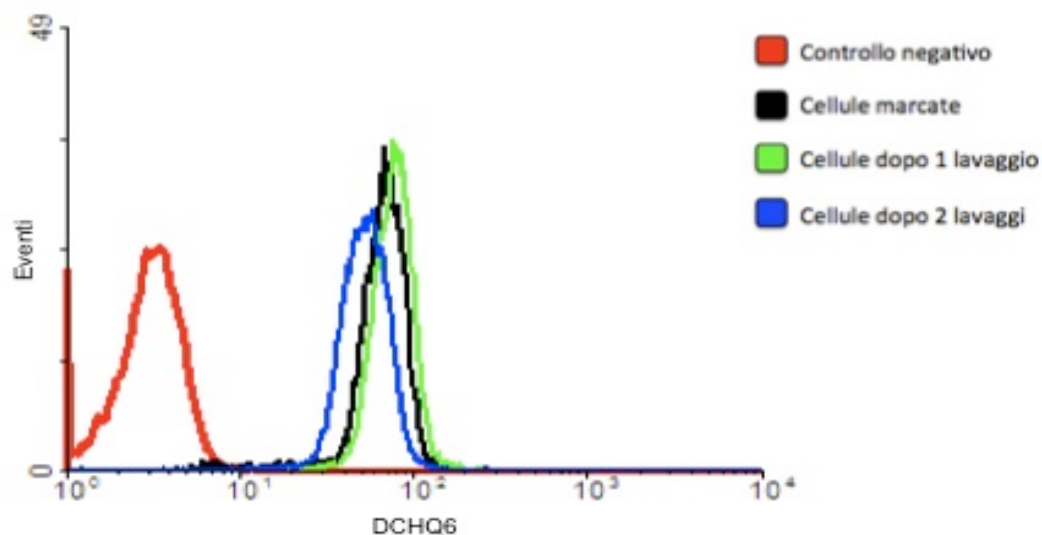


Figura 32. Distribuzione dell'intensità di fluorescenza di cellule HL60 marcate con la sonda DCHQ6 $5 \mu\text{M}$. In rosso sono rappresentate le cellule non marcate, in nero le cellule marcate prima del lavaggio, in verde le cellule dopo il primo lavaggio, in blu dopo il secondo lavaggio. Risultati di un tipico esperimento.

5.6 Determinazione della distribuzione intracellulare di Mg con microscopia confocale a doppio fotone

I DCHQ-derivati hanno mostrato caratteristiche fotofisiche e fotochimiche che li rendono potenzialmente interessanti per lo studio della distribuzione intracellulare del Mg totale. Per questo motivo, si è deciso di testarli in microscopia confocale a doppio fotone.

La microscopia confocale a doppio fotone (*two-photon confocal microscopy*, TPM) prevede l'eccitazione del fluoròforo mediante assorbimento quasi-simultaneo di due fotoni a bassa energia e si sta velocemente affermando in biologia per i suoi numerosi vantaggi rispetto alla classica microscopia confocale (*one-photon microscopy*, OPM). La bassa autofluorescenza e autoassorbimento da parte del tessuto, oltre ai ridotti *photobleaching* e *photodamage* che caratterizzano la TPM, rendono, infatti, possibile l'osservazione di tessuti intatti in profondità (>500 μm) e per lunghi periodi.¹⁴⁴

Sebbene la capostipite DCHQ1 non sia stata sintetizzata specificamente per la TPM, è stato dimostrato che un suo utilizzo con questa tecnica garantisce comunque un discreto segnale di fluorescenza nella marcatura di cellule vive, come mostrato anche in Figura 33 dalla marcatura di cellule SaOS-2.¹²⁷ Recentemente, altre sonde Mg^{2+} -specifiche per la TPM sono state sintetizzate e testate con successo:¹²⁴ tuttavia, queste rispondono solo al Mg^{2+} libero e non sono, perciò, in grado di fornire informazioni sulla distribuzione della specie legata e/o compartimentalizzata di questo catione.

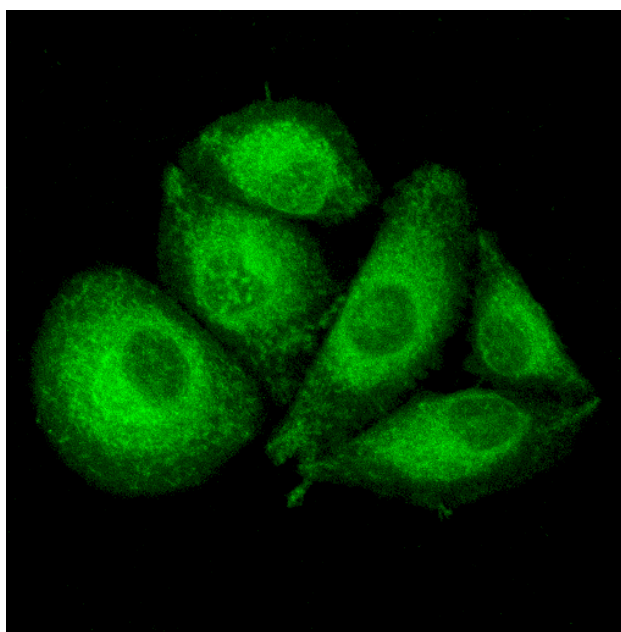


Figura 33. Immagine di microscopia confocale a doppio fotone ($\lambda_{\text{exc}} = 750 \text{ nm}$) di cellule SaOS-2 marcate con la sonda DCHQ1 (25 μM) in PBS senza Mg^{2+} .

Per verificare se i derivati idrossichinolinici di nuova sintesi avessero mantenuto la caratteristica della DCHQ1 di essere utilizzabile in TPM per l'*imaging* del Mg totale cellulare, sono state marcate cellule SaOS-2 (*Human epithelial-like osteosarcoma*) con ciascuna sonda alla concentrazione ottimale di utilizzo.

L'assorbimento quasi-simultaneo di due fotoni ad alta lunghezza d'onda ($\lambda_{\text{exc}} = 750 \text{ nm}$) ha reso possibile l'eccitazione nella regione dell'UV dei DCHQ-derivati. In Figura 34 sono messe a confronto le intensità e distribuzioni di fluorescenza delle cellule SaOS-2 marcate con le sonde in PBS senza Mg^{2+} .

In tutti i campioni acquisiti, e in accordo con quanto precedentemente pubblicato per la sonda DCHQ1,¹²⁷ la fluorescenza appare diffusa su tutto il citoplasma, con un segnale più intenso in corrispondenza della regione perinucleare, dove è noto che sono localizzati i mitocondri e, più in generale, la maggior parte degli organelli. Ciò è in accordo con l'ipotesi che esistano depositi di Mg^{2+} intracellulare nel mitocondrio.²⁸

Le cellule SaOS-2 marcate con il derivato DCHQ3 10 μM , caratterizzato da gruppi funzionali acetometossi-estere sulle braccia idrossichinoliniche, hanno mostrato un basso segnale di fluorescenza in TPM (Figura 34, pannello A): per l'acquisizione delle immagini, infatti, è stato necessario aumentare notevolmente il *gain* dei fotomoltiplicatori. Di conseguenza, le immagini ottenute dalla marcatura con la sonda DCHQ3 sono risultate poco brillanti e con un elevato rumore di fondo.

Questo comportamento dipende in parte dal fatto che la sonda DCHQ3 si è dimostrata meno fluorescente delle altre, ma anche piuttosto citotossica rispetto alla capostipite DCHQ1: la sua concentrazione ottimale di utilizzo, infatti, deve necessariamente essere più bassa (10 μM anziché 25 μM della DCHQ1). Concentrazioni più alte, con cui certamente si avrebbero segnali di fluorescenza più intensi e brillanti, mostrano valori troppo elevati di mortalità cellulare.

In Figura 34B è mostrata l'intensità di fluorescenza di cellule SaOS-2 marcate con la sonda DCHQ4 5 μM in PBS senza Mg^{2+} . Questa molecola è stata specificamente funzionalizzata con lunghe catene laterali idrofobiche allo scopo di consentire una migliore marcatura delle membrane cellulari. Come atteso, lo *staining* della membrana plasmatica e delle membrane interne è più definito se confrontato con le sonde DCHQ1 e DCHQ3 (Figura 33 e Figura 34A, rispettivamente). Inoltre, il segnale nel citoplasma e nell'interno del nucleo è pressoché assente, a dimostrazione della propensione della sonda a localizzarsi in ambienti lipofili. Per questo motivo, anche se ha mostrato una scarsa ritenzione, la DCHQ4

potrebbe rappresentare uno strumento utile per la mappatura del Mg^{2+} di membrana. lo studio dei movimenti del Mg^{2+} dalla membrana plasmatica in risposta a stimoli appropriati, tuttavia, si rende necessaria la sintesi di un ulteriore derivato che, rispetto alla sonda DCHQ4, mostri caratteristiche di ritenzione elevata.

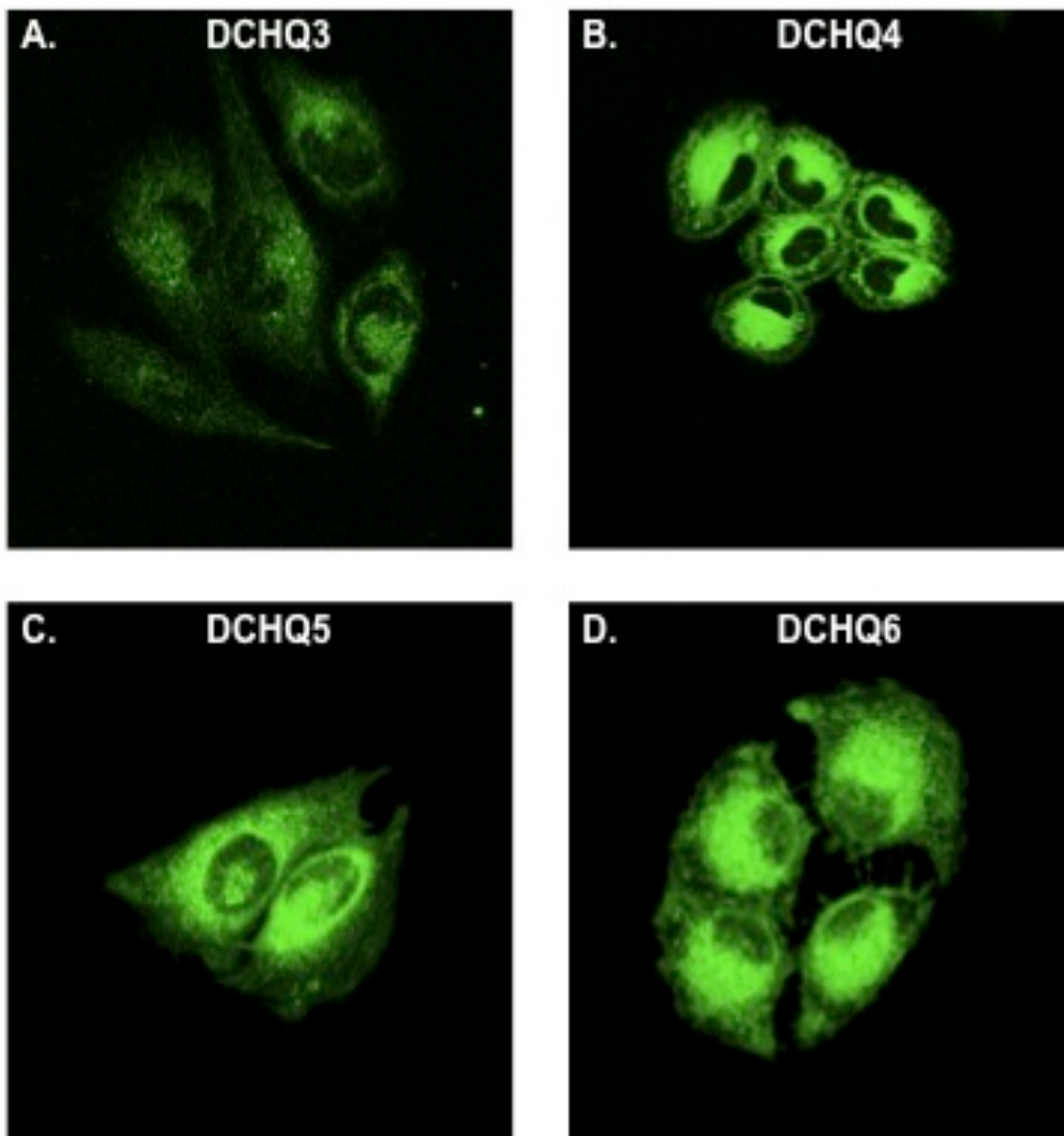


Figura 34. Immagini di microscopia confocale a doppio fotone ($\lambda_{exc} = 750 \text{ nm}$) di cellule SaOS-2 marcate con le sonde DCHQ3 ($10 \mu\text{M}$, pannello A), DCHQ4 ($5 \mu\text{M}$, pannello B), DCHQ5 ($5 \mu\text{M}$, pannello C) e DCHQ6 ($10 \mu\text{M}$, pannello D).

Infine, le immagini delle cellule SaOS-2 marcate con le due sonde aromatiche DCHQ5 e DCHQ6 (Figura 34, pannelli C e D rispettivamente) sono evidentemente molto più brillanti di quelle ottenute con gli altri composti: come atteso, la fluorescenza risulta distribuita in tutto il citoplasma con particolare intensità nella regione perinucleare. A differenza della capostipite DCHQ1 (Figura 33), le cellule marcate con le due sonde aromatiche mostrano anche una marcatura più definita della membrana plasmatica.

Il derivato fenilico DCHQ5, in particolare, ha mostrato caratteristiche uniche:

1. fluorescenza maggiore di tutti gli altri DCHQ-derivati;
2. segnale di fluorescenza stabile nei 30 minuti;
3. alta ritenzione all'interno delle cellule marcate;
4. possibilità di essere eccitata sia nell'UV che nel visibile;
5. immagini definite e brillanti in TPM.¹⁴²

Per tutte queste caratteristiche, la DCHQ5 potrebbe rappresentare un valido candidato per integrare le informazioni sul Mg^{2+} libero derivate dalle sonde commerciali al fine di comprendere meglio l'omeostasi di questo importante elemento.

5.7 Analisi quantitativa del Mg totale cellulare con la sonda DCHQ5

Considerati i vantaggi che la sonda DCHQ5 ha mostrato rispetto agli altri DCHQ-derivati nell'analisi qualitativa del Mg cellulare, è stato verificato se questo sensore fluorescente potesse essere utilizzato anche per analisi quantitative.

La capostipite DCHQ1 è stata già usata con successo nell'analisi quantitativa del Mg totale intracellulare su piccoli campioni con un metodo semplice basato su un calcolo matematico che mette in relazione la fluorescenza nel massimo di emissione (500 nm) con la concentrazione di Mg^{2+} in soluzione: la quantificazione della fluorescenza della sonda DCHQ1 fornisce una stima del Mg totale confrontabile con la spettroscopia di assorbimento atomico in una varietà di campioni cellulari sonicati.¹²⁸ Il metodo è stato, quindi, proposto come valida alternativa all'AAS, rispetto alla quale ha i vantaggi di richiedere campioni cellulari molto più piccoli ($2-5 \times 10^5$ cells/mL anziché $1-5 \times 10^6$ per l'AAS) ed una tecnica semplice, rapida e diffusa qual è la spettrofluorimetria statica.

Il legame della sonda DCHQ5 con il Mg^{2+} in soluzioni saline come il PBS comporta, a differenza della DCHQ1, solo piccole variazioni dell'intensità di fluorescenza, come discusso nel paragrafo 4.5: al contrario, il complesso con il Mg^{2+} va incontro a modificazioni evidenti della fluorescenza in una soluzione 1:1 di MeOH:MOPS (20 mM, pH 7.4). Per questo motivo, si è ritenuto che la metodica di quantificazione in PBS proposta per la DCHQ1 non fosse indicata per la molecola DCHQ5.

E' stata, perciò, messa a punto una metodica di analisi quantitativa mediante retta di taratura sfruttando l'*enhancement* di fluorescenza a cui il sensore di nuova sintesi va incontro in presenza di MeOH:MOPS.

5.7.1 Retta di taratura con DCHQ5

Poiché le sospensioni cellulari necessitano tamponi salini acquosi iso-osmotici, la retta di taratura è stata costruita aggiungendo, a una soluzione 1:1 di MeOH:MOPS, una quantità minima di PBS (50-200 μ L/mL). Per quantità di PBS superiori, la fluorescenza della sonda DCHQ5 in soluzione saturante con Mg^{2+} (F_{max}) tende a diminuire significativamente rispetto alla F_{max} in solo MeOH:MOPS: inoltre, si osserva una progressiva perdita di linearità della risposta ad aggiunte crescenti di Mg^{2+} .

Sono stati acquisiti gli spettri di emissione della fluorescenza tra 400 e 650 nm della sonda DCHQ5 ($\lambda_{exc} = 360$ nm) in varie miscele di PBS (0-200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) in MeOH:MOPS, titolate con Mg^{2+} 0-20 μM : le rette di regressione lineare sono state costruite mettendo in relazione i valori di concentrazione del Mg^{2+} in soluzione (μM , in ascissa) con le rispettive intensità di fluorescenza della sonda registrate a 510 nm ($F_{510\text{nm}}$, in ordinata). Le misure sono state effettuate in doppio.

Per ognuna delle miscele di PBS in MeOH:MOPS analizzate, sono stati acquisiti anche gli spettri di emissione di fluorescenza della sonda a saturazione di Mg^{2+} (F_{max}), ottenuti per aggiunta di MgSO_4 8 mM (spettri non mostrati). In Tabella 7 è riportato il valore di F_{max} medio ottenuto dalla media aritmetica delle F_{max} misurate per ciascuna miscela di PBS in MeOH:MOPS.

Tabella 7. Valori medi d'intensità fluorescenza della sonda DCHQ5 saturata a 510nm (F_{max} medio) ed equazioni delle rette di regressione con relativo coefficiente di correlazione lineare (r^2) per aggiunte progressive di PBS a una soluzione 1:1 di MeOH:MOPS (20 mM, pH 7.4).

Q.tà PBS in soluzione MeOH:MOPS 1:1	F_{max} medio (u. a.)	Equazione della retta di taratura	r^2
0 mL/mL	221500	$y = 4797 x + 10955$	0.99
50 mL/mL	219000	$y = 4321 x + 10018$	0.99
100 mL/mL	201500	$y = 3828 x + 10469$	0.99
200 mL/mL	179000	$y = 2674 x + 7513$	0.99

Come riportato in Tabella 7, l'aggiunta di 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ di PBS non influisce sull'intensità di fluorescenza della sonda e, per piccole quantità di MgSO_4 in soluzione, mostra una risposta lineare (Figura 35). Allo stesso modo, aggiungendo 100 μL di PBS si mantiene la linearità di risposta della sonda al variare della concentrazione di Mg^{2+} e la fluorescenza rimane alta (Tabella 7). Aggiungendo 200 μL di PBS, sebbene la linearità della risposta della sonda al variare della concentrazione di Mg^{2+} rimanga pressoché invariata (Figura 35, $r^2=0.99$), si osserva un calo della fluorescenza a saturazione di circa il 20% (da 221500 u.a. in assenza di PBS a 179000 u. a. con 200 mL/mL di PBS, Tabella 7).

Piccole aggiunte di PBS corrispondenti al 5%-10% della miscela di saggio, quindi, non modificano sostanzialmente la linearità della risposta della sonda a quantità crescenti di Mg^{2+} in soluzione. Nella valutazione della miscela migliore, tuttavia, è necessario

considerare anche il valore stesso della fluorescenza, che deve essere sufficientemente alto per consentire la discriminazione di variazioni di concentrazione di Mg^{2+} anche molto piccole.

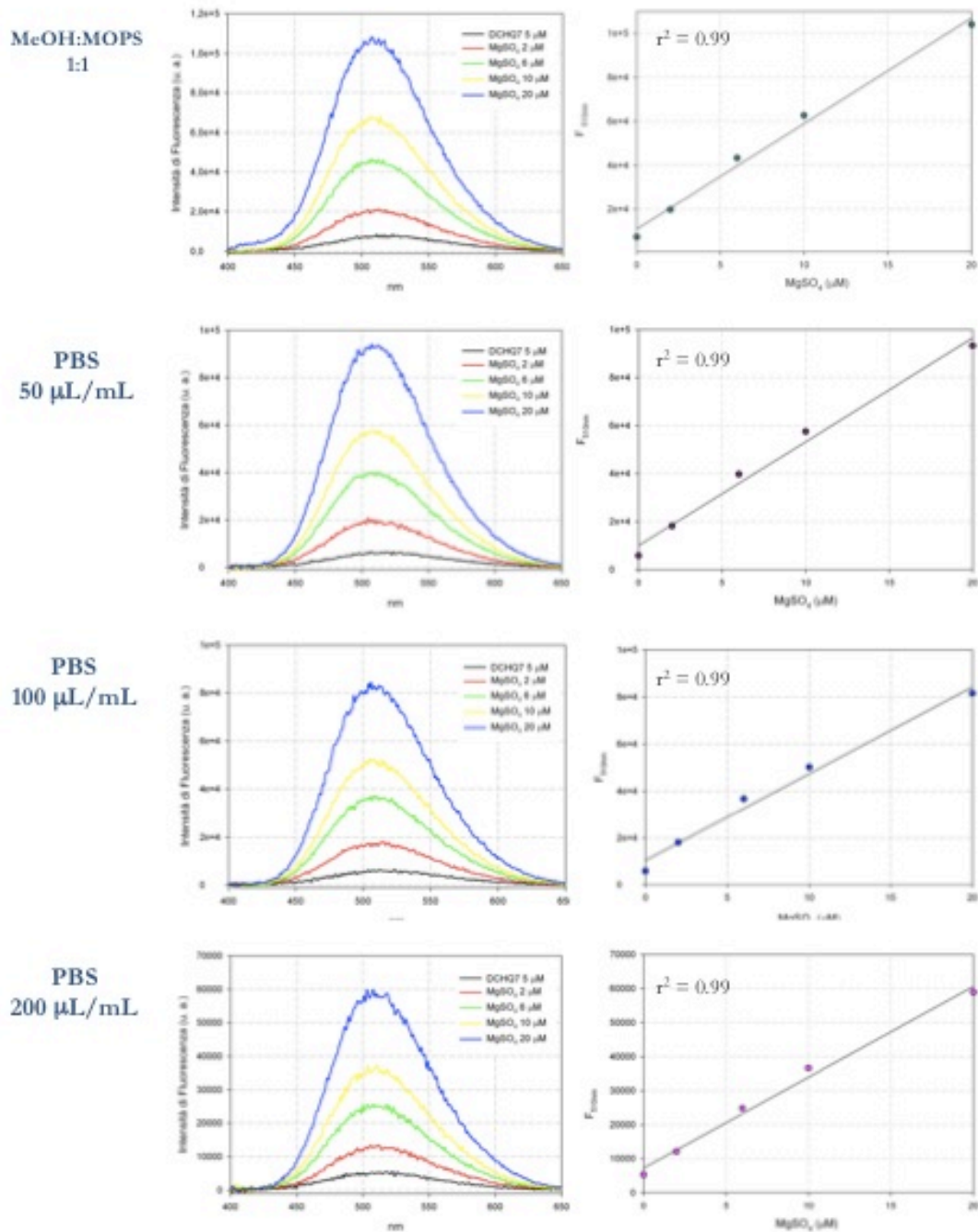


Figura 35. Titolazione della sonda DCHQ5 5 μM con $MgSO_4$ in una miscela 1:1 MeOH:MOPS (20 mM, pH 7.4) con aggiunte progressive di PBS senza Mg^{2+} (0-200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) per la costruzione di una retta di taratura. Colonna di sinistra: Spettri di emissione di fluorescenza della sonda DCHQ5 ($\lambda_{exc} = 360 \text{ nm}$) acquisiti per quantità crescenti di $MgSO_4$; Colonna di destra: rette di taratura costruite mettendo in ascissa le concentrazioni di $MgSO_4$ (μM) e in ordinata i valori delle relative intensità di fluorescenza della sonda DCHQ5 registrati a 510 nm. Risultati di un tipico esperimento.

Pertanto, le miscele che prevedono l'aggiunta di quantità di PBS $\leq 100 \mu\text{L}/\text{mL}$ sono da considerarsi le più opportune per la messa a punto di un protocollo di quantificazione con la sonda DCHQ5 mediante retta di taratura, perché non influiscono sulla sua fluorescenza e sulla risposta a variazioni di Mg^{2+} in soluzione.

5.7.2 Quantificazione del Mg totale cellulare con retta di taratura

In Tabella 8 è riportato un esempio di applicazione del protocollo di quantificazione con DCHQ5 mediante retta di taratura. Sono stati considerati campioni di cellule HL60 a diversi stati di confluenza, che dall'analisi in AAS avevano mostrato un diverso contenuto di Mg totale: in questo caso, si è scelto di costruire la retta di regressione utilizzando una miscela di PBS $100 \mu\text{L}/\text{mL}$ in MeOH:MOPS 1:1. La sonda DCHQ5 è stata utilizzata alla concentrazione finale $15 \mu\text{M}$ per essere certi di operare nella zona di linearità della risposta della sonda ed evitare possibili concentrazioni saturanti. Il contenuto cellulare di Mg, infatti, è molto variabile a seconda del tipo cellulare e del suo grado di confluenza: per questo abbiamo ritenuto opportuno saggiare la risposta della sonda ad una concentrazione più alta di quella precedentemente riportata.

Tabella 8. Quantificazione del contenuto intracellulare di Mg in cellule HL60. Confronto tra i valori ottenuti mediante retta di taratura con la DCHQ5 $15 \mu\text{M}$ in campioni cellulari ($100 \mu\text{L}/\text{mL}$, $10^5 \text{ cells}/\text{mL}$) in MeOH:MOPS e quelli ottenuti mediante spettroscopia di assorbimento atomico.

Campione	Mg con DCHQ5 (nmol/milione cells)	Mg con AAS (nmol/milione cells)
HL60 controllo	20.5	18.1
HL60 75p	9.8	11
HL60 79p	12.4	9.8

Prima dell'analisi fluorimetrica, i campioni sono stati sospesi in PBS senza Mg^{2+} alla concentrazione finale di $10^6 \text{ cells}/\text{mL}$ e sottoposti a sonicazione. La quantificazione è stata effettuata aggiungendo a una soluzione di MeOH:MOPS una quantità pari a $100 \mu\text{L}/\text{mL}$ di campione sonicato in PBS. Le misure sono state effettuate in doppio. L'intensità di fluorescenza a 510 nm ($F_{510\text{nm}}$), registrata dopo l'aggiunta della sonda DCHQ5 alla miscela

così preparata ($\lambda_{exc} = 360 \text{ nm}$), è stata utilizzata per il calcolo della concentrazione di Mg^{2+} sostituendo i valori all'equazione ottenuta per la retta di regressione.

Come evidente dai dati riportati in Tabella 8, la quantità di Mg totale cellulare calcolata con il metodo fluorimetrico ha fornito dati confrontabili con quelli ottenuti in AAS. Considerata la quantità di campione sonicato utilizzata per le misure, si può affermare che con la sonda DCHQ5 è stato possibile quantificare il Mg totale in campioni di circa 10^5 cells/mL, cioè 1/10 rispetto alle quantità utilizzate per l'AAS.

La spettroscopia di assorbimento atomico è una tecnica estremamente sensibile e ormai da lungo tempo validata per la quantificazione degli ioni in soluzione.¹⁰⁸ Comporta, tuttavia, una serie di svantaggi tra cui la necessità di campioni consistenti (indicativamente $1-2 \times 10^6$ cellule) che devono essere prima sottoposti a digestione con HNO_3 e poi volatilizzati. Inoltre, le apparecchiature per questo tipo di analisi sono costose e poco diffuse nei laboratori di ricerca.

Al contrario, già la sonda DCHQ1 si era dimostrata una valida alternativa all'utilizzo dell'AAS per la quantificazione in campioni più piccoli (mediamente $3-5 \times 10^5$ cells/mL).¹²⁸ Il protocollo di quantificazione per via fluorimetrica proposto per la DCHQ1 è semplice e rapido, in quanto consente di effettuare la misura direttamente in PBS senza necessità di costruire una retta di taratura: è sufficiente, infatti, sostituire i valori di fluorescenza ottenuti ad una formula aritmetica ricavata dall'equilibrio delle specie presenti in soluzione (sonda, Mg^{2+} , complesso sonda- Mg^{2+}).

Sebbene il metodo proposto per la sonda DCHQ5 preveda necessariamente la costruzione di una retta di taratura prima di effettuare le misure, ha il vantaggio di consentire la quantificazione del Mg in campioni cellulari ancora più piccoli (indicativamente 10^5 cells/mL) e, più in generale, consente di rilevare concentrazioni di Mg^{2+} in soluzione in un *range* di 1-10 μM .

5.8 Uso della sonda DCHQ5 nell'analisi dell'efflusso di Mg^{2+} indotto da cAMP

Come osservato in precedenza (Figura 21, paragrafo 5.3), sebbene la sua fluorescenza si abbatta in PBS, la sonda DCHQ5 è comunque in grado di monitorare variazioni a carico del contenuto di magnesio intracellulare in cellule intere, poiché penetra all'interno delle cellule dove viene sequestrata (Figura 28, paragrafo 5.5). Rispetto agli altri derivati, infatti, la DCHQ5 ha mostrato di essere altamente ritenuta all'interno delle cellule anche dopo i lavaggi: abbiamo, quindi, voluto valutare un suo possibile utilizzo nel monitoraggio dei flussi di Mg^{2+} attraverso la membrana plasmatica.

E' ormai noto che gli ormoni e le molecole che agiscono inducendo un aumento dei livelli cellulari di cAMP (es. catecolamine, glucagone, acido arachidonico), promuovono un significativo efflusso di Mg^{2+} nello spazio extracellulare. In ognuno dei casi osservati, l'efflusso di Mg^{2+} è un processo rapido che raggiunge il massimo nell'arco di 8 minuti dalla stimolazione e che non è mai accompagnato da variazioni significative della concentrazione di Mg^{2+} libero citosolico: questa, probabilmente, è mantenuta pressoché costante dagli immediati riarrangiamenti intracellulari che inducono mobilitazione del magnesio compartimentalizzato principalmente dal mitocondrio, come ipotizzato da Fatholahi et al.²⁷ e confermato sperimentalmente da Kubota¹²¹ e Farruggia.¹²⁷

Anche il trattamento diretto con cAMP promuove lo stesso meccanismo: come dimostrato da Romani e colleghi in epatociti¹⁴⁵ e cardiomiociti di ratto,²⁷ infatti, la somministrazione del sale permeabile butirril-cAMP provoca un rilascio di Mg^{2+} nell'ambiente extracellulare entro 10 minuti dall'applicazione dello stimolo.

Si è scelto, quindi, questo modello accertato per valutare il comportamento della sonda DCHQ5 nel monitoraggio di flussi di Mg^{2+} .

In precedenza (paragrafo 5.3) è stato osservato che la concentrazione ottimale di utilizzo in cellule vive per la sonda DCHQ5 è 5 μM : in queste condizioni la mortalità cellulare è mantenuta pressoché uguale al controllo anche dopo 30 minuti dalla marcatura. In questo caso, per evitare il rischio di effetti saturanti da parte del Mg cellulare che non consentirebbero di rilevare correttamente variazioni nella sua concentrazione intracellulare, si è scelto di usare la sonda alla concentrazione 15 μM : come mostrato nei citogrammi di

cellule HL60 marcate con DCHQ5 15 μM e PI in Figura 37 pannello 2, in queste condizioni d'utilizzo non si hanno effetti citotossici evidenti dopo 25 minuti di incubazione. E' stato valutato l'effetto citotossico nei 25 minuti dopo la marcatura perché, come riportato nella sezione materiali e metodi, la valutazione dei flussi di Mg^{2+} è condotta su campioni cellulari marcati per 15 minuti al buio con DCHQ5 15 μM e successivamente trattati con cAMP per 10 minuti. I risultati riportati in Figura 37 mostrano che nei 25 minuti complessivi dalla marcatura delle cellule non si ha citotossicità rilevante (circa il 12%, Figura 37).

5.8.1 Analisi fluorimetrica dell'efflusso di Mg^{2+} indotto da cAMP

L'efflusso di Mg^{2+} indotto da cAMP è stato valutato in fluorimetria statica su cellule HL60 risospese in PBS senza Mg^{2+} alla concentrazione finale di 5×10^5 cells/mL.

E' stato monitorato nel tempo (10 minuti) l'andamento dell'intensità di fluorescenza a 510 nm registrata su campioni cellulari marcati con la sonda DCHQ5 15 μM ($\lambda_{\text{exc}} = 360$ nm) e trattati con butirril-cAMP. In Figura 36 è riportato l'andamento della fluorescenza di cellule HL60 di controllo e trattate con cAMP 1.25 mM:

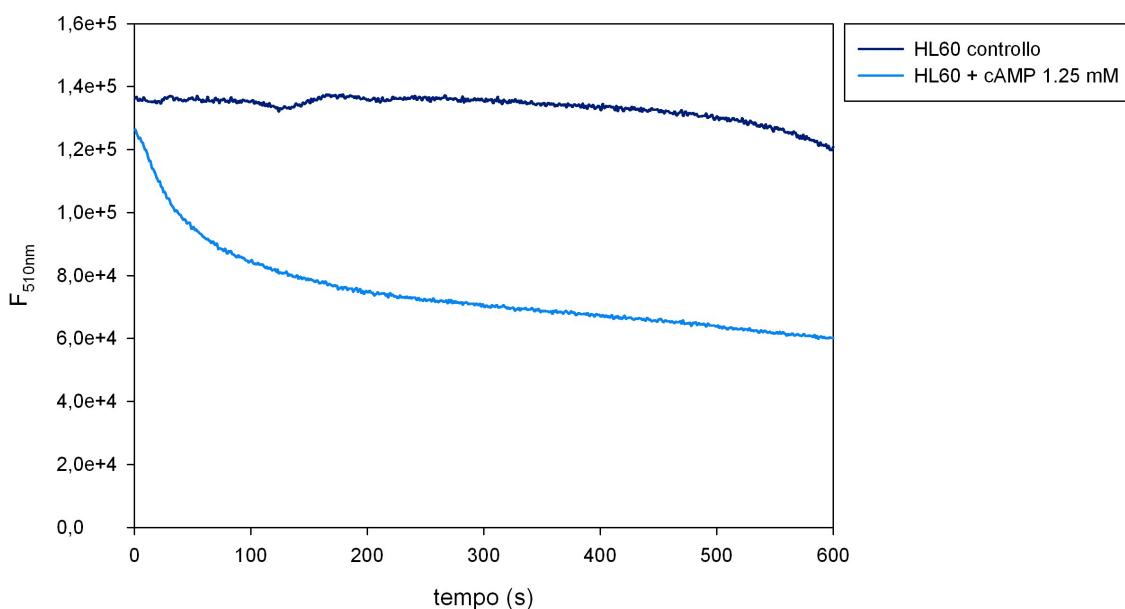


Figura 36. Andamento dell'intensità di fluorescenza a 510 nm nel tempo ($\lambda_{\text{exc}} = 360$ nm) di cellule HL60 di controllo (in blu) e trattate con butirril-cAMP 1.25 mM (azzurro) marcate con la sonda DCHQ5 15 μM . Risultati di un tipico esperimento.

Dai risultati ottenuti è evidente che il trattamento con cAMP 1.25 mM induce un drastico calo della fluorescenza, che è massimo nei primi 3 minuti e tende a stabilizzarsi nei minuti successivi.

5.8.2 Analisi citofluorimetrica della mortalità cellulare indotta dal trattamento con cAMP

Per verificare che il calo di fluorescenza osservato non fosse dovuto a eventuali effetti citotossici del trattamento, è stata effettuata un'analisi citofluorimetrica di cellule HL60 trattate con butirril-cAMP 1.25 mM e sonda DCHQ5 15 μ M.

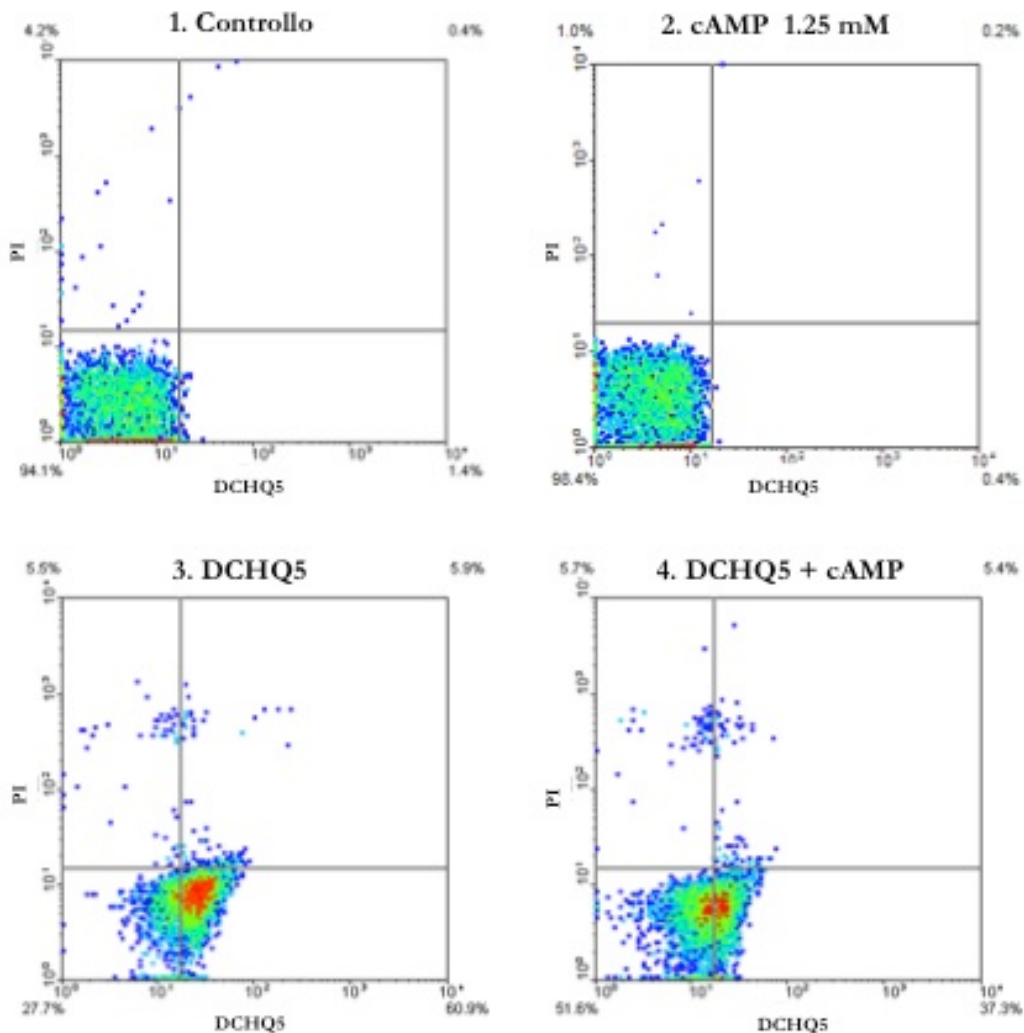


Figura 37. Rappresentazione biparametrica della marcatura con DCHQ5 15 μ M (FL1) e PI (FL2) in cellule HL60 trattate con cAMP 1.25 mM. Pannello 1: controllo; pannello 2: cellule trattate con butirril-cAMP 1.25 mM (10 minuti); pannello 3: cellule marcate con sonda DCHQ5 15 μ M (25 minuti totali di incubazione al buio); pannello 4: cellule marcate con DCHQ5 e trattate con butirril-cAMP (15 minuti di incubazione con la sonda+10 minuti di trattamento). Risultati di un tipico esperimento.

L'analisi è stata effettuata utilizzando un citofluorimetro equipaggiato con una lampada Xe-Hg come sorgente luminosa eccitando nella regione del visibile.

I citogrammi in Figura 37 mostrano chiaramente che, dopo 10 minuti dal trattamento, il butirril-cAMP alla concentrazione 1.25 mM non ha effetti citotossici sulle cellule (pannello 2). Allo stesso modo, non si osservano differenze nella mortalità dei campioni marcati con la sonda DCHQ5 15 μ M (pannello 3, 12%) rispetto a quelli marcati e trattati con entrambi (pannello 4, 11.1%). L'associazione sonda-cAMP, quindi, non produce effetti citotossici rilevanti nei 10 minuti di trattamento. Pertanto, il calo di Mg^{2+} osservato in fluorimetria non è imputabile alla mortalità cellulare, ma è effettivamente legato a un rilascio di Mg^{2+} nel mezzo extracellulare.

E' da notare che i dati mostrati in Figura 37 sono stati acquisiti con eccitazione nel visibile ad un citofluorimetro equipaggiato con una lampada Xe-Hg, anziché un laser, come sorgente luminosa. Poiché l'intensità della luce fornita al campione da una lampada è inferiore rispetto al laser, la fluorescenza emessa dalle cellule marcate con la sonda DCHQ5 ne risulta impoverita: nonostante ciò, tuttavia, l'analisi dei canali medi della fluorescenza verde (DCHQ5) mostra che le cellule trattate con cAMP vanno effettivamente incontro ad un calo di fluorescenza passando da 24.39 a 19.38 su scala logaritmica (Figura 38).

Questi risultati, in associazione a quanto precedentemente osservato in fluorimetria statica (Figura 36), confermano che la sonda DCHQ5 è in grado di monitorare il rilascio di Mg^{2+} dalle cellule indotto dal trattamento con cAMP.

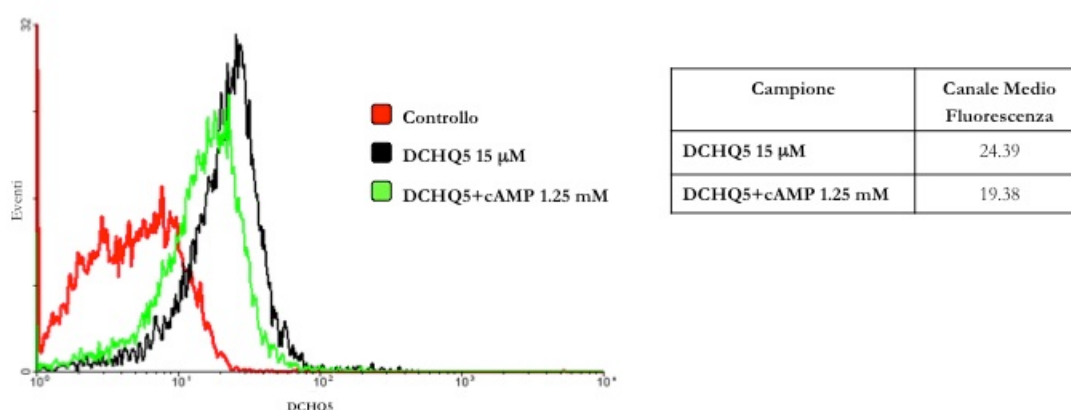


Figura 38. Distribuzione dell'intensità di fluorescenza di cellule HL60 marcate con la sonda DCHQ5 5 μ M e trattate con cAMP 1.25 mM. In rosso sono rappresentate le cellule non marcate, in nero le cellule marcate prima del trattamento con butirril-cAMP, in verde le cellule marcate dopo 3 minuti dal trattamento con butirril-cAMP 1.25 mM. Risultati di un tipico esperimento.

5.8.3 Analisi citofluorimetrica dei movimenti di Mg^{2+} libero citosolico in seguito al trattamento con cAMP

I dati acquisiti con la sonda DCHQ5 mostrano che il calo di fluorescenza osservato è legato a una diminuzione nel contenuto di Mg totale cellulare.

Per verificare se tale diminuzione è imputabile a un rilascio di Mg^{2+} libero citosolico nel mezzo extracellulare, è stato valutato l'effetto del trattamento con butirril-cAMP sul Mg^{2+} libero utilizzando la sonda commerciale mag-fluo-4. Il protocollo di marcatura è descritto in dettaglio nella sezione Materiali e Metodi.

In Figura 39 sono riportate le distribuzioni di fluorescenza di cellule HL60 prima e dopo il trattamento con cAMP. Dai risultati ottenuti risulta evidente che, dopo il trattamento con cAMP, non si hanno modificazioni evidenti a carico del Mg^{2+} libero, perché il canale medio di fluorescenza rimane sostanzialmente invariato rispetto al controllo con tutte e tre le concentrazioni di cAMP utilizzate (Figura 39, tabella sottostante). Ciò è in accordo con quanto riportato in letteratura.²⁷

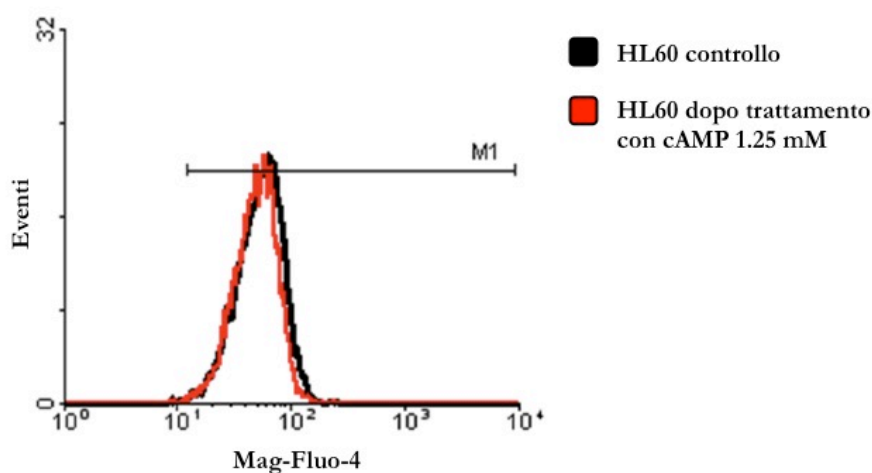


Figura 39. Distribuzione della fluorescenza della sonda Mag-Fluo-4 in cellule HL60 prima (nero) e dopo (rosso) il trattamento con cAMP 1.25 mM (3 minuti).

E' noto, infatti, che il Mg^{2+} libero citosolico e quello legato e/o compartimentalizzato possono rispondere agli stimoli in modo diverso: Fatholahi e colleghi,²⁷ in particolare, hanno osservato in cardiomiociti di ratto che il calo ottenuto dalla stimolazione con cAMP è da imputare principalmente a un efflusso della quota legata e/o compartimentalizzata, mentre il Mg^{2+} citosolico è mantenuto tamponato.

5.8.4 Quantificazione del Mg^{2+} rilasciato dalle cellule in seguito a stimolazione con cAMP

I dati riportati hanno mostrato chiaramente come il trattamento con cAMP induca un rilascio di Mg^{2+} da cellule HL60 nell'ambiente extracellulare, e come la DCHQ5 sia in grado di monitorare tale efflusso.

Per una quantificazione attendibile del Mg^{2+} rilasciato nel mezzo extracellulare, abbiamo ritenuto opportuno aumentare la concentrazione cellulare (da 5×10^5 a 3×10^6 cells/mL) affinché il Mg^{2+} in uscita dalle cellule non fosse al di sotto del limite di rilevabilità del sistema di quantificazione mediante retta di taratura (cioè al di sotto dell'1 μM in cuvetta).

Cellule HL60 risospese in PBS senza Mg^{2+} alla concentrazione finale di 3×10^6 cells/mL sono state trattate con butirril-cAMP 3.75 mM: in queste condizioni sperimentali, l'analisi spettrofluorimetrica dell'emissione di fluorescenza a 510 nm della sonda DCHQ15 μM nel tempo ($\lambda_{exc} = 360$ nm) mostra un andamento simile a quello riscontrato negli esperimenti condotti su campioni cellulari alla concentrazione 5×10^5 cells/mL con cAMP 1.25 mM: nei primi 3 minuti dal trattamento, infatti, si osserva un netto calo della fluorescenza che si mantiene stabile nei 10 minuti dell'acquisizione (Figura 40).

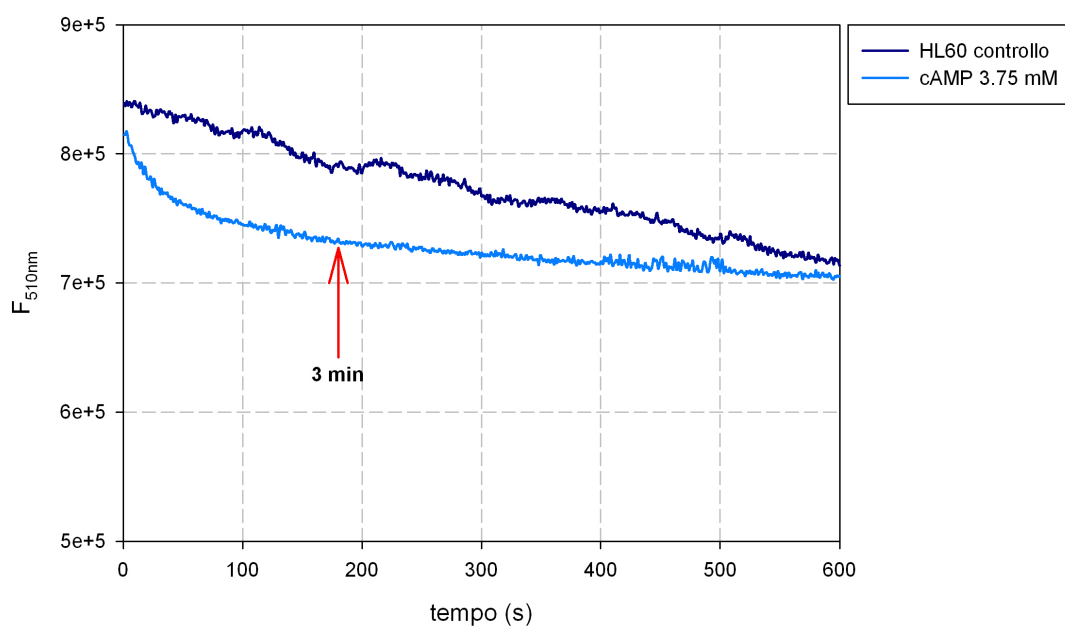


Figura 40. Andamento dell'intensità di fluorescenza a 510 nm di cellule HL60 marcate con la sonda DCHQ5 15 μM ($\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$). In blu il controllo (3×10^6 cells/mL); in azzurro le cellule marcate con la sonda e trattate con cAMP 3.75 mM. Risultati di un tipico esperimento.

Per la quantificazione del Mg^{2+} fuoriuscito dalle cellule in seguito al trattamento con cAMP è stato seguito il protocollo precedentemente descritto per la sonda DCHQ5. Le cellule di controllo e trattate sono state lavate mediante centrifugazione (250g per 10 minuti) dopo 3 minuti dall'inizio del trattamento, poiché in tale intervallo temporale si è già verificato il massimo calo dell'intensità di fluorescenza, e quindi il massimo rilascio di Mg^{2+} .

E' stata costruita una retta di taratura dalla misura delle intensità di fluorescenza della sonda DCHQ5 15 μM per quantità note di MgSO_4 (0-10 μM) disciolte in una miscela contenente 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ di PBS in una soluzione 1:1 di MeOH:MOPS (20 mM, pH 7.4).

La quantità di Mg totale presente nelle cellule prima del trattamento è stata calcolata registrando l'emissione di fluorescenza a 510 nm di un'aliquota di cellule HL60 di controllo sonicate e disciolte in MeOH:MOPS al volume finale di 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Allo stesso modo, sono state registrate le emissioni di fluorescenza dei campioni di controllo dopo la centrifuga e dei surnatanti recuperati dalla centrifuga dei campioni trattati con butirril-cAMP 3.75 mM.

In Figura 41 sono riportate le quantità di Mg^{2+} misurate con il metodo sopra descritto, espresse in nmol/milione di cellule:

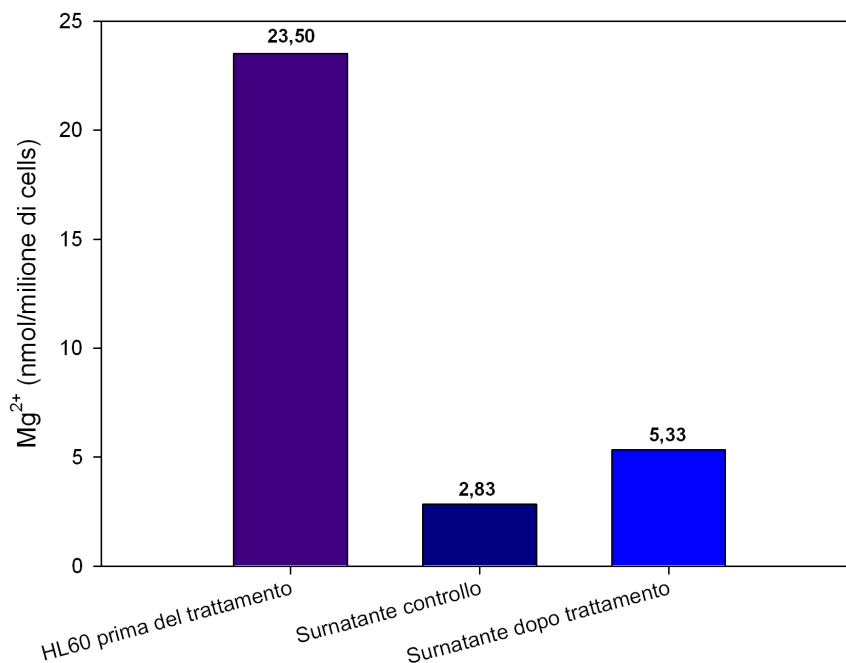


Figura 41. Determinazione del Mg totale presente in cellule HL60 (3×10^6 cells/mL) prima del trattamento con cAMP 3.75 mM e quantificazione del rilascio di Mg^{2+} nel surnatante in seguito a trattamento, con relativo controllo.

Come mostrato in Figura 41, nei surnatanti di controllo si riscontra circa il 12% del Mg totale cellulare (2.83 nmol/milione di cells): questo dato è da considerarsi una conseguenza della perdita di Mg^{2+} dovuta al rilascio da eventuali cellule morte in sospensione o danneggiate dallo stress meccanico a cui sono state sottoposte durante la centrifuga. Il Mg^{2+} rilasciato dai campioni trattati per 3 minuti con cAMP, invece, risulta essere complessivamente circa il 22,7% del totale (5.33 nmol/milione di cells). Di conseguenza, l'efflusso di Mg^{2+} attraverso la membrana plasmatica dovuto al solo effetto del cAMP corrisponde al 10,7% del totale.

Nel loro complesso, questi dati dimostrano come la sonda DCHQ5 sia in grado non solo di monitorare qualitativamente modificazioni a carico del contenuto totale di Mg su cellule intere, ma anche di determinare quantitativamente tali variazioni mediante il protocollo di quantificazione sviluppato.

CONCLUSIONI

Nonostante negli ultimi anni il magnesio abbia suscitato un crescente interesse da parte della comunità scientifica, le informazioni sulle modalità con cui le cellule ne regolano l'omeostasi sono ancora per lo più incomplete, sia per ragioni concettuali che per limitazioni metodologiche. Il lento *turn-over* attraverso le membrane cellulari in assenza di stimoli metabolici e ormonali, l'alta concentrazione intracellulare e le poco significative fluttuazioni di Mg^{2+} libero osservate in passato, hanno per lungo tempo alimentato in molti scienziati la convinzione che la concentrazione cellulare di questo catione non vada incontro a significativi cambiamenti nel tempo e che le sue funzioni fossero essenzialmente limitate al ruolo di cofattore per enzimi e proteine.¹⁹ Ciò ha inevitabilmente contribuito a sfavorire lo sviluppo di tecniche analitiche capaci di monitorare rapidamente e con accuratezza le fluttuazioni del contenuto di Mg^{2+} cellulare.

L'avvento della spettroscopia di assorbimento atomico (AAS),¹⁰⁸ che consente di misurare quantitativamente il Mg totale nei campioni biologici, ha solo parzialmente ovviato a queste limitazioni metodologiche. Il sistema, infatti, non è in grado di rilevare con precisione concentrazioni di Mg^{2+} inferiori a 10 mM: ciò implica la necessità di avere a disposizione campioni cellulari consistenti. Inoltre, per lo studio delle dinamiche che coinvolgono il Mg^{2+} sono necessari strumenti che ne rilevino i movimenti attraverso i diversi compartimenti cellulari.

Analogamente ad altri cationi, il magnesio può esistere sia in forma libera (Mg^{2+} ionizzato) che complessata a ligandi biologici di varia natura. La concentrazione citosolica del Ca^{2+} e di altri cationi, tuttavia, è bassa in condizioni basali ma può variare di diversi ordini di grandezza in risposta a vari stimoli (da 10 nM fino a 100 μ M per il Ca^{2+}), per poi tornare rapidamente alla normalità grazie ad una rete di meccanismi di trasporto che includono, tra gli altri, l'efflusso dalla membrana plasmatica o il sequestro negli organelli cellulari. Il Mg^{2+} , al contrario, è mantenuto nel citoplasma a concentrazioni molto alte (dell'ordine millimolare):¹⁴⁶ ciò implica che sue eventuali fluttuazioni possono essere misurate solo con tecniche sufficientemente sensibili da consentire la rilevazione di piccole variazioni di concentrazione su un consistente *background*.¹⁰⁶ Inoltre, si fa sempre più pressante la

necessità di metodi che rilevino dove e come il magnesio si lega alle diverse componenti cellulari e che identifichino i segnali che ne stabiliscono il reclutamento nei processi metabolici.¹⁰⁶

Lo studio del ruolo del Mg^{2+} nella fisiopatologia cellulare richiede, quindi, la possibilità di monitorare le dinamiche della sua concentrazione in cellule vive con una buona risoluzione spaziale e temporale. Attualmente, il metodo più diffuso per misurare variazioni anche minime nella concentrazione degli ioni cellulari è rappresentato dalle sonde fluorescenti, che costituiscono uno strumento sensibile in grado di fornire anche informazioni dinamiche. I sensori fluorescenti commerciali specifici per il Mg^{2+} , tuttavia, consentono di mappare la distribuzione della sola forma ionizzata citoplasmatica (meno del 5% del totale), e per di più la maggior parte di essi presenta reattività crociata soprattutto con il Ca^{2+} : diventa, così, difficile stabilire con precisione i reali movimenti e la distribuzione del Mg totale intracellulare.¹⁰⁶

I limiti attribuibili alle sonde commerciali sembrano essere stati, in parte, superati da alcuni composti di ultima generazione, tra cui particolarmente interessanti si sono rivelate le molecole della famiglia DCHQ: la sonda capostipite (DCHQ1) ha già mostrato caratteristiche che la rendono uno strumento potenzialmente utile per lo studio e l'analisi quantitativa del magnesio totale intracellulare.¹²⁷ La DCHQ1 ha, infatti, un'affinità e specificità per il magnesio molto maggiori rispetto a qualunque altra sonda commercialmente disponibile (K_d per il Mg^{2+} dell'ordine μM), con in più il vantaggio di non essere influenzata dalla presenza di altri cationi divalenti (compreso il Ca^{2+}) a pH fisiologico. E' ben tollerata dalle cellule e consente non solo di determinare il magnesio totale (tutte le sonde commerciali misurano invece il magnesio libero),¹²⁸ ma anche di monitorarne rapidi transienti intracellulari in risposta a stimoli mitocondriali.¹²⁷

La nuova metodica di sintesi della sonda DCHQ1 proposta in questa tesi e basata sul riscaldamento alle microonde come alternativa al riscaldamento tradizionale, ha consentito di ottenere la molecola pura in tempi molto brevi, con un basso impatto ambientale e resa molto alta (> 90 %). Il maggior vantaggio di questa metodica è consistito, tuttavia, nella sua estrema versatilità e semplicità: il nuovo approccio sintetico ha, infatti, fornito l'opportunità di inserire facilmente gruppi funzionali di varia natura alla struttura base della molecola. La metodica, insieme con i nuovi composti ottenuti, è stata brevettata¹³⁵ e pubblicata.¹³⁶

I DCHQ-derivati di nuova sintesi sono stati progettati allo scopo di migliorare la fluorescenza in risposta al legame con il Mg^{2+} , la ritenzione e la localizzazione cellulare,

preservando, allo stesso tempo, la caratteristica unica di dosare selettivamente il magnesio totale intracellulare.

Oltre a mostrare nuove proprietà fotofisiche quali ad esempio, maggiore resa quantica di fluorescenza in seguito al legame con il Mg^{2+} rispetto alla DCHQ1, tutti i nuovi indicatori fluorescenti hanno mantenuto una $K_d(Mg^{2+})$ nell'ordine micromolare, cioè dello stesso ordine di grandezza di quella dell'ATP (e sono quindi in grado di competere con il maggior ligando cellulare di questo catione). Ciò significa che, come la DCHQ1, anche le molecole di nuova sintesi hanno mantenuto la caratteristica di dosare il Mg totale cellulare.

Nella prospettiva di un possibile uso in ambito biologico, sono state valutate anche l'eventuale citotossicità, la stabilità nel tempo, l'*uptake* e la distribuzione tra cellule e medium di ognuno dei nuovi sensori fluorescenti. I risultati ottenuti sono stati recentemente pubblicati.¹⁴²

Come atteso, la sonda DCHQ3 (funzionalizzata con idrolizzabili gruppi acetometossistere) ha mostrato una maggior ritenzione cellulare rispetto a quanto precedentemente osservato per la sonda DCHQ1. La funzionalizzazione con gruppi AM è una strategia comune per garantire l'intrappolamento dei sensori fluorescenti all'interno delle cellule, ma allo stesso tempo può rappresentare uno svantaggio nell'ottica di una corretta quantificazione del magnesio cellulare, a meno che le forme idrolizzata e non idrolizzata non mostrino caratteristiche spettrali significativamente differenti. La sintesi della sonda DCHQ3 ha, invece, portato a un prodotto che non mostra nessuna differenza spettrale tra la forma esterificata e quella anionica/idrolizzata. In più, dall'analisi della sua stabilità in soluzione è emerso che questo indicatore fluorescente va rapidamente incontro a *photobleaching*: è, cioè, particolarmente sensibile agli effetti della luce.

Inaspettatamente, la ritenzione intracellulare maggiore è stata osservata per i due derivati aromatici DCHQ5 e DCHQ6, che invece esistono nelle cellule in un'unica forma non idrolizzabile: il segnale di fluorescenza rilevato dallo *staining* con questi sensori è, perciò, dovuto al contributo di un'unica specie complessata con il Mg^{2+} . In più, entrambe le molecole hanno dato risultati di fluorescenza incoraggianti in microscopia confocale a doppio fotone (TPM): le due sonde, infatti, oltre ad essere molto fluorescenti, hanno fornito immagini più brillanti e nitide rispetto alla DCHQ1 e agli altri derivati idrossichinolinici.

La TPM si sta velocemente affermando in biologia per i suoi numerosi vantaggi rispetto alla classica microscopia confocale: la bassa autofluorescenza e autoassorbimento da parte

del tessuto, oltre ai ridotti *photobleaching* e *photodamage* che la caratterizzano, rendono, infatti, possibile l'osservazione di tessuti intatti in profondità (>500 μm) e per lunghi periodi.¹⁴⁴ La possibilità di disporre di sonde fluorescenti specifiche per il Mg totale che allo stesso tempo possano essere utilizzate in TPM, apre, quindi, alla possibilità futura di studiare approfonditamente la distribuzione del Mg^{2+} nei tessuti in condizioni vicine alla reale situazione fisiologica.

La molecola DCHQ4, specificamente funzionalizzata con lunghe catene laterali idrofobiche allo scopo di consentire una migliore marcatura delle membrane cellulari, ha effettivamente mostrato una spiccata propensione a localizzarsi negli ambienti lipofili delle membrane. Secondo il modello del *Membrane Magnesium Mitosis* (MMM) proposto da H. Rubin,⁶⁵ il Mg^{2+} associato alla membrana potrebbe essere attivamente coinvolto nella cascata di eventi che portano alla proliferazione cellulare: secondo questo modello il legame dei fattori di crescita ai recettori di membrana causerebbe una perturbazione di quest'ultima con conseguente diminuzione dell'affinità per gli ioni Mg^{2+} ad essa associati, che si riverserebbero nel citoplasma e nel nucleo legandosi a vari bersagli e innescando una cascata di eventi culminanti nella sintesi proteica, nella sintesi del DNA e, infine, nella divisione cellulare. La sonda DCHQ4 potrebbe dimostrarsi utile per la mappatura del Mg^{2+} di membrana, sebbene per lo studio dei movimenti di questo catione in risposta a stimoli appropriati, si renda in futuro necessaria la sintesi di un ulteriore derivato con caratteristiche di ritenzione elevata.

In generale, l'analisi microscopica della distribuzione intracellulare dei DCHQ-derivati ha confermato i dati precedentemente acquisiti per la sonda DCHQ1, e cioè che il maggior segnale di fluorescenza è localizzato nella zona perinucleare. Ciò è in accordo con le sempre più frequenti osservazioni che attribuiscono agli organelli intracellulari (e in particolare al mitocondrio) un importante ruolo di *store* del Mg^{2+} cellulare.

Nell'ambito di un più ampio progetto di studio dell'omeostasi cellulare del magnesio, è stato recentemente sviluppato un approccio innovativo per la mappatura e la quantificazione del magnesio totale intracellulare mediante microscopia a raggi X:¹⁴⁷ in collaborazione con il Dip. di Fisica del CNR di Roma, è stato possibile, per la prima volta, ottenere mappe di concentrazione del magnesio su singola cellula combinando le informazioni ottenute dalla *x-ray fluorescence microscopy* (XRFM) con quelle di microscopia di forza atomica (AFM). Normalizzando i dati di distribuzione intracellulare di questo elemento ottenuti in XRFM per lo spessore della cellula in ogni suo punto, ricavato

dall'analisi AFM, è emerso che la maggior concentrazione di Mg^{2+} non è, come si credeva, a livello nucleare, ma proprio in corrispondenza della regione perinucleare (notoriamente ricca di mitocondri, Figura 42).

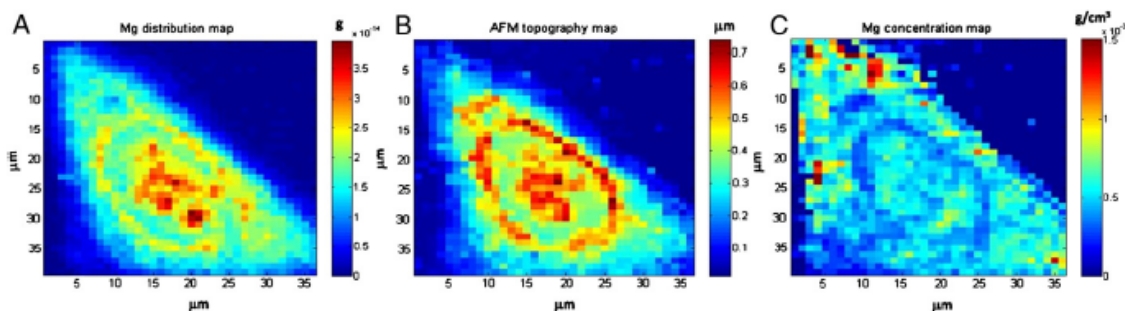


Figura 42. Confronto tra la mappa di distribuzione e quella di concentrazione del Mg in cellule SaOS. A: mappa di distribuzione del Mg; B: mappa tomografica ottenuta in AFM; C: mappa di concentrazione misurata sfruttando la radiazione di sincrotrone di Elettra (Trieste, Italia). Immagini prese da Lagomarsino et al., 2011.¹⁴⁷

L'approccio combinato di XRFM e AFM ha consentito una quantificazione diretta del magnesio intracellulare in cellule fissate, ma allo stesso tempo ha il limite, dovuto alle caratteristiche strumentali delle tecniche usate, di non permettere misure su cellule vive, e quindi non consente di monitorare i movimenti di magnesio da un compartimento cellulare all'altro. In questo contesto, la sintesi con riscaldamento alle microonde potrà rivelarsi ancora una volta molto utile nella prospettiva futura di sviluppare nuove sonde per il Mg^{2+} specifiche per il mitocondrio e altri organelli cellulari.

E' da notare che, tra tutti i DCHQ-derivati di nuova sintesi studiati, la sonda DCHQ5 ha mostrato le caratteristiche in assoluto più promettenti: oltre ad essere molto fluorescente e stabile in soluzione ha, infatti, manifestato la peculiarità di essere eccitabile sia nell'UV che nel visibile. Questa proprietà la rende la candidata ideale per l'analisi del magnesio totale intracellulare, perché utilizzabile con un'ampia varietà di strumenti di fluorescenza.

La sonda DCHQ5, inoltre, è stata usata con successo nella quantificazione di campioni cellulari sonicati con un protocollo spettrofluorimetrico basato sulla costruzione di una retta di taratura: già la sonda DCHQ1 si era dimostrata una valida alternativa all'AAS per la quantificazione in piccoli campioni (mediamente $3-5 \times 10^5$ cells/mL) con un protocollo semplice e rapido che consente di effettuare la misura direttamente in PBS.¹²⁸ Sebbene il metodo proposto per la sonda DCHQ5 preveda necessariamente la costruzione di una

retta di taratura, ha il vantaggio di consentire la quantificazione del Mg in campioni cellulari ancora più piccoli (indicativamente 10^5 cells/mL) e, più in generale, consente di rilevare concentrazioni di Mg^{2+} in soluzione in un *range* di 1-10 μ M (il limite di rilevabilità dell'AAS è 10 mM).

La caratteristica forse più promettente della sonda DCHQ5 è, però, l'alta ritenzione intracellulare che si osserva anche dopo ripetuti lavaggi: questa sua peculiarità ci ha consentito di utilizzarla con successo nel monitoraggio dei flussi di Mg^{2+} attraverso la membrana plasmatica indotti da stimolazione con cAMP. Nella maggior parte delle cellule eucariotiche (tra cui cardiomiociti, epatociti ed eritrociti), gli ormoni e le molecole che agiscono inducendo un aumento dei livelli cellulari di cAMP (es. catecolamine, glucagone, acido arachidonico o forskolina), promuovono un significativo efflusso di Mg^{2+} nello spazio extracellulare.¹⁹ In ognuno dei casi osservati, l'efflusso di Mg^{2+} è un processo rapido a cui non si accompagnano mai variazioni significative della concentrazione di Mg^{2+} libero citosolico: ciò potrebbe indicare che il Mg^{2+} venga rapidamente liberato dai siti di legame citoplasmatici o dai *pool* contenuti negli organelli intracellulari, per essere poi fatto uscire attraverso la membrana plasmatica secondo un meccanismo di efflusso Na^+ -dipendente.¹⁹ Un effetto analogo è stato osservato in cellule eccitabili (cardiomiociti di ratto) stimulate direttamente con cAMP.²⁷ Con le classiche tecniche di analisi, tuttavia, non era stato finora possibile seguire direttamente (e quantificare) i riarrangiamenti del Mg totale.

I risultati ottenuti dalla stimolazione di cellule HL60 marcate con la sonda DCHQ5 dimostrano che l'efflusso di Mg^{2+} dalla membrana plasmatica in seguito a stimolazione con cAMP è effettivamente una conseguenza dei riarrangiamenti a carico del contenuto totale di questo catione, piuttosto che comportare una semplice fuoriuscita del Mg^{2+} citoplasmatico. La sonda DCHQ5 è in grado non solo di monitorare qualitativamente questi riarrangiamenti del Mg totale, ma anche di determinare quantitativamente l'efflusso mediante il protocollo di quantificazione sviluppato.

In conclusione, i risultati presentati in questa tesi mostrano che le sonde della famiglia DCHQ potranno rappresentare in futuro uno strumento versatile per lo studio della distribuzione e dell'omeostasi del magnesio cellulare. Queste sonde, e in particolare la DCHQ5, potrebbero essere utilizzate con successo in un'ampia varietà di misure di fluorescenza, fornendo un contributo importante per la comprensione del ruolo di questo importante elemento.

BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ A. Treener. *The Mercurial Chemist: A Life of Sir Humphrey Davy*. 1963, London: Methuen;
- ² M. E. Maguire, J. A. Cowan. *Biometals*, 2002, 15:203-210;
- ³ F. I. Wolf, A. Cittadini. *Mol. Asp. Med.*, 2009, 24:3-9;
- ⁴ a) J. R. Marier. *Met. Ions Biol. Syst.*, 26, 85-104; b) J. A. Cowan. In: J. A. Cowan (Ed.), *The biological chemistry of Magnesium*. VCH, 1995, 1-23;
- ⁵ A. Smith, M. E. Maguire. *J. Bacteriol.*, 1995, 177:1638-1640;
- ⁶ H. Einspahr, C. E. Bugg. *Met. Ions Biol. Syst.*, 1984, 17:51-91;
- ⁷ a) M. C. Ashby, A. V. Tepikin. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2001, 12:11-17; b) M. D. Bootman, T. J. Collins, C. M. Peppiatt, L. S. Prothero, L. MacKenzie, P. De Smet, M. Travers, S. C. Tovey, J. T. Seo, M. J. Berridge, F. Ciccolini, P. Lipp. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2001, 12:3-10; c) E. M. Brown, R. J. MacLeod. *Physiol. Rev.*, 2001, 81:239-297;
- ⁸ H. W. Huang, J. A. Cowan. *Eur. J. Biochem.*, 1994, 219-253;
- ⁹ A. Tevelev, J. A. Cowan. In: J. A. Cowan (Ed.), *The biological chemistry of Magnesium*. VCH, 1995, 53-84;
- ¹⁰ R. J. P. Williams. In: N. J. Birch, (Ed.), *Magnesium and the cell*. Academic Press, NY, 1993, 15-30;
- ¹¹ D. Porschke. In: J. A. Cowan (Ed.), *The biological chemistry of Magnesium*. VCH, 1995, 85-110;
- ¹² R. J. P. Williams. In: N. J. Birch (Ed.), *Magnesium and the cell*. Academic Press, NY, 1993, 15-30;
- ¹³ A. Hartwig. *Mutation Res.*, 2001, 475:113-121;
- ¹⁴ L. S. Beese and T. A. Steitz. *EMBO J.*, 1991, 10, 25;
- ¹⁵ F. I. Wolf, A. Cittadini. *Mol. Asp. Med.*, 2003, 24:11-26;
- ¹⁶ A. Romani, A. Scarpa. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, 298:1-12;
- ¹⁷ D. W. Jung, L. Apel, G. P. Brierley. *Biochemistry*, 1990, 29:4121-4128;
- ¹⁸ G. A. Rutter, N. J. Osbaldeston, J. G. McCormack, R. M. Denton. *Biochem. J.*, 1990, 271:627-634;

-
- ¹⁹ A. Romani. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2011, 512:1-23;
- ²⁰ P. W. Flatman. *J. Membr. Biol.*, 1984, 80:1-14;
- ²¹ A. Romani. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007, 458:90-102;
- ²² A. Romani, M. E. Maguire. *Biometals*, 2002, 15:271-283;
- ²³ A. Romani, A. Scarpa. *Front. Biosci.*, 2000, 5:D720-D734;
- ²⁴ F. I. Wolf, A. Di Francesco, V. Covacci, A. Cittadini. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997, 344:397-403;
- ²⁵ A. Romani, A. Scarpa. *Nature*, 1990, 346:841-844;
- ²⁶ A. Romani, A. Scarpa. *FEBS Lett.*, 1990, 269:37-40;
- ²⁷ M. Fatholahi, K. Lanoue, A. Romani, A. Scarpa. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, 374:395-401;
- ²⁸ T. Kubota, Y. Shindo, K. Tokuno, H. Komatsu, H. Ogawa, S. Kudo, Y. Kitamura, K. Suzuki, K. Oka. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1774:19-28;
- ²⁹ T. Günther, J. Vormann. *FEBS Letters*, 1992, 297:132-134;
- ³⁰ A. Romani. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2006, 458:90-102;
- ³¹ T. Gunther. *Magnes. Bull.*, 1996, 18:2-6;
- ³² H. Ebel, M. Hollstein, T. Gunther. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1559:135-140;
- ³³ M. J. Nadler, M. C. Hermosura, K. Inabe, A. Perrault, K. Zhou, A. J. Stokes, T. Kurosaki, J. P. Kinet, R. Penner, A. M. Sharenberg, A. Fleigh. *Nature*, 2001, 411:590-595;
- ³⁴ H. Yamaguchi, M. Matsushita, A. Nairn, J. Kuriyan. *Mol. Cell*, 2001, 7:1047-1057;
- ³⁵ C. Montell. *Current Biology*, 2003, 13(20):R799;
- ³⁶ A. Goytain, G. A. Quamme. *BMC Genomics*, 2005, 6:48;
- ³⁷ G. Wiesenberger, M. Waldherr, R. J. Schweyen. *J. Biol. Chem.*, 1999, 267:6963-6969;
- ³⁸ M. Kolisek, G. Zsurka, J. Samai, J. Weghuber, R. J. Schweyen, M. Schweigel. *EMBO J.*, 2003, 22:20438-20443;
- ³⁹ M. Piskacek, L. Zotova, G. Zsurka, R. J. Schweyen. *J. Cell. Mol. Med.*, 2009, 13:693-700;
- ⁴⁰ G. Zsurka, J. Gregan, R. J. Schweyen. *Genomics*, 2001, 72:158-168;
- ⁴¹ T. Matsuura, Y. Kanayama, T. Inoue, T. Takeda, I. Morishima. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, 1220:31-36;
- ⁴² T. Gunther, J. Vormann. *Magnes. Trace Elem.*, 1990, 9:279-282;

-
- ⁴³ J. Vorman, T. Gunther. *Magnesium*, 1987, 6:220-224;
- ⁴⁴ T. E. Fagan, A. Romani. *Am. J. Physiol.*, 2000, 279:G943-G950;
- ⁴⁵ T. E. Fagan, A. Romani. *Am. J. Physiol.*, 2001, 280:G1145-G1156;
- ⁴⁶ A. M. Romani, V. D. Mathews, A. Scarpa. *Circ. Res.*, 2000, 86:326-333;
- ⁴⁷ D. Garfinkel, L. Garfinkel. *Magnesium*, 1988, 7:249-261;
- ⁴⁸ G. Reed, C. Cefaratti, L. N. Berti-Mattera, A. Romani. *J. Cell. Biochem.*, 2008, 104:1034-1053;
- ⁴⁹ V. Gaussin, P. Gailly, J. M. Gillis, L. Hue. *Biochem J.*, 1997, 326:823-827;
- ⁵⁰ A. Gasbarrini, A. B. Borle, H. Farghali, C. Bender, A. Francavilla, D. Van Thiel. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267:6654-6663;
- ⁵¹ J. J. Erdos, M. E. Maguire. *J. Physiol.*, 1983, 337:351-371;
- ⁵² P. Csermely, P. Fodor, J. Somogyi. *Carcinogenesis*, 1987, 8:1663-1666;
- ⁵³ Z. W. Yang, J. Wang, T. Zheng, B. T. Altura, B. M. Altura. *Stroke*, 2001, 32:249-257;
- ⁵⁴ L. M. Torres, B. Konopnika, L. N. Berti-Mattera, C. Liedke, A. Romani. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2010, 34:1659-1669;
- ⁵⁵ R. M. Touyz, G. Yao. *J. Cell. Physiol.*, 2003, 197:326-335;
- ⁵⁶ S. Thebault, R. T. Alexander, W. M. Tiel Groenstege, J. G. Hoenderop, R. J. Bindels. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2009, 20:78-85;
- ⁵⁷ Y. Zhu, A. Auerbach. *J. Gen. Physiol.*, 2001, 117:275-286;
- ⁵⁸ A. Quian, J. W. Johnson. *Physiol. And Behav.*, 2002, 4:577-582;
- ⁵⁹ E. M. Golding, R. Vink. *Brain Research*, 1994, 668:46-53;
- ⁶⁰ F.I. Wolf, V. Trapani, M. Simonacci, A. Boninsegna, A. Mazur, J.A. Maier, *Nutr. Cancer*, 2009, 61:131-136;
- ⁶¹ F.I. Wolf, V. Covacci, N. Bruzzese, A. Di Francesco, A. Sachets, D. Cord, A. Cittadini, *J. Cell. Biochem.*, 1998, 71:441-448.
- ⁶² A. Di Francesco, R.W. Desnoyer, V. Covacci, F.I. Wolf, A. Romani, A. Cittadini, *M. Bond. Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, 360:149-157.
- ⁶³ A. Sgambato, F.I. Wolf, B. Faraglia, A. Cittadini, *J. Cell. Physiol.*, 1999, 180:245-254.
- ⁶⁴ V. Covacci, N. Bruzzese, A. Sgambato, A. Di Francesco, M.A. Russo, F.I. Wolf, A. Cittadini, *J. Cell. Biochem.*, 1998, 70:313-322.
- ⁶⁵ H. Rubin. *Adv. Cancer Res.*, 2005, 93:1-58;

-
- ⁶⁶ H. Rubin. *Bioessays*, 2005, 27:311-320;
- ⁶⁷ H. Rubin. *Arch. Biochem. Biophys.* (2007), 458:16-23;
- ⁶⁸ C. Malpuech-Brugère, W. Nowaki, M. Daveau, E. Gueux, C. Linard, E. Rock, J. Lebreton, A. Mazur, Y. Rayssiguier. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1501:91–98;
- ⁶⁹ G. Calviello, P. Ricci, L. Lauro, P. Paolozza, A. Cittadini. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1994, 32:903–911;
- ⁷⁰ A. M. Freedman, M. M. Cassidy, W. B. Weglicki. *Magnes. Res.*, 1991, 4:185–189;
- ⁷¹ F. I. Wolf, V. Trapani, M. Simonacci, S. Ferré, J. A. Maier. *Magnes. Res.*, 2008, 21:58-64;
- ⁷² B. M. Keenoy, G. Moorkens, J. Vertommen, M. Noe, J. Nève, I. de Leeuw. *J. Am. Coll. Nutr.*, 2000, 81:405-411;
- ⁷³ A. Hartwig. *Mutat. Res.*, 2001, 475:113–121;
- ⁷⁴ F. I. Wolf, J. A. Maier, A. Nasulewicz, C. Feillet-Coudray, M. Simonacci, A. Mazur, A. Cittadini. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007, 458:24–32;
- ⁷⁵ F. I. Wolf, A. Torsello, S. Fasanella, A. Cittadini. *Mol. Aspects Med.*, 2003, 24:11-26;
- ⁷⁶ T. H. Kim, Y. Zhao, M. J. Barber, D. K. Kuharsky, X. M. Yin. *J Biol Chem.*, 2000, 275:39474-39481;
- ⁷⁷ R. Eskes, B. Antonsson, A. Osen-Sand, S. Montessuit, C. Richter, R. Sadoul, A. Mazze, A. Nichols, J. C. Martinou. *J Cell Biol*, 1998, 143: 217-224
- ⁷⁸ F. Y. Li, B. Chaigne-Delalande, C. Kanellopoulou, J. C. Davis, H. F. Matthews, D. C. Douek, J. I. Cohen, G. Uzel, H. C. Su, M. J. Lenardo. *Nature*, 2011, 425: 471-476;
- ⁷⁹ R. D. Grubbs, M. E. Maguire. *Magnesium*, 1987, 6:113-127;
- ⁸⁰ E. J. Brink, A. C. Beynen. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1992, 16:125-162;
- ⁸¹ M. Schweigel, H. Martens. *Front. Biosci.*, 2000, 5:D666-D677;
- ⁸² G. A. Quamme, C. de Rouffignac. *Front. Biosci.*, 2000, 5:D694-D711;
- ⁸³ D. B. Simon, Y. Lu, K. A. Choate, H. Velazquez, E. Al-Sabban, M. Praga, G. Cesari, A. Bettinelli, G. Colussi, J. Rodriguez-Soriano, D. McCredie, D. Milford, S. Sanjad, R. P. Lifton. *Science*, 1999, 285:103-106;
- ⁸⁴ D. D. Fanestil, R. H. Hyde, P. Blakely, D. A. Vaughn. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1999, 10:458-463;
- ⁸⁵ D. B. Vaupel, A. S. Kimes, E. D. London. *Neuropsychopharmacol.*, 1995, 13:315-22;
- ⁸⁶ L. J. Dai. *Physiol. Rev.*, 2001, 81:51-84;
- ⁸⁷ C. De Rouffignac, B. Mandon, M. Wittner, A. Di Stefano. *Min. Electrolyte Metab.*, 1993, 19:226-231;

-
- ⁸⁸ F. Morel. *Am. J. Physiol.*, 1981, 240:F159-164;
- ⁸⁹ J. F. Navarro, M. L. García, E. Gallego, M. L. Méndez, J. Chahín, V. García-nieto, J. J. García. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 1997, 31:275-280;
- ⁹⁰ O. Muneyyirci-Delale, V. L. Nacharaju, B. M. Altura, B. T. Altura. *Fert. Steril.*, 1998, 69:958-962;
- ⁹¹ E. Kelepouris. *Semin. Nephrol.*, 1998, 18:58-73;
- ⁹² J. J. Cunningham. *J. Am. Coll. Nutr.*, 1998, 17:7-10;
- ⁹³ A. Romani, A. Scarpa. *Circ. Res.*, 2000, 86:326-333;
- ⁹⁴ Institute of Medicine. *Dietary reference intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride*. National Academy Press, Washington DC (1997), 190-249;
- ⁹⁵ *Scientific Committee of Food. Opinion of the Scientific Committee of Food on the Tolerable Upper Intake Levels of Magnesium*. Commissione Europea (2001);
- ⁹⁶ Z. S. Agus. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1999, 10:1616-1622;
- ⁹⁷ J. Vormann, M. Anke. *J. Clin. Basic Cardiol.*, 2002, 5:49-53;
- ⁹⁸ J. Vormann. *Mol. Aspects Med.*, 2003, 24:27-37;
- ⁹⁹ S. Iannello, F. Belfiore. *Panminerva Med.*, 2001, 43:177-209;
- ¹⁰⁰ D. E. Cole, G. A. Quamme. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2000, 11:1937-1947;
- ¹⁰¹ M. Konrad, S. Weber. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2003, 14:249-260;
- ¹⁰² F. Guerrero-Romero, M. Rodríguez-Morán. *Arch. Med. Res.*, 2005, 36:250-257;
- ¹⁰³ S. Chakraborti, T. Chakraborti, M. Mandal, A. Mandal, S. Das, S. Ghosh. *Mol. Cell. Biochem.*, 2002, 238:163-179;
- ¹⁰⁴ H. P. Dimai, S. Porta, G. Wirnsberger, M. Lindschinger, I. Pamperl, H. Dobnig, M. Wilders-Truschnig, K. W. Lau. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998, 83:2742-2748;
- ¹⁰⁵ O. S. Alamoudi. *Eur. Respir. J.*, 2000, 16:427-431;
- ¹⁰⁶ V. Trapani, G. Farruggia, C. Marraccini, S. Iotti, A. Cittadini, F. I. Wolf. *Analyst*, 2010, 135:1855-1866;
- ¹⁰⁷ N. L. Saris, E. Mervaala, H. Karppanen, J. A. Khawaja, A. Lewenstam. *Clin. Chim. Acta*, 2000, 294:1-26;
- ¹⁰⁸ M. Walsh. *Spectrochim. Acta*, 1955, 7:108-117;
- ¹⁰⁹ C. Feillet- Coudray, A. Trzeciakiewicz, C. Coudray, M. Rambeau, A. Chanson, Y. Rayssiguier, A. Opolski, F. I. Wolf, A. Mazur, *Eur. J. Nutr.*, 2006, 45:171-177;

-
- ¹¹⁰ S. Iotti, R. Lodi, C. Frassinetti, P. Zaniol, B. Barbiroli. *NMR in Biomedicine*, 1993, 6:248-253
- ¹¹¹ S. Iotti, C. Frassinetti, L. Alderighi, A. Sabatini, A. Vacca, B. Barbiroli. *NMR in Biomedicine*, 1996, 9:24-32;
- ¹¹² S. Iotti, C. Frassinetti, L. Alderighi, A. Sabatini, A. Vacca, B. Barbiroli. *Magn. Res. Imaging*, 2000, 18:607-614;
- ¹¹³ M. Bond, G. Vadasz, A. V. Somlyo, A. P. Somlyo, *J. Biol. Chem.*, 1987, 262:15630–15636;
- ¹¹⁴ R. D. Grubbs. *Biometals*, 2002, 15:251-259;
- ¹¹⁵ L. A. Levy, E. Murphy, B. Raju, R. E. London. *Biochemistry*, 1988, 27:4041–8;
- ¹¹⁶ B. Raju, E. Murphy, L. A. Levy, R. D. Hall, R. E. London, *Am. J. Physiol.*, 1989, 256:C540–C548;
- ¹¹⁷ P. Delva, M. Degan, C. Pastori, G. Faccini, A. Lech. *Life Sciences*, 2000, 71:2119-2135;
- ¹¹⁸ H. J. Huijgen, R. Sanders, R. W. Van Olden, M. G. Klous, F. R. Gaffar, G. T. B. Sanders. *Clin. Chem.*, 1998, 44:639-648;
- ¹¹⁹ M. N. Sharikabad, K. M. Østbye, O. Brørs. *J. Physiol. Heart and Circulatory Physiology*, 2001, 281:H2113-H2123;
- ¹²⁰ M. Watanabe, M. Konoshi. *Pflugers Archiv: European journal of Physiology*, 2001, 442:35-40;
- ¹²¹ T. Kubota, K. Tokuno, J. Nakagawa, Y. Kitamura, H. Ogawa, Y. Suzuki, K. Suzuki, K. Oka. *Biochem. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.*, 2005, 303:332-336;
- ¹²² H. Komatsu, N. Iwasawa, D. Citterio, Y. Suzuki, T. Kubota, K. Tokuno, Y. Kitamura, K. Oka, K. Suzuki. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126:16353-16360;
- ¹²³ Y. Shindo, T. Fujii, H. Komatsu, D. Citterio, K. Hotta, K. Suzuki, K. Oka. *PLoSOne*, 2011, 6, issue 8, e23684;
- ¹²⁴ H. W. Kim, C. Jung, B. R. Kim, S. Y. Jung, J. H. Hong, Y. G. Ko, K. J. Lee, B. R. Cho. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46:3460-3463;
- ¹²⁵ V. Nikolenko, K. E. Poskanzer, R. Yuste. *Nat. Methods*, 2007, 4:943-950;
- ¹²⁶ K. Soroka, R. S. Vithanage, D. A. Philips, B. Walker, P. K. Dasgupta. *Anal. Chem.*, 1987, 59:629-636;
- ¹²⁷ G. Farruggia, S. Iotti, L. Prodi, N. Zaccheroni, M. Montalti, P. B. Savage, V. Trapani, P. Sale, F. I. Wolf. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128:344-350;
- ¹²⁸ G. Farruggia, S. Iotti, L. Prodi, N. Zaccheroni, M. Montalti, P. B. Savage, G. Andreani, V. Trapani, F. I. Wolf. *J. Fluoresc.*, 2008, 19:11-19;
- ¹²⁹ V. Covacci, N. Bruzzese, A. Sgambato, A. Di Francesco, M. A. Russo, F. I. Wolf, A. Cittadini. *J. Cell. Biochem.*, 1998, 70:313-322;

-
- ¹³⁰ V. Covacci, N. Bruzzese, A. Sgambato, A. Di Francesco, M. A. Russo, F. I. Wolf, A. Cittadini. *J. Cell. Biochem.*, 1998, 70:313-322;
- ¹³¹ J. H. Burckhalter, R. I. Leib. *J. Org. Chem.*, 1961, 26, 4078;
- ¹³² J. P. Heiskanen, O. E. O. Hormi. *Tetrahedron*, 2009, 65, 518;
- ¹³³ M. Nusse and J. Kramer. *Cytometry*, 1984, 5:20-5.
- ¹³⁴ N. Su, J. S. Bradshaw, X. X. Zhang, H. Song, P. B. Savage, G. Xue, K. E. Krakowiak, R. M. Izatt. *J. Org. Chem.*, 1999, 64:8855:
- ¹³⁵ a) Brevetto Italiano per Invenzione Industriale N° BO2009A000811 del 21/12/2009. M. Lombardo, C. Trombini, M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, S. Iotti, G. Farruggia, C. Marraccini. *Procedimento per la sintesi di sonde fluorescenti di metalli*; b) Estensione PCT N. PCT/IB2010/003317 depositata il 21.12.2010 della Domanda di Brevetto italiana N° BO2009A000811. M. Lombardo, C. Trombini, M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, S. Iotti, G. Farruggia, C. Marraccini. *Procedure for the synthesis of fluorescent probes for metals*;
- ¹³⁶ G. Farruggia, S. Iotti, M. Lombardo, C. Marraccini, D. Petruzzello, L. Prodi, M. Sgarzi, C. Trombini, N. Zaccheroni. *J. Org. Chem.*, 2010, 75:6275-6278;
- ¹³⁷ C. O. Kappe, D. Dallinger, S. S. Murphree. *Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2009
- ¹³⁸ (a) I. Szatmari. *Synthesis*, 2009, 775. (b) W.-J. Hao, B. Jiang, S.-J. Tu, X.-D. Cao, S.-S. Wu, S. Yan, X.-H. Zhang, Z.-G. Hana, F. Shi. *Org. Biomol. Chem.*, 2009, 7:1410. (c) Y. Ohta, H. Chiba, S. Oishi, N. Fujii, H. Ohno. *Org. Lett.*, 2008, 10:3535. (d) B. Rodriguez, C. J. Bolm. *Org. Chem.*, 2006, 71:2888. (e) S. Mosse, A. Alexakis. *Org. Lett.*, 2006, 8:3577. (f) M. Follmann, F. Graul, T. Scheafer, S. Kopec, P. Hamley. *Synlett.*, 2005, 1009. (g) B. Westermann, C. Neuhaus. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, 44:4077. (h) N. J. McLean, H. Tye, M. Whittaker. *Tetrahedron Lett.*, 2004, 45:993. (i) N. Pemberton, V. Aberg, H. Almstedt, A. Westermark, F. Almqvist. *J. Org. Chem.*, 2004, 69:7830. (j) F. Lehmann, A. Pilotti, K. Luthman. *Mol. Diversity*, 2003, 7:145. (k) N. E. Leadbeater, H. M. Torenus, H. Tye. *Mol. Diversity*, 2003, 7:135. (l) O. I. Zbruyev, N. Stiasni, C. O. Kappe. *J. Comb. Chem.*, 2003, 5:145;
- ¹³⁹ (a) R. Ballardini, G. Varani, M. T. Indelli, F. Scandola, *Inorg. Chem.*, 1986, 25:3858-3865; (b) R. E. Ballard, J. W. Edwards, *J. Chem. Soc.*, 1964, 4868-4874;
- ¹⁴⁰ (a) E. Bardez, I. Devol, B. Larrey, B. Valeur. *J. Phys. Chem. B*, 1997, 101:7786-7793; (b) M. Goldman, E. L. Wehry. *Anal. Chem.*, 1970, 42:1178-1185; (c) L. Prodi, C. Bargossi, M. Montalti, N. Zaccheroni, N. Su, J. S. Bradshaw, R. M. Izatt, P. B. Savage. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122:6769-6770; (d) L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccheroni, J. S. Bradshaw, R. M. Izatt, P. B. Savage. *Tetrahedron Lett.*, 2001, 42:2941-2944; (e) A. Casnati, F. Sansone, A. Sartori, L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccheroni, F. Ugozzoli, R. Ungaro. *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, 1475-1485; (f) R. T. Bronson, M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, R. D. Lamb, N. K. Dalley, R. M. Izatt, J. S. Bradshaw, P. B. Savage. *Tetrahedron*, 2004, 60:11139-11144;
- ¹⁴¹ O. Senèque, J. Latour. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132:17760-17774;

-
- ¹⁴² C. Marraccini, G. Farruggia, M. Lombardo, L. Prodi, M. Sgarzi, V. Trapani, C. Trombini, F. I. Wolf, N. Zaccheroni, S. Iotti. *Chem. Sci.*, 2012, 3:727-734;
- ¹⁴³ F. I. Wolf, V. Covacci, N. Bruzzese, A. Di Francesco, A. Sacchetti, D. Corda, A. Cittadini. *J. Cell. Biochem.*, 1998, 71:441-448;
- ¹⁴⁴ F. Helmchen and W. Denk, *Nat. Methods*, 2005, 2:932-940;
- ¹⁴⁵ A. Romani, E. Dowell, A. Scarpa. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 36:24376-24384;
- ¹⁴⁶ P. W. Flatman. *Annu. Rev. Physiol.*, 1991, 53:259-271;
- ¹⁴⁷ S. Lagomarsino, S. Iotti, G. Farruggia, A. Cedola, V. Trapani, M. Fratini, I. Bukreeva, A. Notargiacomo, L. Mastrototaro, C. Marraccini, A. Sorrentino, I. McNulty, S. Vogt, D. Legnini, S. Kim, A. Gianoncelli, J. A. M. Maier, F. I. Wolf. *Spectrochim. Acta B*, 2011, 66:834-840.