



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOLOGIA

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE BIO-09

CICLO XXV°

Tesi di Dottorato di Ricerca

Modulazione del CFTR da parte della variante
ipertensiva della proteina citoscheletrica adducina

Dottorando: Dott.ssa Francesca Sassone

Matricola: R08850

Tutor: Prof. Giuliano Meyer

Dipartimento di Bioscienze

Coordinatore: Prof. Paolo Cavallari

Anno Accademico 2011-2012

Indice

1. Riassunto	7
2. Introduzione	11
2.1 L'ipertensione	11
2.2.1 L'ipertensione "sodio sensibile"	14
2.2 L'adducina	20
2.2.1 Struttura	20
2.2.2 Funzioni	21
2.2.3 Ruolo nell'ipertensione	24
2.3 Il CFTR	27
2.3.1 Struttura e interazioni	27
2.3.2 Glicosilazione e localizzazione cellulare	33
2.3.3 Funzioni	35
2.3.4 Trafficking	35
2.3.5 Localizzazione nel rene e ruolo nell'ipertensione	39
3. Scopo del lavoro	41
4. Materiali e Metodi	44
4.1 Colture cellulari	44
4.2 Clonaggio del cDNA per il CFTR nei vettori: pIRES2-EGFP, pEYFP-N1, pEYFP-C1 e pEGFP-C1 fotoattivabile	45
4.2.1 PCR	47

4.2.2 Elettroforesi del DNA	48
4.2.3 Purificazione dei prodotti di PCR	49
4.2.4 Digestione con enzimi di restrizione	50
4.2.5 Purificazione dei prodotti di digestione	51
4.2.6 Ligazione	51
4.3 Trasformazione batterica e amplificazione del DNA	52
4.3.1 Produzione di batteri competenti	52
4.3.2 Trasformazione batterica	54
4.3.3 Miniprep	54
4.3.4 Maxiprep	56
4.3.5 Dosaggio acidi nucleici	57
4.4 Transfezione e cotransfezione	58
4.4.1 Transfezione	58
4.4.2 Cotransfezione	59
4.5 Saggio della Luciferasi	60
4.6 Esperimenti di FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)	61
4.7 Studi di immunocitochimica	65
4.7.1 Staining CFTR	65
4.7.2 Staining actina e adducina	66
4.8 Estrazione proteica	68
4.8.1 Estrazione proteine totali	68
4.8.2 Estrazione delle membrane plasmatiche	69
4.9 Dosaggio proteico	71
4.10 Coimmunoprecipitazione	71
4.10.1 Coimmunoprecipitazione con FLAG tag	71
4.10.2 Coimmunoprecipitazione con HA tag	73

4.11 Biotinilazione	75
4.12 Western blot	77
4.12.1 Elettroforesi SDS PAGE	77
4.12.2 Trasferimento	79
4.12.3 Blocco e incubazione con gli anticorpi	79
4.12.4 Sviluppo	81
4.12.5 Stripping della membrana	82
4.12.6 Colorazione Amido black di membrane PVDF	82
4.13 Esperimenti di patch-clamp	83
4.13.1 Esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell	84
4.13.2 Esperimenti di patch-clamp in configurazione cell-attached	86
4.14 Misurazione del cAMP intracellulare	87
4.15 Esperimenti di FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)	89
4.16 Esperimenti di fotoattivazione	91
4.17 Analisi statistiche	93
5. Risultati	94
5.1 Espressione dell'adducina in cellule NU12 e HU33	94
5.2 Effetti dell'adducina sull'attività del CFTR: esperimenti di patch-clamp	95
5.2.1 Esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell	95
5.2.2 Esperimenti di patch-clamp in configurazione cell-attached	98
5.3 Valutazione dell'efficienza di transfezione di cellule NU12 e HU33 con il vettore pcDNA3-CFTR	101
5.3.1 Renilla Luciferase Reporter assay	102
5.3.2 Conte cellulari	103

5.4 Effetti dell'adducina sull'espressione del CFTR: esperimenti di Western blot e di biotinilazione del canale	104
5.4.1 Espressione totale del CFTR	104
5.4.2 Espressione del CFTR a livello della membrana plasmatica	106
5.4.3 Biotinilazione del CFTR	108
5.5 Effetti dell'adducina sulla localizzazione del CFTR: esperimenti di immunofluorescenza	109
5.6 Studio dell'interazione tra CFTR e adducina	111
5.6.1 Studio dell'interazione tra CFTR e adducina: esperimenti di coimmunoprecipitazione	111
5.6.1.1 Prove di efficienza di transfezione del vettore pcDNA3-CFTR in cotransfezione	111
5.6.1.2 Esperimenti di coimmunoprecipitazione con FLAG-tag	112
5.6.1.3 Esperimenti di coimmunoprecipitazione con HA-tag	116
5.6.2 Studio dell'interazione tra CFTR e adducina: esperimenti di FRET	118
5.7 Studio del trafficking del CFTR	123
5.7.1 Studio del trafficking del CFTR: esperimenti di FRAP	124
5.7.2 Studio del trafficking del CFTR: esperimenti di fotoattivazione	127
5.8 Studio dell'organizzazione del citoscheletro actinico	131
6. Discussione	133
Bibliografia	143
Ringraziamenti	153

1. Riassunto

L'ipertensione primaria è una patologia multifattoriale la cui eziologia è riconducibile alla concomitanza di diversi fattori, di origine genetica ed ambientale. Circa il 40% degli individui affetti da ipertensione presentano una forma ipertensiva detta "sodio sensibile", dovuta cioè all'eccessivo riassorbimento di cloruro di sodio. Un ruolo fondamentale nell'insorgenza e nel mantenimento dell'ipertensione Na^+ -sensibile sembra essere svolto dal rene (ipotesi di Guyton). Secondo tale ipotesi, l'incremento del riassorbimento di Na^+ nel nefrone, seguito per osmosi dall'acqua, porterebbe ad un aumento del volume plasmatico con il conseguente aumento del riempimento cardiaco, della gittata cardiaca e quindi della pressione sanguigna. Un incremento del riassorbimento di Na^+ nel rene è stato osservato, oltre che nei pazienti ipertesi, anche nei ratti del ceppo MHS (Milan Hypertensive Strain), un sistema modello ampiamente utilizzato per lo studio dell'ipertensione Na^+ -sensibile. Questi ratti, oltre a possedere numerose caratteristiche comuni a pazienti affetti da ipertensione Na^+ -sensibile, presentano una mutazione puntiforme a carico della proteina citoscheletrica α -adducina. Mutazioni a carico di questa proteina, nell'uomo G460W-S586C, sono strettamente correlate con la patologia ipertensiva. La mutazione dell'adducina, oltre a determinare una variazione dello stato di polimerizzazione dell'actina, altera espressione ed attività di numerosi trasportatori e canali renali, in particolare della pompa Na^+/K^+ -ATPasi, situata sulla membrana basolaterale delle cellule del nefrone, provocando così un incremento del riassorbimento di ione sodio.

Il riassorbimento di cloruro nelle cellule del nefrone distale è strettamente correlato a quello dello ione sodio. Un canale per il Cl^- espresso nel rene ma le cui funzioni in questo distretto non sono del tutto chiarite è il CFTR. Espressione ed attività di questo canale sono risultate incrementate in colture primarie di DCT (tubulo convoluto distale) di ratti MHS rispetto a quanto osservato in ratti MNS. È inoltre noto che il CFTR è una proteina cargo sottoposta, come la pompa Na^+/K^+ -ATPasi, a

rapido turnover da e verso la membrana plasmatica, e che attività ed espressione del CFTR sono influenzate dal citoscheletro. Si è quindi voluto studiare se il CFTR potesse essere influenzato dall'espressione della variante ipertensiva dell'adducina. Gli esperimenti sono stati condotti su cellule HEK e su cellule NU12 (HEK stabilmente transfettate con adducina wild-type) e HU33 (HEK stabilmente transfettate con adducina mutata G460W).

Mediante esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell su cellule NU12 e HU33 transfettate con un vettore di espressione per il CFTR si è voluto studiare se la variante mutata dell'adducina avesse un impatto funzionale sull'attività del canale. Si è osservato che, in condizioni basali, la corrente mediata dal CFTR non variava tra i due tipi cellulari, ma, in seguito ad esposizione delle cellule a forskolina, attivatore del canale, si assisteva all'attivazione di una corrente di cloruro, inibita dall'inibitore specifico del CFTR (CFTR_{inh}-172), che risultava avere una densità statisticamente superiore in cellule HU33.

L'analisi della curva di attivazione della corrente nel tempo ha permesso di osservare che, mentre il tempo a cui si raggiungeva il 50% dell'attivazione massimale della corrente non variava tra i due tipi cellulari, lo slope della curva era statisticamente superiore in cellule HU33. Ciò suggerisce che l'espressione della variante mutata dell'adducina provochi un incremento del numero di canali attivi in cellula.

Esperimenti di patch-clamp in configurazione cell-attached hanno confermato questa ipotesi: densità ed attività del CFTR risultavano incrementate in cellule HU33. Inoltre l'esecuzione di rampe di potenziale ha permesso di riscontrare un incremento significativo della corrente media registrata in cellule HU33 rispetto a cellule NU12. In seguito all'aggiunta di forskolina si assisteva ad un aumento della corrente media in entrambi i tipi cellulari rispetto alla condizione basale. La corrente registrata in cellule HU33 si manteneva comunque significativamente superiore a quella registrata in cellule NU12.

Per escludere la possibilità che la differenza nell'attivazione della corrente CFTR-mediata tra i due tipi cellulari possa essere dovuta ad un diverso effetto della

forskolina sul pathway di sintesi del cAMP, si sono misurati i livelli di cAMP che non sono risultati essere differenti tra cellule NU12 e HU33.

Mediante esperimenti di Western blot si sono valutati i livelli di espressione del canale in cellule NU12 e HU33 transfettate con il vettore pcDNA3-CFTR. L'espressione totale del canale, data dalle sue isoforme "core-glycosylated" (forma immatura, localizzata a livello del reticolo endoplasmatico) e "fully-glycosylated" (forma matura e attiva, localizzata in membrana), non variava, mentre l'espressione della sola forma "fully-glycosylated" era statisticamente incrementata in cellule HU33. Questo aumento di espressione della forma matura del canale in membrana in presenza di adducina mutata è stato confermato anche mediante esperimenti di biotinilazione del CFTR.

Si è quindi voluto studiare il meccanismo alla base di questo aumento di espressione e quindi di attività del CFTR osservato in cellule esprimenti la forma mutata dell'adducina.

Innanzitutto è stata indagata l'esistenza di interazione tra adducina e CFTR. Si sono condotti esperimenti di FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), con la metodica dell'acceptor photobleaching, su cellule HEK simultaneamente transfettate con pEYFP-CFTR e pECFP-adducina wild-type o mutata. Questi esperimenti hanno mostrato un segnale di FRET statisticamente significativo, sia in presenza di adducina wild-type che in presenza di adducina mutata, sia in assenza che in presenza di stimolazione delle cellule con forskolina. Il segnale FRET era però di debole intensità. Sono stati condotti esperimenti di coimmunoprecipitazione volti ad approfondire le informazioni sull'interazione tra le due proteine. Questi esperimenti sono stati eseguiti su cellule HEK simultaneamente transfettate con CFTR e adducina con un FLAG tag in C-terminale o con un HA tag in N-terminale. Con questa metodica l'interazione è risultata essere praticamente assente. Potrebbe quindi trattarsi di un'interazione estremamente dinamica come già riportato per le interazioni tra il CFTR e i componenti del citoscheletro actinico.

Poiché il CFTR è una proteina che va incontro a trafficking e poiché l'adducina è coinvolta nei processi di endocitosi clatrina-dipendente, si è voluto studiare se

l'adducina mutata abbia un effetto sul processo di riciclo endocitico del canale. Si sono quindi condotti esperimenti di FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) su cellule HEK cotrasfettate con pEYFP-CFTR e pECFP-adducina wild-type o mutata. Questi esperimenti hanno evidenziato che, in presenza di adducina mutata, la frazione mobile del canale era statisticamente diminuita, il CFTR risulterebbe quindi maggiormente ritenuto a livello della membrana plasmatica. Lo studio del trafficking è stato effettuato anche mediante esperimenti di fotoattivazione, condotti su cellule HEK cotrasfettate con CFTR fuso ad una variante fotoattivabile della GFP e adducina wild-type o mutata fusa a CFP. Questi esperimenti hanno mostrato che, in presenza di adducina mutata, il decadimento della fluorescenza legata al CFTR è più lento, indice, anche in questo caso, di una maggior ritenzione del canale in membrana. Per cercare di chiarire in che modo agisca l'adducina mutata si sono condotti ulteriori esperimenti di fotoattivazione, in presenza di adducina wild-type, che hanno mostrato, in seguito a blocco dell'endocitosi con ikarugamicina, un decadimento della fluorescenza legata al CFTR più lento, effetto simile a quanto osservato in presenza di adducina mutata, suggerendo quindi un'influenza dell'adducina sul fenomeno endocitotico.

L'aumento della ritenzione del canale in membrana, osservato sia mediante FRAP che mediante fotoattivazione, potrebbe essere la conseguenza sia dell'alterato pathway di riciclo endocitico, come osservato anche per la pompa Na^+/K^+ -ATPasi, sia dell'alterata organizzazione del citoscheletro actinico, le cui fibre, come osservato in esperimenti di fluorescenza con staining dell'actina, risultano più spesse e più fitte in presenza di adducina mutata, ed è noto che, un citoscheletro rigido abbia un effetto inibitorio sui processi di trafficking a livello della membrana. In conclusione, questi esperimenti dimostrano che, nel modello cellulare renale, l'adducina mutata è in grado di influenzare l'attività del CFTR per via di un'alterazione del turnover del canale che porta ad un aumento della ritenzione del canale stesso a livello della membrana plasmatica.

2. Introduzione

2.1 L'ipertensione

L'ipertensione è una condizione patologica molto diffusa che interessa circa 1,5 miliardi di persone nel mondo, causando indirettamente 7,1 milioni di morti all'anno, ciò la rende la terza causa di mortalità nel mondo. Uno stato ipertensivo arterioso prolungato nel tempo determina svariati effetti a breve e a lungo termine su diversi organi: infarto del miocardio, cardiomiopatie, retinopatie, nefropatie, encefalopatie (Lawes et al. 2008). I danni agli organi causati dall'ipertensione sono attribuibili al danneggiamento dei vasi sanguigni sottoposti ad elevate pressioni del flusso sanguigno.

L'ipertensione è caratterizzata da un aumento persistente dei valori di pressione arteriosa sistolica e diastolica a riposo.

I valori di pressione sistolica, ossia la pressione registrata durante la contrazione (sistole) ventricolare e di pressione diastolica, ossia la pressione registrata durante il rilassamento (diastole) ventricolare, sono, in un individuo adulto, a riposo e in condizioni fisiologiche, inferiori a 130 mmHg e a 85 mmHg rispettivamente.

A parità di condizioni, quindi, valori di pressione sistolica superiori a 140 mmHg e di pressione diastolica superiori a 90 mmHg sono indice di uno stato ipertensivo [Figura 2.1].

PRESSIONE DIASTOLICA	< 85	normale
	85-90	normale-moderata
	90-104	moderata-alta
	104-114	alta-severa
	> 115	severa
PRESSIONE SISTOLICA	< 140	normale
	140-159	borderline
	> 160	alta

Figura 2.1 - Classificazione dei livelli dei valori di pressione sistolica e diastolica (tratto da World Organization International Society of Hypertension Guidelines, 1999).

La pressione che permette al sangue di circolare è direttamente proporzionale all'azione della pompa cardiaca (output cardiaco) e al tono delle arterie (resistenza periferica) (Trepiccione, Zacchia and Capasso 2012).

Esistono due forme ipertensive: l'ipertensione secondaria e l'ipertensione primaria o essenziale; il 92% dei soggetti ipertesi presenta questa seconda forma. L'ipertensione essenziale è definita come elevata pressione sanguigna non riconducibile a cause primarie conclamate, quali malattie renali, tumore alle ghiandole surrenali, terapia farmacologica, diabete (Mullins, Bailey and Mullins 2006). L'eziologia di questa forma ipertensiva ha natura multifattoriale, legata alla concomitanza di fattori genetici, ambientali e comportamentali. Al mantenimento dell'omeostasi pressoria contribuiscono infatti numerosi sistemi fisiologici e ciascuna variazione di pressione arteriosa dovuta ad uno sbilanciamento di uno di questi meccanismi tende ad essere controbilanciata e corretta dall'intervento di uno o più altri sistemi, in una sorta di meccanismo di feedback, al fine di riportare la pressione entro i normali valori. Solo quando l'equilibrio è molto compromesso, o quando i sistemi di feedback e di controllo falliscono nel controbilanciare la perturbazione, si sfocia nella condizione patologica ipertensiva. Alcuni dei principali sistemi fisiologici responsabili del mantenimento dell'equilibrio pressorio sono di seguito riportati:

- sistema renina-angiotensina-aldosterone: l'angiotensina II agisce attraverso i recettori AT1 e AT2 stimolando la produzione di aldosterone e controllando

il tono vascolare;

- peptidi atriali natriuretici: regolatori della funzionalità renale e cardiovascolare, il peptide atriale natriuretico (ANP) e il peptide natriuretico di tipo B (BNP) sono rilasciati rispettivamente dagli atri e dai ventricoli in seguito a stretching dei miociti cardiaci. Entrambi hanno effetto vasodilatatore e sono in grado di causare natriuresi e quindi escrezione di acqua. ANP è anche in grado di inibire la secrezione sia di aldosterone che di ADH;
- sistema dell'endotelina: coinvolge l'azione di tre peptidi, ET1, ET2, ET3 e di due recettori accoppiati a proteine G, entrambi ampiamente distribuiti ma predominanti a livello di rene e cuore. Il ruolo chiave delle endoteline nell'omeostasi della pressione sanguigna è sottolineato da studi condotti su soggetti sani in cui si è evinto che antagonisti dei recettori per le endoteline riducono la pressione sanguigna arteriosa media (MABP) e normalizzano i valori pressori in varie forme ipertensive umane;
- pathway di signaling dell'ossido nitrico: l'ossido nitrico è un potente vasodilatatore che regola un'ampia varietà di funzioni renali e cardiovascolari ed è fondamentale nel controllo pressorio sia a breve che a lungo termine;
- sistema chinina-callicreina: il sistema chinina-callicreina è un sistema multi enzimatico che consiste nel substrato, il chininogeno, nell'enzima attivatore, la callicreina e nei metaboliti attivi, di cui la bradichinina è il predominante. L'evidenza a sostegno dell'importanza del sistema chinina-callicreina nella regolazione a lungo termine della pressione arteriosa viene dagli studi epidemiologici, nei quali, la ridotta attività di questo sistema è stata associata allo sviluppo di elevati valori pressori;
- sistema dopaminergico: la dopamina può agire come modulatore ormonale della pressione; è prodotta dal rene in risposta ad un carico di sodio e può essere considerata un regolatore intrarenale del trasporto di sodio. Topi mancanti dei recettori dopaminergici manifestano incrementi sia della

pressione sistolica che della pressione diastolica;

- sistema adrenergico: la generale efficacia dei farmaci α e β bloccanti nella riduzione della pressione indica un probabile coinvolgimento dei recettori adrenergici nel controllo pressorio. Esistono 9 sottotipi di recettori adrenergici (3 α_1 , 3 α_2 , 3 β), in particolare gli α_1 , recettori post-sinaptici che mediano alcune delle funzioni principali delle catecolamine adrenalina e noradrenalina, sembrano giocare un ruolo chiave nella regolazione della pressione sanguigna (Mullins et al. 2006).

Numerose ricerche sono state condotte sui riflessi barorecettoriali, sul sistema renina-angiotensina-aldosterone e sul rene, sulla funzionalità del sistema nervoso autonomo, senza però riuscire ad identificare un'alterazione che potesse essere, da sola, la causa dell'aumentata resistenza vascolare periferica determinante lo stato ipertensivo.

2.2.1 L'ipertensione "sodio sensibile"

Il 50% circa dei soggetti affetti da ipertensione essenziale presenta una forma ipertensiva definita come "sodio sensibile"; questi soggetti sono caratterizzati da un aumento dei valori di pressione arteriosa in seguito a somministrazione di un carico di sodio. L'assunzione di cloruro di sodio con la dieta è infatti il fattore ambientale che ha la maggior incidenza per quanto riguarda lo sviluppo di ipertensione. Nonostante ciò comunque il grado di sensibilità all'intake di cloruro di sodio differisce molto tra i pazienti affetti da ipertensione essenziale (Ando and Fujita 2012).

I fattori che determinano il grado di sensibilità all'introito di cloruro di sodio con la dieta variano molto, anche se sono principalmente di origine genetica (Procino et al. 2011), e possono influenzarsi vicendevolmente. Inoltre l'invecchiamento, i cambiamenti di peso corporeo e altri fattori alterano la sodio sensibilità (Ando and Fujita 2012).

Bisogna inoltre tenere presente che quando si parla di intake di sale non si intende esclusivamente introito di sodio, infatti evidenze sperimentali supportano il ruolo

pro-ipertensivo svolto dagli ioni sodio e cloruro accoppiati. Già dal 1983 infatti era stato dimostrato che una dieta implementata di cloruro di sodio provocava un forte aumento dei valori pressori mentre diete a base di bicarbonato di sodio o ascorbato di sodio (equimolari rispetto al cloruro di sodio) non avevano alcun effetto sulla pressione sanguigna. Questi studi sottolineano il ruolo cruciale dello ione cloruro nello sviluppo di ipertensione (Trepiccione et al. 2012).

In base all'ipotesi più accreditata, l'ipertensione "sodio sensibile" sarebbe caratterizzata da un aumento del riassorbimento renale di ione sodio, seguito per gradiente osmotico dal riassorbimento di acqua che, a sua volta, provoca un aumento del volume plasmatico, del riempimento cardiaco e della gittata cardiaca e, in ultima analisi, della pressione sanguigna (Guyton 1991).

Infatti la regolazione a lungo termine della pressione arteriosa media (MABP, mean arterial blood pressure) è strettamente correlata con l'omeostasi del volume di fluido extracellulare (ECVF, extracellular fluid volume), che, a sua volta, è principalmente determinato dalla concentrazione plasmatica dello ione sodio. Il sodio rappresenta infatti il principale ione nell'ultrafiltrato glomerulare e l'NaCl contribuisce per oltre l'80% all'osmolarità del fluido extracellulare.

L'omeostasi ionica del sodio, ossia il bilancio tra assunzione ed escrezione, è quindi un fattore critico per l'ECVF; in quest'ottica, i reni, essendo la principale via attraverso la quale il sodio viene eliminato dall'organismo, svolgono un ruolo chiave sia nell'induzione che nel mantenimento di diversi tipi di ipertensione (Mullins et al. 2006).

L'aumentato riassorbimento tubulare renale è una delle maggiori cause di insorgenza di ipertensione, al punto che sembra che una vasocostrizione sistemica non sia in grado di indurre un aumento dei valori medi di pressione arteriosa, se la funzionalità renale non è compromessa. Studi di perfusione renale hanno mostrato che un aumento della MABP è abbinato ad un aumento dell'escrezione renale di sodio che ha l'effetto di ridurre l'ECFV e l'output cardiaco, facendo tornare la MABP ai normali valori. Il rene, in sostanza, protegge contro perturbazioni dal punto di equilibrio e il bilancio di sodio viene in questo modo ristabilito con un sistema a

feedback negativo (Mullins et al. 2006). Sembra pertanto che nessuna forma ipertensiva si possa sviluppare senza che siano presenti alterazioni a livello del rene (Guyton 1991). I reni provvedono quindi alla regolazione a lungo termine della pressione sanguigna, tramite un fine bilanciamento tra assorbimento ed escrezione di sale e fluidi attorno ad uno specifico punto di equilibrio (Trepiccione et al. 2012). Infatti, in un certo lasso di tempo, intake ed escrezione di sodio devono equivalersi in quanto un prolungato eccesso dell'intake rispetto all'eliminazione porta a rigonfiamento e lisi cellulare mentre, viceversa, un eccesso di escrezione porta a morte cellulare per disidratazione.

Il punto di equilibrio tra intake e output sta esattamente nel punto di intersezione tra la curva della funzionalità renale e la retta dell'intake [Figura 2.2].

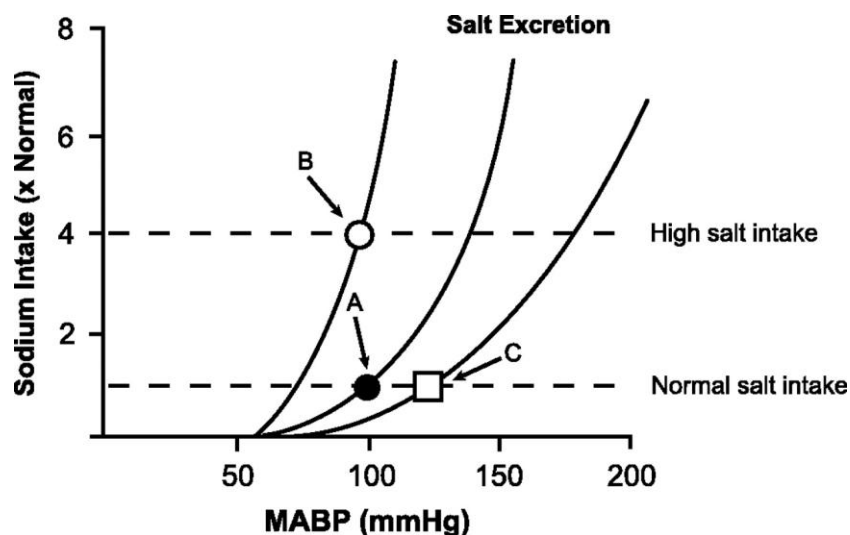


Figura 2.2 - Curva della funzionalità renale che mostra l'effetto della pressione sanguigna arteriosa media (MABP) sull'escrezione renale di sodio. A) Punto di equilibrio pressorio mantenuto grazie all'aggiustamento del bilancio di sodio. B) In caso di incremento dell'intake di sodio, la curva si sposta a sinistra per garantire una maggiore escrezione per ciascun valore pressorio. C) Se questa correzione fallisce, la curva si sposta a destra in modo che sia necessario un equilibrio pressorio più alto per accoppiare assunzione ed escrezione di sodio.

Questo stesso meccanismo che regola finemente il bilancio tra assunzione ed escrezione di fluido fornisce anche un preciso metodo di controllo della pressione arteriosa. Infatti, ad esempio, se la pressione arteriosa aumenta oltre il punto

d'equilibrio, l'output urinario supererà l'intake di sale e acqua e si perderanno fluidi finché i valori pressori non torneranno al punto di equilibrio. Proprio perché i reni sono in grado di riportare i valori pressori all'equilibrio, il sistema renale a feedback è un meccanismo a guadagno infinito. Nessuno degli altri meccanismi di controllo della pressione ha le stesse potenzialità del meccanismo renale (Guyton 1991).

Studi di trapianto renale crociato tra animali normotesi ed ipertesi hanno confermato il ruolo centrale del rene nell'insorgenza di ipertensione; la stessa osservazione è stata fatta nel corso di trapianti renali tra pazienti normo ed ipertesi, si è infatti evidenziata una normalizzazione dei valori pressori in pazienti ipertesi che avevano ricevuto un trapianto renale da pazienti normotesi (Mullins et al. 2006).

L'importanza dei meccanismi di trasporto tubulare renali per la regolazione della pressione sanguigna è testimoniata anche dalle patologie sia ipotensive che ipertensive dovute a mutazioni a carico di tali sistemi di trasporto.

I principali meccanismi di trasporto renali sono di seguito riassunti:

- a livello del tubulo convoluto prossimale, il riassorbimento di ione sodio è in larga parte accoppiato al riassorbimento di vari substrati, tra cui in particolare glucosio, amminoacidi e fosfato e, in parte, lo ione è riassorbito dallo scambiatore Na^+/H^+ (NHE3);
- a livello del tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle, il sodio è riassorbito con il cotrasporto $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (NKCC), localizzato sulla membrana apicale delle cellule di questo segmento. Lo ione potassio ricicla poi nel lume tubulare grazie al canale per il K^+ (ROMK), mentre il cloruro è riassorbito dai canali Cl^- -Kb localizzati a livello della membrana basolaterale. Il riciclo di ioni potassio carichi positivamente nel lume tubulare e la contemporanea uscita di ioni cloruro carichi negativamente attraverso la membrana basolaterale generano un gradiente di voltaggio trans epiteliale che porta ad ulteriore riassorbimento di ioni sodio per via paracellulare;
- a livello del tratto convoluto distale il riassorbimento di ione sodio è accoppiato al riassorbimento di cloruro dal cotrasporto Na^+-Cl^- (NCC);
- nel dotto collettore, lo ione sodio è riassorbito, nelle cellule principali, attraverso il

canale epiteliale per il sodio (ENaC);

- nella maggior parte delle cellule epiteliali del nefrone (con eccezione dei tratti sottili dell'ansa di Henle) la pompa Na^+/K^+ -ATPasi, localizzata sulla membrana basolaterale, provvede all'estrusione di ioni sodio.

Mutazioni con perdita di funzione a carico dei geni codificanti per il cotrasportatore NKCC e per i canali ROMK o ClC-Ka e ClC-Kb, o della loro subunità Barttina, compromettono il riassorbimento tubulare a livello del tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle, mentre mutazioni a carico del cotrasportatore NCC e dei canali ClC-Kb portano a riduzione del riassorbimento renale a livello distale (Lang et al. 2005). Questi disordini sono caratterizzati da ipotensione (Lang et al. 2005). Ne sono esempi la sindrome di Bartter e la sindrome di Gitelman; la prima è dovuta a difetti nel riassorbimento di sodio, potassio e cloruro a livello dell'ansa di Henle. Esistono quattro varianti genetiche di questa patologia: mutazioni a carico del cotrasporto NKCC2 sono responsabili della sindrome di Bartter di tipo I, mutazioni a carico del canale ROMK sono responsabili della sindrome di Bartter di tipo II, mutazioni nel ClC-Kb di quella di tipo III e mutazioni a carico del gene codificante per la subunità Barttina provocano la sindrome di Bartter di IV tipo (Deschênes and Fila 2011). La sindrome di Gitelman è invece dovuta a mutazioni a carico del gene codificante per il cotrasportatore NCC.

L'evento principale che spiegherebbe invece un aumento del riassorbimento di sodio a livello del nefrone è l'incremento di attività dei trasportatori per lo ione sodio; ne sono esempio le mutazioni, con aumento di attività, a carico del canale epiteliale per il sodio (ENaC) che determinano la sindrome di Liddle e le mutazioni che comportano un difetto nell'attività chinasi di WNK1 con conseguente aumento di attività del cotrasporto NCC, che determinano la sindrome di Gordon (Lang et al. 2005).

Poiché la funzionalità renale viene modulata da diversi sistemi neuronali ed endocrini (barocettori, recettori adrenergici e dopaminergici, sistema chinina-calcitriolo, sistema renina-angiotensina-aldosterone, vasocostrittori, vasodilatatori), anche l'alterazione di questi meccanismi, oltre ad un'azione diretta dei meccanismi

di trasporto, può influenzare l'omeostasi della pressione sanguigna (Mullins et al. 2006). Mutazioni a carico di questi sistemi infatti possono essere fattori predisponenti per lo sviluppo di ipertensione, alcuni esempi possono essere l'enzima ACE, l'enzima aldosterone sintasi, il peptide atriale natriuretico, i recettori del glucagone, dell'insulina, dei glucocorticoidi, la proteina adducina (Luft 2001).

Lo studio dell'ipertensione è stato condotto, oltre che mediante osservazioni dirette sui pazienti, anche attraverso l'utilizzo di modelli animali di questa patologia. Un ottimo sistema modello per lo studio della forma ipertensiva "sodio sensibile" è costituito dai ratti inbred Milano ipertesi (MHS: Milan Hypertensive Strain). Tali ratti sono caratterizzati da un incremento della pressione arteriosa, associato ad un aumento del riassorbimento renale di sodio, che si sviluppa dai 50 giorni di vita, raggiungendo la pressione massima di 170 mmHg contro i 119 mmHg dei ratti Milano normotesi (MNS: Milano Normotensive Strain). Le cause primarie dell'ipertensione in questi ratti sono un trasporto di sodio a livello renale più veloce e difetti nella regolazione dell'adenilato ciclasi nelle membrane delle cellule muscolari lisce.

Studi condotti su questi animali modelli hanno ancora una volta sottolineato il ruolo primario del rene nella patogenesi dell'ipertensione: si è infatti osservato che i ratti MHS presentano un aumento del flusso sanguigno renale, della filtrazione glomerulare, del riassorbimento di ione sodio e, in antitesi, una riduzione della concentrazione di callicreina nelle urine e della concentrazione plasmatica di renina rispetto a ratti MNS di età corrispondente (Barlassina et al. 1997).

Inoltre, le differenze nel trasporto ionico attraverso la membrana delle cellule tubulari di ratti MNS e MHS vengono meno in seguito a rimozione del citoscheletro sottomembranario, suggerendo quindi il coinvolgimento di alcuni dei suoi componenti (Manunta, Barlassina and Bianchi 1998). È stato infatti dimostrato che in questi ratti, che possiedono numerose caratteristiche in comune con pazienti affetti da ipertensione "sodio sensibile", si ha una stretta correlazione tra mutazioni a carico della proteina citoscheletrica adducina e sviluppo di ipertensione. In particolare due sono le mutazioni missenso legate allo sviluppo di ipertensione: si

tratta della mutazione F316Y nella subunità α dell'adducina e della mutazione Q519R nella subunità β (Bianchi et al. 1994).

Mutazioni a carico della proteina adducina sono state riscontrate anche in pazienti affetti da ipertensione "sodio sensibile", si tratta delle mutazioni missenso G460W ed S586C della subunità α della proteina (Cusi et al. 1997).

I ceppi MNS e MHS si sono rivelati dunque modelli utili per lo studio dell'effetto dell'espressione della proteina adducina mutata nello sviluppo di ipertensione.

2.2 L'adducina

2.2.1 Struttura

L'adducina è una proteina citoscheletrica presente in cellula come eterodimero o eterotetramero. La forma eterodimerica è composta da una subunità α e una subunità β oppure γ . Queste subunità, del peso molecolare rispettivamente di 103 kDa, 97 kDa e 90 kDa, sono codificate da tre diversi geni: la subunità α dal gene ADD1, che mappa sul cromosoma 4, la β da ADD2, sul cromosoma 2 e la γ da ADD3, sul cromosoma 3 (Staessen and Bianchi 2005).

Le subunità α e β dell'adducina presentano un'identità del 49% e una similarità del 66% a livello amminoacidico; la subunità γ ha una percentuale di similarità con le altre due del 60-70% (Matsuoka, Li and Bennett 2000).

Strutturalmente ciascuna molecola di adducina α , β , γ è composta da tre domini funzionali: un dominio detto "head", globulare, all'N-terminale, un piccolo dominio centrale di 8 kDa, detto "neck" e un dominio detto "tail" al C-terminale [Figura 2.3].

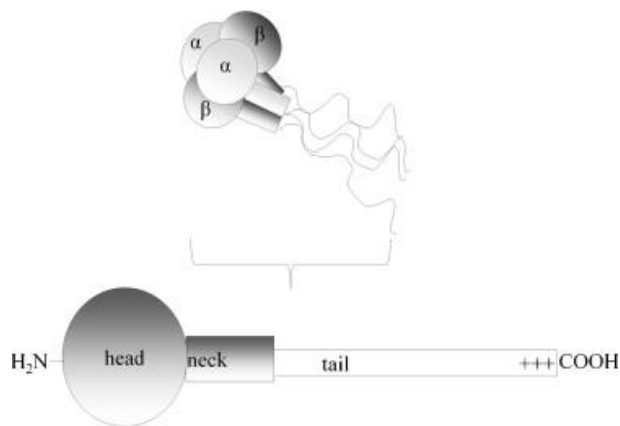


Figura 2.3 - Modelli delle strutture tetrameric e monomeric della proteina adducina. Ciascuna subunità è composta da un dominio "head", un dominio "neck" e un dominio "tail". La regione identificata con +++ nel dominio "tail" corrisponde alla sequenza MARCKS, formata da 22 amminoacidi basici e contiene i siti di fosforilazione per le proteine chinasi A e C, oltre al sito di legame per la calmodulina.

La regione "head" contiene una sequenza simile al dominio di interazione con l'actina, tipico delle proteine ABP-120, distrofina, α -actinina; a livello della regione "neck" si trovano i siti di fosforilazione della proteina Rho chinasi e questa regione sembra rivestire un ruolo chiave nella dimerizzazione della proteina. La regione "tail" contiene alla sua estremità C-terminale un dominio caratteristico, composto da 22 amminoacidi, omologo ai domini MARCKS (Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate). Proprio per via della presenza di questo dominio, l'adducina appartiene alla famiglia di proteine MARCKS, tipicamente coinvolte nel controllo del ciclo del calcio, nei contatti cellula-cellula, nella trasduzione del segnale e nella motilità cellulare (Torielli et al. 2008).

La regione "tail", soprattutto grazie alla presenza della sequenza MARCKS, è in grado di promuovere la formazione del complesso actina-spectrina (Li, Matsuoka and Bennett 1998), inoltre contiene i siti di legame con la calmodulina e i siti di fosforilazione per le proteine chinasi A e C.

2.2.2 Funzioni

L'adducina è una proteina fortemente conservata tra le diverse specie, ciò è indice del suo ruolo nelle funzioni cellulari di base. L'adducina infatti gioca un ruolo attivo nell'organizzazione del citoscheletro cellulare, regolando l'assemblaggio del

network di actina e spectrina (Torielli et al. 2008, Efendiev et al. 2004). La spectrina è il componente principale del citoscheletro membranario, 5 o 6 molecole di spectrina sono connesse a corti filamenti di actina a formare una sorta di rete a livello della superficie citoplasmatica della membrana cellulare. Lo scheletro membranario è connesso con il plasmalemma in particolare attraverso due classi di interazioni proteina-proteina. La prima classe è costituita dal legame ad alta affinità tra l'ankirina e la subunità β della spectrina. La seconda classe è costituita dal legame tra la proteina 4.1 e la regione N-terminale della subunità β della spectrina e il dominio citoplasmatico della proteina integrale di membrana glicoforina C. Le proteine accessorie di questo network di spectrina e actina hanno funzioni di formazione delle connessioni con la membrana, di promozione dell'interazione tra le due proteine e di reclutamento dei filamenti di actina. (Matsuoka et al. 2000).

Le proteine coinvolte nell'interazione spectrina-actina includono tropomodulina, tropomiosina, proteina 4.1, proteina 4.9 e proteina adducina. Queste proteine rivestono un ruolo chiave nell'assemblare e regolare il network di actina e spectrina (Matsuoka et al. 2000).

L'adducina, in particolare, promuove e stabilizza il legame di queste due proteine (Bennett and Baines 2001) modulando la struttura del citoscheletro e l'ubicazione di alcune proteine transmembrana (Manunta et al. 1998). La struttura dei protofilamenti di actina viene influenzata dall'effetto concomitante di diverse proteine accessorie: tropomiosina, tropomodulina e adducina. La tropomiosina funge da "righello" molecolare nel definire la lunghezza dei protofilamenti di actina, l'adducina fa da end-capping protein alle estremità fast-growing dei filamenti, mentre la tropomodulina opera il capping alle estremità slow-growing (Matsuoka et al. 2000).

È probabile che le attività di capping dell'actina e di reclutamento della spectrina siano due diversi aspetti di un unico sistema di interazione tra adducina e actina e che quindi il reclutamento della spectrina venga operato da parte dell'adducina al lato terminale del filamento di actina, proprio dove viene operato anche il processo di capping del filamento stesso. Questa ipotesi è supportata dall'osservazione che

entrambe le attività di capping dell'actina e di reclutamento della spectrina sono inibite dal legame della calmodulina e dalla fosforilazione da parte della PKC. La fosforilazione da parte della PKC avviene a livello del dominio MARCKS dell'adducina, lo stesso dominio responsabile del legame alla membrana cellulare attraverso l'interazione tra i residui basici presenti nel dominio MARCKS e i fosfolipidi acidi (come la fosfatidilserina). La fosforilazione dei residui di serina nella sequenza MARCKS provoca una riduzione dell'interazione elettrostatica con i fosfolipidi e costituisce il meccanismo mediante il quale l'adducina, con il suo dominio MARCKS, interagirebbe in modo reversibile con il plasmalemma (Matsuoka et al. 2000).

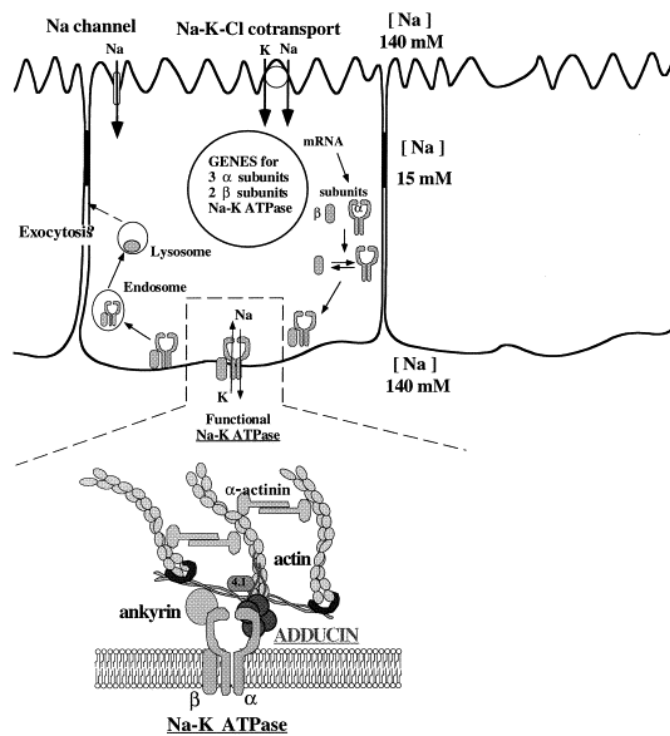


Figura 2.4 - Modello schematico delle interazioni della proteina adducina con il citoscheletro e con le proteine di membrana in una cellula di epitelio tubulare renale. L'adducina è rappresentata associata con i filamenti di actina e con la subunità α della pompa Na^+/K^+ -ATPasi. I filamenti di actina sono associati ai filamenti di spectrina e ad altri componenti del citoscheletro sottomembranario come anchirina e integrina. La pompa Na^+/K^+ -ATPasi è responsabile dell'instaurazione del gradiente di ione sodio a cavallo della membrana basolaterale che consente l'ingresso di ione sodio attraverso la membrana luminale.

Nelle cellule epiteliali i complessi adducina-anchirina-spectrina fanno da

collegamento strutturale tra la membrana plasmatica e il citoscheletro di actina (Naydenov and Ivanov 2010) [Figura 2.4]; in queste cellule l'adducina è particolarmente abbondante nei siti di contatto cellula-cellula ed è anche presente a livello delle vescicole di clatrina, dove si trova associata con la clatrina stessa (Torielli et al. 2008).

2.2.3 Ruolo nell'ipertensione

Un polimorfismo genetico a carico del gene dell' α -adducina è stato dimostrato essere associato a variazioni della pressione sanguigna nei ratti Milano ipertesi (MHS, polimorfismo F316Y) e in un sottogruppo di pazienti ipertesi (polimorfismi G460W ed S586C), facendo così dell'adducina uno dei candidati per lo sviluppo di ipertensione essenziale (Torielli et al. 2008).

La frequenza dell'allele mutato dell'adducina è stato calcolato essere dell'8% nelle popolazioni africane, del 12% nelle popolazioni afroamericane, tra il 22% e il 25% in quelle caucasiche e maggiore del 50% nelle popolazioni asiatiche (Bianchi 2005).

Studi funzionali e biochimici, sia in vitro che in vivo, in ratto e uomo, indicano che le varianti mutate influenzano la pressione del sangue tramite un'azione sui diversi meccanismi di trasporto ionico negli epitelii renali.

Gli studi in vitro hanno mostrato che l'espressione delle varianti mutate dell'adducina attivano la Na^+/K^+ -ATPasi più di quanto avviene quando è espressa la proteina wild-type, per via di un aumento dell'affinità della pompa per l'ATP e di un'accelerazione del cambio conformazionale della pompa stessa grazie ad un'interazione diretta tra pompa e adducina.

Inoltre l'aumento di attività della pompa, osservato in presenza di adducina mutata, è in parte dovuto alla diminuzione dei livelli di endocitosi della pompa stessa. L'adducina si trova infatti associata con la proteina fosfatasi A_2 (PPA_2) che opera la defosforilazione della proteina adattina A_2 (AP-2). In condizioni basali, l'associazione PPA_2 - α -adducina è ridotta in presenza di adducina mutata. Poiché lo stato di fosforilazione di una proteina è il risultato di un corretto bilanciamento tra l'azione di proteine chinasi e proteine fosfatasi, la riduzione dell'associazione tra

fosfatasi A₂ e adducina favorisce lo stato fosforilato della proteina adaptina A2 (Bianchi 2005). L'associazione tra AP-2 e pompa Na⁺/K⁺-ATPasi è l'evento chiave per il reclutamento della clatrina che dà il via alla formazione delle vescicole di endocitosi. Lo sbilanciamento di questo processo endocitotico è il meccanismo molecolare che sta alla base dell'aumento di espressione, e quindi di attività, della pompa, osservato in presenza della variante mutata dell'adducina (Bianchi 2005) [Figura 2.5].

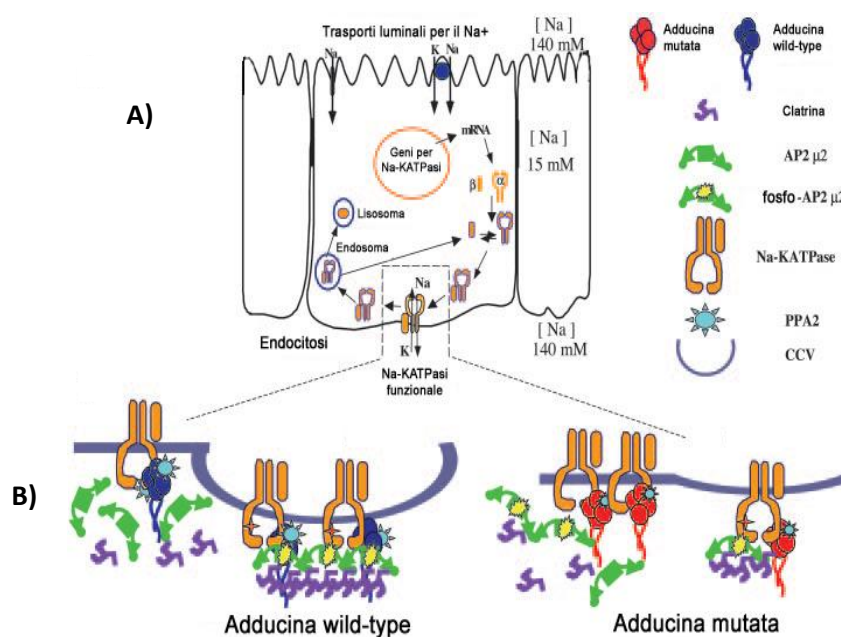


Figura 2.5 – A) Influenza del polimorfismo dell'adducina sull'endocitosi della pompa Na⁺/K⁺-ATPasi e sul riassorbimento di sodio. È mostrato il ciclo di inserimento e rimozione della pompa a livello della membrana basolaterale di cellule tubulari renali. La ridotta endocitosi della pompa comporta un suo aumento di espressione, che, a sua volta, provoca un incremento del riassorbimento di sodio. B) È mostrata l'interazione di alcune proteine coinvolte nei processi endocitotici. In presenza di adducina mutata l'associazione tra adducina e PPA₂ è ridotta, ciò sbilancia il ciclo fosfo-defosforilativo di AP-2, favorendone lo stato fosforilato. L'equilibrio di questo processo sta alla base del reclutamento della clatrina per la formazione delle vescicole di endocitosi e un suo sbilanciamento potrebbe costituire il meccanismo molecolare che provoca la ridotta endocitosi della pompa osservata in presenza di adducina mutata.

L'influenza dell'adducina nel processo di endocitosi non è limitata alla sola pompa Na⁺/K⁺, è stato infatti riportato un effetto inibitorio delle varianti mutate dell'adducina sui processi endocitotici in generale; questo effetto sembra possa essere dovuto alla rigidità del citoscheletro di actina indotta dall'espressione

dell'adducina mutata, infatti un citoscheletro actinico rigido ha un effetto inibitorio sul trafficking proteico membranario (Torielli et al. 2008).

La pompa Na^+/K^+ -ATPasi non è l'unico sistema di trasporto renale interessato dalla mutazione dell'adducina. È stato infatti dimostrato che nei ratti Milano ipertesi l'espressione basolaterale dell'aquaporina 4 nelle cellule principali del dotto collettore è incrementata. Questo aumento di espressione e attività di AQP4 sembra possa contribuire all'aumento del volume di fluido extracellulare tipico dell'ipertensione "sodio sensibile". In analogia con la pompa Na^+/K^+ -ATPasi, AQP4 è espressa sulla membrana basolaterale delle cellule epiteliali del tubulo renale e la sua endocitosi è regolata dall'interazione con il complesso adattatore AP-2. Saggi di endocitosi in vitro, condotti su cellule renali esprimenti l'aquaporina 4, hanno mostrato che l'endocitosi costitutiva di AQP4 è fortemente inibita in presenza della variante mutata dell'adducina (Procino et al. 2011).

Inoltre è stato dimostrato un aumento del riassorbimento di sodio dovuto alla upregolazione del cotrasportatore NKCC2 a livello delle cellule del tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle (TAL). In particolare, durante le fasi di induzione dell'ipertensione nei giovani ratti MHS, questo incremento di attività di NKCC2 è dovuto all'aumento di espressione del cotrasporto stesso, mentre nelle cellule di TAL di ratti MHS adulti, in cui l'ipertensione è ormai conclamata, l'espressione di questo cotrasportatore risulta invariata, se paragonati a ratti MNS di età corrispondente (Capasso et al. 2008). Nei ratti adulti, infatti, l'incremento di attività di NKCC2 osservata va messa in relazione all'aumento della forma fosforilata del cotrasportatore rispetto al totale (Carmosino et al. 2011). Ciò sembra suggerire un ruolo chiave di NKCC2 sia nella genesi che nel mantenimento dello stato ipertensivo in questo modello animale.

I ratti MHS adulti presentano anche una upregolazione del cotrasporto NCC espresso a livello della membrana apicale delle cellule del tratto convoluto distale (DCT), e, a livello della membrana basolaterale di queste cellule, un incremento di espressione dei canali Cl^-/K^+ , responsabili dell'uscita basolaterale di cloruro (Capasso et al. 2008).

Sembra dunque che le mutazioni dell'adducina possano direttamente o indirettamente avere un impatto sui sistemi di trasporto di sodio e cloruro a livello reanle.

2.3 Il CFTR

Il CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) è un canale per il cloruro codificato da un gene responsabile, se mutato, dell'insorgenza di fibrosi cistica, una delle patologie genetiche autosomiche recessive letali più comuni nella popolazione caucasica. Esistono più di mille mutazioni a carico del gene del CFTR, molte di queste provocano una riduzione del numero o dell'attività dei canali sulla membrana cellulare (Hanrahan and Wioland 2004). La perdita di funzione del CFTR provoca anomalie nel trasporto di cloruro e si manifesta di conseguenza con la produzione di secrezioni mucose anormalmente dense, viscosi e disidratate, che determinano l'ostruzione dei principali dotti ghiandolari, provocando le manifestazioni cliniche tipiche della malattia: gravi disturbi alle vie aeree, infezioni batteriche polmonari, insufficienza pancreatica, incremento della concentrazione di NaCl nel sudore, infertilità maschile (Guggino and Stanton 2006). Morbidità e mortalità associate alla fibrosi cistica sono principalmente dovute all'infezione batterica cronica e all'infiammazione polmonare (Gadsby, Vergani and Csanady 2006).

2.3.1 Struttura e interazioni

Il gene del CFTR, collocato nella regione q21-31 del cromosoma 7, codifica una proteina di 165 kDa, composta da 1480 amminoacidi.

Il CFTR è un membro della famiglia di trasportatori ABC (ATP Binding Cassette), famiglia che comprende proteine integrali di membrana (come ad esempio MDR e P-glicoproteina) in grado di legare l'ATP e di sfruttarne l'energia per permettere il passaggio di molecole o ioni a cavallo della membrana cellulare.

Come membro della famiglia ABC, il CFTR presenta la struttura tipica di questi trasportatori. È infatti composto da due domini transmembranari (TMD1 e TMD2), ciascuno formato da sei segmenti ad α elica, da due nucleotide-binding domain citoplasmatici (NBD1 e NBD2). Tra il dominio NBD1 e il dominio TMD2 si trova il dominio regolatorio R, che rende il CFTR unico tra i trasportatori ABC; questo dominio regolatorio è composto da 200 amminoacidi e contiene siti multipli di fosforilazione per le proteine chinasi A e C (PKA e PKC), importanti per la regolazione della funzionalità del canale [Figura 2.6].

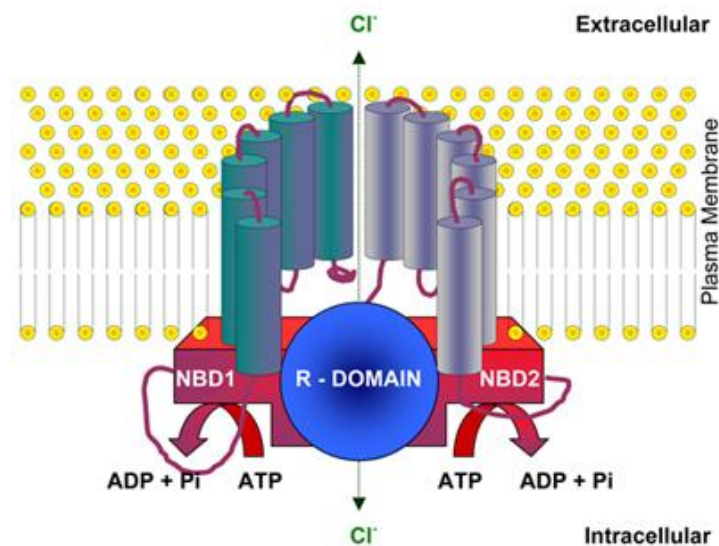


Figura 2.6 - Struttura del canale CFTR. Sono mostrati i due domini transmembranari, TMD1 e TMD2 ciascuno composto da sei segmenti, i due nucleotide-binding domains, NBD1 e NBD2 e il dominio regolatorio R.

I domini NBD contengono motivi caratteristici della famiglia dei trasportatori ABC: il primo è il dominio Walker A, contenente una lisina in grado di interagire con il fosfato terminale dell'ATP; il secondo è il dominio Walker B, contenente un aspartato che aiuta a coordinare il magnesio durante il processo di idrolisi dell'ATP (Hanrahan and Wioland 2004). Un'altra sequenza caratteristica nei domini NBDs è il motivo "firma": LSGGQ e LSHGH nei domini NBD1 e NBD2 rispettivamente; questi domini "firma" sono situati nelle vicinanze di tre eliche, in grado di ruotare quando i NBDs legano l'ATP (Hanrahan and Wioland 2004).

Alcuni studi hanno permesso di ipotizzare che il poro del CFTR sia localizzato a livello del sesto segmento transmembranario del dominio TMD1, infatti, a sostegno di questa ipotesi, è noto che il sesto segmento contenga almeno tre residui basici (Arg334, Lys335, Arg347), importanti per la selettività anionica del canale (Gadsby et al. 2006).

Sembra inoltre che gli anioni, come il cloruro, tendano ad accumularsi nei pressi delle regioni cariche positivamente localizzate nei domini transmembrana formanti il poro (Gadsby et al. 2006). Il prerequisito per l'apertura del poro del canale è la fosforilazione dei siti multipli del dominio regolatorio R da parte di PKA e PKC; in seguito a fosforilazione di tali residui, l'attività del canale aumenta di circa cento volte.

L'apertura e la chiusura del poro del CFTR sono modulate rispettivamente dalla formazione e dalla distruzione del dimero tra i due domini NBD.

L'evento chiave per l'apertura del canale è il legame di una molecola di ATP a ciascun NBD, ciò provoca l'avvicinamento dei due domini, e, a sua volta, questa modifica strutturale, comporta l'apertura del poro (Gadsby et al. 2006). L'apertura del CFTR viene mantenuta finché l'idrolisi dell'ATP non provoca l'allontanamento dei due NBD e la conseguente chiusura del poro (Gadsby et al. 2006) [Figura 2.7]. La concentrazione di ATP è quindi limitante per l'attività del canale, ma, a concentrazioni di ATP saturanti, altri meccanismi intervengono nel controllo degli eventi di apertura e chiusura del canale. Uno di questi è la concentrazione di cationi bivalenti, in particolare di Mg^{2+} , infatti, a concentrazioni di ATP saturanti, in assenza di Mg^{2+} , la velocità di apertura del canale è solo il 2% rispetto alla massima velocità raggiungibile in presenza di tali ioni (Gadsby et al. 2006).

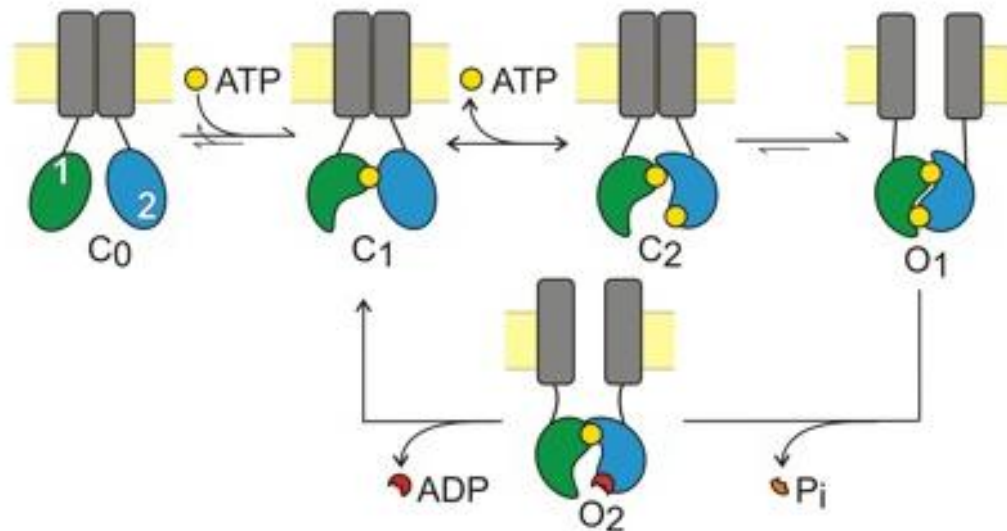


Figura 2.7 - Schematizzazione dei processi di aperture e chiusura del CFTR. Una molecola di ATP lega il NBD1 (C1) per alcuni minuti durante i quali avvengono numerosi eventi di apertura/chiusura del canale. Un'altra molecola di ATP lega il NBD2 (C2), ciò determina la formazione del dimerico NBD1-NBD2, cui segue l'apertura del poro del canale (O1). Lo stato aperto del canale si destabilizza con l'idrolisi della molecola di ATP legata al NBD2 (O2) e la chiusura del canale è determinata dalla rottura del dimerico NBD1-NBD2.

Studi di cristallografia condotti sui trasportatori ABC hanno portato ad ipotizzare che una proteina ABC funzionale debba contenere due domini TMD e due NBD, ciò, per il CFTR, significa che un singolo polipeptide sia funzionale; questa teoria è confermata dagli studi funzionali (Gadsby et al. 2006). È noto comunque che due molecole di CFTR possano associarsi mediante i loro domini PDZ. Il dominio PDZ è composto da 80-100 amminoacidi, è localizzato al C-terminale della proteina e, generalmente, ha la funzione di mediare le interazioni proteina-proteina, di permettere la colocalizzazione e la clusterizzazione di trasportatori, canali e proteine segnale, di consentire la polarizzazione di alcune proteine, di controllare l'attività di canali e trasportatori e di regolare il trafficking endocitico (Guggino and Stanton 2006). La sequenza del dominio d'interazione PDZ del CFTR umano è Asp-Thr-Arg-Leu e, oltre a consentire la dimerizzazione del canale, permette il legame ad altre proteine contenenti anch'esse lo stesso dominio PDZ, ad esempio: NHERF1 (Na^+/H^+ exchanger regulatory factor isoform 1), NHERF2 (Na^+/H^+ exchanger regulatory factor isoform 2), CAP70 (CFTR associated protein), CAL (CFTR associated ligand). Studi di FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) hanno mostrato che l'interazione tra queste proteine avviene a livello della membrana

plasmatica e che si tratta di interazioni altamente dinamiche che si realizzano nell'arco di secondi o addirittura millisecondi (Guggino and Stanton 2006). Proprio grazie a queste interazioni il dominio PDZ del CFTR è in grado di consentire l'espressione polarizzata del canale sulla membrana apicale delle cellule epiteliali. Infatti la delezione di questo dominio di interazione (CFTR- Δ TRL) impedisce la localizzazione polarizzata del CFTR sulla membrana apicale, determinandone una diminuita espressione e, di conseguenza, compromettendone la funzionalità. Questo perché inizialmente il CFTR viene indirizzato dal Golgi verso le membrane apicale e basolaterale in modo random, ma è poi ritenuto a livello della membrana apicale proprio grazie alle interazioni, mediate dal dominio PDZ, con le proteine contenenti tale dominio. Inoltre, l'interazione del CFTR con queste proteine PDZ ha la funzione di promuovere e facilitare il riciclo endocitico del canale verso la membrana apicale, aumentandone l'emivita in membrana. Quando il dominio PDZ è deletato (CFTR- Δ TRL) il pattern di interazioni del CFTR con le proteine PDZ risulta compromesso e, di conseguenza, il riciclo risulta meno efficiente e l'emivita del canale in membrana si riduce, da circa 24 ore a circa 13 ore (Swiatecka-Urban et al. 2002).

Oltre al dominio PDZ, il CFTR contiene altri domini di interazione proteina-proteina: all'N-terminale si trova il dominio di interazione con syntaxina-1A e con la proteina sinaptosoma-associata, al C-terminale presenta due domini per l'endocitosi, un dominio di legame alla proteina fosfatasi 2A e un dominio di legame alla AMP chinasi (Guggino and Stanton 2006).

Tutte queste interazioni sono fondamentali per la fine regolazione dell'attività del CFTR. Ad esempio, infatti, la fosforilazione, e quindi l'attivazione del canale, è facilitata dall'interazione del CFTR con le proteine NHERF1/NHERF2 e con l'ezrina, quest'ultima lega la subunità regolatoria della PKA oltre al network submembranario actinico. L'ezrina funge da switch molecolare, che, quando attivata da PKC, fosfatidilinositolo bisfosfato e Rho GTPasi, lega NHERF e ne aumenta l'affinità, mediata dal dominio PDZ, per il CFTR. Ciò facilita la formazione di micro domini in cui la PKA può efficientemente fosforilare il canale. Al contrario

invece due proteine appartenenti alla famiglia SNARE, SNAP23 e SYN1A, quest'ultima ancorata alla membrana plasmatica, legano l'N-terminale del CFTR, nello specifico gli amminoacidi da 1 a 79, e, interagendo anche tra loro, riducono l'attivazione PKA-dipendente del CFTR (Guggino and Stanton 2006).

Fondamentali sono anche le interazioni del CFTR con gli elementi del citoscheletro actinico. È noto che numerosi elementi del citoscheletro, inclusi l'actina stessa e le proteine ad essa associate, ancorano, co-localizzano e regolano la stabilità e la funzionalità delle proteine trasportatrici (Cantiello 2001). Da un'analisi della sequenza amminoacidica del CFTR è emerso che i domini NBD del canale contengono sequenze conservate che mostrano omologia con i domini di legame dell'actina, sia delle proteine actin-capping, sia delle proteine actin-crosslinking (Cantiello 2001). Il CFTR risulta essere regolato dall'organizzazione del citoscheletro, sia tramite un'interazione diretta con l'actina che mediante un'interazione con le proteine associate all'actina. In particolare è riportato che l'interazione funzionale tra il canale e i filamenti di actina moduli l'attivazione del CFTR con un meccanismo indipendente dal pathway regolatorio mediato da cAMP e PKA (Cantiello 1996). Infatti l'aggiunta di actina esogena e delle proteine ad essa associate è in grado di indurre l'attivazione del canale. Non solo, i processi che, in generale, comportano un aumento della disponibilità di corti filamenti di actina, sia per via di un accorciamento dei filamenti pre-esistenti, sia per via della sintesi di nuovi filamenti, provocano l'attivazione del CFTR. Al contrario, una diminuzione del numero di filamenti corti di actina, sia per via di un'inibizione della polimerizzazione dell'actina, sia per via di un "impacchettamento" dei filamenti stessi, ha come conseguenza una diminuita attivazione del CFTR. La completa distruzione del citoscheletro di actina previene completamente la possibilità di attivazione cAMP-dipendente del canale; ciò suggerisce che l'effetto regolatorio del citoscheletro e l'effetto stimolatorio del pathway mediato da PKA siano combinati e collegati nella regolazione dell'attività del CFTR (Cantiello 1996).

2.3.2 Glicosilazione e localizzazione cellulare

Tra le modificazioni post-traduzionali che agiscono sul CFTR, riveste grande importanza la glicosilazione, in grado di determinarne la localizzazione subcellulare. Infatti, proprio in quanto proteina integrale di membrana, il CFTR risiede almeno transientemente in tutti i compartimenti del pathway secretorio proteico, prima di migrare verso la superficie cellulare. Per questo si può trovare sulle membrane del reticolo endoplasmatico, a livello del Golgi e dei compartimenti endosomiali e lisosomiali delle cellule epiteliali (Bertrand and Frizzell 2003). Dopo la sintesi, a livello del reticolo endoplasmatico, la proteina viene “core-glycosylated”, mediante l’attacco di catene oligosaccaridiche ai residui di asparagina in posizione 894 e 900, nel quarto loop extracellulare del TMD2 (Rogan, Stoltz and Hornick 2011). Da qui il CFTR viene trasportato all’apparato di Golgi dove subisce un’ulteriore modifica dei suoi residui glicidici con la produzione della proteina matura, “fully-glycosylated”. A questo punto la proteina è pronta per essere secreta a livello della membrana apicale. Tutti questi step sono strettamente regolati da complessi network di interazione con chaperonine e cochaperonine. Alla corretta localizzazione in membrana del canale partecipano inoltre complessi macromolecolari di proteine dotate di dominio PDZ in grado di legare il dominio PDZ del CFTR (Cholon et al. 2010). A seconda del livello di glicosilazione del canale si possono distinguere tre isoforme del CFTR: la proteina appena sintetizzata, non glicosilata, con peso molecolare di circa 130 kDa, detta banda A; la forma “core-glycosylated”, prodotta dal reticolo endoplasmatico, con peso molecolare di circa 150 kDa, detta banda B; la forma “fully-glycosylated”, prodotta dal Golgi, con peso molecolare di circa 170 kDa, detta banda C.

Quest’ultima è l’unica forma in grado di localizzare correttamente a livello della membrana apicale della cellula (Cheng et al. 1990), il CFTR deglicosilato è altamente instabile in questo distretto e tende ad essere rapidamente internalizzato (Cholon et al. 2010). La mancanza delle catene oligosaccaridiche infatti non ha effetti sul sorting del canale verso la membrana apicale, ma piuttosto la rimozione di tali catene influenza il turnover del canale e la sua stabilità risulta essere

significativamente diminuita (Chang et al. 2008).

Alcuni studi sono stati volti a chiarire la distribuzione del CFTR tra i diversi compartimenti cellulari, in particolare tra la membrana plasmatica e la regione intracellulare. Via immunoblot si è osservato che, in molte cellule epiteliali che esprimono il canale in modo endogeno, il livello di espressione della banda B, in condizioni basali, è relativamente basso. Ad esempio nelle cellule respiratorie Calu-3 il rapporto tra banda C e banda B è pari a circa 10. Ciò indica che la maggior parte del CFTR espresso endogenamente localizza nei compartimenti distali del pathway secretorio della proteina. Queste osservazioni sono confermate anche dai dati derivanti da studi di microscopia confocale su linee cellulari epiteliali umane esprimenti il CFTR nativo che hanno mostrato una localizzazione del canale prevalentemente membranaria (Bradbury et al. 1999). In particolare il CFTR risulterebbe associato alla membrana apicale di tessuti epiteliali assorbenti e secernenti di numerosi organi tra cui i polmoni, il pancreas, l'intestino, il cuore, le ghiandole sudoripare e il rene.

Studi condotti invece sulla localizzazione del CFTR transfettato in transiente hanno mostrato una localizzazione debole a livello del plasmalemma. Il segnale di localizzazione del canale risultava essere prevalente a livello intracellulare probabilmente proprio per via dell'overespressione della proteina (Bertrand and Frizzell 2003).

Benchè non ci siano dubbi sul fatto che il CFTR sia funzionalmente attivo quando esso si trova a risiedere in membrana, numerosi studi hanno mostrato che una quota significativa - approssimativamente metà (Prince, Workman and Marchase 1994) - del CFTR maturo (banda C) presenta una localizzazione subapicale, a livello di compartimenti intracellulari, soprattutto vescicole submembranarie. La natura di queste vescicole non è del tutto chiara, ma almeno una porzione farebbe parte del pathway di riciclo endocitico, parte di queste vescicole sembrano infatti derivare dai processi di fusione/fissione al/dal plasmalemma (Bradbury et al. 1999).

Gli stessi studi hanno evidenziato inoltre che il CFTR in questi compartimenti può essere funzionalmente attivo e che la stimolazione da parte del cAMP può modulare

la distribuzione del canale tra i compartimenti intracellulari e la membrana plasmatica (Bertrand and Frizzell 2003).

2.3.3 Funzioni

Il CFTR è un canale per il cloruro a bassa conduttanza (9 pS), la cui attività è modulata da diversi metaboliti intracellulari come ATP e AMP ciclico. Oltre alla funzione di canale per il cloruro, il CFTR ha anche altre importanti funzioni: gioca un ruolo chiave nell'acidificazione delle vescicole intracellulari, nel processamento e nel trafficking proteico, nella secrezione di ATP (Morales, Falkenstein and Lopes 2000) ed è inoltre in grado di regolare svariate proteine di trasporto tra cui il canale epiteliale del sodio, ENaC [Figura 2.8], il canale per il potassio, ROMK2, gli scambiatori di anioni, le aquaporine (Guggino and Stanton 2006), il canale per il cloruro a rettificazione uscente, ORCC (Morales et al. 2000). La regolazione di questi meccanismi di trasporto ad opera del CFTR è permessa da complessi di macromolecole contenenti anch'esse un dominio PDZ come ad esempio NHERF1. Quest'ultima incrementa per esempio l'interazione tra CFTR ed ENaC.

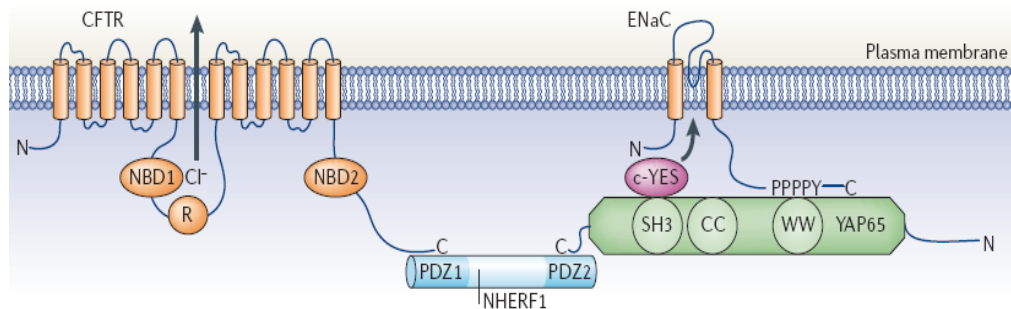


Figura 2.8 - Esempificazione del ruolo di regolatore che il CFTR svolge nei confronti di altre proteine: NHERF1 (Na^+/H^+ exchanger regulatory factor isoform-1) media l'interazione tra il CFTR e il canale epiteliale per il sodio ENaC, facilitando la reciproca regolazione tra questi due canali.

2.3.4 Trafficking

Il numero di canali sulla membrana apicale cellulare è in buona parte determinato dal riciclo endocitico del CFTR dalla membrana plasmatica alle vescicole di riciclo e

dalla sua inserzione in membrana.

È infatti noto che un numero sempre maggiore di proteine di trasporto vada incontro ad inserzione in membrana mediata da esocitosi in seguito a stimolazione della cellula, mentre altre proteine transmembrana sono soggette a continuo trafficking sia in presenza che in assenza di stimolazioni, è quest'ultimo il caso ad esempio di GLUT4, il cotrasportatore di sodio e glucosio di miociti ed adipociti. Sembra che il CFTR non solo sia in grado di modulare il turnover vescicolare nei pathway eso/endocitotici ma che sia in grado di modulare il suo stesso trafficking (Bradbury et al. 1999).

Il "ciclo vitale" del CFTR è costituito da quattro fasi:

- la biosintesi del canale, che comprende la maturazione conformazionale e il trasporto dal reticolo endoplasmatico alla membrana cellulare,
- il recupero dal plasmalemma tramite l'endocitosi in vescicole di riciclo,
- il ricollocamento del CFTR dagli endosomi alla membrana,
- l'endocitosi finale del canale che si conclude con la sua degradazione (Ameen, Silvis and Bradbury 2007).

Numerosi studi hanno dimostrato che l'endocitosi del CFTR avviene mediante l'internalizzazione del canale in vescicole rivestite di clatrina [Figura 2.9]. Il processo è promosso dal riconoscimento e dall'associazione del complesso adattatore della clatrina, AP-2, mediante la sua subunità μ 2, al dominio di internalizzazione ricco in tirosine e dileucine, situato al C-terminale del canale (Weixel and Bradbury 2001). La subunità β 2 di AP-2 provvede poi al reclutamento della clatrina, mentre la subunità α 2 lega le proteine accessorie coinvolte nell'assemblaggio delle vescicole di endocitosi (Fu et al. 2012).

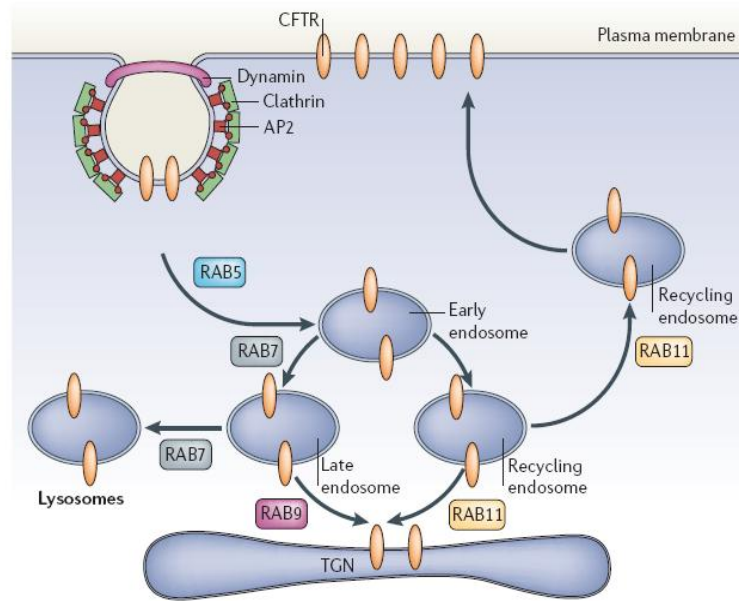


Figura 2.9 - Schematizzazione del processo di internalizzazione del CFTR. Il canale è endocitato dalla membrana apicale con un processo clatrina-dipendente che coinvolge la dinamina, indispensabile per la formazione delle vescicole, e la proteina adattatrice AP-2, che lega la clatrina e il C-terminale del CFTR. Numerosi membri della famiglia Rab partecipano al controllo dell'endocitosi del canale.

Il turnover del CFTR avviene ad una velocità di 10% al minuto, il canale ha un'emivita di circa 12-24 ore (Rogan et al. 2011) e circa il 50% del CFTR internalizzato nelle vescicole endocitiche viene riciclato in membrana (Ameen et al. 2007).

I processi di endocitosi e riciclo sono regolati in modo estremamente dinamico, influenzando la localizzazione del canale e di conseguenza il trasporto di cloruro transepiteliale ma anche la capacità del CFTR di regolare la funzione di altri meccanismi di trasporto. A regolare questi processi partecipa un complesso di proteine che comprende: proteine con dominio PDZ, proteine SNARE, Rho GTPasi, Rab GTPasi, miosina VI.

Tra le proteine con dominio PDZ di particolare importanza sono NHERF1 e CAL. La prima è indispensabile per un'efficiente endocitosi del canale in quanto lega sia l'estremità C-terminale del CFTR che l'ezrina, proteina che a sua volta lega l'actina (Guggino and Stanton 2006), mentre l'overespressione di CAL causa la riduzione del

numero di canali CFTR in membrana e ne facilita l'internalizzazione nei lisosomi (Guggino and Stanton 2006).

Tra le proteine SNARE rivestono un ruolo importante SYN6 e SYN8. SYN6 è coinvolta nel trafficking vescicolare del CFTR tra l'apparato del Golgi e gli endosomi, SYN8, legando l'N-terminale e forse anche il dominio R del canale, è coinvolta nel trafficking vescicolare del CFTR tra endosomi e ha la funzione di inibirne l'esocitosi e quindi il riciclo, riducendo così i livelli di espressione del canale in membrana.

Tra le Rho GTPasi, TC10 è in grado di dirigere le vescicole contenenti il CFTR verso la membrana plasmatica e quindi di incrementare i livelli di espressione del canale mentre Rme-1 non ha nessun ruolo nel trafficking e nell'endocitosi ma regola l'uscita del CFTR dalle vescicole di riciclo.

Rab GTPasi è un'ampia famiglia di proteine i cui membri sono coinvolti nel trasporto intracellulare e nella localizzazione del CFTR; tra queste, Rab 5 regola il trafficking del CFTR dalla membrana apicale agli endosomi, da qui il CFTR è riciclato in membrana grazie a Rab 11, Rab 7 controlla il passaggio del CFTR dagli endosomi ai lisosomi, infine Rab 9 controlla il passaggio del canale dagli endosomi all'apparato del Golgi. Anche la miosina VI riveste un importante ruolo nel processo di endocitosi: le miosine sono proteine che sfruttano l'energia dell'ATP per spostarsi, e spostare le vescicole a loro legate, lungo i filamenti di actina. La miosina VI ha la caratteristica di traslocare le vescicole verso l'"estremità meno" dei filamenti di actina, cioè dalla membrana verso l'interno della cellula, direzione coerente con un ruolo attivo nel processo endocitotico (Ameen et al. 2007).

Infine, un altro elemento importante nel processo di endocitosi è la proteina Dab2: in grado di interagire con la subunità $\alpha 2$ di AP-2, Dab2 sembra far parte di quel pool di proteine reclutate da AP-2 durante il processo di internalizzazione. Esperimenti condotti sui knockdown simultanei di AP-2 e Dab2 hanno mostrato effetti simili, per quanto riguarda l'endocitosi del CFTR, alla deplezione di una sola delle due proteine, suggerendo che esse cooperino al processo di internalizzazione e che, la deplezione di una delle due elimini la funzionalità dell'altra (Fu et al. 2012). È inoltre noto che Dab2 interagisca con la miosina VI, funzionando come una sorta di "ponte"

tra AP-2 e il citoscheletro di actina. La deplezione di Dab2 ha l'effetto di portare ad un forte incremento dell'emivita del CFTR; sembra che Dab2 giochi anche un ruolo importante nel trafficking post endocitico del CFTR, sia per quanto riguarda il riciclo sia per quanto riguarda lo spostamento del canale verso i compartimenti di degradazione (Fu et al. 2012).

Un ruolo chiave nel processo di trafficking è svolto anche dalla fosforilazione del CFTR da parte della PKA che provoca una riduzione dell'endocitosi del canale (Lukacs et al. 1997). Il CFTR viene infatti internalizzato rapidamente per via dell'interazione della sua regione C-terminale con il complesso adattatore AP-2; l'inibizione PKA-mediata dell'endocitosi del CFTR può essere il risultato dell'occlusione/ostruzione del sito di binding di AP-2 al C-terminale del canale, dovuta proprio ad un evento di fosforilazione. Per esempio ciò può essere il risultato dell'interazione fisica del dominio R fosforilato con la coda C-terminale che la proteina adattatrice lega, oppure potrebbe essere il risultato dell'intervento di un'altra proteina, la cui associazione al C-terminale è proporzionale al livello di fosforilazione del CFTR. Un'altra possibilità è che il dominio C-terminale stesso possa essere alterato da eventi di fosforilazione. La caratteristica alla base di questo modello sta nell'accessibilità, fosforilazione-dipendente, del C-terminale, al legame della proteina adattatrice AP-2 (Bertrand and Frizzell 2003).

2.3.5 Localizzazione nel rene e ruolo nell'ipertensione

Come già anticipato, numerosi studi hanno dimostrato la presenza del CFTR nel rene e il suo mRNA è stato identificato in tutti i segmenti del nefrone (Morales et al. 2000) e risulta abbondantemente espresso soprattutto a livello della corticale e della midollare esterna, meno nella midollare interna (Devuyst and Guggino 2002).

Pazienti affetti da fibrosi cistica presentano gravi alterazioni in diversi epiteli ma non evidenziano alcuna alterazione a livello renale, sebbene abbiano una ridotta secrezione di NaCl e una diminuita capacità di concentrare e diluire le urine.

A livello del tubulo convoluto prossimale esperimenti di immunolocalizzazione hanno confermato la presenza del CFTR a livello della membrana apicale, mentre

esperimenti di patch-clamp ne hanno localizzato l'attività sulla membrana basolaterale (Morales et al. 2000). Nel tratto ascendente sottile dell'ansa di Henle è stato identificato l'mRNA codificante per il canale ma né gli studi di immunolocalizzazione né gli studi elettrofisiologici ne hanno confermato espressione ed attività (Morales et al. 2000). Nel tratto ascendente spesso dell'ansa, studi di patch-clamp hanno mostrato la presenza, sulla membrana basolaterale, di un canale per il cloruro a bassa conduttanza (9 pS), dipendente da ATP e Mg^{++} ; questo canale è stato denominato pseudo CFTR in quanto risulta essere funzionale anche nel topo knock out per il CFTR (Morales et al. 2000). A livello del tubulo convoluto distale, il CFTR è stato individuato sia mediante gli studi di immunolocalizzazione sia mediante gli studi di elettrofisiologia sulla membrana apicale. Nel tubulo connettore il canale non è stato identificato mentre nel dotto collettore localizza a livello della membrana apicale delle sole cellule principali (Morales et al. 2000).

La funzione del CFTR nel rene non è ancora stata del tutto chiarita. È stato però osservato che pazienti affetti da fibrosi cistica mostrano una tendenza minore a sviluppare ipertensione con l'età (Super 2000). Inoltre, in ratti affetti da sindrome di Liddle, forma ipertensiva autosomica dominante, legata alla ritenzione di sodio, si osserva un incremento dell'attività del CFTR, correlato ad un aumento di attività del canale epiteliale per il sodio ENaC.

Inoltre dati recenti del nostro laboratorio indicano che, nelle cellule isolate del tubulo convoluto distale dei ratti Milano ipertesi (MHS), si osserva un aumento significativo dell'espressione e dell'attività del CFTR, rispetto a quanto si osserva nei ratti Milano normotesi (MNS).

Poiché inoltre il riassorbimento di cloruro a livello renale è correlato al riassorbimento di sodio e poiché è noto che il CFTR sia in grado di agire come regolatore dell'attività di altri canali e trasportatori di membrana, il CFTR sembra possa essere coinvolto nell'insorgenza della patologia ipertensiva.

3. Scopo del lavoro

L'ipertensione essenziale è una patologia alla cui insorgenza e al cui mantenimento contribuiscono diversi loci genici e svariati fattori ambientali. Proprio per via della complessità della malattia e della sua multifattorialità risulta difficile comprenderne i meccanismi patogenici.

Dati sperimentali, sia nel modello animale sia in pazienti umani, suggeriscono un forte coinvolgimento del rene nella patologia ipertensiva.

L'ipertensione "sodio sensibile" è stata correlata nei ratti MHS ad alterazioni del trasporto di sodio nei tratti distali del nefrone. Questi ratti presentano inoltre una mutazione a carico della proteina citoscheletrica adducina, mutazione che sembra essere responsabile delle alterazioni di espressione ed attività dei meccanismi di trasporto, quali NKCC2, NCC, aquaporina 4, e, in particolare, della pompa Na^+/K^+ -ATPasi. È inoltre noto che, nei tratti distali del nefrone, il riassorbimento dello ione sodio è correlato a quello dello ione cloruro.

Un canale per il cloruro, espresso nel rene ma le cui funzioni svolte in quest'organo non sono del tutto chiare, è il CFTR. Diverse osservazioni sembrerebbero indicare un coinvolgimento del CFTR nella patologia ipertensiva; dati recenti di patch-clamp ottenuti nel nostro laboratorio hanno mostrato che densità ed attività del CFTR risultano incrementate in colture cellulari primarie di DCT (tubulo convoluto distale) di ratti MHS rispetto a quanto osservato in ratti MNS. Poiché inoltre il CFTR è una proteina cargo, sottoposta, come la pompa Na^+/K^+ -ATPasi, a rapido turnover da e verso la membrana plasmatica, e poiché attività ed espressione del CFTR sono influenzate dal citoscheletro si è voluto studiare se il canale potesse essere influenzato dalla mutazione dell'adducina, così come è già stato osservato per gli altri meccanismi di trasporto.

Gli studi sono stati condotti su cellule HEK (Human Embryonic Kidney) e su cellule NU12 e HU33; le NU12 sono cellule HEK stabilmente transfettate con adducina wild-type, le cellule HU33 sono cellule HEK stabilmente transfettate con adducina

mutata G460W.

Per valutare se l'adducina mutata avesse un impatto funzionale sul CFTR si sono condotti esperimenti di patch-clamp su cellule NU12 e HU33 transfettate con il vettore pIRES2-EGFP in cui era stato subclonato il cDNA codificante per il CFTR. Gli esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell hanno consentito di valutare se l'espressione di adducina mutata avesse un effetto sull'attività del CFTR, mentre gli esperimenti di patch-clamp in configurazione cell-attached hanno permesso di valutare le caratteristiche biofisiche del CFTR e la sua attività di singolo canale, in presenza di adducina wild-type e mutata.

Mediante esperimenti di Western blot si sono studiati i livelli di espressione del canale in cellule NU12 e HU33, transfettate con il vettore di espressione del CFTR, pcDNA3-CFTR, sia a livello dei lisati totali cellulari che a livello della sola frazione di membrane plasmatiche, regione in cui localizza la forma matura, funzionalmente attiva del canale.

La localizzazione del CFTR nei due tipi cellulari è stata valutata mediante esperimenti di immunocitochimica.

Per valutare poi l'esistenza di una possibile interazione tra adducina e CFTR si sono utilizzate le tecniche di FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) e di coimmunoprecipitazione. Gli esperimenti di FRET sono stati condotti su cellule HEK simultaneamente transfettate con CFTR fuso al fluoroforo YFP e adducina, wild-type o mutata, fusa al fluoroforo CFP. Gli esperimenti di coimmunoprecipitazione sono stati condotti su cellule HEK transfettate con CFTR e adducina wild-type con un FLAG tag in C-terminale oppure con un HA tag in N-terminale.

Poiché il CFTR è una proteina che va incontro a continuo trafficking e poiché l'adducina è coinvolta nei processi di endocitosi clatrina-dipendente, si è voluto studiare se l'adducina mutata abbia un effetto sul processo di riciclo endocitico del canale. Si sono quindi condotti esperimenti di FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) su cellule HEK cotransfettate con CFTR fuso a YFP e adducina, wild-type o mutata, fusa a CFP ed esperimenti di fotoattivazione su cellule HEK cotransfettate con CFTR fuso ad una variante fotoattivabile della GFP e adducina,

wild-type o mutata, fusa a CFP.

4. Materiali e Metodi

4.1 Colture cellulari

Gli esperimenti sono stati condotti su cellule HEK 293 Phoenix e HEK293 T (Human Epithelial Kidney), cellule NU12 e HU33. Le cellule sono state fatte crescere a 37 °C, in presenza di 5% CO₂ (95% aria) in un terreno di coltura adeguato [Tabella 4.1].

Composizione terreni di coltura

HEK 293	MEM Minimum Essential Medium Eagle (M5650, Sigma)
	FBS Fetal Bovin Serum (14-801F, Lonza) 10%
	L-glutammina (G7513, Sigma) 200 mM
	Sodio Piruvico (P2256, Sigma) 100 mM
	Penicillina 100 U/ml; Streptomicina 0,1 mg/ml (P4333, Sigma)
NU12 HU33	MEM Minimum Essential Medium Eagle (M5650, Sigma)
	FBS Fetal Bovin Serum (14-801F, Lonza) 10%
	L-glutammina (G7513, Sigma) 200 mM
	Sodio Piruvico (P2256, Sigma) 100 mM
	Penicillina 100 U/ml; Streptomicina 0,1 mg/ml (P4333, Sigma)
	G418 100 µM

Tabella 4.1 – Composizione del terreno di crescita per cellule HEK 293 Phoenix e HEK293 T (HEK 293, parte alta) e per cellule NU12 e HU33 (parte bassa).

Le cellule venivano fatte crescere in piastre Petri dal diametro di 3,5 cm, 6 cm oppure 10 cm; una volta raggiunto l'80% circa della confluenza, lavorando sotto cappa a flusso laminare, in condizioni di sterilità, il terreno di coltura veniva prelevato e le cellule erano lavate con PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) [Tabella 4.2], al fine di rimuovere il terreno residuo in modo da evitare l'inibizione dell'azione della tripsina da parte delle proteine contenute nel siero. Una volta

rimosso il PBS 1X, si aggiungeva una soluzione 0,05% trispina – 0,02% EDTA in PBS (T3924, Sigma) e la si lasciava agire per qualche minuto affinché l'enzima potesse agire staccando le cellule dal fondo della piastra. Per bloccare l'azione della tripsina si aggiungeva un volume opportuno (variabile a seconda delle dimensioni della piastra Petri in cui le cellule erano coltivate) di terreno completo [Tabella 4.1]. Le cellule erano quindi seminate in altre piastre di diametro variabile a seconda dell'esperimento da condurre, aggiungendo un opportuno volume di terreno completo fresco.

Composizione del PBS 1X

NaCl	136,89 mM
KCl	2,69 mM
Na ₂ HPO ₄	3,21 mM
KH ₂ PO ₄	1,47 mM
NaOH	1 mM

Tabella 4.2 - Composizione del PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X, pH 7,4; soluzione tampone, salina, isotonica, comunemente usata come soluzione di lavaggio per le cellule.

4.2 Clonaggio del cDNA per il CFTR nei vettori: pIRES2-EGFP, pEYFP-N1, pEYFP-C1 e pEGFP-C1 fotoattivabile

Il cDNA esprime il CFTR è stato clonato nel vettore pEYFP sia in posizione N-terminale rispetto alla YFP, pEYFP-N1 (Clontech), sia in posizione C-terminale rispetto alla YFP, pEYFP-C1 (Clontech) [Figura 4.1]. È stato inoltre clonato nel vettore pEGFP fotoattivabile, in posizione C-terminale rispetto alla GFP, pEGFP-C1 (Clontech) [Figura 4.1] e nel vettore pIRES2-EGFP (Clontech) [Figura 4.2].

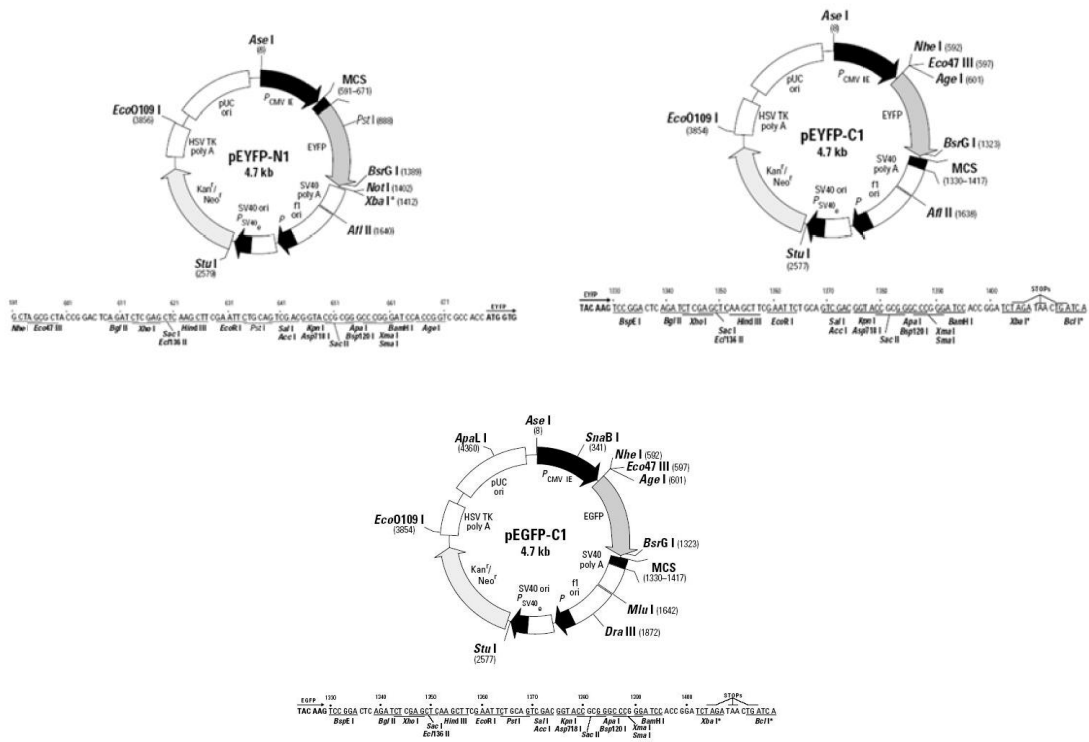


Figura 4.1 - Mappe dei vettori pEYFP-N1, pEYFP-C1, pEGFP-C1, in cui sono evidenziati: 1) il multiple cloning site (MCS) che contiene diversi siti di restrizione unici del vettore e rappresenta il punto in cui viene inserito il cDNA; 2) la sequenza codificante per la proteina fluorescente (YFP o GFP) localizzata in 3' rispetto al MCS per pEYFP-N1 e in 5' rispetto al MCS per pEYFP-C1 e pEGFP-C1; 3) l'origine di replicazione SV40 e un gene che conferisce resistenza alla neomicina (Neo^r) per la selezione (con G418) delle cellule transfettate stabilmente. Un promotore batterico a monte (P) conferisce resistenza alla kanamicina (Kan^r) in E. coli. Il vettore fornisce anche un'origine di replicazione pUC19 per la propagazione in E. coli e un'origine f1 per la produzione di DNA a singola elica.

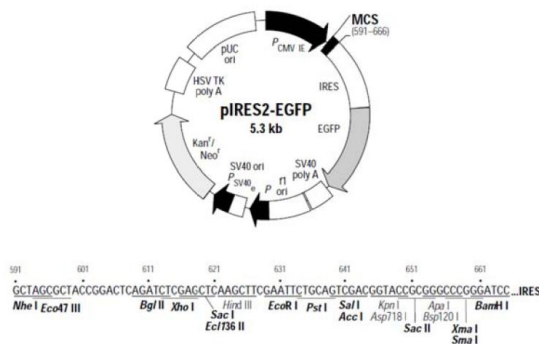


Figura 4.2 - Mappa del vettore pIRES2-EGFP in cui sono evidenziati: 1) il multiple cloning site (MCS) che contiene diversi siti unici di restrizione del vettore e rappresenta il punto in cui viene inserito il cDNA; 2) la sequenza IRES (Internal Ribosome Entry Site) localizzata tra il MCS e la regione EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) corrispondente alla regione codificante per la proteina GFP. Questo permette alle cellule di produrre da un singolo mRNA bicistronico la proteina di interesse e la proteina GFP come proteine separate; 3) l'origine di replicazione SV40 e un gene che conferisce resistenza alla neomicina (Neo^r) per la selezione (con G418) delle cellule stabilmente transfettate. Un promotore batterico a monte (P) conferisce resistenza alla kanamicina (Kan^r) in E. coli. Il vettore fornisce anche un'origine di replicazione pUC per la propagazione in E. coli e un'origine f1 per la produzione di DNA a singola elica.

4.2.1 PCR

La prima fase nel procedimento di clonaggio di un cDNA in un vettore è l'amplificazione del DNA di partenza, detto template. Il template d'interesse era costituito dal vettore pcDNA3-CFTR e l'amplificazione è stata effettuata mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), tecnica che consente appunto l'amplificazione di un frammento di DNA.

Per realizzare la PCR è stata preparata, sotto cappa, in condizioni di sterilità ed in modo da evitare contaminazioni, una mix di reazione, del volume finale di 50 µl, così composta [Tabella 4.3]:

Composizione miscela di reazione per PCR

H ₂ O	39,75 µl
Pfu Ultra II Fusion buffer 10X	5 µl
dNTPs 100mM	1,25 µl
primer senso 50 µM	1 µl
primer antisenso 50 µM	1 µl
polimerasi Pfu Ultra II Fusion HS	1 µl

Tabella 4.3 - Composizione della miscela di reazione per PCR.

Il template, pcDNA3-CFTR, alla concentrazione di 50 ng/µl, e in quantità di 1µl, veniva aggiunto alla reazione all'esterno della cappa.

I primers senso ed antisenso utilizzati variavano a seconda del vettore in cui il CFTR veniva clonato:

- 1) primers utilizzati per il clonaggio nei vettori pIRES2-EGFP, pEYFP-C1 e pEGFP-C1:

- primer senso:

5' ACGTGAGCTCACATGCAAAGGTCGCCTCTGGAAAAG 3' Tm: 83,7 °C

- primer antisenso:

5' TTAACCGCGCTAAAGTCTTGTATCTTGACCT 3' Tm: 77,1 °C

2) primers utilizzati per il clonaggio nel vettore pEYFP-N1:

- primer senso:

5' ACGTGAGTCATGCAAAGGTCGCCTCTGGAAAAG 3' Tm: 81,9 °C

- primer antisenso:

5' AACACCGCGAAGCCTTGTATCTTGCACCTC 3' Tm: 79,1 °C

Una volta aggiunto il templatò alla mix, veniva svolta la reazione di PCR in un termociclatore, secondo un protocollo che prevedeva le seguenti fasi:

- denaturazione iniziale	a 96 °C	per 2 minuti	} per 30 cicli
- denaturazione	a 95 °C	per 20 secondi	
- annealing	a 65 °C	per 20 secondi	
- allungamento	a 72 °C	per 3 minuti	
- allungamento finale	a 72 °C	per 3 minuti	

4.2.2 Elettroforesi del DNA

Al termine della reazione di PCR, per ciascun campione, è stata eseguita una corsa elettroforetica su gel di agarosio.

Preparazione del gel 1% w/v

Si è preparato il gel sciogliendo 0,3 g di agarosio in polvere in 30 ml di tampone TAE (Tris Acetato EDTA) 0,5X [Tabella 4.4]; la miscela è stata scaldata fino a completo scioglimento dell'agarosio, quindi si sono aggiunti circa 0,3 µl di bromuro di etidio (10 µg/µl).

La miscela viene versata in un opportuno supporto e viene inserito il pettine per i pozzetti, si attendono circa 40 minuti per la solidificazione del gel.

Preparazione del campione

Al DNA viene aggiunto un appropriato volume di Loading Dye 6X [Tabella 4.5] in modo che la sua concentrazione finale nella miscela sia 1X.

Nei pozzetti del gel vengono caricati 6 μ l di questa miscela (5 μ l della miscela di PCR e 1 μ l di Loading Dye), come marker di corsa vengono caricati 8 μ l di DNA Ladder 1kb (SM1163, Fermentas) per quantificare peso molecolare e quantità del campione.

Il gel, posizionato nell'apparato di corsa, viene ricoperto di TAE 0,5X e sottoposto ad un voltaggio costante di 100 V per un tempo di circa 20 minuti.

Composizione TAE 0,5X

Tris base	40 mM
Sodio acetato	20 mM
EDTA	1 mM

Tabella 4.4 – Composizione del TAE 0,5%, tampone utilizzato per la preparazione del gel per l'elettroforesi del DNA.

Composizione Loading Dye 6X

Blu di bromofenolo	0,2 %
Xilene cyanol FF	0,2 %
Glicerolo	60 %
EDTA	60 mM

Tabella 4.5 – Composizione del Loading Dye 6X.

4.2.3 Purificazione dei prodotti di PCR

Per purificare i frammenti di DNA dalla PCR è stato utilizzato il PCR Purification kit (Qiagen) che prevedeva i seguenti passaggi:

- 5 volumi di Buffer PB (fornito dal kit) venivano aggiunti a ciascun volume del campione proveniente da PCR e si misceleva con cura;
- la miscela veniva caricata in una Spin Column QIAquick e centrifugata per 1 minuto a 13000 rpm; il flow through veniva eliminato e la colonnina rimessa nel suo supporto;

- venivano aggiunti 0,75 ml di Buffer PE (fornito dal kit) alla colonnina e si centrifugava 1 minuto a 13000 rpm;
- la colonnina veniva inserita in una nuova eppendorf da 1,5 ml;
- 30 μ l di acqua milliQ erano aggiunti al centro della colonnina per eluire il DNA, si attendeva 1 minuto circa, poi si centrifugava la colonna per 1 minuto a 13000 rpm.

4.2.4 Digestione con enzimi di restrizione

Sia il cDNA per il CFTR che i vettori pIRES2-EGFP, pEYFP-C1, pEYFP-N1, pEGFP-C1 sono stati digeriti a 37 °C per 90 minuti. Per la digestione è necessaria la preparazione di una miscela di reazione contenente enzimi di restrizione che taglino nei siti appropriati; questi siti erano presenti sia a livello del CFTR che a livello dei vettori ed erano riconosciuti dagli enzimi di restrizione Sac I e Sac II. Le miscele di reazione preparate avevano un volume finale di 50 μ l e la seguente composizione [Tabella 4.6]:

Composizione miscela di reazione per la digestione

	DNA purificato (CFTR)	pEYFP-C 1/ pEYFP-N1 / pEGFP-C1/ pIRES2-EGFP
enzima Sac I	1 μ l	1 μ l
enzima Sac II	2 μ l	2 μ l
Buffer B	5 μ l	5 μ l
H ₂ O milliQ	14 μ l	41 μ l
DNA CFTR	28 μ l	-
plasmide	-	1 μ l (=3 μ g)

Tabella 4.6 – Composizione della miscela di reazione per la digestione, con enzimi di restrizione, del cDNA del CFTR e dei vettori pIRES2-EGFP, pEYFP-C1, pEYFP-N1, pEGFP-C1.

4.2.5 Purificazione dei prodotti di digestione

Al termine della digestione con gli enzimi di restrizione, i campioni sono stati purificati con il Min Elute Reaction Cleanup kit (Qiagen), che prevedeva i seguenti passaggi:

- ad ogni mix di reazione venivano aggiunti 300 μ l di Buffer ERC (fornito dal kit) e si miscelava;
- la miscela veniva caricata in una Spin Column e centrifugata per 1 minuto a 13000 rpm, il flow through veniva eliminato e la colonnina rimessa nel suo supporto;
- venivano aggiunti 750 μ l di Buffer PE (fornito dal kit) alla colonnina e si centrifugava 1 minuto a 13000 rpm;
- il flow through veniva eliminato e si centrifugava un'ulteriore volta per 1 minuto a 13000 rpm;
- la colonnina era quindi inserita in una nuova eppendorf da 1,5 ml;
- 30 μ l di acqua milliQ nel caso dei plasmidi e 10 μ l di acqua milliQ nel caso del frammento erano aggiunti al centro della colonna per eluire il DNA, si attendeva circa 1 minuto e quindi si centrifugava la colonnina per 1 minuto a 13000 rpm.

4.2.6 Ligazione

La ligazione è stata effettuata con un apposito kit (DNA Ligation kit, Takara).

Per l'inserimento del cDNA del CFTR nei vettori pEYFP-N1, pEYFP-C1, pIRES2-EGFP sono state allestite le reazioni di ligazione in modo che il rapporto molare frammento/plasmide fosse pari a 3. I campioni venivano quindi scaldati a 65 °C per 3 minuti per denaturare eventuali strutture secondarie, venivano poi riportati ad una temperatura di 25 °C e vi si aggiungeva un volume di Soluzione I (contenente buffer, ligasi e ATP) e infine si incubava a 16 °C per 180 minuti e poi a 70 °C per 15 minuti.

Per l'inserimento del cDNA del CFTR nel vettore pEGFP-C1 sono state allestite diverse reazioni di ligazione in modo che il rapporto molare frammento/campione

fosse pari a 2, a 1 e a 0,5. I campioni venivano quindi scaldati a 65 °C per 3 minuti per denaturare eventuali strutture secondarie, venivano riportati ad una temperatura di 25 °C e si aggiungeva un volume di Soluzione I (contenente buffer, ligasi e ATP), poi si incubava a 25 °C per 5 minuti, quindi a 24 °C per 15 minuti, a 22 °C per 25 minuti, a 18 °C per 30 minuti e infine a 16 °C per 1 ora.

Per la trasformazione dei batteri sono stati utilizzati 9 µl per ogni miscela di ligazione.

4.3 Trasformazione batterica e amplificazione del DNA

4.3.1 Produzione di batteri competenti

Per procedere con la trasformazione batterica è stato necessario rendere i batteri competenti, cioè renderli in grado di assumere il plasmide. Per fare ciò:

- 5 ml di terreno di coltura liquido LB sono stati versati in una Falcon a cui successivamente sono stati aggiunti i batteri XL1Blue, conservati a -80 °C, grattandoli con un'ansa sterile dal glicerolato;
- la Falcon è stata incubata a 37 °C overnight;
- il giorno successivo la coltura è stata aggiunta a 200 ml di terreno LB liquido ed è stata fatta crescere fino ad ottenere una densità ottica pari a circa 0,6;
- la coltura è stata suddivisa in quattro provette sterili da centrifuga ed è stata lasciata in ghiaccio 30 minuti, è stata quindi centrifugata a 3500 rpm con rotore swing out per 15 minuti a 4 °C;
- al termine della centrifugata il sovrnatante veniva eliminato e i pellet erano risospesi ciascuno in 2 ml (8 ml totali per i 200 ml di coltura di partenza) di buffer RF1 [Tabella 4.7] freddo;
- gli 8 ml totali erano raccolti in una Falcon da 15, lasciati in ghiaccio per 30 minuti e quindi centrifugati a 3500 g per 15 minuti a 4 °C;

- al termine della centrifugata il sovrnatante veniva eliminato e il pellet risospeso in 2 ml di buffer RF2 [Tabella 4.7];
- si aliquotava in frazioni da 100 µl in eppendorf sterili che venivano congelate immediatamente in azoto liquido e poi conservate a -80 °C fino al momento dell'utilizzo.

Composizione soluzioni per la produzione di batteri competenti

	RF1	RF2
RbCl	0,1 M	10 mM
Acetato di potassio KOAc	60 M	-
CaCl ₂	10 M	75 mM
Glicerolo	15% (v/v)	15% (v/v)
MOPS	-	10 mM

Tabella 4.7 – Composizione delle soluzioni RF1 e RF2 per la produzione di batteri competenti; RF1 pH 5,8 con acido acetico, RF2 pH 6,8 con NaOH.

Preparazione delle piastre e del terreno di crescita per *E. coli*

Per la preparazione delle piastre di terreno su cui far crescere *E. coli*:

- 20 g/l di LB (Luria Broth, L-3522, Sigma) e 15 g/l di agar per batteri erano sciolti in acqua bidistillata e autoclavati per 20 minuti a 120 °C;
- si lasciava raffreddare la soluzione fino ad una temperatura di circa 50 °C, quindi, sotto cappa sterile, si aggiungeva l'antibiotico (kanamicina 30 µg/ml oppure ampicillina 100 µg/ml) e si versava la soluzione in piastre Petri sterili (circa 30 ml per piastra);
- si attendeva la solidificazione, quindi si conservavano le piastre a 4 °C fino al momento dell'utilizzo.

Per la preparazione del terreno liquido, si scioglievano 20 g/l di LB in acqua bidistillata e si autoclavava.

4.3.2 Trasformazione batterica

La trasformazione batterica consiste nell'inserimento di DNA esogeno in cellule riceventi precedentemente rese competenti [Paragrafo 4.3.1].

Protocollo della trasformazione batterica:

- un'aliquota (100 μ l) di batteri competenti XL1-Blue, prelevati dal freezer, era fatta scongelare in ghiaccio;
- si aggiungevano 50-100 ng di DNA plasmidico alle cellule batteriche e si miscelava delicatamente con un puntale;
- si lasciava la eppendorf in ghiaccio per 20 minuti;
- si sottoponevano i batteri a shock termico portandoli ad una temperatura di 42 °C per 45 secondi e poi li si lasciavano in ghiaccio per 2 minuti; in questo modo si permetteva la creazione di pori transienti in membrana necessari per l'endocitosi del plasmide;
- 250 μ l di terreno liquido LB addizionato con glucosio 20 mM erano aggiunti ai batteri, questi ultimi erano poi lasciati a 37 °C per circa 30 minuti, in modo tale che i batteri che avevano acquisito il plasmide avessero il tempo per produrre l'enzima necessario per distruggere l'antibiotico (kanamicina/ampicillina) del terreno;
- i batteri erano quindi piastrati su una piastra Petri di terreno solido contenete l'antibiotico (kanamicina/ampicillina) per la selezione dei cloni trasformati con il DNA plasmidico;
- la piastra era incubata capovolta a 37 °C overnight.

4.3.3 Miniprep

Il giorno successivo, con uno stuzzicadenti sterile, alcuni cloni venivano prelevati dalla piastra e venivano inoculati ciascuno in 2 ml di terreno liquido LB contenete kanamicina 30 μ g/ml oppure ampicillina 100 μ g/ml. Le colture venivano lasciate a 37 °C, in agitazione, per circa 16 ore. Si procedeva quindi all'estrazione del plasmide, secondo il seguente protocollo:

- 1,5 ml di coltura erano prelevati da ciascun tubo da microbiologia e messi in eppendorf da 2 ml;
- si centrifugavano le eppendorf a 10000 rpm per 10 minuti e si scartava il sovrnatante;
- il pellet veniva risospeso in 100 µl di Soluzione I [Tabella 4.8] fredda e si lasciava a temperatura ambiente 5 minuti;
- si aggiungevano 200 µl di Soluzione II [Tabella 4.8], la funzione di questa soluzione è quella di portare alla lisi cellulare e alla denaturazione controllata proteine e DNA genomico. Si miscelava delicatamente per inversione e si lasciava agire la soluzione 5 minuti a temperatura ambiente;
- si aggiungevano 150 µl di Soluzione III [Tabella 4.8], la cui funzione è quella di far precipitare le proteine e neutralizzare il pH acido della Soluzione II, interrompendo la reazione di denaturazione. Si miscelava delicatamente per inversione e si lasciava agire la soluzione 5 minuti in ghiaccio;
- si centrifugava a 13000 rpm per 15 minuti;
- 400 µl di sovrnatante (contenete il plasmide) erano trasferiti in una nuova eppendorf;
- il DNA plasmidico veniva precipitato in etanolo: 1 ml di etanolo 100% era aggiunto alle eppendorf e si vortexava, le eppendorf erano lasciate a -80 °C per 20 minuti, al fine di facilitare la precipitazione del plasmide;
- si centrifugava a 13000 rpm per 30 minuti e si eliminava il sovrnatante;
- il pellet era lavato con 750 µl di etanolo 70% freddo;
- si centrifugava a 13000 rpm per 5 minuti e si eliminava il sovrnatante;
- si lasciava asciugare il pellet e lo si risospendeva in 20 µl di H₂O milliQ.

Composizione soluzioni per miniprep

Soluzione I	Soluzione II	Soluzione III
Glucosio 50 mM	NaOH 0,2 N	KOAc 3 M
Tris pH 8 25 mM	SDS 0,1%	Acido acetico glaciale 1,5%
EDTA 10 mM		

Tabella 4.8 – Composizione delle Soluzioni I, II, III per l'estrazione plasmidica mediante protocollo Miniprep.

Al termine dell'estrazione i DNA plasmidici sono controllati tramite analisi di restrizione e corsa su gel di agarosio.

4.3.4 Maxiprep

Per amplificare i plasmidi d'interesse si inoculava un singolo clone di una piastra contenente i batteri trasformati col plasmide in 1 ml di terreno LB addizionato dell'antibiotico kanamicina 30 µg/ml o ampicillina 100 µg/ml.

Il preinoculo veniva fatto crescere a 37 °C, in agitazione, per 7/8 ore, successivamente veniva diluito in 250 ml di terreno LB addizionato con kanamicina o ampicillina e fatto crescere a 37 °C in agitazione overnight.

Il giorno successivo i batteri venivano raccolti in un provettone da 250 ml e centrifugati a 4000 rpm per 40 minuti a 4 °C. Al termine della centrifugata, il sovrnatante veniva eliminato e si procedeva all'estrazione del DNA plasmidico utilizzando un apposito kit (Nucleobond):

- il pellet veniva risospeso in 12 ml di Buffer S1 + RNaseA freddo;
- si aggiungevano 12 ml di Buffer S2 a temperatura ambiente e si invertiva con delicatezza il provettone 6-8 volte, poi lo si lasciava a temperatura ambiente circa 3 minuti;
- si aggiungevano 12 ml di Buffer S3 freddo e si invertiva il provettone 6-8 volte, poi lo si lasciava in ghiaccio 5 minuti;
- si chiarificava il lisato per filtrazione su carta e lo si applicava all'apposita colonna contenete una specifica resina (per legare gli acidi nucleici), pre-

- equilibrata con 6 ml di Buffer N2;
- la colonna veniva lavata con 32 ml di Buffer N3;
 - si eluiva il DNA plasmidico con 15 ml di Buffer N5;
 - per far precipitare il DNA, si aggiungevano 11 ml di isopropanolo e si vortexava;
 - si centrifugava a 12500 g per 45 minuti a 4 °C;
 - si lavava il DNA eluito con 5 ml di etanolo al 70% freddo per eliminare i residui di sale e in seguito si centrifugava a 12500 g per 15 minuti a temperatura ambiente;
 - si eliminava il sovrantante e si lasciava asciugare il DNA che poi veniva risospeso in un volume variabile (a seconda delle dimensioni del pellet) di H₂O milliQ.

Tutti i buffer, la carta per filtrazione e le colonne sono forniti dal produttore del kit.

Il DNA plasmidico estratto era dosato con uno spettrofotometro, controllato mediante analisi di restrizione e sequenziato (servizio di sequenziamento esterno, Cogentech, Campus IFOM-IEO).

4.3.5 Dosaggio acidi nucleici

Per il dosaggio si usava una cuvetta di quarzo trasparente agli UV e si seguiva il seguente protocollo:

- si riempiva la cuvetta con 350 µl di TE [Tabella 4.9];
- si effettuava una lettura allo spettrofotometro del TE, tale lettura costituisce il "bianco", il valore letto verrà sottratto automaticamente dallo strumento alla lettura fatta in presenza del DNA;
- ai 350 µl di TE si aggiungevano 3 µl di plasmide, direttamente in cuvetta, si rimescolava e si misurava il valore di assorbanza;
- la lettura veniva fatta a due diverse lunghezze d'onda: 260 nm (per la concentrazione del DNA) e 280 nm (per la concentrazione delle proteine). Il rapporto tra le due letture fornisce un indice della qualità della preparazione

del DNA. Una preparazione di DNA deve avere un rapporto compreso tra 1,8 e 2.

- il calcolo della concentrazione veniva effettuato sapendo che, per un cammino ottico pari ad 1 cm, una soluzione acquosa di DNA a pH 7-7,5, ad una concentrazione di 50 ng/μl, ha un'assorbanza pari a 1. Si utilizzava quindi la seguente formula:

$$[DNA]_{\mu g/\mu l} = \frac{A_{260} \times 0,05 \left(\frac{\mu g}{\mu l} \right) \times 353 \mu l}{3 \mu l}$$

Composizione del TE

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

Tabella 4.9 – Composizione del TE utilizzato per il dosaggio degli acidi nucleici, pH 7,5.

4.4 Transfezione e cotransfezione

4.4.1 Transfezione

La transfezione consiste nel trasferimento di molecole di DNA esogeno in cellule riceventi. Il DNA, una volta transfettato, viene mantenuto per un limitato periodo di tempo come DNA extra-cromosomiale e il prodotto della sua espressione si mantiene stabile per un determinato periodo (transfezione transiente). Per la transfezione è stato utilizzato il metodo del PEI (polietilenimina), molecola carrier nel cui scheletro sono presenti gruppi amminici facilmente protonabili. A pH neutro essa è dotata di elevata carica cationica che le permette di legare il DNA con alta efficienza, ciò consente al DNA di entrare in cellula per endocitosi grazie al legame con i proteoglicani cellulari. Inoltre il PEI garantisce che i complessi formati non vengano degradati dalla cellula.

Per effettuare la transfezione si procedeva in questo modo:

- il giorno della transfezione (giorno successivo a quello della semina delle

cellule) si preparavano due diverse miscele, A e B, la prima composta da NaCl 150 mM (tamponato con HEPES 10 mM; pH 7) e DNA e la seconda composta da NaCl 150 mM (tamponato con HEPES 10 mM; pH 7) e PEI (jetPEI, Euroclone) [Tabella 4.10];

- le miscele venivano lasciate a temperatura ambiente 5 minuti, poi la miscela B era aggiunta alla miscela A, si mescolava e si lasciava a temperatura ambiente per 15 minuti;
- la miscela era quindi aggiunta goccia a goccia alla piastra contenente le cellule da transfettare a cui, precedentemente, il terreno era stato sostituito con terreno fresco in quantità pari a metà del volume iniziale;
- dopo circa 7 ore dalla transfezione si aggiungeva alla piastra la restante metà di terreno fresco.

Composizione delle mix A e B per la transfezione

	MIX A		MIX B	
Petri	NaCl 150 mM	48 µl	NaCl 150 mM	46 µl
Ø 3,5 cm	DNA (1 µg/µl)	2 µg (= 2 µl)	PEI (1 µg/µl)	4 µl
Petri	NaCl 150 mM	94 µl	NaCl 150 mM	88 µl
Ø 6 cm	DNA (1 µg/µl)	6 µg (=6 µl)	PEI (1 µg/µl)	12 µl
Petri	NaCl 150 mM	235 µl	NaCl 150 mM	220 µl
Ø 10 cm	DNA (1 µg/µl)	15 µg (= 15 µl)	PEI (1 µg/µl)	30 µl

Tabella 4.10 – Composizione delle miscele di transfezione per piastre Petri da 3,5 cm, 6 cm, 10 cm.

4.4.2 Cotransfezione

Anche nel caso delle cotransfezioni, transfezioni simultanee di due diversi DNA esogeni nelle cellule riceventi, veniva utilizzato il metodo del PEI (polietilenimina), procedendo come descritto per le transfezioni singole.

Poiché la transfezione del CFTR, in passato, era spesso risultata problematica, si sono voluti testare differenti rapporti di transfezione tra i due plasmidi (pcDNA3-

CFTR e pcDNA3.1-adducina), in modo da poter scegliere la combinazione ottimale per i successivi esperimenti. I rapporti testati sono riportati nella *Tabella 4.11*.

Composizione delle mix A e B per la cotransfezione (piastre Petri Ø 10 cm)

MIX A			MIX B	
NaCl 150 mM	235 µl		NaCl 150 mM	220 µl
DNA (1 µg/µl) 15 µg totali	pcDNA3-CFTR	7.5 µg	PEI (1 µg/µl)	30 µl
	pcDNA3.1-adducina	7.5 µg		
NaCl 150 mM	235 µl		NaCl 150 mM	220 µl
DNA (1 µg/µl) 15 µg totali	pcDNA3-CFTR	10 µg	PEI (1 µg/µl)	30 µl
	pcDNA3.1-adducina	5 µg		
NaCl 150 mM	235 µl		NaCl 150 mM	220 µl
DNA (1 µg/µl) 15 µg totali	pcDNA3-CFTR	12.5 µg	PEI (1 µg/µl)	30 µl
	pcDNA3.1-adducina	2.5 µg		

Tabella 4.11 – Composizione delle miscele per le prove di cotransfezione di piastre Petri da 10 cm con i vettori pcDNA3-CFTR e pcDNA3.1-adducina.

4.5 Saggio della Luciferasi

Il Renilla Luciferase Reporter assay (Promega) è stato utilizzato per valutare l'efficienza di transfezione dei due tipi cellulari NU12 ed HU33. Le cellule erano seminate in multiwell da 24 pozzetti, nella quantità di $2,2 \times 10^5$ cellule/pozzetto. A 24 ore dalla semina erano cotransfettate con 1 µg di pcDNA3-CFTR e 75 ng di pRL-TK (vettore contenente il gene reporter Renilla luciferasi sotto il controllo di un promotore timidin-chinasi). Per le transfezioni era utilizzato il metodo del PEI.

48 ore dopo la transfezione ciascun pozzetto era lavato con PBS 1X e le cellule venivano staccate enzimaticamente con tripsina.

50 μ l erano utilizzati per la conta cellulare con emocitometro (cameretta di Bürker) e il resto era pellettato e risospeso nel buffer di lisi fornito dal kit e veniva usato in parte per la misurazione della concentrazione proteica con il metodo Bradford e in parte per il saggio.

Il protocollo per il saggio Renilla Luciferase è qui riportato:

- si aggiungevano 100 μ l di Renilla luciferase assay reagent (fornito dal kit) ai pozzetti di un multiwell a fondo bianco;
- si aggiungevano 20 μ l dei lisati cellulari;
- si mescolava accuratamente;
- i valori di luminescenza erano misurati con un luminometro Tecan F200 Pro.

4.6 Esperimenti di FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

Il FRET è una nanotecnologia utilizzata per studiare l'interazione tra macromolecole biologiche e il distretto cellulare in cui l'eventuale interazione sussiste. Ciò è possibile grazie all'utilizzo di due molecole fluorescenti, un donatore ed un accettore, che vengono espresse in fusione con le proteine di cui si vuole studiare l'interazione. Le sequenze proteiche possono essere inserite all'estremità ammino o carbossi terminale delle proteine fluorescenti.

Quando il fluoroforo donatore viene eccitato ad una propria lunghezza d'onda specifica è in grado di trasferire parte dell'energia assorbita al fluoroforo accettore mediante un'interazione di tipo dipolo-dipolo. Una prima condizione necessaria perché tale trasferimento energetico possa avvenire è che i due fluorofori e quindi le due proteine cui essi sono fusi siano a distanza ristretta (non oltre i 10 nm) [Figura 4.3], ciò avviene solo nel caso in cui le due proteine interagiscono direttamente.

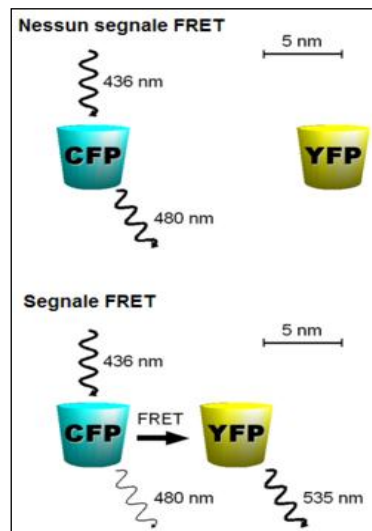


Figura 4.3 - Modello schematico di FRET. Nel pannello superiore della figura, il donatore, CFP (in azzurro), viene eccitato, ma la distanza dall'accettore, YFP (in giallo), non consente il trasferimento di energia tra le due molecole. Nel pannello inferiore della figura, il donatore viene eccitato ed emette energia che eccita l'accettore grazie alla stretta vicinanza tra i due fluorofori.

In secondo luogo è necessario che lo spettro di emissione del donatore si sovrapponga in parte allo spettro di eccitazione dell'accettore.

I due fluorofori da noi utilizzati per gli esperimenti di FRET sono derivati della proteina GFP (Green Fluorescence Protein): come donatore è stato scelto il CFP (Cyan Fluorescence Protein), come accettore il YFP (Yellow Fluorescence Protein). La coppia di fluorofori CFP-YFP è una delle più utilizzate per questi esperimenti, gli spettri di emissione del CFP e di assorbimento del YFP si sovrappongono ampiamente a lunghezze d'onda comprese tra i 450 e i 550 nm [Figura 4.4].

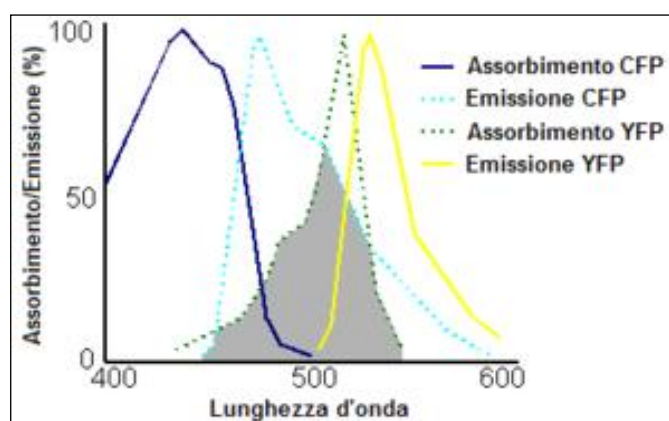


Figura 4.4 - Grafico riportante gli spettri di assorbimento e di emissione dei fluorofori CFP e YFP. Il donatore, CFP, assorbe ad una lunghezza d'onda di 458 nm ed emette a lunghezze d'onda comprese tra 465 nm e 505 nm. L'accettore, YFP, assorbe ad una lunghezza d'onda di 514 nm ed emette a lunghezze d'onda comprese tra 525 nm e 590 nm. L'area grigia, compresa tra 450 nm e 550 nm, corrisponde alla sovrapposizione tra lo spettro di emissione del CFP e lo spettro di assorbimento del YFP.

La metodica FRET che è stata utilizzata per questi esperimenti è quella dell'“Acceptor Photobleaching” (Kenworthy AK, 2001); il metodo si basa sul seguente principio: l'energia trasferita dal donatore all'accettore è ridotta o eliminata quando l'accettore è sottoposto a “bleaching”, ovvero alla distruzione delle molecole di accettore. Il “bleaching” si ottiene eccitando il fluoroforo con un laser a potenza massima per un tempo opportuno. Il metodo prevede pertanto tre fasi: l'acquisizione dell'immagine del donatore, il photobleaching dell'accettore e la nuova acquisizione dell'immagine del donatore.

L'efficienza di trasferimento energetico viene poi calcolata utilizzando il software di Image J sulla base della variazione d'intensità di fluorescenza del donatore secondo la seguente formula:

$$\text{FRET eff} = (D_{\text{post}} - D_{\text{pre}}) / D_{\text{post}}$$

dove D_{post} è l'intensità di fluorescenza del donatore (CFP) dopo il “bleaching” dell'accettore e D_{pre} è l'intensità del CFP prima del “bleaching” dell'accettore. Perché l'efficienza di trasferimento energetico sia massima, ossia pari ad 1, è necessario che D_{pre} sia pari a zero, ossia che tutta l'energia emessa dal donatore sia trasmessa per FRET all'accettore.

Per intensità di fluorescenza si intende la somma delle intensità di fluorescenza dei singoli pixels nella regione sottoposta a bleaching. Sono stati considerati per il calcolo solo quei pixels che, sia nell'immagine del donatore che nell'immagine dell'accettore, superassero una certa soglia di intensità (20 su 255).

Per l'acquisizione delle immagini è stato utilizzato un microscopio confocale Leica TCS SP2 AOBs dotato di laser Argon. Per l'eccitazione del donatore è stata utilizzata la linea a 458 nm, mentre per l'eccitazione e il photobleaching dell'accettore è stata utilizzata la linea a 514 nm. Le rispettive finestre di emissione sono state impostate in modo da minimizzare il cross-talk tra i canali CFP e YFP, rispettivamente a 465-505 nm e 525-590 nm. Le immagini sono state acquisite a zoom 2 e alla risoluzione 512x512 (line average 2, 8 bit), posizionando il fuoco in un piano centrale sull'asse z della cellula.

Per il photobleaching, dopo aver posto lo zoom a 10X e portato la risoluzione a 1024x1024, sono state effettuate tre diverse scansioni con il laser al 100% di potenza.

Nei nostri esperimenti la proteina adducina, sia wild-type che mutata, è stata coniugata al fluoroforo donatore CFP, mentre la proteina CFTR è stata coniugata al fluoroforo accettore YFP. Per gli esperimenti di controllo è stata valutata l'efficienza di trasferimento energetico tra il CFTR e la proteina ICln, che era stata coniugata al fluoroforo donatore CFP.

Per gli esperimenti di FRET, le cellule HEK erano seminate in piastre da 3,5 cm di diametro, con il fondo in vetro e, il giorno successivo, venivano cotransfettate con CFTR fuso a YFP e adducina, wild-type o mutata, oppure ICln, nel caso degli esperimenti di controllo, fusa a CFP. Gli esperimenti erano condotti a 24 ore dalla transfezione; nel caso in cui gli esperimenti fossero condotti su cellule trattate con forskolina, prima dell'acquisizione delle immagini si procedeva all'esposizione delle cellule a soluzione fisiologica (PBS) con aggiunta di forskolina 10 μ M per un tempo di 20 minuti.

4.7 Studi di immunocitochimica

4.7.1 Staining CFTR

Le cellule NU12 e HU33, seminate in Petri del diametro di 6 cm, sono state transfettate con il vettore pcDNA3-CFTR; a 24 ore dalla transfezione sono state tripsinizzate e seminate in Petri del diametro di 3,5 cm sul cui fondo erano stati posti vetrini del diametro di 12 mm.

Dopo 24 ore dalla tripsinizzazione, i vetrini sono stati prelevati e collocati nei pozzetti di multiwell da 24. Si procedeva quindi nel modo seguente:

- le cellule venivano sottoposte a due lavaggi con circa 2 ml di PBS 1X al fine di eliminare gli eventuali residui di terreno;
- le cellule venivano fissate mediante l'aggiunta in ogni pozzetto di 1 ml di paraformaldeide al 3% in PBS 1X per 10 minuti, a temperatura ambiente;
- sono stati effettuati tre lavaggi da 3 minuti ciascuno in una soluzione di glicina 0,1 M in PBS 1X;
- si è aggiunta una soluzione composta da PBS 1X, Triton X-100 0,1% e $MgCl_2$ 3 mM, con lo scopo di favorire la permeabilizzazione delle membrane e permettere l'ingresso in cellula dell'anticorpo primario (questo è un passaggio indispensabile nel caso si intendano utilizzare anticorpi che riconoscono proteine intracellulari o proteine di membrana con epitopi intracellulari), si sono attesi 3 minuti, in cui le cellule sono state incubate a 4 °C;
- le cellule sono state sottoposte a tre lavaggi da 3 minuti in PBS 1X;
- le cellule sono state esposte ad una soluzione di blocco, composta da PBS 1X, goat serum 5% e BSA 0,1%, per 60 minuti a temperatura ambiente, al fine di ridurre un eventuale legame aspecifico dell'anticorpo (la BSA compete con l'anticorpo per i siti di legame);
- le cellule sono state incubate, a 4 °C overnight, con l'anticorpo primario anti-CFTR 24.1 (R&D Systems), diluito 1:25 in una soluzione di BSA 0,5% in PBS 1X;

- successivamente le cellule sono state sottoposte ad un ciclo di tre lavaggi da 3 minuti in PBS 1X;
- sono state esposte per 60 minuti a temperatura ambiente all'anticorpo secondario anti-mouse coniugato con Alexa 568 (Invitrogen; Alexa 568 è una molecola con un massimo di eccitazione a $\lambda=578$ nm e con un massimo di emissione a $\lambda=603$ nm), diluito 1:100 in PBS 1X contenente BSA 0,5%; da questo momento si procedeva lavorando al buio in quanto l'anticorpo secondario è fotosensibile;
- le cellule sono state esposte a DAPI 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS 1X, per 5 minuti. Il DAPI è una molecola fluorescente in grado di intercalarsi al DNA e consentire così la colorazione dei nuclei cellulari;
- le cellule sono state sottoposte a tre lavaggi in PBS 1X;
- i vetrini sono stati infine disposti capovolti su un vetro porta oggetto, utilizzando come montante glicerolo 90%, addizionato di DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane) 1%, come agente antifading e sono stati contornati con smalto per evitare l'essiccazione all'aria.

I vetrini sono stati osservati al microscopio confocale Leica TSC SP5 AOBS (Leica Microsystem, Heidelberg, Germany), con obiettivi 40X e 63X a immersione. Tutte le immagini sono state acquisite con i medesimi parametri di acquisizione.

4.7.2 Staining actina e adducina

Le cellule NU12 e HU33 sono state seminate in Petri del diametro di 3,5 cm sul cui fondo erano stati posti vetrini dal diametro di 12 mm.

Dopo 24 ore, i vetrini sono stati prelevati e collocati nei pozzetti di multiwell da 24.

Si procedeva quindi nel modo seguente:

- le cellule venivano sottoposte a due lavaggi con circa 2 ml di PBS 1X al fine di eliminare gli eventuali residui di terreno;
- le cellule venivano fissate mediante l'aggiunta in ogni pozzetto di 1 ml di paraformaldeide al 3% in PBS 1X per 7 minuti, a temperatura ambiente;

- si è aggiunta una soluzione composta da PBS 1X, Triton X-100 0,1% e MgCl₂ 3 mM, con lo scopo di favorire la permeabilizzazione delle membrane e permettere l'ingresso in cellula dell'anticorpo primario (questo è un passaggio indispensabile nel caso si intendano utilizzare anticorpi che riconoscono proteine intracellulari o proteine di membrana con epitopi intracellulari), si sono attesi 5 minuti durante i quali le cellule sono state incubate a 4 °C;
- si sono lavate le cellule due volte con PBS 1X;
- le cellule sono state esposte a due lavaggi da 3 minuti in una soluzione di blocco, composta da PBS 1X e BSA 5%, al fine di ridurre un eventuale legame aspecifico dell'anticorpo (la BSA compete con l'anticorpo per i siti di legame);
- le cellule sono state incubate, a temperatura ambiente per 60 minuti, con l'anticorpo primario anti-HA tag (Covance), diluito 1:200 in una soluzione di BSA 5% in PBS 1X;
- successivamente le cellule sono state sottoposte ad un ciclo di tre lavaggi in PBS 1X e poi a due lavaggi da 3 minuti in una soluzione di BSA 5% in PBS 1X;
- le cellule sono state esposte per 60 minuti a temperatura ambiente all'anticorpo secondario anti-mouse, coniugato con Alexa 488 (Invitrogen, A21202; Alexa 488 ha un massimo di eccitazione a $\lambda=495$ nm e un massimo di emissione a $\lambda=519$ nm), diluito 1:300 in PBS 1X contenente BSA 5%; da questo momento si procedeva lavorando al buio in quanto l'anticorpo secondario è fotosensibile;
- le cellule sono state sottoposte a tre lavaggi in PBS 1X;
- si è effettuato lo staining per F-actina esponendo le cellule, per 20 minuti a temperatura ambiente, a falloidina coniugata con Alexa 568 (Alexa 568 ha un massimo di eccitazione a $\lambda=578$ nm e un massimo di emissione a $\lambda=603$ nm) ad una concentrazione di 0,16 μ M in una soluzione di BSA 0,1% in PBS 1X;
- le cellule sono state sottoposte a tre lavaggi in PBS 1X;

- i vetrini sono stati infine disposti capovolti su un vetro porta oggetto, utilizzando come montante glicerolo 90%, addizionato di DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane) 1%, come agente antifading e sono stati contornati con smalto per evitare l'essiccazione all'aria.

I vetrini sono stati osservati al microscopio confocale Leica TSC SP5 AOBS (Leica Microsystem, Heidelberg, Germany), con obiettivi 40X e 63X a immersione. Tutte le immagini sono state acquisite con i medesimi parametri di acquisizione.

4.8 Estrazione proteica

4.8.1 Estrazione proteine totali

A 48 ore dalla transfezione delle cellule NU12 e HU33 con il vettore pcDNA3-CFTR:

- il terreno di coltura era eliminato dalle piastre da 6 cm di diametro;
- le cellule erano lavate con PBS 1X;
- alle cellule era aggiunto 1 ml di PBS 1X;
- le cellule venivano staccate dal fondo della piastra utilizzando uno scraper e venivano raccolte in eppendorf;
- le eppendorf venivano centrifugate a 230 g, 4 °C per 10 minuti;
- il sovrnatante era eliminato;
- il pellet di cellule veniva lisato in 60 µl di Buffer di Lisi [Tabella 4.12] addizionato di inibitori delle proteasi;
- si procedeva con un ciclo di congelamento in azoto liquido e scongelamento al fine di favorire la lisi cellulare;
- le eppendorf erano quindi incubate a 4 °C per 30 minuti su un hybridizer;
- si procedeva quindi a centrifugare a 4 °C, 10000 rpm per 20 minuti per eliminare i debris cellulari;
- del sovrnatante così ottenuto se ne prelevava una parte (circa 5 µl) per i dosaggi proteici, la restante parte veniva conservata a -80 °C fino al momento dell'utilizzo.

Composizione del Buffer di Lisi

Tris HCl (pH 7,4)	25 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	1%

Tabella 4.12 – Composizione del Buffer di Lisi per l'estrazione di proteine totali, pH 7.4.

4.8.2 Estrazione delle membrane plasmatiche

Per ottenere l'estratto di proteine di membrana è stato utilizzato il kit "Plasma Membrane Protein Extraction Kit" (MBL). Il protocollo si articola come segue:

- a 48 ore dalla transfezione delle cellule NU12 e HU33 con il vettore pcDNA3-CFTR, il terreno di coltura era eliminato dalle piastre da 6 cm di diametro;
- le cellule erano lavate con PBS 1X;
- alle cellule veniva aggiunto 1 ml di PBS 1X;
- le cellule venivano staccate dal fondo della piastra utilizzando uno scraper e venivano raccolte in Falcon (9 Petri da 6 cm costituivano una preparazione);
- le Falcon erano centrifugate a 3000 rpm, per 5 minuti a 4 °C;
- il pellet di cellule veniva risospeso in 1 ml di Buffer di omogeneizzazione (fornito dal produttore del kit), addizionato di inibitori delle proteasi. Il lisato veniva poi trasferito in eppendorf;
- si procedeva con tre cicli di congelamento in azoto liquido e scongelamento, quindi, con una siringa da insulina si siringava il campione 30-50 volte. Questi passaggi hanno lo scopo di favorire la lisi cellulare;
- l'omogenato era centrifugato a 700 g, per 10 minuti a 4 °C;
- il surnatante così ottenuto era trasferito in una nuova eppendorf e centrifugato a 10000 g, per 30 minuti a 4 °C;
- il surnatante ottenuto da questa centrifugata, contenente le proteine citosoliche, veniva trasferito in una nuova eppendorf e congelato a -80 °C fino al momento dell'utilizzo;
- il pellet, composto dalle proteine totali di membrana (sia quelle della membrana plasmatica sia quelle delle membrane degli organelli) era

- risospeso in 200 µl di Upper Phase Solution (fornita dal produttore del kit);
- erano aggiunti 200 µl di Lower Phase Solution (fornita dal produttore del kit);
 - le eppendorf venivano vortexate e incubate in ghiaccio per 5 minuti;
 - le eppendorf erano centrifugate a 3500 rpm, per 5 minuti a 4 °C, in modo da ottenere la separazione di Upper e Lower Phase;
 - la Upper Phase veniva prelevata, trasferita in una nuova eppendorf e incubata in ghiaccio;
 - alla Lower Phase erano aggiunti 100 µl di Upper Phase Solution, si vortexava e si centrifugava nuovamente a 3500 rpm per 5 minuti a 4 °C, in modo da riottenere la separazione tra Upper e Lower Phase;
 - la Upper Phase era prelevata e aggiunta alla Upper Phase ottenuta dalla centrifugata precedente;
 - alla Upper Phase erano aggiunti 100 µl di Lower Phase Solution, si vortexava e si centrifugava a 3500 rpm per 5 minuti a 4 °C, ottenendo una nuova separazione tra Upper e Lower Phase;
 - la Lower Phase era congelata a -80 °C fino al momento dell'utilizzo, mentre la Upper Phase veniva trasferita in una nuova eppendorf, a cui venivano aggiunti cinque volumi di H₂O milliQ, e la si incubava in ghiaccio per 5 minuti;
 - la Upper Phase era centrifugata a 14000 rpm per 10 minuti a 4 °C. Il pellet ottenuto dalla centrifugata (costituito dalle sole proteine della membrana plasmatica) veniva risospeso in 50-60 µl di Buffer di Lisi contenente NP-40 [Tabella 4.13].

Composizione del Buffer di Lisi

Tris HCl (pH 7,5)	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
NP-40	1%

Tabella 4.13 – Composizione del Buffer di Lisi per l'estrazione di proteine di membrana, pH 7.

4.9 Dosaggio proteico

Per misurare la concentrazione delle proteine viene utilizzato il metodo Bradford (1979). Tale sistema consiste nell'utilizzo di un colorante costituito da una soluzione acida di Comassie Brilliant Blue G-250 (Sigma) contenuto in un reattivo formato da acido fosforico ed etanolo (Biorad Protein Assay kit). Il colorante anionico si lega alle proteine causando una variazione di colore che è possibile rilevare attraverso una variazione di assorbanza quantificabile ad una lunghezza d'onda di 595 nm. Per il dosaggio si utilizza 1 ml di reattivo diluito 1:5 in acqua, a cui viene aggiunto il campione. Il dosaggio delle proteine viene misurato allo spettrofotometro; per risalire dal valore di assorbanza alla concentrazione del campione è necessario allestire una retta di taratura, servendosi di diluizioni seriali di albumina da siero bovino a concentrazione nota. La quantificazione dei campioni avviene leggendo l'assorbanza a $\lambda=595$ nm. Dopo averne determinato la concentrazione proteica è possibile preparare i campioni per effettuare la corsa elettroforetica.

4.10 Coimmunoprecipitazione

4.10.1 Coimmunoprecipitazione con FLAG tag

Per effettuare questi esperimenti di coimmunoprecipitazione, le cellule HEK sono state cotrasfettate con CFTR e pcDNA3.1-adducina-FLAG (adducina wild-type con un FLAG tag all'estremità carbossi-terminale) oppure con CFTR e pFLAG-BAP (Bovine Alkaline Peroxidase, condizione di controllo). Per ciascuna condizione si sono transfettate tre Petri da 10 cm di diametro.

A 48 ore dalla transfezione:

- le cellule erano lavate con PBS 1X;

- a ciascuna piastra si aggiungeva 1 ml di PBS 1X e si staccavano le cellule utilizzando uno scraper, le tre piastre ugualmente transfettate erano raccolte nella medesima Falcon;
- le Falcon erano centrifugate a 1000 g per 10 minuti, a 4 °C;
- si eliminava il sovrnatante e si risospendeva il pellet in 3 ml (1 ml per piastra) di Buffer di lisi per immunoprecipitazione a bassa stringenza [Tabella 4.14], addizionato con inibitori delle proteasi;
- si procedeva con un ciclo di congelamento in azoto liquido e scongelamento per favorire la lisi cellulare;
- si centrifugava a 1000 g per 5 minuti a 4 °C per eliminare i debris;
- il sovrnatante era prelevato e aliquotato in eppendorf, una quota era utilizzata per il dosaggio proteico con metodo Bradford.

Per questi esperimenti di coimmunoprecipitazione si è utilizzata la resina α -FLAG M2 Affinity Gel (Sigma), costituita da anticorpi monoclonali α -FLAG coniugati ad agarosio. La resina veniva preparata seguendo le istruzioni del produttore:

- si usavano 100 μ l totali di resina che venivano centrifugati a 10000 rpm per 1 minuto per eliminare il sovrnatante (glicerolo);
- si avvinava la resina con Buffer di lisi e la si pellettava nuovamente, si eliminava il sovrnatante;
- alla resina veniva aggiunto un volume di campione corrispondente a 5 mg di proteine totali, secondo il dosaggio effettuato con il metodo Bradford;
- si lasciavano in incubazione resine e proteine, a 4 °C, per un tempo di 2 ore oppure overnight;
- al termine dell'incubazione la resina veniva centrifugata nuovamente a 1000 g per 5 minuti, per separare il flow-through, costituito dalle proteine non legate alla resina, dalla resina stessa;
- si lavava la resina con 10 ml di Wash buffer [Tabella 4.15] e si separava nuovamente per centrifugazione a 1000 g per 5 minuti.

A partire da questo punto sono state seguite due strategie differenti, in un caso:

- si trasferiva la resina in colonnine (Biorad) in grado di trattenere la resina ma non la soluzione;
- si lavava ulteriormente con 500 µl di Wash buffer per 4 volte e infine una volta con PBS 1X;
- si effettuavano eluizioni sequenziali con 40 µl di Flag peptide 130 µg/ml.

In alternativa:

- si risospendeva la resina (pellet) in 1 ml di Wash buffer e si centrifugava a 10000 rpm per 1 minuto a 4 °C, si ripeteva tre volte;
- si risospendeva la resina in 500 µl di PBS 1X e si centrifugava a 10000 rpm per 1 minuto a 4 °C, si eliminava il sovrnatante;
- si risospendeva la resina in 40 µl di Sample Buffer 2X (ottenuto dalla diluizione del Sample Buffer 4X [Tabella 4.18] in PBS1X).

Composizione del Buffer di lisi a bassa stringenza

Tris HCl	25 mM
NaCl	150 mM
Glicerolo	10%
Triton X-100	0,5%

Tabella 4.14 – Composizione del Buffer di lisi a bassa stringenza per coimmunoprecipitazione.

Composizione del Wash buffer

Tris HCl	25 mM
NaCl	150 mM
Glicerolo	10%
Triton X-100	0,1%

Tabella 4.15 – Composizione del Wash buffer a bassa stringenza.

4.10.2 Coimmunoprecipitazione con HA tag

Per effettuare questi esperimenti di coimmunoprecipitazione, le cellule HEK sono state cotransfettate con pcDNA3-CFTR e pcDNA3.1-HA-adducina (adducina wild-type con un HA tag all'estremità ammino-terminale) oppure con pcDNA3-CFTR e pFLAG (vettore vuoto, condizione di controllo). Per ciascuna condizione si sono transfettate tre Petri da 10 cm di diametro.

A 48 ore dalla transfezione:

- le cellule erano lavate con PBS 1X;
- a ciascuna piastra si aggiungeva 1 ml di PBS 1X e si staccavano le cellule utilizzando uno scraper, le tre piastre ugualmente transfettate erano raccolte nella medesima Falcon;
- le Falcon erano centrifugate a 1000 g per 10 minuti, a 4 °C;
- si eliminava il sovrnatante e si risospendeva il pellet in 3 ml (1 ml per piastra) di Buffer di lisi Triton [Tabella 4.16], o di Buffer di lisi per coimmunoprecipitazione a bassa stringenza [Tabella 4.14], entrambi addizionati con inibitori delle proteasi;
- si procedeva a siringare ripetutamente per favorire la lisi cellulare;
- si centrifugava a 4500 g per 10 minuti a 4 °C per eliminare i debris cellulari;
- il sovrnatante era prelevato e aliquotato in eppendorf, una quota era utilizzata per il dosaggio proteico con metodo Bradford.

Per questi esperimenti di coimmunoprecipitazione si è utilizzata la resina α -HA Agarose Affinity Gel (Sigma), costituita da anticorpi monoclonali α -HA coniugati ad agarosio. La resina veniva preparata seguendo le istruzioni del produttore:

- si usavano 100 μ l totali di resina che venivano centrifugati a 10000 rpm per 1 minuto per eliminare il sovrnatante (glicerolo);
- si avvinava la resina risospingendola in 750 μ l del Buffer di lisi utilizzato per la lisi delle cellule (Buffer Triton o Buffer di lisi a bassa stringenza) e la si pellettava nuovamente, si eliminava il sovrnatante;
- si ripeteva questa operazione una seconda volta;
- alla resina veniva aggiunto un volume di campione corrispondente a 2 mg di proteine totali, secondo il dosaggio effettuato con il metodo Bradford;

- si lasciava in incubazione a 4 °C per un tempo di 2 ore oppure overnight;
- al termine dell'incubazione la resina veniva centrifugata a 10000 rpm per 30 secondi, per separare il flow-through, costituito dalle proteine non legate alla resina, dalla resina stessa;
- si lavava la resina con 750 µl di Buffer di lisi (Buffer Triton o Buffer di lisi a bassa stringenza) e si separava nuovamente per centrifugazione a 10000 rpm per 30 secondi a 4 °C, si ripeteva 3 volte;
- si risospendeva la resina in 500 µl di PBS 1X e si centrifugava a 10000 rpm per 1 minuto a 4 °C, si eliminava il sovrnatante;
- si risospendeva la resina in 50 µl di Sample Buffer 2X (ottenuto dalla diluizione del Sample Buffer 4X [Tabella 4.18] in PBS1X).

Composizione del Buffer di lisi Triton

MES	0,1 mM
EGTA	1 mM
MgCl ₂	0,5 mM
NaN ₃	0,2 mg/ml
Triton X-100	0,1%

Tabella 4.16 – Composizione del Buffer di lisi Triton per coimmunoprecipitazione.

4.11 Biotinilazione

Per effettuare gli esperimenti di biotinilazione, le cellule NU12 e HU33 sono state transfettate con il vettore pcDNA3-CFTR. Per ciascuna condizione si sono transfettate due Petri del diametro di 6 cm.

A 48 ore dalla transfezione:

- le cellule sono state lavate 3 volte con PBS 1X + 100 µM Ca²⁺ + 1 mM Mg²⁺ (PBS-CM) pH 8;

- le cellule sono state incubate a 4 °C, in agitazione, per 20 minuti con biotina EZ-Link sulfo-NHS-LC-biotin (21335, Pierce) 1 mg/ml in PBS-CM pH 8; i controlli negativi sono stati incubati in PBS-CM pH 8;
- l'incubazione in biotina è stata ripetuta una seconda volta;
- le cellule sono state lavate con PBS 1X + 50 mM glicina pH 8 a 4 °C e quindi sono state incubate in agitazione, per 20 minuti, in PBS 1X + 50 mM glicina pH 8 a 4 °C, questo passaggio ha la funzione di bloccare la reazione di biotinilazione;
- le cellule sono state lavate due volte in PBS 1X a 4 °C;
- le cellule sono state lisate in 400 µl di Buffer di Lisi [Tabella 4.12] addizionato di inibitori delle proteasi e sono state raccolte;
- si sono incubate le cellule a 4 °C per 30 minuti su hybridizer;
- le cellule sono state centrifugate a 10000 rpm 4 °C per 20 minuti;
- il sovrnatante era prelevato e aliquotato in eppendorf, una quota era utilizzata per il dosaggio proteico con metodo Bradford;

Per questi esperimenti di biotinilazione si è utilizzata la streptavidina Ultra Link Immobilized Streptavidine (53117, Pierce), la resina veniva preparata seguendo le istruzioni del produttore:

- si prelevavano 120 µl di resina per campione che venivano pellettati per eliminare il glicerolo;
- si risospendeva la resina in 250 µl di Buffer di Lisi addizionato con 0,2% BSA, si pellettava e si eliminava il surnatante;
- si ripeteva 2 volte.

Si incubavano con la resina di streptavidina 1250 µg di proteine, overnight, a 4 °C su hybridizer.

Il giorno successivo:

- le resine di streptavidina venivano pellettate, il sovrnatante , prelevato e aliquotato, andrà a costituire il flow-through, ovvero la quota di proteine non legate alla resina;
- le resine erano risospese in 1 ml di Buffer di Lisi addizionato con 0,2%

- BSA, pellettate e il sovrnatante era eliminato. Si ripeteva due volte;
- le resine erano quindi risospese in Buffer di Lisi, pellettate e il sovrnatante eliminato;
 - si risospendeva infine ciascuna resina in 40 μ l di Sample Buffer 2X (ottenuto dalla diluizione del Sample Buffer 4X [Tabella 4.18] in PBS1X).

4.12 Western blot

4.12.1 Elettroforesi SDS PAGE

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PPA) viene condotta in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), utilizzando un metodo di tipo discontinuo, così detto per le differenze di concentrazione e di pH esistenti fra Running gel e Stacking gel [Tabella 4.17]. La funzione dello Stacking gel è quella di impaccare le proteine sul fronte di corsa, mentre la funzione del Running gel è quella di permetterne la separazione. La corsa elettroforetica viene effettuata in presenza di sodiododecilsolfato (SDS), un detergente anionico in grado di legarsi alle proteine, provocandone la denaturazione. In tali condizioni le proteine assumono una carica negativa che consente loro di migrare verso il polo positivo, pertanto la separazione avviene solo in funzione del peso molecolare.

Preparazione dei campioni

Prima di caricare i campioni:

- aggiungere ai preparati Sample Buffer 4X [Tabella 4.18] in modo che risulti 1X in concentrazione finale;
- scaldare i campioni a 37 °C per 20 minuti;
- centrifugare a velocità massima per pochi secondi.

I campioni erano quindi caricati nei pozzetti del gel per elettroforesi SDS-PAGE (6,5% acrilammide) ed erano fatti correre con il marker (Page Ruler Plus Prestained

Protein Ladder, SM1811, Fermentas) a voltaggio costante di 120 V, in Buffer di corsa 1X [Tabella 4.19].

Composizione dei gel

	Stacking gel 4%	Running gel 6,5%
Miscela di acrilammide/bisacrilammide (30% e 0,8%)	435 µl	1,63 ml
H ₂ O bi distillata	2,03 ml	4,35 ml
Tris HCl 0,5 M (pH 6,8)	840 µl	-
Tris HCl 1,5 M (pH 8,8)	-	1,88 ml
SDS 10%	16,7 µl	37,5 µl
Temed	3,35 µl	3,75 µl
APS 10%	16,7 µl	37,5 µl

Tabella 4.17 – Composizione dei gel di poliacrilammide per la separazione elettroforetica delle proteine negli esperimenti di Western blot.

Composizione del Sample Buffer 4X

Tris HCl (pH 6,8)	231,4 mM
Glicerolo	40% (w/v)
SDS	8% (w/v)
Blu di bromophenolo	0,016% (w/v)
DTT	75 mg/ml

Tabella 4.18 – Composizione del Sample Buffer 4X.

Composizione del Buffer di corsa 1X

Tris base	25 mM
Glicina	200 mM
SDS	0,1%

Tabella 4.19 – Composizione del Buffer di corsa 1X per la corsa elettroforetica delle proteine negli esperimenti di Western blot.

4.12.2 Trasferimento

Al termine della corsa elettroforetica lo Stacking gel veniva eliminato e le proteine venivano trasferite dal Running gel ad una membrana PVDF (Polyvinylidene fluoride) per mezzo di un elettroblotter:

- la membrana PVDF pretrattata (45 secondi in metanolo poi 2 minuti in acqua), il Running gel, due fogli di carta da filtro 3M e due spugnette erano pre-equilibrate nel Buffer di trasferimento [Tabella 4.20];
- la membrana veniva posta a contatto con il gel, a loro volta, membrana e gel venivano posizionati tra i due fogli di carta da filtro e il tutto tra due apposite spugnette (verificando l'assenza di bolle d'aria che potrebbero compromettere il trasferimento);
- il tutto veniva immerso in Buffer di trasferimento;
- il trasferimento veniva condotto tra due elettrodi di platino (con la membrana rivolta verso l'anodo), con voltaggio costante di 30 V, a 4 °C, overnight;
- al termine del trasferimento, il gel veniva colorato con Blue di Coomassie R-205 (Sigma) 0,4% per 60 minuti e poi decolorato con acido acetico al 10% overnight;
- le membrana veniva sciacquata in PBS-T (Tween-20 0,05% o 0,1%) per eliminare i residui di Buffer di trasferimento.

Composizione del Buffer di trasferimento

Metanolo	20%
Tris base	25 mM
Glicina	192 mM

Tabella 4.20 – Composizione del Buffer di trasferimento per il trasferimento delle proteine su membrana durante gli esperimenti di Western blot.

4.12.3 Blocco e incubazione con gli anticorpi

La membrana veniva messa a contatto con una soluzione di bloccaggio, PBS-T, addizionata a polvere di latte per un tempo variabile a seconda della proteina, in agitazione, in modo da andare a saturare i siti aspecifici della membrana cui potrebbe legarsi l'anticorpo.

Successivamente la membrana veniva incubata con l'anticorpo primario diluito in PBS-T addizionato a polvere di latte.

Seguono lavaggi per eliminare l'anticorpo in eccesso, al termine dei lavaggi, la membrana era incubata in agitazione per un'ora con l'anticorpo secondario, diluito in PBS-T addizionato a polvere di latte. L'anticorpo secondario è coniugato a perossidasi di rafano (HRP).

Seguono ulteriori lavaggi per eliminare l'anticorpo in eccesso.

Combinazioni proteina-blocco-anticorpo primario-lavaggi-anticorpo secondario-lavaggi

CFTR	Blocco	2% milk PBS-T 0,05% 2 ore RT
	anticorpo I	anti-CFTR 24.1 (R&D Systems, MAB25031) 1:1000 O/N 4 °C
	Lavaggi	1 da 15 minuti + 4 da 5 minuti in 2% milk PBS-T 0,05%
	anticorpo II	anti-mouse 1:10000 (Pierce)
	Lavaggi	1 da 15 minuti + 4 da 5 minuti in 2% milk PBS-T 0,05%
CFTR	Blocco	5% milk PBS-T 0,1% 1 ora RT
	anticorpo I	anti-CFTR (Santa Cruz Biotechnology, sc-10747) 1:1000 O/N 4 °C
	Lavaggi	1 da 10 min in 5% milk PBS-T 0,1% + 4 da 10 min in PBS-T 0,1%
	anticorpo II	anti-rabbit 1:5000 (Pierce)

	Lavaggi	5 da 10 minuti in PBS-T 0,1%
Adducina	Blocco	5% milk PBS-T 0,1% 1 ora RT
	anticorpo I	anti-HA tag (Covance) 1:1000 O/N 4 °C
	Lavaggi	4 da 10 minuti in PBS-T 0,1%
	anticorpo II	anti-mouse 1:10000 (Pierce)
	Lavaggi	4 da 10 minuti in PBS-T 0,1%
Caderina	Blocco	5% milk PBS-T 0,1% 1 ora RT
	anticorpo I	anti-caderina (Abcam, ab6529) 1:1500 O/N 4 °C
	Lavaggi	4 da 10 minuti in PBS-T 0,1%
	anticorpo II	anti-rabbit 1:10000 (Pierce)
	Lavaggi	4 da 10 minuti in PBS-T 0,1%
Calreticulina	Blocco	5% milk PBS-T 0,1% 1 ora RT
	anticorpo I	anti-calreticulina (Abcam, ab4) 1:1000 O/N 4 °C
	Lavaggi	5 da 10 minuti in PBS-T 0,1%
	anticorpo II	anti-rabbit 1:10000 (Pierce)
	Lavaggi	5 da 10 minuti in PBS-T 0,1%
FLAG	Blocco	5% milk PBS-T 0,1% O/N 4°C
	anticorpo I	anti-FLAG (Sigma, F3165) 1:2000 1 ora RT
	Lavaggi	3 da 10 minuti in PBS-T 0,1%
	anticorpo II	anti-mouse 1:10000 (Pierce)
	Lavaggi	3 da 10 minuti in PBS-T 0,1%

Tabella 4.21 – Combinazioni delle differenti proteine con le relative modalità di blocco, anticorpo primario, secondario e modalità di lavaggio.

4.12.4 Sviluppo

Il kit utilizzato per lo sviluppo è il kit per chemiluminescenza Immobilon (Millipore). La membrana veniva ricoperta per circa 3 minuti con ECL: una soluzione contenete Luminol, un substrato della perossidasi che, quando viene ossidato, in presenza di H₂O₂ e in condizioni alcaline, passa ad uno stato eccitato. Il decadimento dallo stato

eccitato allo stato fondamentale avviene con emissione di luce che, in seguito a brevi esposizioni (fino a circa 1 ora), può impressionare un film per autoradiografia sensibile alla luce blu.

4.12.5 Stripping della membrana

Dopo lo sviluppo, le membrane incubate con un anticorpo, prima di essere reincubate con un altro anticorpo, devono essere strippate per eliminare i residui di anticorpo legati alla membrana:

- si lavava la membrana in acqua di soluzione per 5 minuti;
- si procedeva con un lavaggio di 1 minuto in Soluzione di stripping [Tabella 4.22];
- si lavava con Soluzione di stripping per 40 minuti;
- si eseguivano due lavaggi da 5 minuti in acqua di soluzione;
- si equilibrava la membrana in PBS-T;
- si effettuava uno sviluppo di controllo, per verificare che non ci fosse più segnale, cioè che l'anticorpo non fosse più legato alla membrana;
- si proseguiva con il blocco della membrana e quindi con le incubazioni con gli anticorpi necessari.

Composizione Soluzione di stripping

Tris HCl	50 mM
SDS	2%

Tabella 4.22 – Composizione della soluzione di stripping, pH 2.2-2.3.

4.12.6 Colorazione Amido black di membrane PVDF

Al termine del Western blot, la membrana PVDF veniva colorata con una soluzione di Amido Black Staining solution (Biorad) [Tabella 4.23] in agitazione per 3 minuti, successivamente veniva lavata velocemente con acqua di soluzione e quindi

decolorata con Destain solution [Tabella 4.24] per 3 minuti in agitazione, poi era fatta asciugare all'aria.

Composizione Amido Black Staining solution

Metanolo	45%
Acido acetico	10%
H ₂ O	45%
Amido Black (Biorad)	0,1%

Tabella 4.23 – Composizione della soluzione Amido Black Staining solution per la colorazione delle membrane degli esperimenti di Western blot.

Composizione Destain solution

Metanolo	90%
Acido acetico	2%
H ₂ O	8%

Tabella 4.24 – Composizione della soluzione Destain solution, per la decolorazione delle membrane degli esperimenti di Western blot, precedentemente colorate con Amido Black Staining solution.

4.13 Esperimenti di patch-clamp

Gli esperimenti di patch-clamp, condotti al fine di studiare l'attività del canale per il cloruro CFTR, sono stati eseguiti in configurazione "whole-cell" e in configurazione "cell-attached".

La configurazione "whole-cell" consente di dializzare il contenuto intracellulare con la soluzione contenuta nell'elettrodo usato per le misurazioni. In questo modo si effettuano misure delle correnti che attraversano i canali ionici di tutta la membrana plasmatica di una singola cellula e si può caratterizzare il canale in presenza di soluzioni intracellulari a composizione nota e/o studiare l'effetto diretto

indotto dalla variazione di alcuni parametri intracellulari (es. pH) o da inibitori/attivatori sulla corrente ionica.

La configurazione "cell-attached" consente di ottenere registrazioni della corrente di singolo canale in una condizione dove l'integrità della cellula viene mantenuta; l'attività del singolo canale risente così dei meccanismi di trasduzione del segnale, dei secondi messaggeri, delle chinasi, dei trasportatori di membrana. In questa configurazione la composizione ionica intracellulare non è modificabile.

L'apparato strumentale utilizzato per la realizzazione di questi esperimenti è costituito da: gabbia di Faraday, tavolo antivibrante, microscopio invertito, amplificatore da patch-clamp (Heka, EPC-9) e relativo holder, micromanipolatore, sistema di perfusione, convertitore analogico-digitale e computer per immagazzinamento e analisi dei dati (programma Pulse Heka, Germania).

Le misure di whole-cell sono state eseguite con una frequenza di campionamento di 2 kHz e filtrate 1 kHz (corner frequency) con un filtro Bessel a 8 poli.

Le misure di cell-attached sono state eseguite con una frequenza di campionamento di 2 kHz e filtrate 0,2 kHz (corner frequency) con un filtro Bessel a 8 poli.

Le pipette da patch-clamp erano preparate a partire da capillari in borosilicato (Garner Glass Company, con diametro esterno di 1,65 mm e diametro interno di 1,15 mm) per mezzo di un puller orizzontale (Sutter Instrument CO Made in U.S.A. Model P-87 Flaming/Brown Micropipette Puller) e forgiate in modo che avessero una resistenza di 5-8 M Ω per gli esperimenti di whole-cell e di 10-15 M Ω per gli esperimenti di cell-attached.

4.13.1 Esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell

Gli esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell sono stati condotti su cellule NU12 e HU33 a 48 ore dalla transfezione con il vettore pIRES2-EGFP-CFTR.

Il protocollo degli esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell prevedeva che il sigillo fosse realizzato in una soluzione extracellulare fisiologica [Tabella 4.25]. Dopo il raggiungimento della configurazione cell-attached, applicando un'ulteriore suzione, si raggiungeva la configurazione whole-cell. A

questo punto si eseguiva un protocollo "I/V" che prevedeva l'invio alla cellula di impulsi di potenziale della durata di 500 ms da -100 mV a +100 mV, con incrementi di 20 mV a partire da un potenziale di holding di 0 mV.

Successivamente la soluzione extracellulare veniva sostituita con una soluzione di uguale composizione rispetto alla precedente, cui però era aggiunta forskolina 10 μ M. La forskolina è un diterpene, un potente attivatore dell'adenilato ciclasi, l'enzima che catalizza la conversione dell'ATP in cAMP e pirofosfato. L'incremento di cAMP intracellulare determina, a sua volta, l'attivazione del canale CFTR.

Veniva quindi applicato un protocollo "sweeps +40 mV" che prevedeva l'applicazione di step di potenziale a +40 mV, a partire da un potenziale di holding di 0 mV, della durata di 400 msec, inviati ogni 10 secondi. L'applicazione di questo protocollo consentiva di osservare un incremento della corrente nel tempo, in seguito all'aggiunta dell'attivatore del canale. Dopo 3 minuti dall'inizio della sostituzione veniva eseguito nuovamente un protocollo "I/V".

Al termine della registrazione era aggiunto alla soluzione extracellulare l'inibitore specifico del CFTR, tiazolidinone CFTR_{inh}-172, ad una concentrazione di 2 μ M. L'inibizione della corrente nel tempo era valutata applicando il protocollo "sweeps +40 mV", mentre l'entità della corrente ai diversi potenziali era valutata con il protocollo "I/V".

Composizione soluzione extracellulare

NaCl	145 mM
CsCl	4 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1 mM
Glucosio	10 mM
HEPES	10 mM

Tabella 4.25 – Composizione della soluzione extracellulare utilizzata negli esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell, pH 7.4, 324 mOsm.

Composizione soluzione elettrodo

TEA-Cl	10 mM
CsCl	140 mM
MgCl ₂	2 mM
EGTA	0,5 mM
Glucosio	5 mM
HEPES	5 mM

Tabella 4.26 – Composizione della soluzione per elettrodo utilizzata negli esperimenti di patch-clamp in configurazione whole cell, pH 7.3, 320 mOsm. Al momento dell'utilizzo era aggiunto Mg²⁺-ATP 2 mM.

4.13.2 Esperimenti di patch-clamp in configurazione cell-attached

Gli esperimenti di patch-clamp in configurazione cell-attached sono stati condotti su cellule NU12 e HU33 a 48 ore dalla transfezione con il vettore pIRES2-EGFP-CFTR.

Per gli esperimenti di cell-attached, i potenziali sono stati corretti tenendo conto del potenziale di membrana (pari a circa -30 mV, come risultava da esperimenti preliminari di current clamp) e del potenziale di giunzione liquida (pari a -5 mV in presenza delle soluzioni utilizzate, calcolato con l'equazione di Henderson).

Il protocollo sperimentale per gli esperimenti di singolo canale prevedeva che il sigillo fosse realizzato in una soluzione extracellulare fisiologica.

Le correnti erano studiate applicando potenziali variabili compresi tra -100 mV e +100 mV per 3 minuti.

Successivamente il protocollo prevedeva la realizzazione di rampe di potenziale che andavano da -100 mV a +100 mV. Quindi la soluzione extracellulare era sostituita con una soluzione uguale per composizione alla precedente, cui però era stata aggiunta forskolina 10 µM. Al termine della sostituzione e poi ogni 2 minuti, per un totale di 6 minuti, venivano applicate ulteriori rampe di potenziale.

Per finire erano nuovamente applicati potenziali variabili tra -100 mV e +100 mV per 3 minuti, al fine di valutare come variava l'attivazione del canale in seguito all'aggiunta di forskolina.

Composizione soluzione extracellulare

NaCl	145 mM
KCl	4 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1 mM
Glucosio	10 mM
HEPES	10 mM

Tabella 4.27 – Composizione della soluzione extracellulare utilizzata negli esperimenti di patch-clamp in configurazione cell-attached, pH 7.4, 304 mOsm.

Composizione soluzione elettrodo

NMDG	115 mM
TEA-Cl	30 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	2 mM
HCl	115 mM
HEPES	10 mM

Tabella 4.28 – Composizione della soluzione per elettrodo utilizzata negli esperimenti di patch-clamp in configurazione cell-attached, pH 7.4, 309 mOsm.

4.14 Misurazione del cAMP intracellulare

Per la misura dei livelli di cAMP intracellulari è stato utilizzato il kit cAMP Glo assay (Promega).

Le cellule NU12 e HU33 venivano piastrate in multiwell da 96 polilisinati, in quantità di 5×10^3 cellule/pozzetto.

Il giorno successivo:

- il terreno veniva eliminato dai pozzetti;
- le cellule venivano lavate una volta con PBS 1X;

- le cellule venivano esposte per 15 minuti, a temperatura ambiente, a 20 μ l di Buffer di induzione [Tabella 4.29], contenente forskolina 10 μ M oppure la corrispondente quantità di DMSO (solvente della forskolina), nel caso della condizione di controllo;
- si preparavano gli standard di cAMP (in triplo) per costruire la retta di taratura:
 - si preparava la cAMP solution: cAMP 4 μ M in Buffer di induzione [Tabella 4.29];
 - si operavano 10 diluizioni seriali 1:2 della cAMP solution in Buffer di induzione;
 - si trasferivano 20 μ l di cAMP solution, delle sue 10 diluizioni seriali e del solo Buffer di induzione (no cAMP), in un multiwell da 96 privo di cellule;
- a tutti i pozzetti (standard inclusi) si aggiungevano 20 μ l di cAMP Glo lysis buffer;
- si mescolavano i pozzetti e si lasciava il multiwell in agitazione 20-30 minuti, a temperatura ambiente;
- i 40 μ l erano trasferiti in un multiwell a fondo bianco, quindi, a tutti i pozzetti, standard inclusi, erano aggiunti 40 μ l di cAMP Glo detection solution (contenente PKA);
- si incubava 20 minuti a temperatura ambiente;
- si aggiungevano 80 μ l di Kinase Glo reagent a tutti pozzetti (standard inclusi) e si incubava 10 minuti a temperatura ambiente;
- i valori di luminescenza erano misurati con un luminometro Tecan F200 Pro.

Il saggio è stato effettuato in 4 serie sperimentali indipendenti e, per ciascuna serie, ogni condizione è stata testata in triplo e i valori di luminescenza ottenuti sono stati normalizzati per la concentrazione proteica.

Composizione Buffer di induzione

PBS 1X	
R _o 20-1724 (4-(3-butoxy-4-methoxy-benzyl)imidazolidone)	100 μ M
IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine)	500 μ M

Tabella 4.29 – Composizione del Buffer di induzione utilizzato per la misurazione del cAMP intracellulare.

4.15 Esperimenti di FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

La tecnica FRAP consente di studiare la mobilità e la diffusione di macromolecole biologiche in cellule vive. Per fare ciò la molecola di interesse viene fusa ad un fluoroforo, si va quindi a spegnere la fluorescenza, utilizzando un laser ad elevata intensità, in una specifica regione di interesse (ROI). Dopo il photobleaching, la fluorescenza nella ROI viene in parte recuperata se la molecola è in grado di diffondere nella ROI. Generalmente il recupero di fluorescenza non è mai totale e si raggiunge uno stato stazionario, la frazione di molecole non in grado di diffondere costituisce la cosiddetta frazione immobile.

Per effettuare questi esperimenti le cellule HEK erano piastrate in Petri da 3,5 cm di diametro, con il fondo in vetro e, il giorno successivo, venivano cotransfettate con i vettori pEYFPC1-CFTR e pECFPC1-adducina wild type oppure con i vettori pEYFPC1-CFTR e pECFPC1-adducina mutata.

Gli esperimenti erano condotti a 48 ore dalla transfezione, su cellule esprimenti entrambi i costrutti. Durante le acquisizioni al microscopio confocale, le cellule erano mantenute ad una temperatura di 37 °C in PBS 1X complementato con glucosio al 4,5%.

Per l'imaging il CFP era eccitato con la linea laser a 458 nm mentre il YFP con la linea laser a 514 nm e, i due fluorofori erano acquisiti in due differenti fotomoltiplicatori con una scansione sequenziale. L'emissione del CFP era raccolta tra i 465 e i 490 nm, mentre l'emissione del YFP tra i 525 nm e i 600 nm; si utilizzava un obiettivo ad

immersione 63X (1.4 NA).

Il photobleaching del YFP fuso al CFTR e il conseguente recupero di fluorescenza erano analizzati in tre differenti ROI; le ROI comprendevano sempre una porzione di membrana plasmatica e avevano forma e dimensioni sempre uguali. Il recupero di fluorescenza era monitorato per un tempo di 150 secondi.

I valori di fluorescenza totale nella ROI ($F_{ROI(t)}$), per ciascun tempo, erano corretti per la fluorescenza del background ($F_{bg(t)}$) ed erano normalizzati per la fluorescenza totale di una ROI non sottoposta a photobleaching ($F_{noPB(t)}$), anch'essa sottratta della fluorescenza del background ($F_{bg(t)}$), al fine di correggere il photobleaching spontaneo del YFP:

$$F(t) = [F_{ROI(t)} - F_{bg(t)}] / [F_{noPB(t)} - F_{bg(t)}].$$

Infine i valori di fluorescenza così ottenuti, corretti per il background e per il bleaching spontaneo, erano normalizzati per il valore di fluorescenza misurato prima del photobleaching (F_{prePB}):

$$F_{norm(t)} = F(t) / F_{prePB}.$$

Per calcolare la frazione di proteine in grado di diffondere nella regione sottoposta a photobleaching, ossia la frazione mobile, e la velocità di recupero di fluorescenza, espressa come $t_{1/2}$, il recupero normalizzato (F_{norm}) di ciascuna ROI è stato individualmente fittato con l'equazione esponenziale $F_{norm(t)} = A * (1 - e^{-B*t})$ dove A è $F_{norm MAX}$ che rappresenta il valore di fluorescenza ottenuto da estrapolazione ad un tempo infinito dopo il recupero, B è $1/\tau$; τ , a sua volta, è una costante di tempo espressa in secondi.

$$t_{1/2} = \tau * \ln 2$$

$$F_{mob\%} = 100 * [F_{norm MAX} - F_{norm MIN}] / [1 - F_{norm MIN}]$$

dove $F_{norm MIN}$ è il primo valore di fluorescenza misurato dopo il photobleaching.

4.16 Esperimenti di fotoattivazione

Questa tecnica consente di studiare i fenomeni di trafficking del CFTR da, verso e all'interno della membrana plasmatica. Per fare ciò il CFTR è stato fuso alla versione fotoattivabile del fluoroforo GFP (PAGFP), in grado, in seguito ad intensa illuminazione con un laser alla lunghezza d'onda di 405 nm, di incrementare la sua emissione di fluorescenza di circa 100 volte quando eccitata con un laser a lunghezza d'onda di 488 nm. Questa proprietà della PAGFP è dovuta ad una mutazione dell'amminoacido treonina in posizione 203 della GFP, sostituito da un'istidina. La proteina fotoattivata rimane stabile per alcuni giorni in condizioni aerobiche.

Le cellule HEK erano cotrasfettate transientemente con PAGFP-CFTR e CFP-adducina wild-type oppure CFP-adducina mutata.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti a 48 ore dalla transfezione; le cellule erano incubate in terreno completo [Tabella 4.1] addizionato con ikarugamicina (Santa Cruz Biotechnology, sc-202179) 5 μ M oppure con DMSO 0,05% (DMSO è il solvente di ikarugamicina, costituiva la condizione di controllo) per 2 ore prima delle osservazioni al microscopio confocale. Ikarugamicina è un acido tetramico pentaciclico in grado di inibire l'endocitosi mediata da clatrina e, per questo, si è rivelata un buon agente per studiare i fenomeni di endocitosi.

Durante le osservazioni/acquisizioni al microscopio le cellule erano mantenute nel loro terreno di incubazione addizionato di HEPES 10 mM, a 37 °C.

CFP e PAGFP erano eccitati con i laser 458 nm e 488 nm rispettivamente ed erano acquisiti in due differenti fotomoltiplicatori per mezzo di una scansione sequenziale. Lo spettro di emissione del CFP era compreso tra 465 nm e 490 nm, quello della PAGFP era compreso tra 500 e 550 nm.

La fotoattivazione veniva eseguita eccitando la PAGFP con il laser AOTF a 405 nm; il decadimento di fluorescenza nella regione fotoattivata (ROI) era monitorato per 150 secondi con una frequenza di 2 frame al secondo. Le ROI scelte avevano

medesima forma, area di $8 \mu\text{m}^2$ e comprendevano sempre una porzione di membrana plasmatica.

Sono stati condotti esperimenti preliminari di controllo per valutare la possibile cross-eccitazione del CFP e il possibile photo-bleaching spontaneo della PAGFP.

Per testare l'esistenza di cross-eccitazione del CFP durante l'imaging della PAGFP fotoattivata, si sono eccitati campioni esprimenti il solo CFP con il laser a 488 nm: in queste condizioni non si è misurata alcuna cross-attivazione.

Per testare l'esistenza di photo-bleaching spontaneo dopo la fotoattivazione della PAGFP, alcune cellule sono state fotoattivate interamente e l'andamento della fluorescenza è stato monitorato per 150 secondi: non si è osservato photo-bleaching spontaneo.

Le immagini sono state analizzate con il programma Image J e i dati ottenuti con il programma Excel.

La fluorescenza totale nella ROI ($FROI_{t(i)}$) in seguito a fotoattivazione è stata corretta per il background ($Fbg_{t(i)}$) e per la fluorescenza prima della fotoattivazione ($FROI_{t(pre)} - Fbg_{t(pre)}$). Questi valori di fluorescenza sono stati poi normalizzati, per ciascun tempo, per la fluorescenza totale (a sua volta corretta per il background e per la fluorescenza pre-fotoattivazione) della ROI nel primo frame dopo la fotoattivazione ($FROI_{t(0)}$):

$$F_{norm} = \frac{(FROI_{t(i)} - Fbg_{t(i)}) - (FROI_{t(pre)} - Fbg_{t(pre)})}{(FROI_{t(0)} - Fbg_{t(0)}) - (FROI_{t(pre)} - Fbg_{t(pre)})}$$

I dati sono stati poi fittati con una curva di decadimento a singolo esponenziale ($F_{norm \ t(i)} = (F_{norm \ t(0)} - \text{Plateau}) * e^{(-K*t)} + \text{Plateau}$) utilizzando il programma GraphPad Prism 5. Il Plateau è il valore di F_{norm} al tempo infinito; K è una costante espressa in $1/s$ ed è il reciproco di τ , una costante di tempo espressa in secondi; l'emivita è calcolata come $\ln(2)/K$.

4.17 Analisi statistiche

Tutti i dati sono espressi come media aritmetica più o meno errore standard.

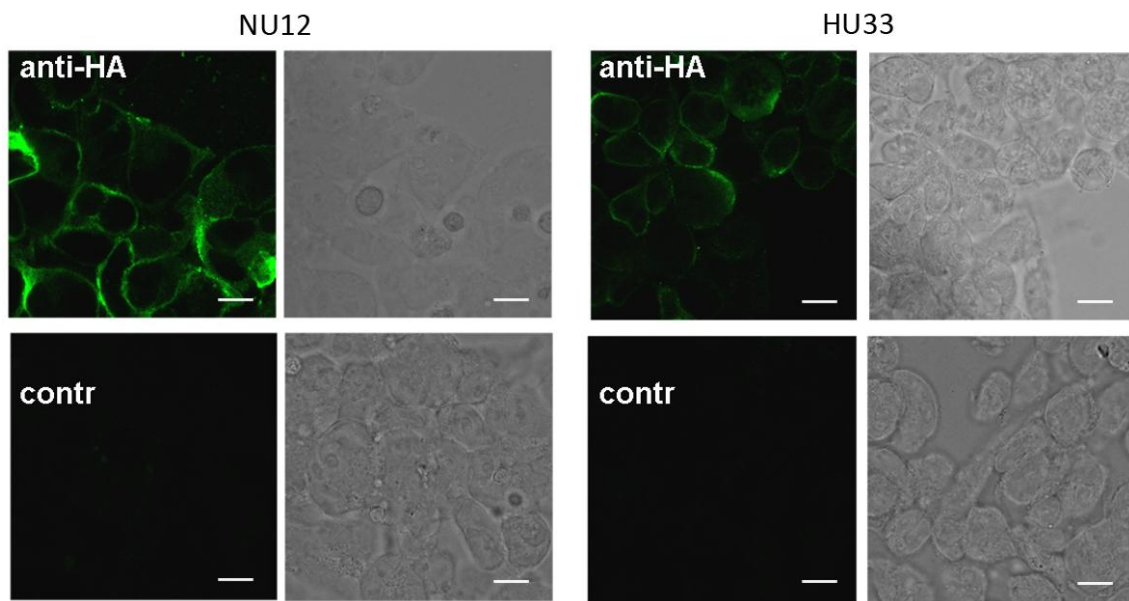
Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il test T di Student per i dati non appaiati o il test Anova (post test Bonferroni) ad una o due vie, mediante il programma Prism (GraphPad, San Diego, California). Le differenze tra i dati sono assunte come statisticamente significative quando $p\text{-value} < 0.05$.

5. Risultati

5.1 Espressione dell'adducina in cellule NU12 e HU33

Prima di condurre gli esperimenti che prevedevano l'utilizzo di cellule NU12 e HU33, si è proceduto al controllo dell'effettiva over-espressione di adducina [Figura 5.1].

A)



B)

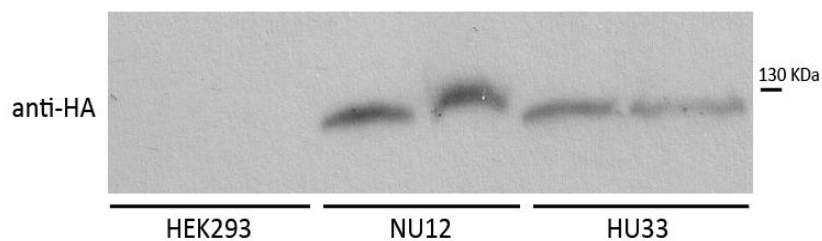


Figura 5.1 – Espressione dell'adducina in cellule NU12 e HU33. A) Immagini di microscopia confocale relative agli esperimenti di immunofluorescenza. Le immagini mostrano il segnale di HA-adducina (*anti-HA*) in cellule NU12 (*NU12*) e HU33 (*HU33*). Anticorpo primario: anti-HA, anticorpo secondario: anti-mouse Alexa 488. Negli esperimenti di controllo (*contr*) l'anticorpo primario è stato omesso. Ogni condizione è affiancata dalla relativa immagine acquisita in bright field. Barra di scala: 10 μ m. B) Western blot relativo all'espressione di HA-adducina in cellule NU12 (*NU12*) e HU33 (*HU33*), paragonate a cellule HEK non transfettate (*HEK293*). Sono mostrate due preparazioni indipendenti per ciascuna condizione; sono stati caricati 100 μ g di proteine per ciascun campione. Anticorpo primario: anti-HA.

L'adducina wild-type e mutata transfettata rispettivamente in cellule NU12 e HU33 aveva un HA-tag in N-terminale, si sono quindi condotti esperimenti di immunofluorescenza [Figura 5.1A] e di Western blot [Figura 5.1B], utilizzando un anticorpo specifico per questo tag.

Questi controlli venivano eseguiti periodicamente e consentivano di verificare che le cellule mantenessero la transfezione stabile con adducina.

5.2 Effetti dell'adducina sull'attività del CFTR: esperimenti di patch-clamp

5.2.1 Esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell

Per studiare se l'espressione dell'adducina abbia conseguenze funzionali sull'attività del CFTR, sono stati condotti esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell su cellule NU12 (cellule HEK stabilmente transfettate con l'adducina umana wild-type) e HU33 (cellule HEK stabilmente transfettate con l'adducina mutata G460W), transientemente transfettate con il vettore pIRES2-EGFP-CFTR. Questo vettore, dotato di un sito IRES (Internal Ribosome Entry Site) per la produzione contemporanea della proteina di interesse, il CFTR, e della proteina fluorescente, GFP, consentiva la selezione delle cellule transfettate su cui condurre gli esperimenti di patch-clamp.

In presenza di soluzioni simmetriche di cloruro ($[Cl^-] = 153 \text{ mmol/L}$) nella pipetta e nel bagnetto extracellulare, la densità di corrente (calcolata come pA/pF, ossia intensità di corrente normalizzata per la capacità della cellula, un indice delle dimensioni della cellula) non era statisticamente differente tra cellule NU12 e cellule HU33. I valori di densità di corrente erano pari a $-0,007 \pm 0,003 \text{ pA/pF}$ ($n = 12$) nelle cellule NU12 e a $-0,008 \pm 0,002 \text{ pA/pF}$ ($n = 14$) nelle cellule HU33 al potenziale di $-103,9 \text{ mV}$ ed erano pari a $0,009 \pm 0,003 \text{ pA/pF}$ ($n = 12$) nelle cellule NU12 e a $0,012 \pm 0,003 \text{ pA/pF}$ ($n = 14$) nelle cellule HU33, al potenziale di $96,1 \text{ mV}$. Dopo sostituzione della soluzione del bagno extracellulare con una soluzione di uguale composizione ma a cui era stata aggiunta forskolina $10 \mu\text{M}$ (la forskolina è

un diterpene, potente attivatore dell'adenilato ciclastasi che aumenta i livelli di cAMP, attivando di conseguenza la corrente mediata dal CFTR), si osservava l'attivazione di una corrente di cloruro, che raggiungeva l'attivazione massima dopo circa 80 secondi dalla sostituzione, e che era statisticamente superiore rispetto alla condizione di controllo sia in cellule NU12 che in cellule HU33. La densità di corrente era $-0,064 \pm 0,018$ pA/pF ($n = 12$) nelle cellule NU12 e $-0,166 \pm 0,035$ pA/pF ($n = 14$) nelle cellule HU33 al potenziale di $-103,9$ mV e $0,056 \pm 0,016$ pA/pF ($n = 12$) nelle cellule NU12 e $0,145 \pm 0,033$ pA/pF ($n = 14$) nelle cellule HU33, al potenziale di $96,1$ mV. I potenziali di inversione della corrente erano $0,84 \pm 0,4$ mV ($n = 12$) nelle cellule NU12 e $1,6 \pm 0,3$ mV ($n = 14$) nelle cellule HU33, tali valori non erano statisticamente diversi da 0 mV, come atteso per una corrente di cloruro in queste condizioni sperimentali, in assenza cioè di un gradiente chimico di Cl^- . La relazione corrente-voltaggio era lineare.

Ad attivazione massima della corrente, la densità di corrente era significativamente superiore nelle cellule HU33 rispetto a quanto osservato in cellule NU12 ($P < 0,01$) [Figura 5.2].

Dopo l'aggiunta, nella soluzione del bagno extracellulare, dell'inibitore specifico del CFTR, CFTR-(inh)-172, $2 \mu\text{M}$ si osservava l'inibizione della corrente, che raggiungeva valori non statisticamente differenti rispetto ai valori registrati prima dell'esposizione a forskolina. L'inibizione massima della corrente era raggiunta dopo circa 200 secondi di esposizione all'inibitore.

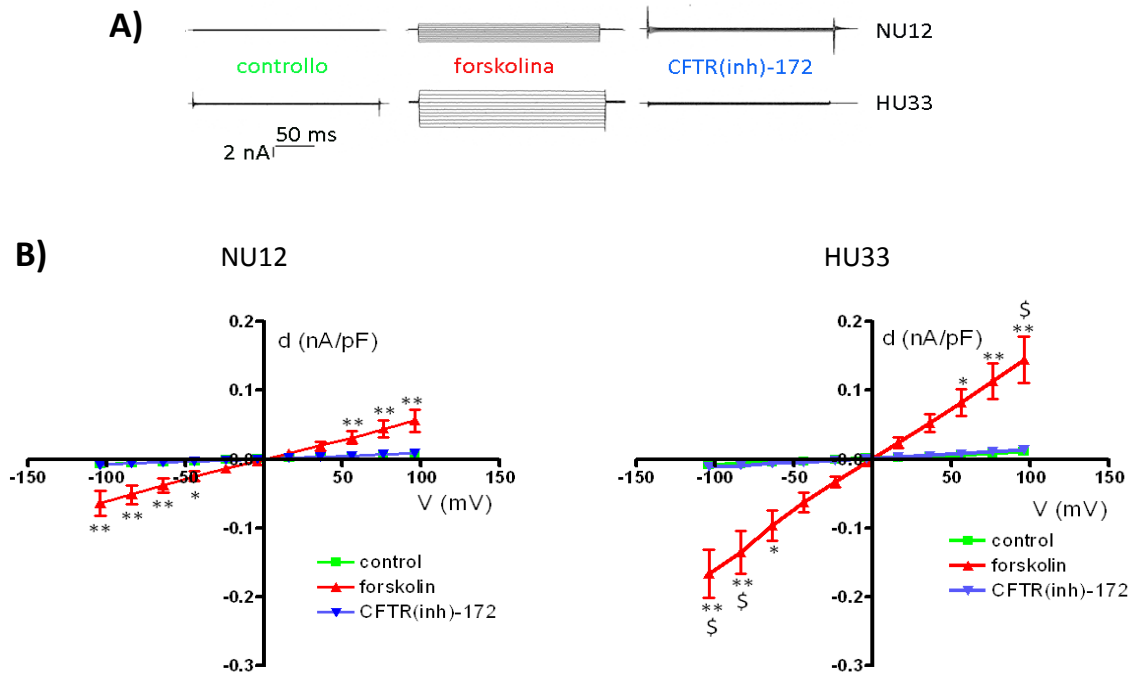


Figura 5.2 - Effetto dell'adducina sull'attività del CFTR, misurata con esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell su cellule NU12 e HU33. A) Tracce rappresentative delle correnti registrate in cellule NU12 (NU12, in alto) e HU33 (HU33, in basso), in presenza di soluzioni simmetriche di cloruro, in condizioni di controllo (controllo), in seguito all'esposizione a forskolina 10 μM (forskolina) e in seguito all'aggiunta dell'inibitore specifico del CFTR, CFTR(inh)-172 2 μM (CFTR(inh)-172) alla soluzione contenete forskolina 10 μM . B) Relazioni Id/V, densità di corrente (nA/pF) su voltaggio (mV), registrate in cellule NU12 (NU12, a sinistra, n = 12) e HU33 (HU33, a destra, n = 14), transfettate con il vettore pRES2-EGFP-CFTR. Le correnti di whole-cell sono state registrate in presenza di soluzioni simmetriche di cloruro (control, in verde), 140 s dopo l'esposizione a forskolina 10 μM (forskolin, in rosso) e dopo inibizione con CFTR(inh)-172 (CFTR(inh)-172, in blu). La densità di corrente era statisticamente superiore, dopo esposizione delle cellule a forskolina, in cellule HU33 rispetto a cellule NU12 ($P < 0,01$).

Si è inoltre valutata l'attivazione della corrente nel tempo, come densità di corrente al potenziale costante di 40 mV. La curva di attivazione era ben fittata ($R^2 = 0,9992$ e $0,9998$ in cellule NU12 e HU33 rispettivamente) da una sigmoide:

$$Y = \text{bottom} + (\text{top} - \text{bottom}) / (1 + \exp((t_{50} - X) / \text{slope}))$$

dove bottom è la corrente minima, top è la corrente massimale, t_{50} è il tempo a cui si raggiunge il 50% dell'attivazione massimale della corrente, slope è la pendenza della curva di attivazione.

Si è potuto osservare che il t_{50} non variava in modo significativo tra i due tipi cellulari ($48,78 \pm 0,34$ s per le NU12 e $48,29 \pm 0,40$ s per le HU33), mentre lo slope della sigmoide era significativamente superiore ($P < 0,01$) nelle cellule HU33 ($0,049 \pm 0,0019$ $\text{pA} \times \text{pF}^{-1} \times \text{s}^{-1}$, n = 14), rispetto alle cellule NU12 ($0,028 \pm 0,005$ $\text{pA} \times \text{pF}^{-1} \times \text{s}^{-1}$,

n = 12) [Figura 5.3].

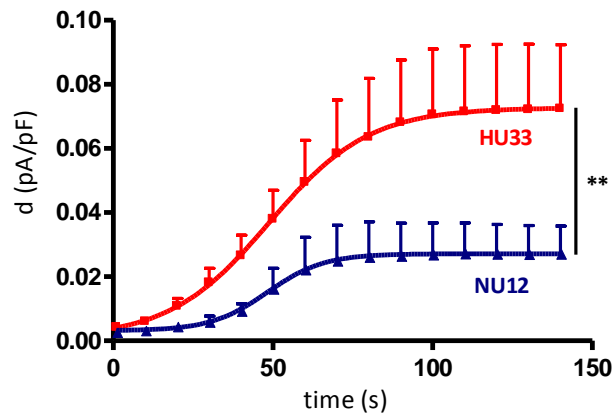


Figura 5.3 - Cinetiche di attivazione della corrente di cloruro mediate dal CFTR in cellule NU12 (NU12, in blu) e HU33 (HU33, in rosso), transfettate con il vettore pIRES2-EGFP-CFTR. I valori sono stati fittati con una curva sigmoide, il cui slope era statisticamente incrementato in cellule HU33 ($P < 0,01$).

5.2.2 Esperimenti di patch-clamp in configurazione cell-attached

Sono stati condotti esperimenti di patch-clamp in configurazione cell-attached, volti a studiare l'effetto dell'espressione dell'aducina wild-type e mutata sulle proprietà biofisiche e sull'attività di singolo canale del CFTR. Gli esperimenti condotti in questa configurazione consentivano inoltre di valutare l'attività del canale in una condizione in cui l'integrità cellulare era preservata. Questi esperimenti sono stati eseguiti su cellule NU12 e HU33 transientemente transfettate con il vettore pIRES2-EGFP-CFTR. In questi esperimenti, a differenza degli esperimenti di whole-cell, le differenze di potenziale imposte erano differenze del potenziale globale, inteso come somma algebrica oltre che del potenziale di giunzione (-5 mV) e del potenziale di holding (da -100 mV a +100 mV) anche del potenziale di membrana (circa -30 mV da misurazioni di current clamp).

L'attività di un canale con una conduttanza di $10,5 \pm 0,9$ pS ($n = 6$) e di $10,8 \pm 0,6$ pS ($n = 5$) è stata registrata in cellule NU12 e HU33 rispettivamente. Questo canale non è mai stato osservato in cellule non transfettate con pIRES2-EGFP-CFTR ($n = 10$).

Il canale presentava inoltre una probabilità di apertura (P_o) voltaggio indipendente [Figura 5.4C].

Il potenziale di inversione della relazione corrente-voltaggio del canale, corretto per il potenziale di giunzione e per il potenziale di membrana, non era statisticamente differente tra i due tipi cellulari ($-31,0 \pm 5,2$ mV ($n = 5$) in cellule NU12 e $-31,4 \pm 8,1$ mV ($n = 6$) in cellule HU33) ed era compatibile con quanto atteso per un canale permeabile al cloruro. La relazione I/V mostrava una rettificazione uscente a differenza di quanto osservato negli esperimenti di whole-cell, presumibilmente determinata dalle concentrazioni di cloruro asimmetriche della configurazione cell-attached (con $[Cl^-]_{in}$ minore di $[Cl^-]_{out} = 151$ mM) [Figura 5.4B].

La densità del canale in membrana, calcolata come numero di canali attivi osservati per patch (N), risultava essere $1,0 \pm 0,4$ canali/patch ($n = 5$) in cellule NU12 e $2,8 \pm 0,5$ canali/patch ($n = 6$) in cellule HU33 [Figura 5.4D]. È stata inoltre valutata l'attività del canale, misurata come prodotto del numero di canali (N) per la probabilità di apertura (P_o) [Figura 5.4E]. Sia la densità che l'attività del CFTR risultavano significativamente superiori nelle cellule esprimenti adducina mutata ($P < 0,05$).

Inoltre, al fine di valutare la corrente media di singolo canale nei due tipi cellulari, sono state eseguite rampe di potenziale, durante le quali il potenziale variava linearmente da -135 mV a $+65$ mV, con un rapporto di $0,5$ mV/ms. La corrente media (I_{ramp}) registrata era significativamente superiore ($P < 0,05$) in cellule HU33 rispetto a quanto osservato in cellule NU12 [Figura 5.4F].

Nel corso di questi esperimenti le cellule sono state esposte ad una soluzione extracellulare contenente forskolina $10 \mu\text{M}$, l'esposizione a forskolina è stata effettuata per permettere l'analisi dell'attività del CFTR anche in cellule che, in condizioni di controllo, mostravano una scarsa attività del canale.

Dopo l'aggiunta di forskolina, sono state eseguite ulteriori rampe di potenziale da -135 mV a $+65$ mV; la corrente media, a 140 secondi dall'esposizione a forskolina, era incrementata in entrambi i tipi cellulari ma risultava essere ancora statisticamente superiore ($P < 0,05$) in cellule HU33 rispetto a cellule NU12 [Figura 5.4G].

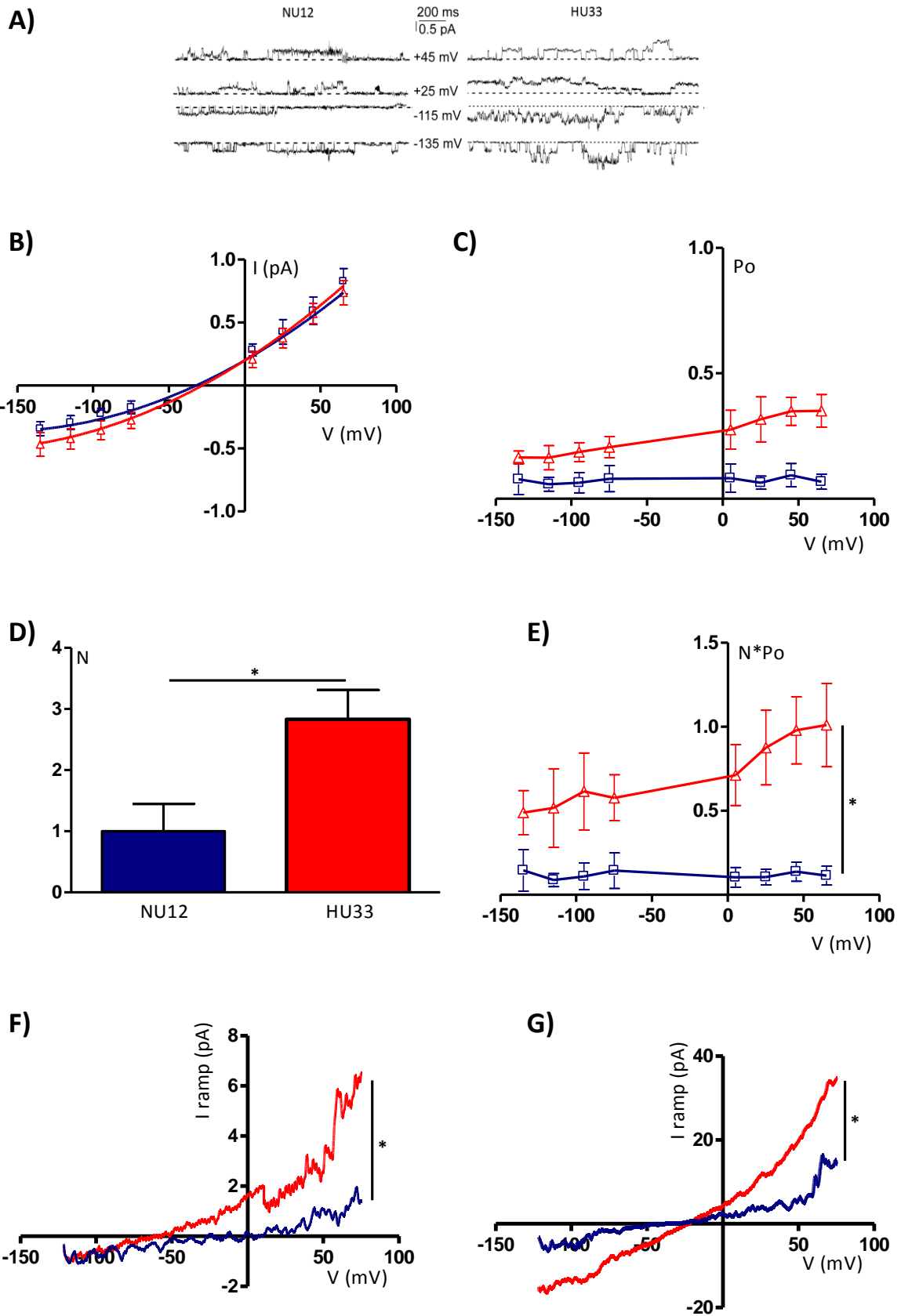


Figura 5.4 - Effetto dell'adducina sull'attività del CFTR, misurata con esperimenti di patch-clamp in

configurazione cell-attached su cellule NU12 e HU33. A) Tracce rappresentative di singolo canale, registrate a potenziali positivi (+45 mV e +25 mV) e a potenziali negativi (-115 mV e -135 mV) in cellule NU12 (NU12) e HU33 (HU33). La linea tratteggiata corrisponde al canale chiuso. B) Relazioni corrente-voltaggio (I/V) del CFTR in singolo canale registrate in cellule NU12 (in blu, n = 5) e HU33 (in rosso, n = 6). C) Probabilità di apertura (P_o) in relazione al potenziale in cellule NU12 (in blu, n = 5) e HU33 (in rosso, n = 6). D) Densità di canali (N) in cellule NU12 (NU12, n = 5) e HU33 (HU33, n = 6); la densità è statisticamente superiore in cellule HU33 ($P < 0,05$). E) Attività del canale, misurata come numero di canali per la loro probabilità di apertura ($N \cdot P_o$), rispetto al potenziale di membrana in cellule NU12 (in blu, n = 5) e HU33 (in rosso, n = 6); l'attività è statisticamente superiore in cellule HU33 ($P < 0,05$). F) Corrente media registrata durante rampe di potenziale da -135 mV a +65 mV, con la frequenza di 0,5 mV/ms. L'I/V (I ramp) rappresenta la corrente media di 10 rampe applicate a cellule NU12 (in blu, n = 5) e HU33 (in rosso, n = 6). Si riscontra una differenza significativa ($P < 0,05$) tra i due tipi cellulari. G) Corrente media registrata durante rampe di potenziale, dopo 3 minuti dall'esposizione delle cellule a forskolina 10 μ M. La corrente registrata in cellule NU12 (in blu, n = 5) è statisticamente superiore alla corrente registrata in cellule HU33 (in rosso, n = 6).

Poiché è riportato (Hubberstey and Mottillo 2002) che le proteine che legano l'actina possono direttamente o indirettamente modulare l'attività dell'adenilato ciclasi, si sono voluti misurare i livelli di cAMP in cellule NU12 e HU33 sia prima che dopo l'esposizione delle cellule a forskolina. Questo dato avrebbe anche permesso di escludere la possibilità che i due tipi cellulari rispondano in modo diverso all'esposizione a forskolina. I livelli di cAMP (valutati come RLU: Relative Luminescence Units) non sono risultati diversi né in presenza ($217451,5 \pm 77983,31$ RLU (n = 4) e $113667 \pm 25298,86$ RLU (n = 4) in cellule NU12 e HU33 rispettivamente), né in assenza ($370905,9 \pm 68154,9$ RLU (n = 4) e $205104,7 \pm 25875,07$ RLU (n = 4) in cellule NU12 e HU33 rispettivamente) di stimolazione con forskolina. Anche le concentrazioni di cAMP, misurate come differenza tra pre e post stimolazione, non sono risultate differenti ($0,024026 \pm 0,011712$ nM (n = 4) e $0,014316 \pm 0,002341$ nM (n = 4) in cellule NU12 e HU33 rispettivamente) tra i due tipi cellulari.

5.3 Valutazione dell'efficienza di transfezione di cellule NU12 e HU33 con il vettore pcDNA3-CFTR

Si è valutata l'efficienza di transfezione di cellule NU12 e HU33 con il vettore di espressione del CFTR, pcDNA3-CFTR, per poter escludere che le eventuali differenze di espressione del canale osservate tra i due tipi cellulari fossero determinate da differenze nell'efficienza di transfezione.

5.3.1 Renilla Luciferase Reporter assay

L'efficienza di transfezione delle cellule NU12 e HU33 con il vettore pcDNA3-CFTR è stata innanzitutto valutata con il saggio commerciale Renilla Luciferase Reporter assay (Promega).

Questo saggio si basa sulla cotransfezione del vettore di interesse con un vettore reporter, pRL-TK, contenente il cDNA codificante per Renilla luciferasi, che codifica una proteina monometrica di 36 kDa che non richiede modificazioni post-traduzionali per la sua attività e che può quindi fungere da gene reporter per quanto riguarda l'efficienza di transfezione.

I due istogrammi mostrano l'attività della luciferasi normalizzata, per il numero di cellule ($n = 15$) [Figura 5.5A] e per la quantità totale di proteine ($n = 20$) [Figura 5.5B], in cellule NU12 e HU33. Non si sono riscontrate differenze significative tra i due tipi cellulari.

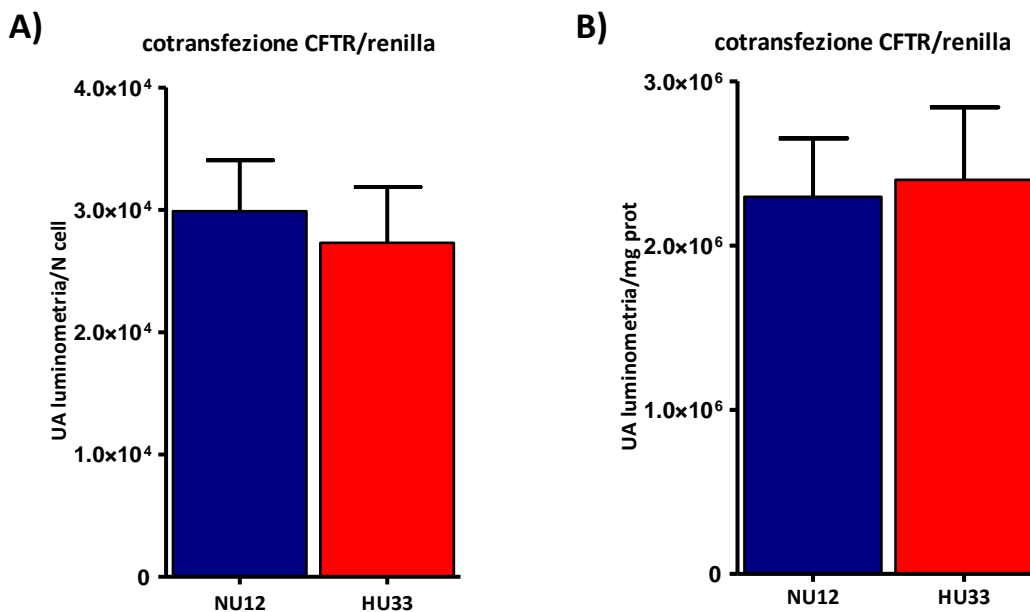


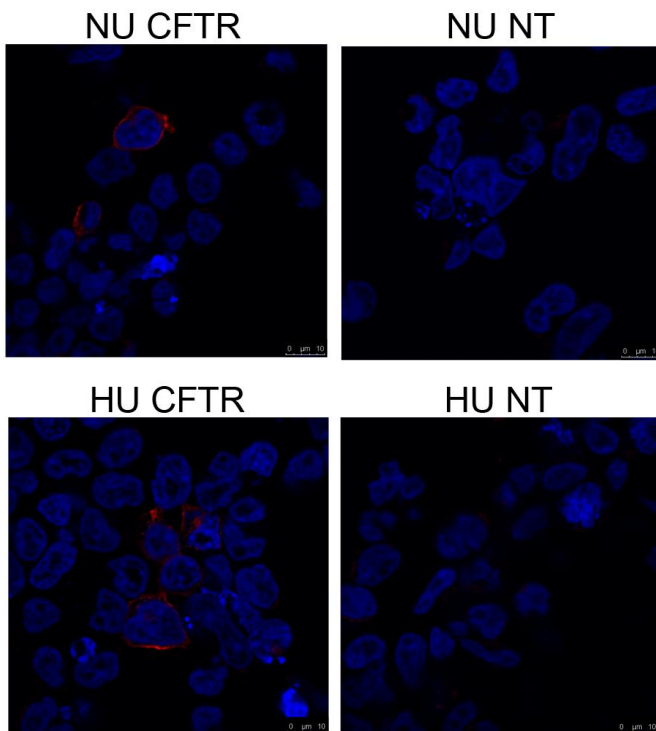
Figura 5.5 - Efficienza di transfezione di cellule NU12 e HU33 con il vettore pcDNA3-CFTR, valutata con il saggio Renilla Luciferasi. A) L'istogramma mostra l'attività della luciferasi normalizzata per il numero di cellule (UA luminometria/N cell, $n = 15$) in cellule NU12 (NU12) e HU33 (HU33). B) L'istogramma mostra l'attività della luciferasi normalizzata per la quantità totale di proteine (UA luminometria/mg prot, $n = 20$) in cellule NU12 (NU12) e HU33 (HU33). Non si riscontrano differenze significative nell'efficienza di transfezione con il plasmide pcDNA3-CFTR tra i due tipi cellulari.

5.3.2 Conte cellulari

L'efficienza di transfezione è stata valutata anche mediante conte cellulari. Le cellule NU12 e HU33 venivano transfettate con il vettore d'interesse, pcDNA3-CFTR e, 48 ore dopo la transfezione, veniva eseguita la marcatura del CFTR mediante saggi immunocitochimici. Le immagini venivano quindi acquisite con un microscopio confocale e veniva effettuata una conta delle cellule transfettate (in rosso: anti-mouse Alexa 568) rispetto alle cellule totali, grazie alla marcatura dei nuclei (in blu: DAPI). Come condizione di controllo si sono utilizzate cellule NU12 e HU33 non transfettate.

Gli istogrammi mostrano la percentuale di cellule transfettate: $11,61 \pm 1,71 \%$ ($n = 11$) per le cellule NU12 e $11,29 \pm 2,49 \%$ ($n = 11$) per le cellule HU33 [Figura 5.6]. Anche con questi esperimenti non è stata riscontrata alcuna differenza nell'efficienza di transfezione dei due tipi cellulari con il vettore pcDNA3-CFTR.

A)



B)

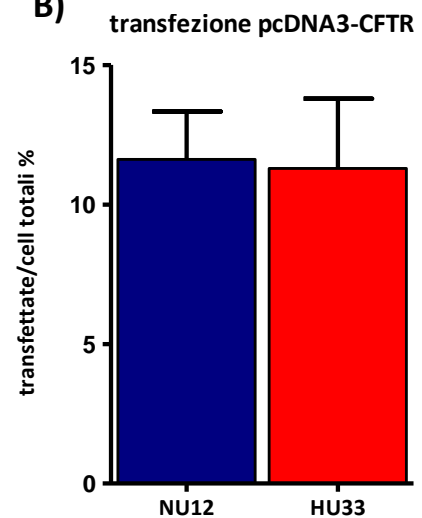


Figura 5.6 – Efficienza di transfezione di cellule NU12 e HU33 valutata mediante conte cellulari. A) Immagini di microscopia confocale relative ad esperimenti di immunofluorescenza in cui è mostrato il segnale del CFTR (in rosso) in cellule NU12 (pannelli in alto) e in cellule HU33 (pannelli in basso), transfettate con il vettore

pcDNA3-CFTR (*NU CFTR*, *HU CFTR*, a sinistra). Come condizione di controllo si sono utilizzate cellule NU12 e HU33 non transfettate con il vettore per l'espressione del CFTR (*NU NT*, *HU NT*, a destra). Anticorpo primario: anti-CFTR, anticorpo secondario: anti-mouse Alexa 568; i nuclei sono colorati con DAPI (blu). Barra di scala: 10 μ m. B) L'istogramma mostra la percentuale di NU12 (*NU12*) e HU33 (*HU33*) transfettate rispetto alle cellule totali (n = 11); non si riscontrano differenze significative nell'efficienza di transfezione dei due tipi cellulari con il plasmide pcDNA3-CFTR.

5.4 Effetti dell'adducina sull'espressione del CFTR: esperimenti di Western blot e di biotinilazione del canale

Poiché gli esperimenti di patch-clamp in configurazione cell-attached avevano mostrato un incremento della densità del CFTR, si è voluto studiare l'effetto dell'adducina sui livelli di espressione del canale mediante esperimenti di Western blot e biotinilazione del canale.

5.4.1 Espressione totale del CFTR

Si sono svolti esperimenti di Western blot sui lisati totali di cellule NU12 e HU33 transfettate transientemente, 48 ore prima della raccolta delle cellule, con il vettore di espressione del CFTR, pcDNA3-CFTR.

Gli anticorpi specifici per il CFTR utilizzati erano in grado di riconoscere entrambe le isoforme, "core-glycosylated" (localizzata a livello del reticolo endoplasmatico e in cui il livello di glicosilazione è solo parziale) e "fully-glycosylated" (localizzata a livello della membrana plasmatica e delle vescicole di riciclo, si tratta della proteina matura) del canale e le due isoforme si separavano durante la corsa elettroforetica per via del differente peso molecolare, dovuto proprio ai diversi livelli di glicosilazione.

Dall'analisi della lastra era quindi possibile identificare due diverse bande: una banda B, con un peso molecolare di circa 140 kDa, corrispondente alla forma "core-glycosylated" ed una banda C, con un peso molecolare di circa 160 kDa, corrispondente alla forma "fully-glycosylated".

Mentre nelle cellule NU12 era possibile osservare chiaramente la presenza di entrambe le bande B e C, nelle cellule HU33 solo la banda C era chiaramente identificabile [Figura 5.7A].

L'analisi densitometrica delle bande è stata effettuata normalizzando il segnale del CFTR per il segnale di caderina, utilizzato come controllo interno di caricamento e tale analisi ha mostrato che l'espressione totale del CFTR (ossia l'intensità delle bande B e C sommate) non differiva in modo statisticamente significativo tra cellule NU12 e HU33 [Figura 5.7B].

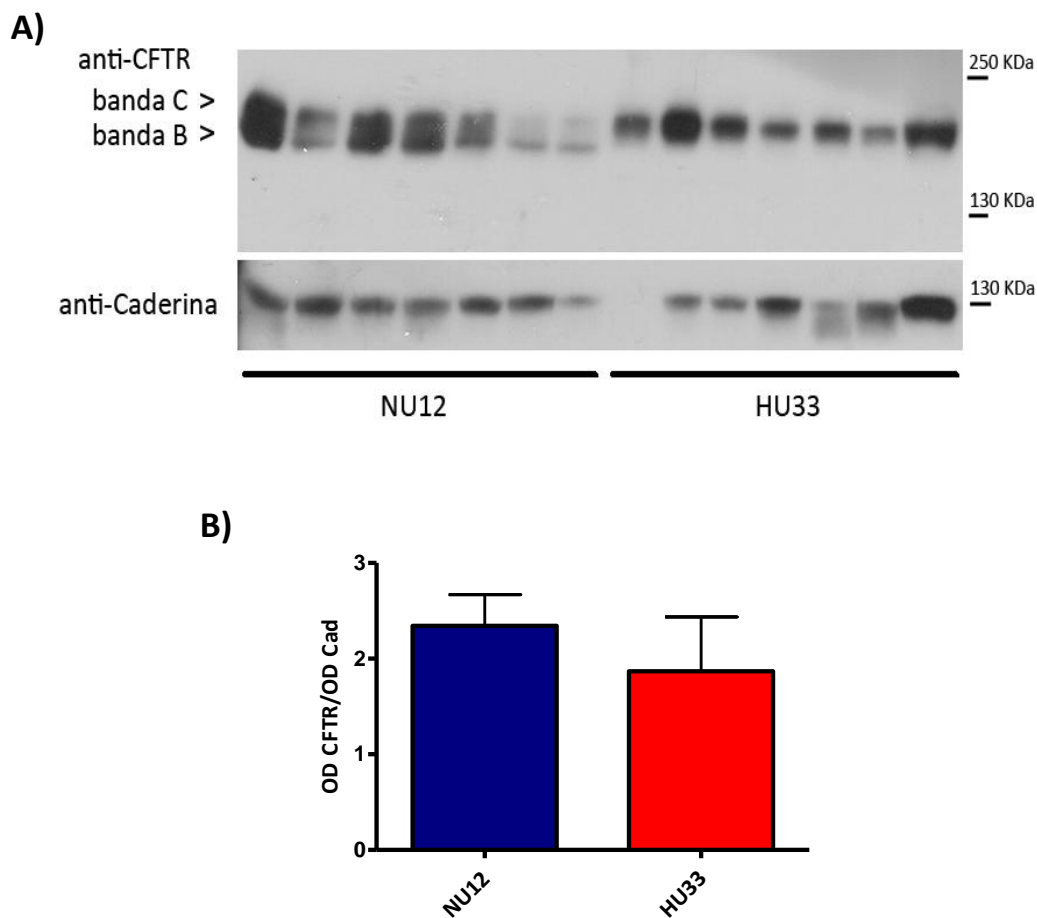


Figura 5.7 - Espressione del CFTR nei lisati totali di cellule NU12 e HU33. A) Western blot relativo all'espressione del CFTR in cellule NU12 (NU12) e HU33 (HU33) transientemente transfettate con il plasmide pcDNA3-CFTR. Nel pannello in alto è mostrato il segnale dell'anticorpo anti-CFTR, nel pannello in basso è mostrato il segnale dell'anticorpo anti-caderina. Le frecce indicano le due isoforme, core-glycosylated (banda B) e fully-glycosylated (banda C), del canale. Sono stati caricati 100 µg di proteine per ciascun campione (NU12: n = 7, HU33: n = 6). B) Istogramma relativo all'analisi densitometrica del rapporto delle intensità di banda del CFTR totale (banda B + banda C)/caderina (OD CFTR/OD Cad). Non si riscontrano differenze significative nell'espressione totale del CFTR tra i due tipi cellulari.

Ulteriori esperimenti di Western blot sono stati condotti sui lisati cellulari totali di cellule HEK293 e cellule NU12, transientemente transfettate, 48 ore prima della raccolta delle cellule, con il vettore pcDNA3-CFTR.

Questi esperimenti hanno permesso di osservare che il pattern di espressione delle bande B e C del CFTR era simile nei due tipi cellulari, ciò indica che la transfezione stabile con adducina wild-type, di per sé, non influisce sui livelli di maturazione del canale [Figura 5.8].

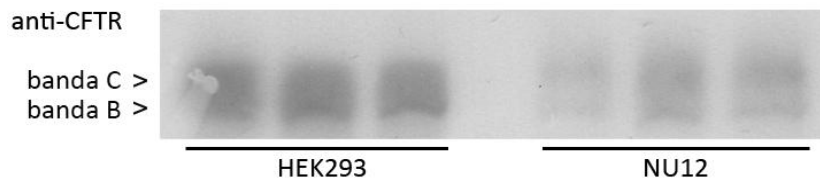


Figura 5.8 - Espressione del CFTR nei lisati totali di cellule HEK293 (*HEK293*) e NU12 (*NU12*), transientemente transfettate con il plasmide pcDNA3-CFTR. La lastra mostra il segnale relativo all'anticorpo anti-CFTR, le frecce indicano le due isoforme, core-glycosylated (*banda B*) e fully-glycosylated (*banda C*), del canale; sono stati caricati 100 µg di proteine per ciascun campione.

5.4.2 Espressione del CFTR a livello della membrana plasmatica

Poiché è stata riscontrata una differenza nella distribuzione delle due isoforme del canale tra cellule NU12 e HU33, si è voluto analizzare se i livelli di espressione del CFTR in membrana plasmatica variassero in funzione dell'espressione di adducina wild-type o mutata.

Si è quindi utilizzato un kit commerciale (Plasma Membrane Protein Extraction kit, MBL) per l'estrazione delle proteine della sola frazione plasmamembranaria di cellule NU12 e HU33 transfettate con il vettore pcDNA3-CFTR. La purezza della preparazione di membrane plasmatiche è stata controllata valutando l'espressione, nelle diverse frazioni cellulari separate con il kit, delle proteine caderina e calreticulina.

Il Western blot mostra l'arricchimento della caderina, marker del plasmalemma, paragonato al segnale della calreticulina, marker del reticolo endoplasmatico, nella

frazione di membrane plasmatiche [Figura 5.9].

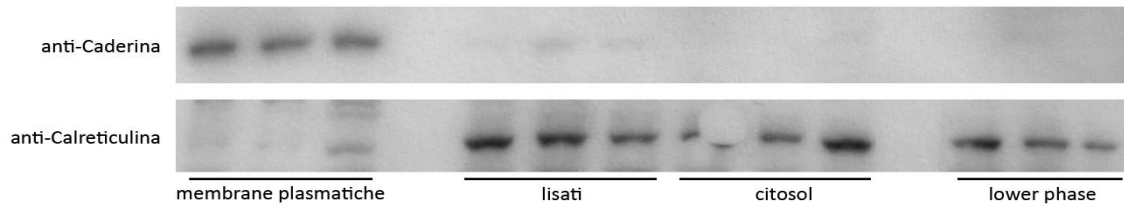


Figura 5.9 - Valutazione dell'efficienza di separazione delle membrane plasmatiche. Il Western blot mostra l'arricchimento della proteina caderina (marker del plasmalemma, lastra in alto) nella frazione di membrane plasmatiche, paragonata al segnale della proteina calreticulina (marker del reticolo endoplasmatico, pannello in basso). Il segnale della lastra superiore è relativo all'anticorpo anti-caderina, il segnale della lastra inferiore è relativo all'anticorpo anti-calreticulina; sono stati caricati 25 µg in ciascuna corsia. Il segnale delle due proteine è mostrato nelle diverse frazioni separate dal Plasma Membrane Protein Extraction kit (MBL): membrane plasmatiche, lisati, citosol, lower phase (costituita da tutte le proteine rimanenti dopo l'estrazione della frazione delle proteine del plasmalemma).

Sia in cellule NU12 che in cellule HU33 transfettate con il CFTR, mediante Western blot sulla frazione di membrana, era possibile osservare la presenza di una sola banda, con un peso molecolare compatibile con quello della banda C (circa 160 kDa), l'isoforma matura "fully-glycosylated" del canale [Figura 5.10A].

L'analisi densitometrica delle bande è stata effettuata normalizzando il segnale del CFTR per il segnale di caderina, utilizzato come controllo interno di caricamento, e tale analisi ha mostrato che l'intensità della banda era significativamente superiore in cellule HU33 ($P < 0,05$). I valori CFTR/caderina erano pari a $0,83 \pm 0,30$ ($n = 6$) e $2,69 \pm 0,72$ ($n = 6$) in cellule NU12 e HU33 rispettivamente [Figura 5.10B].

Questa differenza di espressione del CFTR tra i due tipi cellulari non era dovuta né ad un diverso livello di espressione del CFTR in cellula, come verificato con gli esperimenti di Western blot sulle proteine totali (Paragrafo 5.4.1) né ad una diversa efficienza di transfezione con il vettore pcDNA3-CFTR, come provato dagli esperimenti volti a valutare l'efficienza di transfezione (Paragrafo 5.3).

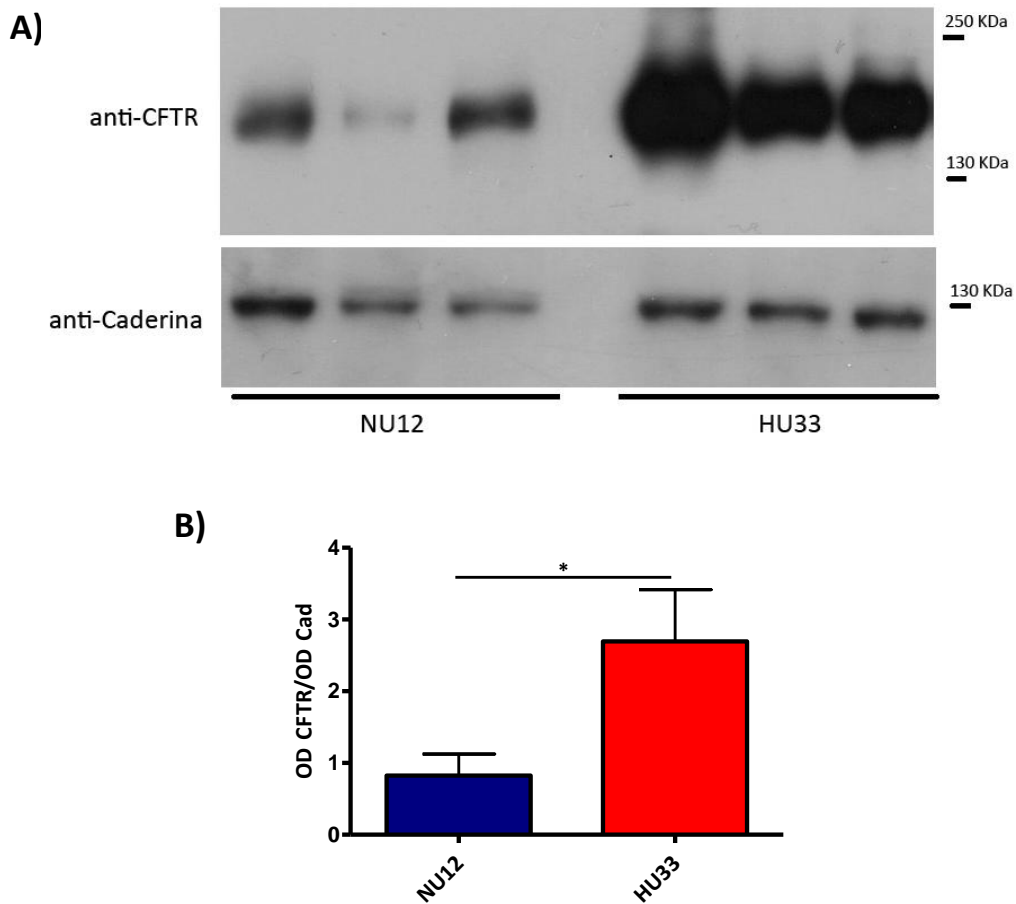


Figura 5.10 - Espressione del CFTR a livello della membrana plasmatica di cellule NU12 e HU33. A) Western blot relativo all'espressione del CFTR nelle membrane plasmatiche di cellule NU12 (NU12) e HU33 (HU33) transientemente transfettate con il plasmide pcDNA3-CFTR. Nel pannello in alto è mostrato il segnale dell'anticorpo anti-CFTR, nel pannello in basso è mostrato il segnale dell'anticorpo anti-caderina. Dalla lastra è visibile una sola banda di CFTR con un peso molecolare compatibile con quello della banda C (~ 160 kDa). Sono stati caricati 25 µg di proteine per ciascun campione (n = 6 per NU12 e HU33). B) Istogramma relativo all'analisi densitometrica del rapporto tra le intensità di banda del CFTR e della caderina (OD CFTR/OD Cad). L'espressione del CFTR a livello del plasmalemma è statisticamente incrementata in cellule HU33 rispetto a cellule NU12 (P < 0,05).

5.4.3 Biotinilazione del CFTR

L'espressione membranaria del CFTR in cellule NU12 e HU33 è stata valutata anche con esperimenti di biotinilazione del CFTR. La biotinilazione è stata effettuata a 48 ore dalla transfezione delle cellule con il vettore pcDNA3-CFTR, l'espressione del canale è stata poi saggiata mediante Western blot.

Dall'analisi della lastra relativa all'espressione superficiale del CFTR si può osservare la presenza di una sola banda, con un peso molecolare compatibile con quello della banda C, "fully-glycosylated".

Questa banda è presente in cellule NU12 e HU33 biotinilate, ma non nei controlli,

costituiti da cellule NU12 e HU33 transfettate con il vettore pcDNA3-CFTR, in cui però il passaggio di biotinilazione era stato omesso.

Dall'analisi della lastra dei lisati è invece visibile l'espressione del CFTR, presente sia nelle cellule che hanno subito la biotinilazione sia nei controlli. In questo caso, trattandosi di lisati cellulari totali, è possibile osservare la presenza di entrambe le isoforme, B e C, del canale.

Questi esperimenti suggeriscono che la banda corrispondente al CFTR in superficie nelle cellule HU33 è solo lievemente più marcata di quanto si osservi invece in cellule NU12, ma questa differenza diventa nettamente più eclatante se si rapporta il segnale superficiale al corrispondente segnale nei lisati totali [Figura 5.11].

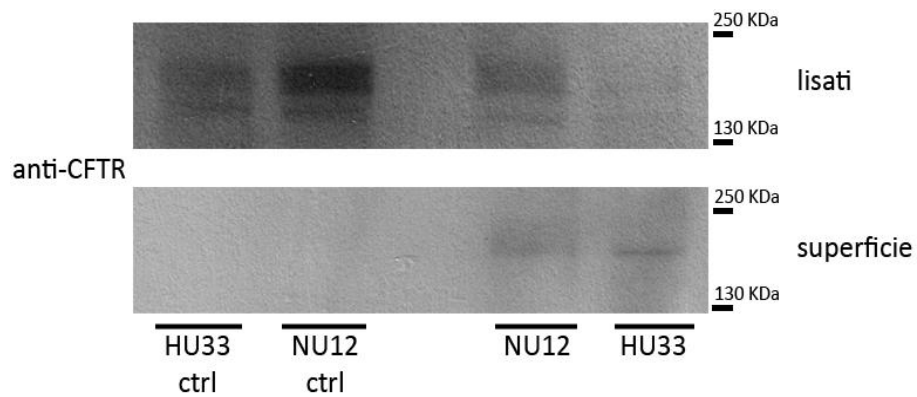


Figura 5.11 - Espressione del CFTR a livello della membrana plasmatica di cellule NU12 e HU33. Western blot relativo agli esperimenti di biotinilazione del CFTR in cellule NU12 (NU12) e HU33 (HU33) transfettate con il vettore pcDNA3-CFTR. Le lastre mostrano il segnale del CFTR (anticorpo anti-CFTR) nei lisati cellulari (*lisati*, pannello superiore) e nella frazione di superficie (*superficie*, pannello inferiore). Nella frazione di proteine di superficie è visibile una sola banda con un peso molecolare compatibile con quello della banda C. Come condizione di controllo si è utilizzata l'assenza di biotinilazione (NU12 ctrl, HU33 ctrl).

5.5 Effetti dell'adducina sulla localizzazione del CFTR: esperimenti di immunofluorescenza

La localizzazione del CFTR è stata studiata con esperimenti di immunocitochimica su cellule NU12 e HU33, transfettate con il vettore pcDNA3-CFTR. Le immagini sono state acquisite con un microscopio confocale, i nuclei sono stati colorati con DAPI

(in blu).

Dall'osservazione delle immagini emerge una diversa localizzazione del canale (in rosso: anticorpo secondario anti-mouse Alexa 568).

L'espressione del CFTR risulta infatti essere diffusa a livello del citosol e della membrana nelle cellule NU12; per quanto riguarda invece le cellule HU33 il segnale di espressione del canale è più netto e chiaro a livello della membrana plasmatica [Figura 5.12].

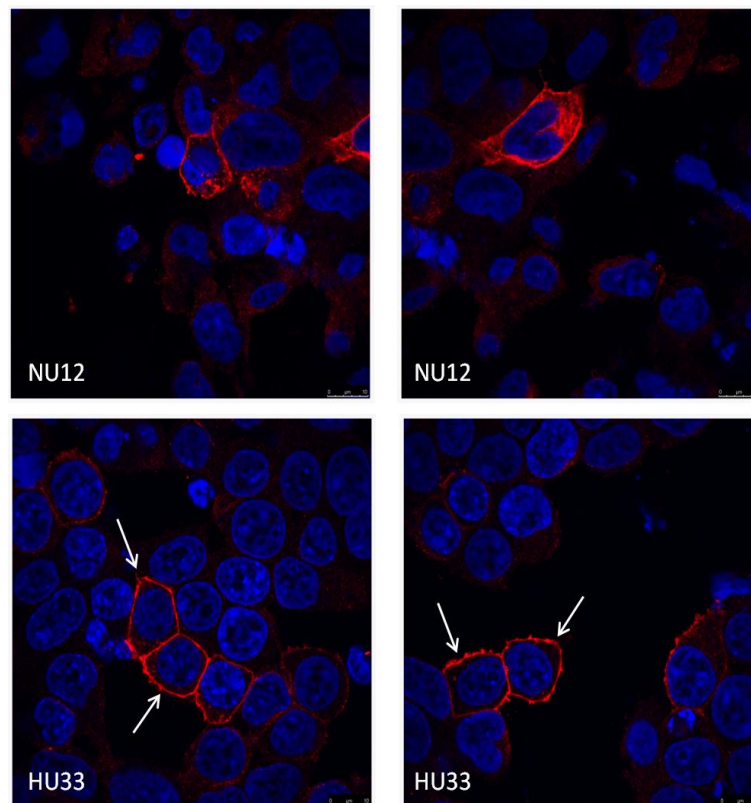


Figura 5.12 - Localizzazione del CFTR in cellule NU12 e HU33. Immagini di microscopia confocale relative ad esperimenti di immunofluorescenza condotti su cellule NU12 (NU12, pannelli in alto) e HU33 (HU33, pannelli in basso) transfettate con il vettore pcDNA3-CFTR. Il segnale del CFTR (in rosso) risulta essere più chiaramente localizzato a livello della membrana plasmatica in cellule HU33, come indicato dalle frecce. Anticorpo primario: anti-CFTR, anticorpo secondario: anti-mouse Alexa 568; i nuclei sono colorati con DAPI (blu). Barra di scala: 10 µm.

5.6 Studio dell'interazione tra CFTR e adducina

È noto che il CFTR interagisca con diverse proteine del citoscheletro che ne modulano la localizzazione, l'espressione e l'attività. Per studiare l'esistenza di interazione tra CFTR e adducina, sono stati condotti esperimenti di coimmunoprecipitazione e FRET.

5.6.1 Studio dell'interazione tra CFTR e adducina: esperimenti di coimmunoprecipitazione

Con questa tecnica abbiamo studiato l'interazione tra CFTR e adducina wild-type, con un FLAG-tag in C-terminale oppure con un HA-tag in N-terminale.

5.6.1.1 Prove di efficienza di transfezione del vettore pcDNA3-CFTR in cotransfezione

Gli esperimenti di coimmunoprecipitazione prevedevano che cellule HEK Phoenix fossero cotransfettate con i vettori pcDNA3-CFTR e pcDNA3.1-HA-adducina o pcDNA3.1-adducina-FLAG.

La quantità totale di plasmide/i utilizzata nella transfezione di piastre da 10 cm è 15 µg. Poiché l'efficienza di transfezione di piastre da 10 cm con il vettore pcDNA3-CFTR non è alta, prima di condurre i suddetti esperimenti di coimmunoprecipitazione, si è voluto controllare se esistesse una proporzione ottimale tra i due vettori da transfettare in modo che l'espressione del CFTR fosse ottimizzata.

Si è scelto di effettuare queste prove cotransfettando le cellule con i due plasmidi pcDNA3-CFTR e pcDNA3.1-adducina-FLAG.

Si sono testati tre differenti rapporti tra i due plasmidi: quello "classico", in cui i vettori sono in un rapporto 1:1, cioè 7,5 µg di pcDNA3-CFTR e 7,5 µg di pcDNA3.1-adducina-FLAG, un rapporto 2:1, cioè 10 µg di pcDNA3-CFTR e 5 µg di pcDNA3.1-adducina-FLAG e un rapporto 5:1, , cioè 12,5 µg di pcDNA3-CFTR e 2,5 µg di pcDNA3.1-adducina-FLAG.

Via Western blot sono state valutate l'espressione del CFTR e dell'adducina (FLAG). L'espressione del CFTR ha una leggera tendenza a crescere aumentando la quantità di plasmide con cui le cellule sono state transfettate; l'espressione del FLAG invece diminuisce drasticamente diminuendo la quantità di plasmide in transfezione [Figura 5.13].

In base a questo risultato, si è quindi scelto di utilizzare il rapporto 1:1 nelle cotransfezioni per tutti gli esperimenti di coimmunoprecipitazione, in modo che l'espressione dell'adducina non risultasse compromessa.

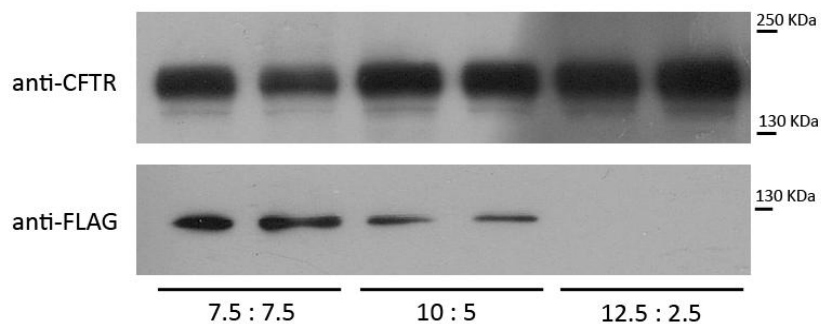


Figura 5.13 - Western blot relativo alle prove di cotransfezione di cellule HEK Phoenix con i vettori pcDNA3-CFTR e pcDNA3.1-adducina-FLAG. Nelle prime due corsie sono stati caricati i lisati cellulari di cellule transfettate utilizzando un rapporto 1:1, cioè 7,5 µg di ciascun plasmide (7.5:7.5), nelle successive due corsie sono stati caricati i lisati di cellule transfettate utilizzando un rapporto 2:1, cioè 10 µg di pcDNA3-CFTR e 5 µg di pcDNA3.1-adducina-FLAG (10:5), nelle ultime due corsie si sono caricati i lisati di cellule transfettate con un rapporto 5:1, cioè 12,5 µg di pcDNA3-CFTR e 2,5 µg di pcDNA3.1-adducina-FLAG (12.5:2.5). Nella lastra in alto è mostrato il segnale del CFTR (anticorpo anti-CFTR), nella lastra in basso il segnale dell'anticorpo anti-FLAG. Per ciascun campione sono stati caricati 30 µg di proteine.

5.6.1.2 Esperimenti di coimmunoprecipitazione con FLAG-tag

Per questi esperimenti, cellule HEK Phoenix sono state cotransfettate con i vettori pcDNA3-CFTR e pcDNA3.1-adducina wild-type-FLAG.

Sono stati inoltre allestiti esperimenti di controllo, transfettando le cellule con pcDNA3-CFTR e pFLAG-BAP (Bovine Alkaline Peroxidase, Sigma), che si suppone non legni il CFTR.

A 48 ore dalla transfezione le cellule sono state raccolte e lisate, il lisato è stato successivamente incubato con una resina, α-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma), costituita

da anticorpi monoclonali α -FLAG, coniugati ad agarosio. Le proteine con un FLAG-tag (e le eventuali proteine con esse interagenti) sono in grado di legarsi alla resina.

L'eluizione della resina è stata effettuata in due modi differenti:

- per competizione, in presenza di un eccesso di peptide FLAG purificato (Sigma);
- direttamente in Sample Buffer.

I lisati e gli eluati sono stati controllati mediante Western blot per la presenza del CFTR (mediante anticorpi anti-CFTR) e dell'adducina (mediante anticorpi anti-FLAG). Nel caso in cui l'eluizione è stata fatta per competizione sono state caricate quattro eluizioni successive (E2, E3, E4, E5, E6), poiché non era noto con quale/i eluizione/i le proteine si sarebbero staccate dalla resina. Nel caso in cui l'eluizione è stata effettuata direttamente in Sample Buffer si otteneva invece un unico eluato.

La Figura 5.14 si riferisce agli esperimenti di coimmunoprecipitazione con eluizione per competizione, la Figura 5.15 invece si riferisce agli esperimenti di coimmunoprecipitazione con eluizione della resina in Sample Buffer.

In Figura 5.14 si può osservare la lastra autoradiografica derivante dallo sviluppo del segnale di chemiluminescenza relativo alla membrana incubata con anticorpo anti-CFTR (in alto) e anti-FLAG (in basso).

Nella prima corsia è stato caricato il lisato della coimmunoprecipitazione CFTR + adducina-FLAG; è possibile osservare come fosse presente un segnale (anti-CFTR e anti-FLAG), indice della presenza nei lisati di partenza di entrambe le proteine di interesse. Nella corsia successiva è stato caricato il flow through, che rappresenta ciò che non si era legato alla resina; in questo caso il segnale dell'anticorpo anti-CFTR era piuttosto intenso, indice che una buona parte della proteina risulta non legata, mentre il segnale dell'anticorpo anti-FLAG era quasi assente, come atteso, in quanto il FLAG tag dell'adducina lega fortemente la sua resina specifica.

Nelle successive cinque corsie sono state caricate le eluizioni. In questo caso si poteva osservare un segnale molto debole (pressoché assente nelle eluizioni E2 ed E6, di intensità decrescente in E3, E4, E5) dell'anticorpo anti-CFTR, mentre un segnale molto intenso (ad eccezione dell'eluizione E2) dell'anticorpo anti-FLAG.

Questo confermava la presenza dell'adducina legata alla resina, mentre l'arricchimento del segnale del CFTR era praticamente assente, suggerendo una scarsa interazione tra le due proteine adducina e CFTR.

Nelle corsie successive del gel sono stati caricati rispettivamente la frazione di lisati, di flow through e cinque eluizioni successive (E2, E3, E4, E5, E6) della condizione di controllo di questa coimmunoprecipitazione, ossia CFTR + BAP-FLAG. Nei lisati di partenza sono presenti entrambe le proteine di interesse, nel flow through è forte il segnale dell'anti-CFTR e quasi assente quello del FLAG, che infatti risulta quasi totalmente legato alla resina, negli eluati si riscontra la presenza di un segnale solo con l'anticorpo anti-FLAG. Questo indica che, come atteso, negli eluati, il CFTR, che non interagisce con la proteina di controllo BAP, non è presente. In queste frazioni c'è solo la proteina BAP che grazie al FLAG tag è in grado di legare la resina.

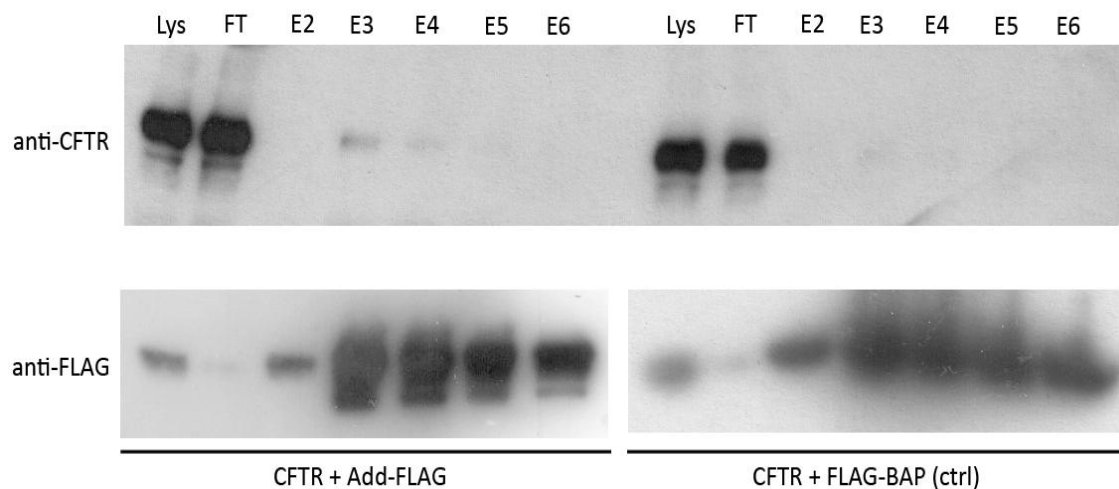


Figura 5.14 - Western blot relativo agli esperimenti di coimmunoprecipitazione condotti su cellule HEK cotransfettate con pcDNA3-CFTR e pcDNA3.1-adducina wild-type-FLAG (FLAG tag al C-terminale dell'adducina) (*CFTR + Add-FLAG*); come condizione di controllo si è utilizzata la cotransfezione con pcDNA3-CFTR e pFLAG-CMV4-BAP (Bovine Alkaline Peroxidase) (*CFTR + FLAG-BAP*). Nel pannello superiore è mostrato il segnale dell'anticorpo anti-CFTR, mentre nei pannelli inferiori è mostrato il segnale dell'anticorpo anti-FLAG, nei lisati cellulari (*Lys*), nei flow through (*FT*) e in cinque eluizioni seriali con FLAG peptide (*E2, E3, E4, E5, E6*).

In Figura 5.15 si può osservare la lastra autoradiografica derivante dallo sviluppo del segnale di chemiluminescenza relativo alla membrana incubata con gli anticorpi anti-CFTR (in alto) e anti-FLAG (in basso).

Nella prima corsia è stato caricato il lisato della coimmunoprecipitazione CFTR + adducina-FLAG, la presenza di segnale sia con l'anticorpo anti-CFTR sia con l'anticorpo anti-FLAG indica che nei lisati di partenza entrambe le proteine di interesse erano espresse. Nella seconda corsia è stato caricato l'eluato, in questo caso mentre il segnale dell'anticorpo anti-FLAG è presente ed intenso, il segnale relativo all'anti-CFTR è completamente assente.

Nelle successive due corsie sono stati caricati rispettivamente lisato ed eluato della condizione di controllo, ossia CFTR + BAP-FLAG. Mentre nel lisato sono presenti i segnali di ambedue gli anticorpi, nell'eluato, come atteso, si ha il solo segnale dell'anticorpo anti-FLAG, in quanto la proteina BAP di controllo non lega il CFTR.

Questa coimmunoprecipitazione e il relativo controllo derivava da un esperimento in cui si erano lasciate in incubazione resine e proteine per un tempo pari a 2 ore.

Le successive quattro corsie della lastra autoradiografica [Figura 5.15] si riferiscono al caricamento di lisati ed eluati della coimmunoprecipitazione CFTR + adducina-FLAG e del relativo controllo CFTR + BAP-FLAG, derivanti da un esperimento in cui resine e proteine erano state lasciate in incubazione 24 ore. I segnali sono in questo secondo caso paragonabili a quanto osservato nel caso precedentemente descritto (2 ore di incubazione).

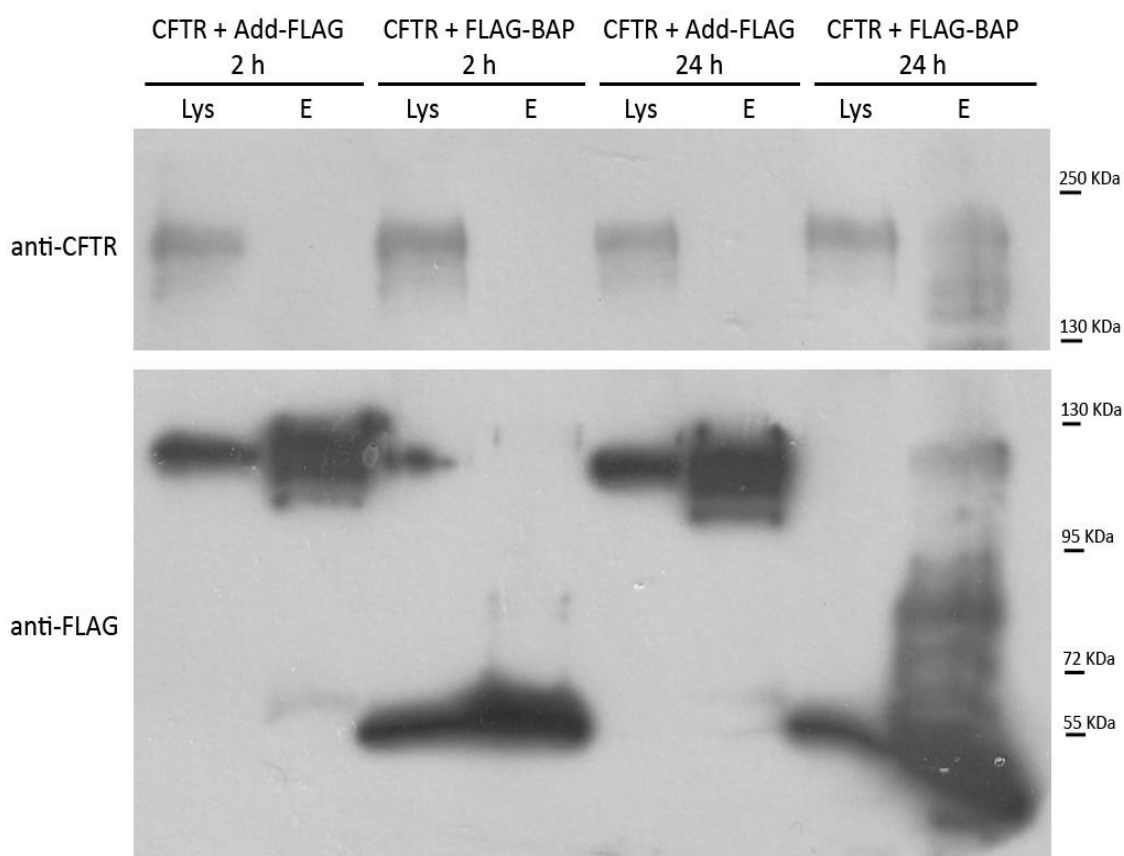


Figura 5.15 - Western blot relativo agli esperimenti di coimmunoprecipitazione condotti su cellule HEK cotransfettate con pcDNA3-CFTR e pcDNA3.1-adducina wild-type-FLAG (FLAG tag al C terminale dell'adducina) (*CFTR + Add-FLAG*), come controllo si è utilizzata la cotransfezione con pcDNA3-CFTR e pFLAG-CMV4-BAP (*CFTR + FLAG-BAP*). Nel pannello superiore è mostrato il segnale relativo all'anticorpo anti-CFTR, mentre nel pannello inferiore è mostrato il segnale relativo all'anticorpo anti-FLAG, nei lisati cellulari (*Lys*) e negli eluati (*E*) derivanti da incubazioni di 2 ore (*2 h*) o 24 ore (*24 h*) con resine α -FLAG M2 Affinity Gel (Sigma).

5.6.1.3 Esperimenti di coimmunoprecipitazione con HA-tag

Per questi esperimenti, cellule HEK Phoenix sono state cotransfettate con i vettori pcDNA3-CFTR e pcDNA3.1-adducina wild-type.

Sono stati inoltre allestiti esperimenti di controllo, transfettando le cellule con pcDNA3-CFTR e pFLAG (vettore vuoto), che non lega il CFTR.

A 48 ore dalla transfezione le cellule sono state raccolte e lisate. Il lisato è stato successivamente incubato con una resina, α -HA Affinity Gel (Sigma), costituita da anticorpi monoclonali α -HA, coniugati ad agarosio. Le proteine con un HA-tag sono

in grado di legarsi alla resina e, con esse, le proteine a loro legate.

L'eluizione della resina è stata effettuata direttamente in Sample Buffer.

I lisati e gli eluati sono stati controllati mediante Western blot per la presenza del CFTR (mediante anticorpi anti-CFTR) e dell'adducina (mediante anticorpi anti-HA).

Nella prima e nella terza corsia sono stati caricati i lisati relativi a due indipendenti coimmunoprecipitazioni CFTR + HA-adducina, in cui proteine e resine sono state lasciate in incubazione per un tempo pari a 2 ore. La presenza di segnale sia con l'anticorpo anti-CFTR sia con l'anticorpo anti-HA indica che, nei lisati di partenza, entrambe le proteine di interesse erano espresse. Nella seconda e nella quarta corsia sono stati caricati i relativi eluati. In questo caso, mentre il segnale dell'anticorpo anti-HA è presente ed intenso, il segnale relativo all'anti-CFTR è completamente assente.

Nelle successive quattro corsie sono stati caricati lisati ed eluati di due esperimenti indipendenti di controllo, ossia CFTR + pFLAG (vettore vuoto). Nei lisati è presente il segnale relativo all'anticorpo anti-CFTR ma non quello relativo all'anticorpo anti-HA, le cellule non erano infatti transfettate con HA-adducina. Negli eluati entrambi i segnali dei due anticorpi sono assenti, come atteso [Figura 5.16].

Nelle ultime quattro corsie sono stati caricati lisato ed eluato di un esperimento di coimmunoprecipitazione CFTR + HA-adducina e del relativo controllo. In questo caso proteine e resine sono state incubate per un tempo pari a 24 ore.

Sia il segnale del CFTR, sia il segnale dell'anticorpo anti-HA sono presenti nei lisati; negli eluati il segnale dell'anticorpo anti-HA è presente, come atteso, e si ha anche un debole segnale relativo all'anticorpo diretto contro il CFTR. Un segnale simile, anche più intenso, è presente anche nella frazione di eluato della condizione di controllo, indice che si tratta di un segnale aspecifico massimizzato dall'incubazione più prolungata (24 ore) con la resina.

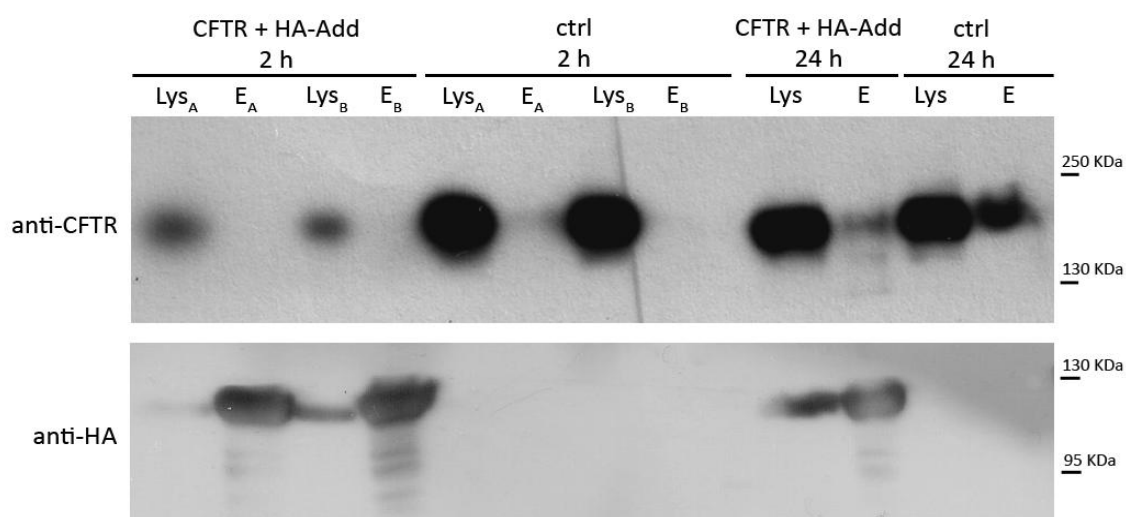


Figura 5.16 - Western blot relativo agli esperimenti di coimmunoprecipitazione condotti su cellule HEK cotrasfettate con pcDNA3-CFTR e pcDNA3.1-HA-adducina wild-type (HA-tag all'N-terminale dell'adducina) (*CFTR + HA-Add*). Come condizione di controllo (*ctrl*) si è utilizzata la cotrasfezione con pcDNA3-CFTR e pFLAG-CMV4, vettore vuoto. Nel pannello superiore è mostrato il segnale relativo all'anticorpo anti-CFTR, mentre nel pannello inferiore il segnale relativo all'anticorpo anti-HA, nei lisati cellulari (*Lys*) e negli eluati (*E*), derivanti da incubazioni di 2 ore (*2 h*) o 24 ore (*24 h*) con resine α -HA Affinity Gel (Sigma). I pedici A e B indicano due diverse preparazioni indipendenti.

5.6.2 Studio dell'interazione tra CFTR e adducina: esperimenti di FRET

Per studiare l'eventuale interazione tra le proteine CFTR e adducina sono stati allestiti esperimenti FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), che consentivano anche di osservare la localizzazione e il distretto cellulare in cui tale interazione potrebbe avvenire. Si è utilizzato il metodo dell'Acceptor Photobleaching, che consente di misurare la variazione di intensità di emissione del fluoroforo donatore, ECFP (Enhanced Cyan Fluorescent Protein), in seguito a bleaching del fluoroforo accettore, EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein). Il bleaching è ottenuto illuminando una regione del preparato con un laser ad elevata potenza.

Questi esperimenti sono stati condotti su cellule HEK Phoenix transfettate con i plasmidi che consentono l'espressione di proteine di fusione aventi il fluoroforo CFP in N- o C- terminale rispetto all'adducina ed il fluoroforo YFP in N- o C- terminale rispetto al CFTR. La presenza del voluminoso fluoroforo (26 kDa) potrebbe infatti determinare l'alterazione della localizzazione o della funzionalità della proteina. Inoltre diverse potrebbero essere le regioni di interazione delle proteine,

determinando perciò anche una variazione di efficienza del trasferimento energetico.

Gli esperimenti di FRET sono stati condotti per queste possibili coppie:

- pEYFP-C1-CFTR + pECFP-C1-adducina wild-type
- pEYFP-C1-CFTR + pECFP-N1-adducina wild-type
- pEYFP-C1-CFTR + pECFP-C1-adducina G460W
- pEYFP-C1-CFTR + pECFP-N1-adducina G460W
- pEYFP-C1-CFTR + pECFP (condizione di controllo)

Il vettore pECFP-C1 ha il cDNA codificante per l'adducina in C-terminale della sequenza nucleotidica codificante per il fluoroforo CFP, mentre il vettore pECFP-N1 ha il cDNA codificante per l'adducina in N-terminale della sequenza nucleotidica codificante per il CFP; il vettore pEYFP-C1 ha il cDNA per il CFTR a valle della sequenza nucleotidica codificante per il fluoroforo YFP. Non sono stati invece condotti esperimenti con il vettore pEYFP-N1-CFTR in quanto, in questo caso, il CFTR non localizzava a livello della membrana plasmatica, probabilmente proprio per la presenza del voluminoso fluoroforo al C-terminale del canale.

Inizialmente sono stati condotti gli esperimenti di controllo volti a valutare il segnale di fondo, ossia l'efficienza di FRET dovuta all'interazione aspecifica e casuale tra i due fluorofori CFP e YFP in cellula.

Nel corso di questi esperimenti le cellule sono state transfettate con il vettore vuoto pECFP, esprime il solo CFP, libero di diffondere in cellula, ed il vettore pEYFP-C1-CFTR. In questi esperimenti di controllo è stata rilevata un'efficienza di FRET (FRET eff %) pari a $-0,46 \pm 0,47$ ($n = 27$) [Figura 5.17A].

Dopo avere effettuato gli esperimenti di controllo, si sono allestiti gli esperimenti FRET per ognuna delle coppie precedentemente elencate.

Dagli esperimenti condotti è emerso che, mentre l'adducina localizzava uniformemente a livello della regione citoplasmatica e della regione sottomembranaria, il CFTR localizzava prevalentemente a livello della membrana plasmatica e delle regioni sottomembranarie [Figura 5.17B].

Per la coppia pEYFP-C1-CFTR + pECFP-C1-adducina wild-type si è misurata

un'efficienza di FRET (FRET eff %) pari a $3,65 \pm 0,71$ ($n = 40$), statisticamente superiore rispetto alla condizione di controllo ($P < 0,01$) [Figura 5.17C].

La coppia pEYFP-C1-CFTR + pECFP-N1-adducina wild-type presentava un'efficienza di FRET non statisticamente differente rispetto a quanto misurato per la coppia pEYFP-C1-CFTR + pECFP-C1-adducina wild-type.

Anche l'efficienza di FRET misurata in presenza di adducina mutata (G460W), in entrambe le conformazioni, non era significativamente diversa da quella misurata in presenza di adducina wild-type ed era pari a $3,46 \pm 0,45$ ($n = 35$) per la coppia pEYFP-C1-CFTR + pECFP-C1-adducina G460W. Anche in questo caso era quindi statisticamente superiore rispetto alla condizione di controllo ($P < 0,01$) [Figura 5.17C].

Poiché le proprietà, la localizzazione e l'espressione del CFTR sono modulate dai livelli di cAMP intracellulari, gli stessi esperimenti sono stati condotti in presenza di forskolina. Le cellule venivano trattate per 20 minuti con una soluzione fisiologica contenete forskolina $10 \mu\text{M}$.

In questo caso, per il controllo, costituito dalla coppia pECFP + pEYFP-C1-CFTR si è misurata un'efficienza di FRET pari a $0,24 \pm 0,61$ ($n = 14$), mentre per le coppie pECFP-C1-adducina wild-type + pEYFP-C1-CFTR e pECFP-C1-adducina mutata + pEYFP-C1-CFTR le efficienze di FRET erano rispettivamente pari a $3,33 \pm 0,62$ ($n = 22$) e $2,76 \pm 0,75$ ($n = 24$) [Figura 5.17D].

L'efficienza di FRET (FRET eff %) era ancora statisticamente rispetto alla condizione di controllo ($P < 0,05$).

Anche in questo caso non si sono riscontrate differenze significative tra cellule transfettate con adducina wild-type e adducina mutata.

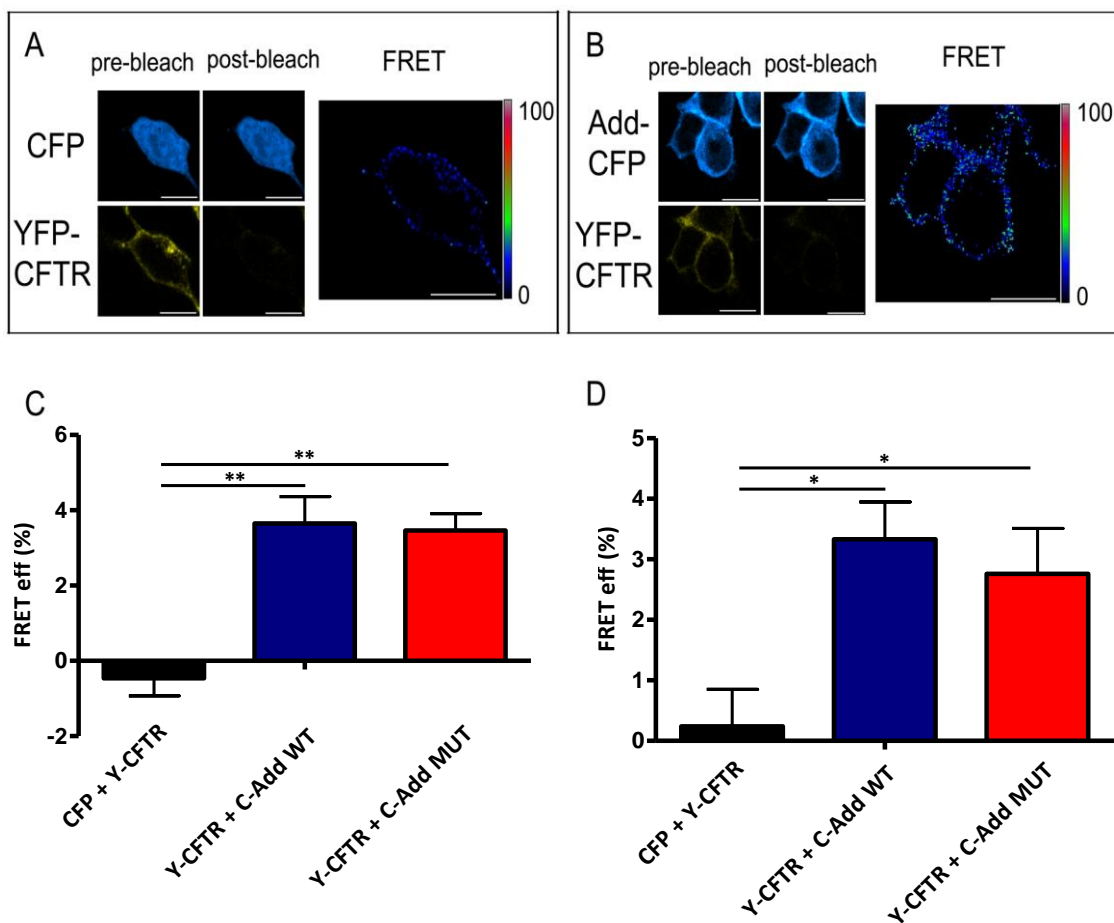


Figura 5.17 - Esperimenti di FRET. Il metodo dell'acceptor photobleaching è stato utilizzato per ottenere l'efficienza di FRET. A) Immagini ottenute nel canale del CFP (blu, pannelli in alto, CFP) e del YFP (giallo, pannelli in basso, YFP-CFTR), prima (*pre-bleach*, pannelli a sinistra) e dopo (*post-bleach*, pannelli a destra) il photobleaching del fluoroforo YFP. Il pannello sulla destra mostra l'efficienza di FRET (FRET) in cellule HEK overesprimenti CFP e YFP-CFTR (condizione di controllo). Barra di scala: 10 μ m. B) Immagini ottenute nel canale del CFP (blu, pannelli in alto, Add-CFP) e del YFP (giallo, pannelli in basso, YFP-CFTR), prima (*pre-bleach*, pannelli a sinistra) e dopo (*post-bleach*, pannelli a destra) il photobleaching del fluoroforo YFP. Il pannello sulla destra mostra l'efficienza di FRET (FRET) in cellule HEK overesprimenti CFP-adducina wild-type e YFP-CFTR. Barra di scala: 10 μ m. C) Istogramma rappresentante l'efficienza di FRET (FRET eff %) misurata in cellule di controllo (CFP + Y-CFTR, n = 27) e in cellule overesprimenti YFP-CFTR e CFP-adducina wild-type (Y-CFTR + C-Add WT, n = 40) oppure CFP-adducina mutata (Y-CFTR + C-Add MUT, n = 35). L'efficienza di FRET è statisticamente superiore rispetto alla condizione di controllo sia in presenza di adducina wild-type che in presenza di adducina mutata ($P < 0,01$). D) Istogramma rappresentante l'efficienza di FRET (FRET eff %) misurata dopo l'esposizione delle cellule a forskolina 10 μ M, in cellule di controllo (CFP + Y-CFTR, n = 4) e in cellule overesprimenti YFP-CFTR e CFP-adducina wild-type (Y-CFTR + C-Add WT, n = 11) oppure CFP-adducina mutata (Y-CFTR + C-Add MUT, n = 9). L'efficienza di FRET è statisticamente superiore rispetto alla condizione di controllo sia in presenza di adducina wild-type che in presenza di adducina mutata ($P < 0,05$).

Come già specificato, in queste serie sperimentali di FRET, è stato utilizzato come controllo negativo il segnale FRET misurato tra il fluoroforo YFP fuso al CFTR e il fluoroforo CFP, senza una specifica localizzazione cellulare in quanto libero di diffondere in cellula.

Si è quindi scelto di condurre ulteriori esperimenti di FRET utilizzando un diverso controllo negativo. A questo proposito le cellule sono state transfettate con pEYFP-C1-CFTR e pECFP-C1-ICln.

ICln è una proteina multifunzionale, ubiquitariamente espressa in tutte le cellule. A livello subcellulare ICln è prevalentemente distribuita nel citosol (circa 90%) mentre per il restante 10% è localizzata in membrana plasmatica. La proteina ICln si trova inoltre al centro di una complessa rete di interazioni, in particolare sono note le sue interazioni con alcune componenti del citoscheletro, quali actina, miosina, proteina 4.1. Non sono invece note interazioni con il CFTR, quindi, per tutti questi motivi, si è ritenuto che il FRET tra ICln e CFTR potesse essere un buon controllo negativo. È stata quindi allestita un'ulteriore serie sperimentale. Per questo controllo negativo (pEYFP-C1-CFTR + pECFP-C1-ICln) si è misurata un'efficienza di FRET pari a $-0,18 \pm 0,39$ (n = 42).

Per le coppia pEYFP-C1-CFTR + pECFP-C1-adducina wild-type e pEYFP-C1-CFTR + pECFP-N1-adducina wild-type si sono misurate efficienze di FRET (FRET eff %) pari a $1,75 \pm 0,49$ (n = 55) e a $2,39 \pm 0,86$ (n = 18), non statisticamente differenti tra loro ma entrambe statisticamente superiori rispetto alla condizione di controllo ($P < 0,05$) [Figura 5.18].

In questa serie sperimentale sono stati allestiti anche esperimenti di controllo positivo, misurando l'efficienza di trasferimento energetico tra i due fluorofori CFP e YFP fusi tra loro. In questo caso l'efficienza FRET era pari a $45,04 \pm 1,23$ (n = 32), decisamente superiore rispetto alle efficienze FRET misurate nei nostri casi sperimentali ($P < 0,001$) [Figura 5.18]. L'aver incluso in questa serie di esperimenti un controllo positivo ha fornito un'indicazione sulla validità della metodica utilizzata, permettendo di evidenziare che il segnale di FRET rilevato nel corso degli esperimenti per verificare l'interazione tra CFTR e adducina, seppur significativo rispetto ai controlli negativi, è nettamente più ridotto rispetto ad un segnale registrato in presenza di una coppia FRET ottimale e interagente con elevata efficienza (fluorofori CFP e YFP fusi tra loro).

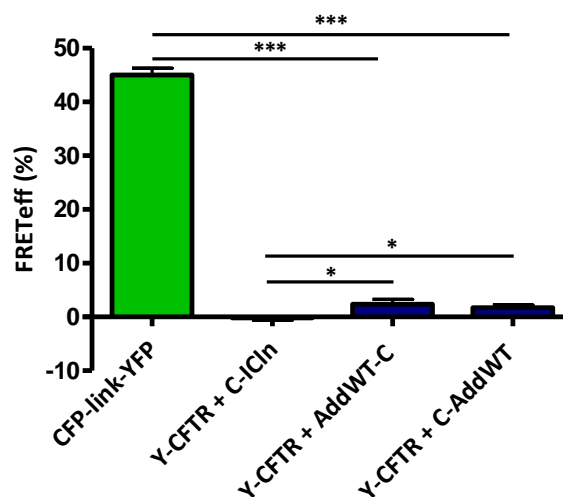


Figura 5.18 - Istogramma rappresentante l'efficienza di FRET (*FRET eff %*) misurata in presenza del controllo negativo costituito da YFP-CFTR e CFP-ICln (*Y-CFTR + C-ICln*, n = 42), in presenza del controllo positivo, costituito dai due fluorofori CFP e YFP fusi tra loro (*CFP-link-YFP*, n = 32) e in cellule overesprimenti YFP-CFTR e adducina wild-type-CFP (*Y-CFTR + AddWT-C*, n = 18) oppure CFP-adducina wild-type (*Y-CFTR + C-AddWT*, n = 55). L'efficienza di FRET è statisticamente superiore rispetto alla condizione di controllo, sia con il fluoroforo CFP fuso all'N-terminale dell'adducina, sia con il fluoroforo CFP al C-terminale dell'adducina ($P < 0,05$). L'efficienza di FRET è però di debole intensità, come visibile dal confronto con il controllo positivo ($P < 0,001$).

5.7 Studio del trafficking del CFTR

L'attività del CFTR è strettamente correlata alla regolazione del suo trafficking. Infatti evidenze sempre maggiori suggeriscono che il numero di canali in membrana sia in buona parte determinato dalla regolazione del riciclo endocitico del CFTR dalla superficie e dall'inserzione del canale in membrana a partire dalle vescicole intracellulari (Guggino and Stanton 2006). Il CFTR viene efficacemente rimosso dalla membrana apicale con una velocità non differente dalla velocità con cui vengono endocitati nutrienti e recettori di molecole di segnale (Ameen, Silvis and Bradbury 2007).

Per studiare se l'incremento di espressione membranaria del CFTR in presenza di adducina mutata, osservato tramite gli esperimenti di Western blot e biotilazione del canale, possa essere dovuto ad un'alterazione della mobilità e del trafficking del CFTR, sono stati condotti esperimenti volti proprio a valutare l'aspetto della mobilità.

5.7.1 Studio del trafficking del CFTR: esperimenti di FRAP

Gli esperimenti di FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) sono stati condotti su cellule HEK293 T, simultaneamente transfettate con i vettori pEYFP-C1-CFTR e pECFP-C1-adducina wild-type oppure pECFP-C1-adducina mutata.

In seguito a photobleaching di YFP-CFTR con un raggio laser ad elevata potenza, si monitorava il recupero di fluorescenza della regione in cui era stato effettuato il bleaching [Figura 5.19A]. Queste regioni di interesse (ROI) comprendevano sempre zone di membrana plasmatica.

L'analisi quantitativa delle immagini ha permesso di determinare la cinetica del recupero di fluorescenza in seguito a photobleaching.

La percentuale di recupero della fluorescenza, indice della frazione mobile del CFTR legato al fluoroforo YFP ($F_{mob}\%$), era $67,20 \pm 4,84$ ($n = 38$) in presenza di adducina wild-type, valore paragonabile a quanto riportato in letteratura nel caso di over-espressione del canale (Haggie, Stanton and Verkman 2004).

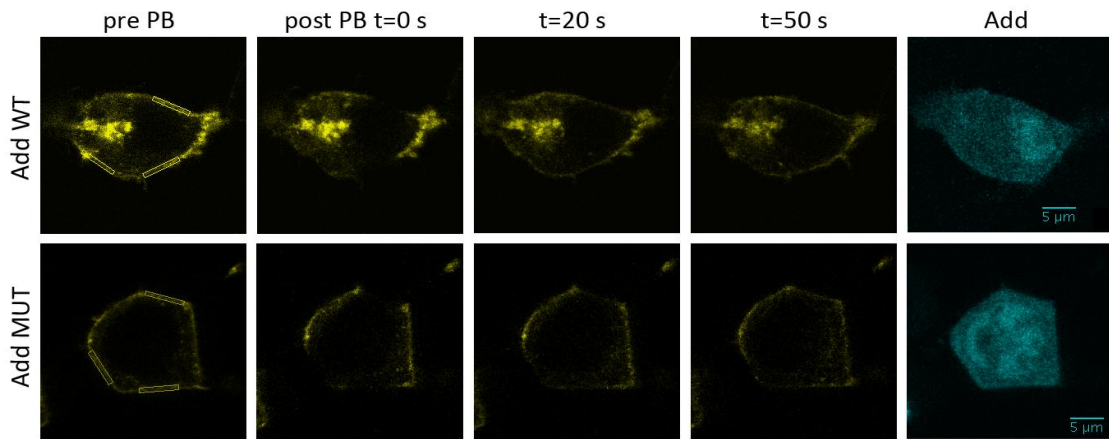
Il recupero di fluorescenza monitorato con questa metodica riflette sia i fenomeni di esocitosi ed endocitosi della proteina, sia la sua diffusione laterale in membrana. È stata infatti condotta un'ulteriore serie sperimentale, in cui le ROI membranarie venivano, al loro interno, suddivise in tre porzioni di cui due laterali ed una centrale ed è stato monitorato il recupero di fluorescenza nelle diverse regioni. Si è osservato che il recupero nelle porzioni laterali, $t_{1/2}$ pari a $18,41 \pm 1,55$ s ($n = 26$), è statisticamente ($P < 0,01$) più rapido di quanto si osserva nella regione centrale, $t_{1/2}$ $28,88 \pm 3,28$ s ($n = 26$). Non è stata riscontrata invece variazione della frazione mobile tra porzione centrale e porzioni laterali [Figura 5.19D].

In presenza di adducina mutata è stata osservata una riduzione statisticamente significativa ($P < 0,05$) della percentuale di recupero della fluorescenza ($F_{mob}\%$), che risultava essere pari a $53,18 \pm 3,88$ ($n = 42$), rispetto a quanto osservato in presenza di adducina wild-type.

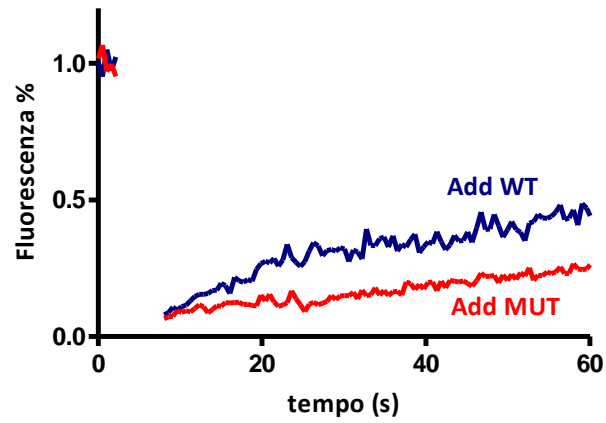
Per quanto riguarda la velocità di recupero di fluorescenza si è osservato che essa non variava in modo significativo in presenza di adducina wild-type o mutata

(adducina wild-type: $t_{1/2}$ $28,17 \pm 2,11$ s ($n = 38$), adducina mutata: $t_{1/2}$ $23,63 \pm 1,47$ s ($n = 42$)) [Figura 5.19C].

A)



B)



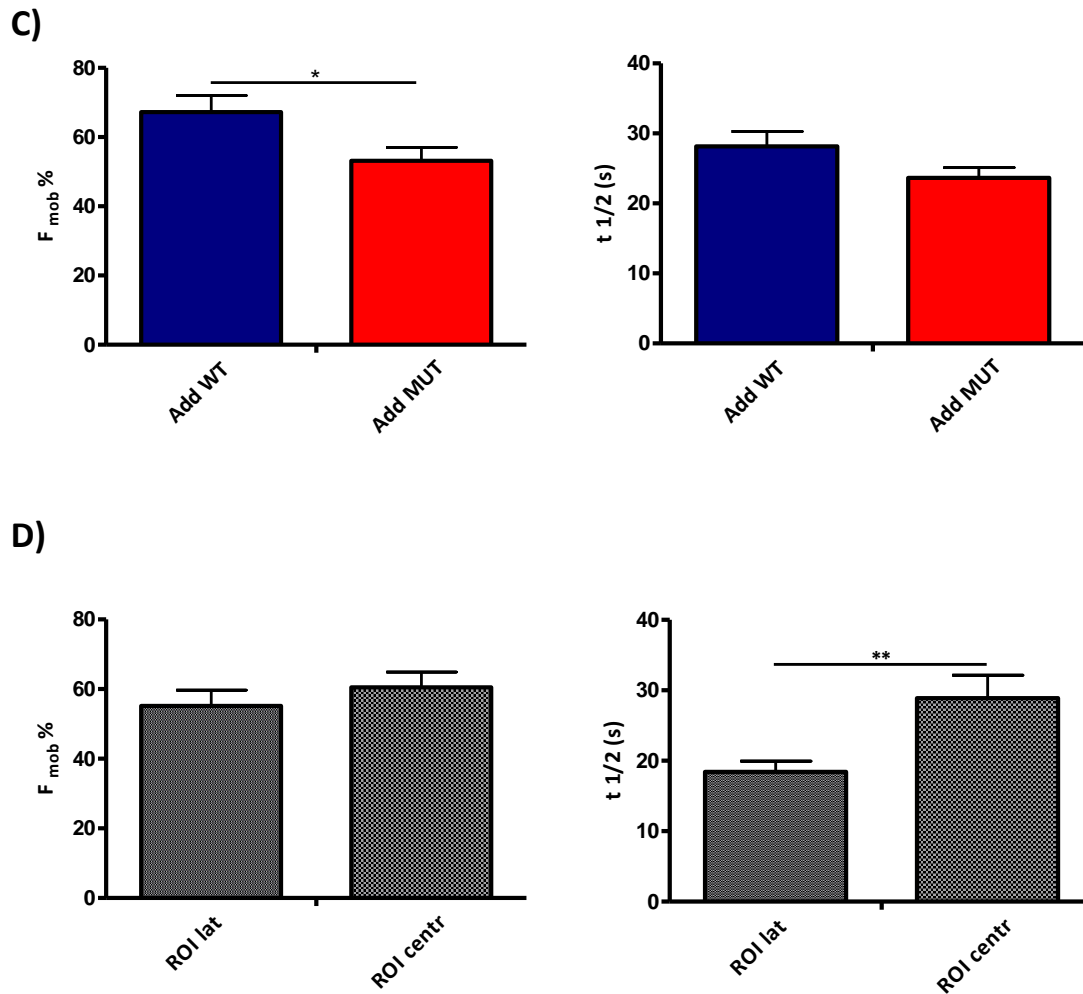


Figura 5.19 - Esperimenti di FRAP per lo studio della mobilità del CFTR. A) Immagini ottenute da un esperimento di FRAP. Segnale del CFTR, nel canale del YFP (giallo), in cellule HEK, overesprimenti adducina wild-type (*Add WT*, pannelli in alto) o adducina mutata (*Add MUT*, pannelli in basso), prima del photobleaching (*pre PB*) e a diversi tempi dopo il photobleaching (*post PB* $t=0$ s, $t=20$ s, $t=50$ s). Sulla destra è mostrato il corrispondente segnale dell'adducina (*Add*), nel canale del CFP (ciano). Nelle immagini pre-photobleaching (*pre PB*) sono indicate le tre regioni di interesse membranarie su cui è stato condotto il photobleaching. Barra di scala: 5 μ m. B) Grafico relativo alle cinetiche di recupero della fluorescenza dopo il photobleaching di CFTR-YFP, in presenza delle varianti wild-type (*Add WT*, in blu) e mutata (*Add MUT*, in rosso) dell'adducina. C) Istogrammi relativi alla percentuale di frazione mobile media ($F_{mob} \%$, a sinistra) e alla costante di tempo ($t_{1/2}$, a destra), in cellule HEK overesprimenti CFP-adducina wild-type (*Add WT*, $n = 38$) o CFP-adducina mutata (*Add MUT*, $n = 42$). In presenza di adducina mutata si ha una riduzione significativa ($P < 0,05$) della frazione mobile del CFTR. D) Istogrammi relativi alla percentuale di frazione mobile media ($F_{mob} \%$, a sinistra) e alla costante di tempo ($t_{1/2}$, a destra), in cellule HEK overesprimenti CFP-adducina wild-type, monitorati in regioni di interesse centrali (*ROI centr*) o laterali (*ROI lat*). Il recupero di fluorescenza è statisticamente più rapido nelle ROI laterali ($P < 0,01$).

5.7.2 Studio del trafficking del CFTR: esperimenti di fotoattivazione

L'avvento delle proteine fluorescenti fotoattivabili ha offerto nuove opportunità nello studio della localizzazione di organelli e molecole all'interno di cellule vive (Lippincott-Shwartz and Patterson 2009).

Queste proteine fotoattivabili vengono frequentemente utilizzate per monitorare la distribuzione di una proteina d'interesse fusa alla proteina fotoattivabile. In questo caso la proteina taggata può essere seguita nei suoi movimenti in modo temporalmente e spazialmente controllato, così da poter determinare il grado di mobilità della proteina stessa in cellula (Chudakov, Lukyanov and Lukyanov 2007).

La fotoattivabilità di queste particolari proteine fluorescenti è dovuta ai cambiamenti nelle proprietà spettrali cui vanno incontro in risposta all'irradiazione con luce a specifica lunghezza d'onda e intensità. In questo modo queste molecole eccitate dalla fotoattivazione forniscono un forte segnale su un background "scuro" (Lippincott-Shwartz and Patterson 2009).

Per studiare la mobilità del CFTR e, in particolare, l'influenza dell'adducina sul suo trafficking, è stata allestita una serie di esperimenti di fotoattivazione.

Questi esperimenti sono stati condotti su cellule HEK293 T cotransfettate transientemente con i vettori pECFP-C1-adducina wild-type oppure pECFP-C1-adducina mutata e pEGFP-C1-CFTR, vettore in cui il CFTR è fuso al C-terminale di una GFP fotoattivabile (PAGFP).

Questa PAGFP-CFTR veniva fotoattivata in regioni d'interesse (ROI) sempre comprendenti porzioni di membrana plasmatica e veniva monitorato il decadimento di fluorescenza nel tempo.

Dalle curve risultanti, il cui fitting è stato fatto con una funzione a decadimento esponenziale (Paragrafo 4.16), si è calcolata la costante di tempo, $t_{1/2}$, che è risultata essere pari a $21,13 \pm 1,80$ s ($n = 30$) in presenza di adducina wild-type e pari a $28,35 \pm 3,12$ s ($n = 29$) in presenza di adducina mutata. Il valore di $t_{1/2}$ in presenza di adducina mutata era statisticamente superiore ($P < 0,05$) rispetto a quello ottenuto quando era espressa adducina wild-type [Figura 5.20B].

Questo dato conferma quindi la ridotta mobilità del CFTR, osservata mediante gli esperimenti di FRAP, a livello della regione membranaria, causata dalla mutazione dell'adducina.

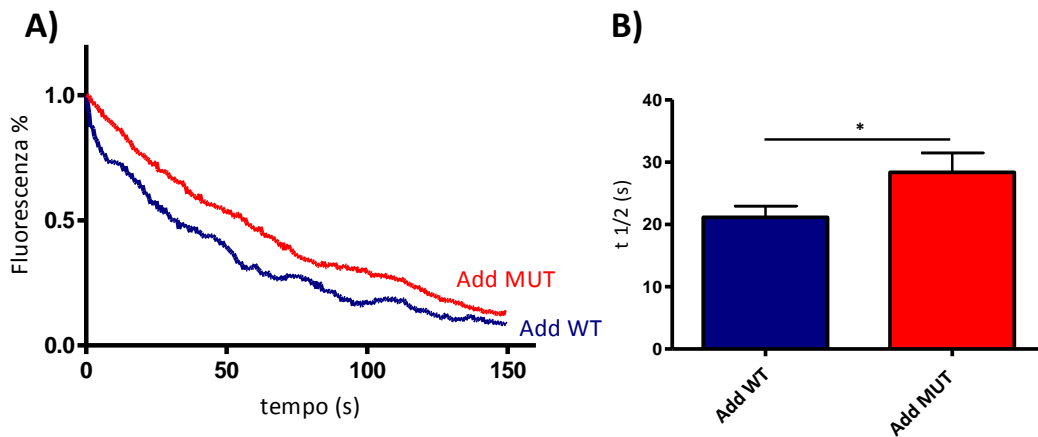


Figura 5.20 - Esperimenti di fotoattivazione per lo studio della mobilità del CFTR. A) Tracce rappresentative che mostrano le cinetiche di decadimento della fluorescenza dopo la fotoattivazione di PAGFP-CFTR in cellule HEK overesprimenti CFP-adducina wild-type (*Add WT*, in blu) o CFP-adducina mutata (*Add MUT*, in rosso). B) Istogrammi relativi alla costante media di tempo ($t_{1/2}$) in presenza della variante wild-type (*Add WT*) o mutata (*Add MUT*) dell'adducina. In presenza di adducina mutata il decadimento della fluorescenza di PAGFP-CFTR è più lento rispetto a quanto osservato in presenza di adducina wild-type ($P < 0,05$).

È stata allestita un'ulteriore serie di esperimenti di fotoattivazione volti a cercare di chiarire in che modo agisca l'espressione di adducina mutata.

Si è quindi studiata la mobilità del CFTR in cellule over-esprimenti adducina wild-type, in seguito a trattamento con ikarugamicina. L'ikarugamicina è un antibiotico che agisce come inibitore generico dell'endocitosi mediata da clatrina e che è già stato utilizzato nello studio dei processi di endocitosi (Luo et al. 2001, Moscatelli et al. 2007).

In seguito a trattamento con ikarugamicina, la costante di tempo, ottenuta dalle curve di decadimento della fluorescenza nella ROI fotoattivata, era pari a $54,04 \pm 8,57$ s ($n = 19$), valore statisticamente superiore ($P < 0,05$) rispetto a quello, $22,07 \pm 1,40$ s ($n = 20$), ottenuto in condizioni di controllo [Figura 5.21C].

L'espressione di adducina mutata sembra quindi avere un effetto sulla mobilità del CFTR simile, anche se meno intenso, rispetto a quello provocato dal blocco dell'endocitosi mediata da clatrina.

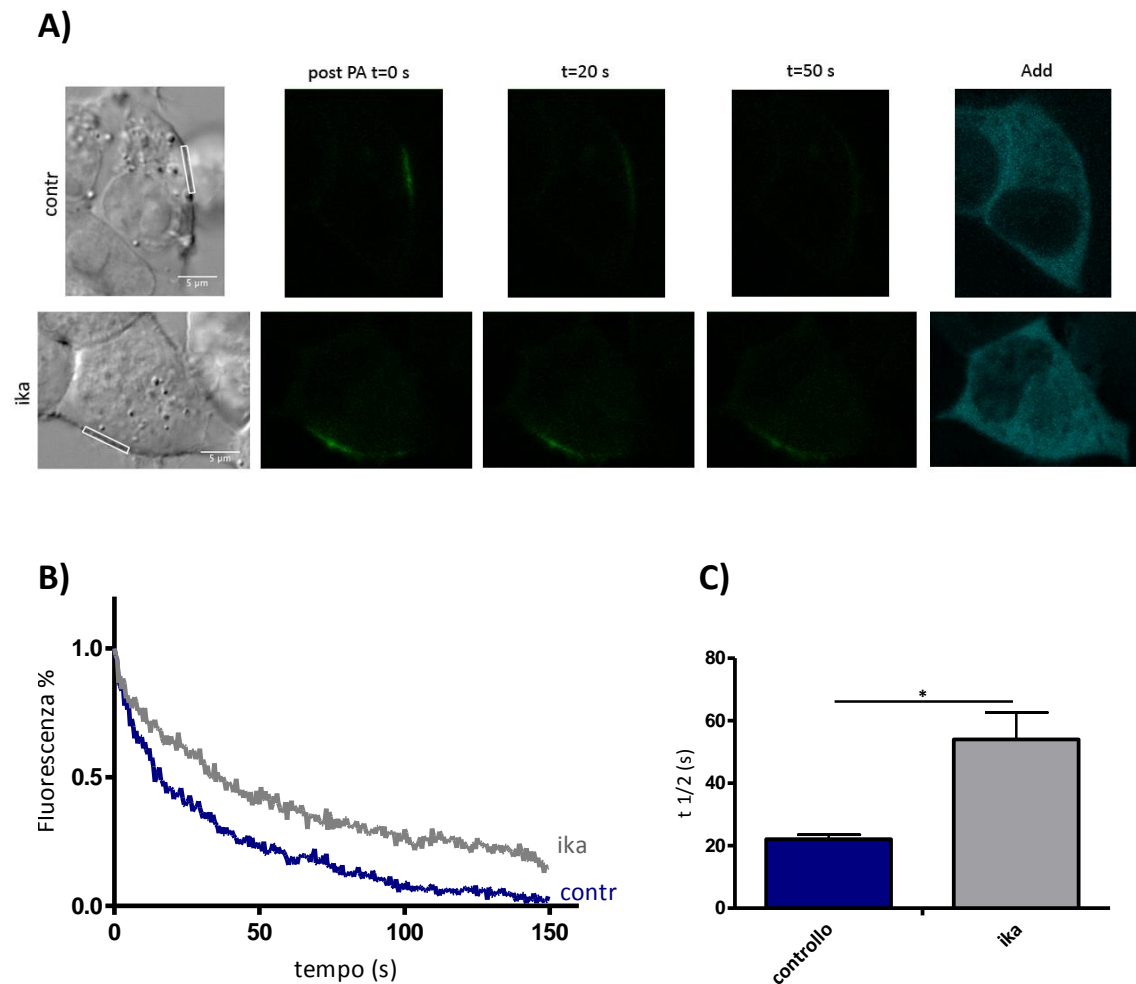


Figura 5.21 - Esperimenti di fotoattivazione per lo studio della mobilità del CFTR. A) Immagini ottenute da un esperimento di fotoattivazione. Segnale del CFTR, nel canale della GFP (verde), in cellule HEK, overesprimenti adducina wild-type, in condizioni di controllo (*contr*, pannelli in alto), o in seguito a trattamento con ikarugamicina, bloccante dell'endocitosi clatrina-dipendente (*ika*, pannelli in basso), a diversi tempi dopo la fotoattivazione (*post PA t=0 s*, *t=20 s*, *t=50 s*). Sulla destra è mostrato il corrispondente segnale dell'adducina (*Add*), nel canale del CFP (ciano), mentre sulla sinistra è mostrata la relativa immagine in bright field. Nelle immagini in bright field è indicata la regione di interesse membranaria su cui è stata condotta la fotoattivazione. Barra di scala: 5 µm. B) Tracce rappresentative che mostrano le cinetiche di decadimento della fluorescenza dopo la fotoattivazione di PAGFP-CFTR in cellule HEK overesprimenti CFP-adducina wild-type, in condizioni di controllo (*contr*, in blu) o in seguito a trattamento con ikarugamicina (*ika*, in grigio). C) Istogrammi relativi alla costante media di tempo ($t_{1/2}$) nella condizione di controllo (*controllo*) o di trattamento con ikarugamicina (*ika*). In seguito a blocco dell'endocitosi con ikarugamicina, il decadimento della fluorescenza di PAGFP-CFTR è più lento rispetto a quanto osservato in condizioni di controllo ($P < 0,05$).

L'effetto del blocco del processo di endocitosi clatrina-dipendente con ikarugamicina è stato saggiato anche mediante esperimenti di Western blot. Questi esperimenti hanno permesso di valutare come variasse il pattern di espressione delle bande B e C in seguito al trattamento con l'antibiotico.

Cellule NU12 e HU33 sono state transfettate con il vettore di espressione del canale, pcDNA3-CFTR e, 48 ore dopo la transfezione, cellule NU12 sono state trattate con ikarugamicina 5 μ M per 120 minuti, mentre cellule NU12 e HU33 sono state esposte per un identico lasso di tempo a DMSO, il solvente dell'ikarugamicina (condizione di controllo).

La lastra autoradiografica mostra il segnale dell'anticorpo diretto contro il CFTR. Era possibile identificare le due bande, la banda B, "core-glycosylated" e la banda C, "fully-glycosylated" [Figura 5.22A].

L'analisi densitometrica delle bande è espressa come rapporto tra l'espressione delle due isoforme, "core-" e "fully-glycosylated" [Figura 5.22B].

Si può osservare che in condizioni di controllo, il rapporto banda C/banda B cresceva in maniera statisticamente significativa ($P < 0,05$) nelle cellule HU33 (HU33 DMSO) rispetto alle cellule NU12 (NU12 DMSO).

Le cellule NU12 esposte a blocco dell'endocitosi (NU12 + ika) presentavano un rapporto tra le bande C e B superiore, anche se non in modo significativo, rispetto alla relativa condizione di controllo.

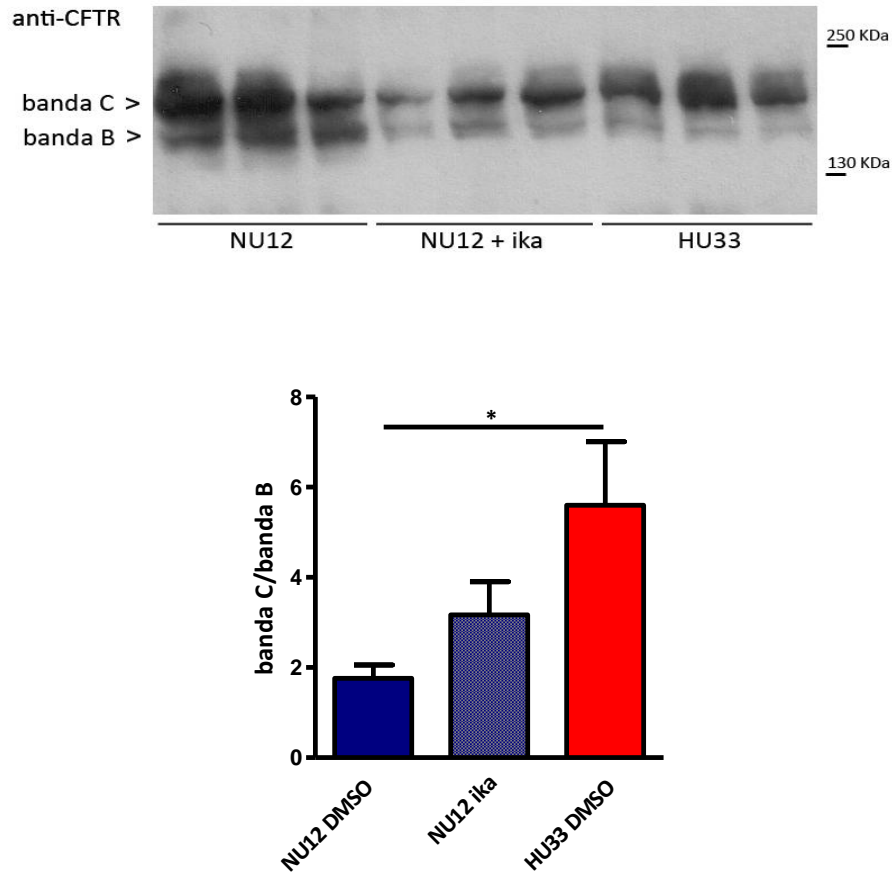


Figura 5.22 - Esperimenti di Western blot per lo studio del pattern di espressione delle bande B e C del CFTR in seguito a blocco dell'endocitosi con ikarugamicina. A) Lastra autoradiografica che mostra il segnale dell'anticorpo anti-CFTR. Le frecce indicano le due isoforme, core-glycosylated (*banda B*) e fully-glycosylated (*banda C*), del canale. Sono stati caricati 100 μ g di proteine per ciascun campione (*NU12*: n = 3, *NU12 + ika*: n = 3, *HU33*: n = 3). B) Istogramma relativo all'analisi densitometrica del rapporto delle intensità della banda C e della banda B del CFTR (*banda C/banda B*) in cellule *NU12* di controllo (*NU12 DMSO*), *NU12* trattate con ikarugamicina (*NU12 ika*) e *HU33* di controllo (*HU33 DMSO*). Si riscontra una differenza significativa ($P < 0,05$) tra i rapporti di banda in cellule *HU33* ed *NU12* di controllo, mentre il pattern mostrato da cellule *NU12* trattate con ikarugamicina è intermedio tra quello delle cellule *NU12* e *HU33* di controllo.

5.8 Studio dell'organizzazione del citoscheletro actinico

Poiché è noto dalla letteratura (Tripodi et al. 1996) che l'organizzazione del citoscheletro actinico sia influenzata dall'espressione della variante mutata dell'adducina, esperimenti di fluorescenza con staining dell'actina, sono stati condotti su cellule *NU12* e *HU33*.

In accordo con quanto già riportato, l'architettura delle fibre di actina risultava diversa nei due tipi cellulari: in presenza di adducina mutata, le fibre erano più spesse, più fitte e più abbondanti [Figura 5.23], indicando di conseguenza una

maggiore rigidità del citoscheletro.

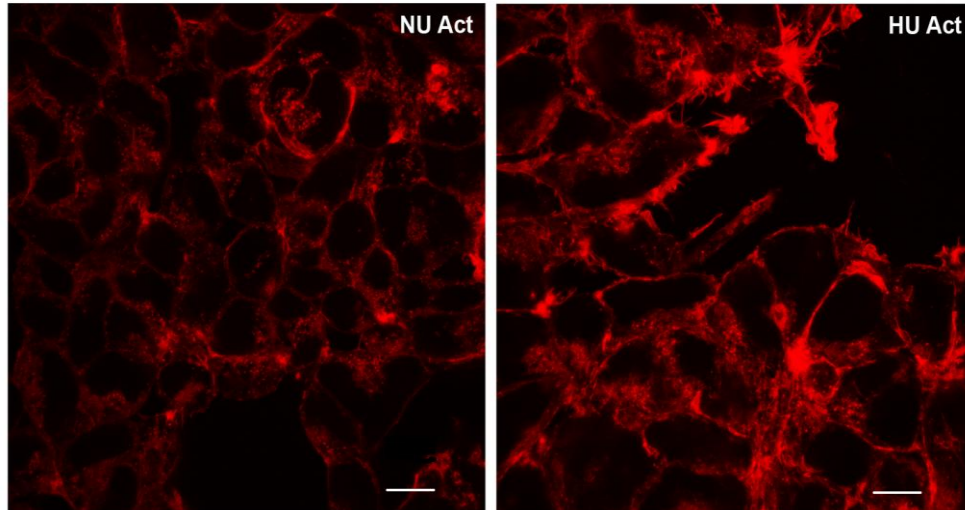


Figura 5.23 - Immagini di microscopia confocale relative agli esperimenti di immunofluorescenza. Le immagini mostrano il segnale dell'actina in cellule NU12 (*NU Act*) e HU33 (*HU Act*). Le fibre di actina sono state colorate mediante Falloidina Alexa 568. Barra di scala: 10 μm .

6. Discussione

Nonostante i numerosi studi a riguardo, l'eziologia dell'ipertensione primaria risulta essere in buona parte ancora sconosciuta. Recentemente è diventato sempre più evidente il ruolo centrale del rene sia nell'induzione che nel mantenimento dell'ipertensione "sodio sensibile". A livello renale sono state riscontrate alterazioni funzionali dovute ad anomalie a carico di canali e trasportatori dislocati nei diversi tratti del nefrone, in particolare del nefrone distale.

Studi condotti su un animale modello, il ratto Milano iperteso (MHS), avevano evidenziato un aumento di espressione e/o attività dei cotrasportatori NKCC (Capasso et al. 2008, Carmosino et al. 2011), NCC (Capasso et al. 2008), dei canali ClC-K (Capasso et al. 2008) e dell'aquaporina 4 (Procino et al. 2011).

Nel corso di esperimenti di patch-clamp condotti su cellule del tubulo convoluto distale (DCT) isolate dai ratti MHS e MNS (ratti Milano normotesi) si era osservata la presenza di un canale a bassa conduttanza (8-9 pS), con caratteristiche biofisiche compatibili con quelle di un CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), la cui presenza era stata confermata mediante esperimenti di immunocitochimica. Il canale presentava, nei ratti MHS, una densità e un'attività statisticamente superiori rispetto a quanto osservato nei ratti MNS.

I ratti MHS presentano una mutazione della proteina citoscheletrica adducina di cui è noto il ruolo chiave nell'organizzazione del citoscheletro di actina e, mutazioni a carico di questa proteina, nell'uomo G460W ed S586C e nel ratto MHS F316Y, hanno un ruolo centrale nell'insorgenza della patologia ipertensiva. Questa proteina è infatti in grado di modulare direttamente e indirettamente l'attività e l'espressione di diversi meccanismi di trasporto: l'espressione della pompa Na^+/K^+ -ATPasi a livello della membrana basolaterale delle cellule tubulari renali, ad esempio, è ridotta a causa di una diminuzione della sua endocitosi.

Il CFTR, come la pompa, è una proteina che va incontro ad un continuo processo di trafficking da e verso la membrana plasmatica (Bertrand and Frizzell 2003),

processo regolato da un complesso pathway che sfrutta vescicole rivestite di clatrina e numerose proteine adattatrici, tra cui il complesso AP-2 (Weixel and Bradbury 2001), la cui interazione con la pompa è alterata in presenza di adducina mutata.

Alcuni studi hanno inoltre dimostrato che l'attività del CFTR è influenzata dal citoscheletro di actina e dal suo stato di polimerizzazione (Cantiello 2001) e che mutazioni nell'organizzazione del citoscheletro di actina inducono l'attivazione del canale anche in assenza della stimolazione da parte della PKA (Cantiello 2001).

Per studiare se l'espressione della variante mutata (G460W) dell'adducina comportasse una modifica funzionale dell'attività del CFTR, sono stati condotti esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell su cellule NU12 (HEK stabilmente transfettate con adducina wild-type) e su cellule HU33 (HEK stabilmente transfettate con adducina mutata G460W). Entrambi i tipi di cellule sono stati transfettati in modo transiente con il vettore pIRES2-EGFP-CFTR. Le cellule HEK non presentano infatti un'espressione endogena del canale (dati di Western blot non riportati). In assenza di attivazione del canale con forskolina (attivatore della PKA), la corrente registrata in cellule HU33 non variava in modo significativo rispetto a quanto osservato in cellule NU12, mentre in seguito a stimolazione con forskolina si originava una corrente che, in stato stazionario, era significativamente superiore ($P < 0,05$) in cellule HU33 rispetto a quella registrata in cellule NU12. La mancanza di una differenza nella densità di corrente in cellule non stimulate con forskolina ma esprimenti il canale CFTR, potrebbe dipendere dal fatto che, in configurazione whole-cell, il CFTR va incontro a rapido run down: l'attività del canale si riduce molto rapidamente dopo il raggiungimento della configurazione whole-cell. In queste condizioni dunque la corrente registrata non è quella dipendente dell'attività del canale, come dimostrato anche dall'osservazione che il trattamento con un inibitore specifico del CFTR, il CFTR-(inh)-172, determina, in entrambi i tipi di cellule una riduzione della corrente che non risulta essere differente rispetto a quanto osservato in assenza di stimolazione con forskolina. L'espressione di adducina mutata sembrava quindi influire sull'entità della corrente

mediata dal CFTR.

Considerando la curva, con andamento sigmoide, di attivazione della corrente nel tempo dopo esposizione a forskolina, era possibile osservare che, il tempo a cui il 50% (t_{50}) della corrente era attiva non variava in modo significativo nei due tipi di cellule, mentre lo slope di attivazione della corrente era significativamente superiore ($P < 0,01$) nelle cellule HU33. Quest'osservazione potrebbe essere in accordo con l'ipotesi che l'adducina non influenzi il meccanismo d'attivazione del canale, ma il numero di canali funzionalmente attivi in membrana.

Questa ipotesi è supportata dai risultati degli esperimenti di patch-clamp in configurazione cell-attached condotti su cellule NU12 e HU33. In questi esperimenti è stato possibile osservare le caratteristiche di singolo canale del CFTR e i dati ottenuti evidenziano come la relazione corrente-voltaggio, la conduttanza e la probabilità di apertura del canale non siano influenzate dalla presenza dell'isoforma mutata dell'adducina. Al contrario, si è osservato che, sia l'attività che la densità dei canali erano significativamente superiori ($P < 0,05$) in cellule HU33 rispetto a cellule NU12 e la corrente media, registrata mediante l'utilizzo di rampe di potenziale che andavano da -135 mV a +65 mV, risultava essere incrementata ($P < 0,05$) in presenza di adducina G460W sia prima che dopo l'aggiunta di forskolina e quindi l'attivazione del CFTR.

La misurazione dei livelli di cAMP intracellulari in cellule NU12 e HU33 indica che la differenza nell'attivazione della corrente non era dovuta ad un diverso effetto della forskolina sui livelli di cAMP nei due tipi cellulari, in particolare che il pathway di sintesi del cAMP non era né up-regolato nelle cellule HU33, né down-regolato nelle cellule NU12.

L'aumento di attività del CFTR osservato mediante gli esperimenti di patch-clamp sembra possa essere dovuto ad un'alterazione del processamento del canale nelle cellule over-esprimenti adducina mutata. Gli esperimenti di Western blot hanno mostrato un incremento del rapporto tra la forma "fully-glycosylated" (banda C) e la forma "core-glycosylated" (banda B) del CFTR in presenza di adducina mutata. La banda C rappresenta la forma matura del canale, prevalentemente localizzata a

livello della membrana plasmatica e delle vescicole submembranarie di riciclo, mentre la banda B rappresenta la forma immatura del CFTR, tipicamente localizzata a livello del reticolo endoplasmatico. L'incremento di espressione della banda C non sembra essere dovuto ad una variazione dell'espressione totale del canale (banda B + banda C), in quanto i livelli totali del CFTR non sono statisticamente diversi tra i due tipi cellulari.

L'aumento di espressione della banda C del CFTR potrebbe essere dovuto sia ad un incremento nell'efficienza di glicosilazione sia ad una riduzione dell'endocitosi, con conseguente ritenzione più duratura del CFTR maturo in membrana. È stato dimostrato infatti che la glicosilazione del canale influenza il turnover del canale stesso nei compartimenti reticolari post endoplasmatici. Il canale "fully-glycosylated" risulta essere più stabile in membrana, mentre l'attività del canale non è influenzata dal livello di glicosilazione. Quindi l'incremento di glicosilazione del CFTR, osservato in cellule HU33, può portare all'aumento dell'espressione del canale in membrana osservato mediante gli esperimenti di Western blot condotti sulla frazione di proteine della membrana plasmatica e mediante gli esperimenti di biotinilazione del CFTR. Inoltre gli esperimenti di immunofluorescenza hanno mostrato una diversa localizzazione del canale, diffusa nel citoplasma e in membrana in presenza della variante wild-type dell'adducina, più nettamente confinata a livello del plasmalemma in presenza di adducina mutata. Questo aumento di espressione del CFTR in membrana sarebbe responsabile dell'aumento di attività del canale, osservato con gli esperimenti di patch-clamp.

Mentre non sono state riportate evidenze che correlino l'adducina con i pathway di glicosilazione, è noto che l'espressione dell'adducina mutata riduce l'endocitosi della pompa Na^+/K^+ -ATPasi (Torielli et al. 2008, Efendiev et al. 2004) e dell'aquaporina 4 (Procino et al. 2011), suggerendo che un meccanismo simile possa essere alla base dell'aumento di densità superficiale e di attività anche del CFTR.

Al fine di chiarire quale sia il meccanismo alla base di questo aumento di espressione membranaria del canale in presenza della variante mutata dell'adducina, si sono indagati due differenti aspetti: la possibile interazione tra

CFTR e adducina e il trafficking del canale.

Per studiare l'interazione tra le due proteine si sono condotti esperimenti di FRET e di coimmunoprecipitazione.

Gli esperimenti di FRET hanno innanzitutto permesso di osservare la localizzazione dell'adducina, che risultava essere diffusa in tutta la cellula ad eccezione del nucleo, e del CFTR, espresso in strutture vescicolari intracellulari e submembranarie e a livello della membrana plasmatica. Questi esperimenti, evidenziando un'efficienza di FRET debole ma significativa ($P < 0,01$) rispetto a diverse condizioni di controllo, testimoniano una stretta vicinanza tra le due proteine. L'efficienza di FRET non variava in modo significativo in presenza della variante mutata dell'adducina sia prima che dopo la stimolazione, e quindi l'attivazione, del CFTR con forskolina.

Gli esperimenti di coimmunoprecipitazione non hanno invece mostrato una chiara interazione tra le due proteine.

Questi dati permettono quindi di ipotizzare che l'interazione tra CFTR e adducina sia debole e non stabile, come già riportato in letteratura per le interazioni tra CFTR e actina, mediate da proteine citoplasmatiche intermediarie. È infatti noto che il CFTR sia libero di diffondere a livello della superficie cellulare su una scala di distanze nell'ordine dei micron e su una scala di tempi nell'ordine dei secondi; interazioni statiche del CFTR con il citoscheletro actinico non avvengono, si tratta di interazioni dinamiche che avvengono in tempistiche nell'ordine dei secondi o meno (Haggie, Stanton and Verkman 2004).

L'interazione diretta tra adducina e CFTR non è il solo meccanismo mediante il quale l'adducina possa modulare l'attività e l'espressione membranaria del CFTR. Mutazioni a carico dell'adducina potrebbero agire alterando il trafficking del canale, sia mediante una modulazione dell'organizzazione citoscheletrica, sia mediante lo sbilanciamento del ciclo fosforilativo della proteina adattatrice AP-2, così come avviene per la pompa Na^+/K^+ -ATPasi (Torielli et al. 2008, Efendiev et al. 2004).

Per studiare questo aspetto sono stati condotti esperimenti di FRAP e fotoattivazione.

In entrambi i casi si è riscontrata, nelle ROI comprendenti regioni di membrana

plasmatica, una mobilità del CFTR piuttosto alta, con valori che andavano, nel caso degli esperimenti di FRAP, dal 52% al 70% di frazione mobile. Questi valori di $F_{mob}\%$ erano paragonabili a quelli riportati in altri studi (Haggie et al. 2004, Bates et al. 2006) e l'alta mobilità del CFTR, soprattutto in presenza di adducina wild-type, è probabile che sia la conseguenza dell'over-espressione del canale (Bates et al. 2006, Haggie et al. 2006).

Bisogna però considerare che, in parte, la mobilità del CFTR dipende dai fenomeni di diffusione laterale in membrana, oltre che dai fenomeni di eso ed endocitosi. Infatti gli esperimenti di FRAP in cui la regione di membrana è stata suddivisa nelle regioni laterali e centrale hanno mostrato una significativa ($P < 0,01$) diminuzione del tempo ($t_{1/2}$) di recupero di fluorescenza nelle regioni laterali rispetto alla regione centrale.

Sia gli esperimenti di FRAP che gli esperimenti di fotoattivazione indicano che il CFTR è maggiormente e/o più a lungo ritenuto a livello della membrana quando le cellule esprimono la variante mutata dell'adducina ($P < 0,05$). Sembra quindi che la mutazione dell'adducina alteri la mobilità del CFTR e ne diminuisca il turnover.

Al fine di cercare di chiarire attraverso quale meccanismo l'adducina mutata possa interferire con l'espressione del CFTR, sono stati condotti, su cellule over-esprimenti adducina wild-type, esperimenti di fotoattivazione in seguito a blocco dell'endocitosi con ikarugamicina. L'ikarugamicina è in grado di inibire l'endocitosi mediata da clatrina. Si è osservato che l'effetto dell'espressione di adducina G460W sul tempo ($t_{1/2}$) di decadimento della fluorescenza del PA-CFTR era simile, anche se meno intenso, a quanto osservato trattando cellule over-esprimenti adducina wild-type con ikarugamicina. Gli esperimenti di Western blot condotti in seguito a trattamento delle cellule con ikarugamicina sembrano suggerire che il blocco dell'endocitosi ha l'effetto di incrementare il rapporto tra la forma "fully-glycosylated" del CFTR e la sua forma "core-glycosylated", con la conseguenza di avvicinare la condizione delle cellule esprimenti adducina wild-type a quella delle cellule esprimenti adducina mutata. Nel complesso questi risultati permettono di ipotizzare che il processo di endocitosi mediata da clatrina venga regolato

negativamente dall'espressione di adducina mutata.

Non si può comunque escludere anche il coinvolgimento dell'organizzazione del citoscheletro di actina. Gli esperimenti di fluorescenza con staining dell'actina confermano infatti quanto già noto dalla letteratura (Tripodi et al. 1996): il citoscheletro sembra essere influenzato dall'espressione di adducina mutata, presenta infatti fibre di actina più fitte e più spesse che danno al citoscheletro una maggior rigidità.

Il citoscheletro actinico submembranario è importante per l'ancoraggio delle proteina di membrana, ne limita la diffusione laterale in membrana, contribuisce alla loro compartimentalizzazione e influenza l'attività di canali e trasportatori (Tripodi et al. 1996, Monterisi et al. 2012, Karpushev et al. 2010). Poiché è noto che il CFTR sia soggetto a clustering (Penmatsa et al. 2010) e a ritenzione in regioni di confinamento transiente (Bates et al. 2006), è probabile che l'architettura del citoscheletro actinico abbia un impatto sulla sua mobilità.

Si può quindi supporre che la ritenzione del canale a livello della membrana plasmatica possa essere la conseguenza sia della ridotta endocitosi sia dell'aumentata rigidità citoscheletrica, entrambi fenomeni indotti dall'espressione della variante mutata dell'adducina. Ciò eserciterebbe un effetto inibitorio sul trafficking del canale (Torielli et al. 2008, Qualmann and Kessels 2002).

In conclusione, questi esperimenti dimostrano che, nel modello cellulare renale, l'adducina mutata è in grado di influenzare l'attività del CFTR per via di un'alterazione del turnover del canale che porta ad un aumento della ritenzione del canale stesso a livello della membrana plasmatica. Nonostante la presenza del CFTR nei diversi tratti del nefrone, il ruolo di questo canale nel rene è ancora sconosciuto ma si può supporre un suo coinvolgimento nella patologia ipertensiva. Elementi a sostegno di questa ipotesi vengono da studi effettuati su pazienti affetti da fibrosi cistica, i quali, benché non presentino alterazioni della funzionalità renale, mostrano una ridotta escrezione renale di NaCl e una diminuita capacità di concentrare e diluire le urine. I pazienti affetti da fibrosi cistica mostrano inoltre un minore

incremento della pressione arteriosa con l'età rispetto a quanto mediamente osservato nei soggetti sani (Super et al. 2004).

Ulteriori evidenze suggeriscono un coinvolgimento del CFTR nella sindrome di Liddle, una forma ipertensiva autosomica dominante dovuta a mutazioni a livello del canale epiteliale ENaC, che comportano un eccessivo riassorbimento di sodio nel nefrone distale (Shimkets et al. 1994). L'incremento di espressione e di attività del canale ENaC responsabile della sindrome di Liddle sembra essere correlato ad un incremento della corrente di cloruro mediata dal CFTR, a livello del dotto collettore (Chang et al. 2005). In realtà le interazioni tra CFTR ed ENaC sembrano essere molto più complesse e dipendono dal tipo cellulare, infatti è stato dimostrato che l'attivazione del CFTR inibisce l'ENaC nelle cellule respiratorie (Lazrak et al. 2011, Mall et al. 1998) e nelle cellule del colon (Kunzelmann et al. 2002), mentre nelle cellule assorbenti delle ghiandole sudoripare (Reddy, Light and Quinton 1999), nelle cellule renali del dotto collettore corticale (Chang et al. 2005) e nelle cellule MDCK (Xie and Schafer 2004), l'attivazione del CFTR sarebbe accompagnata da una concomitante attivazione del canale per il sodio ENaC.

Inoltre l'effetto inibitorio esercitato dal CFTR potrebbe essere dovuto all'incremento nei livelli intracellulari di cloruro che produce, piuttosto che ad una diretta interazione tra CFTR ed ENaC (Kunzelmann 2003).

Il CFTR sembra inoltre avere un ruolo fondamentale nella regolazione del volume di fluido extracellulare (ECFV), infatti, alcuni ormoni regolatori dell'ECFV, come la vasopressina, oltre a stimolare l'assorbimento di sodio tramite l'aumento di espressione del canale epiteliale ENaC, producono proprio un incremento di espressione del CFTR nel rene (Chang et al. 2005).

Si sa inoltre che gli ormoni tiroidei (THs), benché non siano considerati classici regolatori dell'ECFV, sono in realtà coinvolti nella modulazione dell'attività di alcuni trasportatori ionici a livello renale. In particolare gli ormoni tiroxina (T_4) e triiodotironina (T_3) stimolano l'espressione della pompa Na^+/K^+ -ATPasi, dello scambiatore Na^+/H^+ e del cotrasportatore Na^+ -fosfato, oltre che del canale per il cloruro ClC-2 e del CFTR. In particolare, per quanto riguarda il CFTR, studi effettuati

su ratti hanno dimostrato che gli animali affetti da ipertiroidismo mostravano un incremento di espressione del canale del 250% rispetto agli animali di controllo. All'ipertiroidismo è infatti associato un aumento di ritenzione idrica. Al contrario, negli animali affetti da ipotiroidismo si sono osservati sia una diminuzione dei livelli di filtrazione glomerulare sia problemi nella capacità di concentrare le urine (de Andrade Pinto et al. 2007).

È inoltre noto che, in determinate condizioni, quando cioè è stimolato l'assorbimento di sodio tramite il canale epiteliale ENaC attraverso la membrana apicale delle cellule principali del dotto collettore corticale e il potenziale di membrana è depolarizzato, il CFTR è in grado non solo di secernere cloruro ma anche di riassorbirlo (Stanton 1997).

Poiché è noto che il CFTR sia in grado di regolare altri canali e trasportatori, il suo incremento di espressione potrebbe avere conseguenze funzionali sull'intero network di meccanismi di trasporto delle cellule renali; l'importanza del CFTR in relazione allo sviluppo della patologia ipertensiva potrebbe quindi essere determinata non tanto, o non solo, dalla sua attività di canale, ma anche, o forse soprattutto, dalla sua capacità di modulare l'attività di proteine di membrana come i canali ROMK, le aquaporine, i trasportatori $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ e i canali del sodio epiteliali ENaC.

*Il lavoro presentato in questa tesi è stato accettato per la pubblicazione,
in data 08-11-2012, dalla rivista PLoS ONE (PONE-D-12-15585R2):*

Mondini A., Sassone F., Civello D.A., Garavaglia M.L., Bazzini C., Rodighiero S., Vezzoli V.,
Conti F., Torielli L., Capasso G., Paulmichl M., Meyer G.

Hypertension-Linked Mutation of alpha-Adducin Increases CFTR Surface Expression and
Activity in HEK and Cultured Rat Distal Convoluted Tubule Cells

Bibliografia

- Ameen, N., M. Silvis & N. A. Bradbury (2007) Endocytic trafficking of CFTR in health and disease. *J Cyst Fibros*, 6, 1-14.
- Ando, K. & T. Fujita (2012) Pathophysiology of salt sensitivity hypertension. *Ann Med*, 44 Suppl 1, S119-26.
- Barlassina, C., L. Citterio, L. Bernardi, L. Buzzi, M. D'Amico, T. Sciarrone & G. Bianchi (1997) Genetics of renal mechanisms of primary hypertension: the role of adducin. *J Hypertens*, 15, 1567-71.
- Bates, I. R., B. Hébert, Y. Luo, J. Liao, A. I. Bachir, D. L. Kolin, P. W. Wiseman & J. W. Hanrahan (2006) Membrane lateral diffusion and capture of CFTR within transient confinement zones. *Biophys J*, 91, 1046-58.
- Bennett, V. & A. J. Baines (2001) Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev*, 81, 1353-92.
- Bertrand, C. A. & R. A. Frizzell (2003) The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285, C1-18.
- Bianchi, G. (2005) Genetic variations of tubular sodium reabsorption leading to "primary" hypertension: from gene polymorphism to clinical symptoms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289, R1536-49.
- Bianchi, G., G. Tripodi, G. Casari, S. Salardi, B. R. Barber, R. Garcia, P. Leoni, L. Torielli, D. Cusi & M. Ferrandi (1994) Two point mutations within the adducin genes are involved in blood pressure variation. *Proc Natl Acad Sci U*

S A, 91, 3999-4003.

Bradbury, N. A., J. A. Clark, S. C. Watkins, C. C. Widnell, H. S. Smith & R. J. Bridges (1999) Characterization of the internalization pathways for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol*, 276, L659-68.

Cantiello, H. F. (1996) Role of the actin cytoskeleton in the regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Exp Physiol*, 81, 505-14.

Cantiello, H. F. (2001) Role of actin filament organization in CFTR activation. *Pflugers Arch.*, 443 Suppl 1, S75-S80.

Capasso, G., M. Rizzo, M. L. Garavaglia, F. Trepiccione, M. Zacchia, A. Mugione, P. Ferrari, M. Paulmichl, F. Lang, J. Loffing, M. Carrel, S. Damiano, C. A. Wagner, G. Bianchi & G. Meyer (2008) Upregulation of apical sodium-chloride cotransporter and basolateral chloride channels is responsible for the maintenance of salt-sensitive hypertension. *Am.J.Physiol Renal Physiol*, 295, F556-F567.

Carmosino, M., F. Rizzo, P. Ferrari, L. Torielli, M. Ferrandi, G. Bianchi, M. Svelto & G. Valenti (2011) NKCC2 is activated in Milan hypertensive rats contributing to the maintenance of salt-sensitive hypertension. *Pflugers Arch*, 462, 281-91.

Chang, C. T., M. Bens, E. Hummler, S. Boulkroun, L. Schild, J. Teulon, B. C. Rossier & A. Vandewalle (2005) Vasopressin-stimulated CFTR Cl⁻ currents are increased in the renal collecting duct cells of a mouse model of Liddle's syndrome. *J.Physiol*, 562, 271-284.

Chang, X. B., A. Mengos, Y. X. Hou, L. Cui, T. J. Jensen, A. Aleksandrov, J. R. Riordan & M. Gentsch (2008) Role of N-linked oligosaccharides in the biosynthetic

processing of the cystic fibrosis membrane conductance regulator. *J Cell Sci*, 121, 2814-23.

Cheng, S. H., R. J. Gregory, J. Marshall, S. Paul, D. W. Souza, G. A. White, C. R. O'Riordan & A. E. Smith (1990) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*, 63, 827-34.

Cholon, D. M., W. K. O'Neal, S. H. Randell, J. R. Riordan & M. Gentsch (2010) Modulation of endocytic trafficking and apical stability of CFTR in primary human airway epithelial cultures. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 298, L304-14.

Chudakov, D. M., S. Lukyanov & K. A. Lukyanov (2007) Using photoactivatable fluorescent protein Dendra2 to track protein movement. *Biotechniques*, 42, 553, 555, 557 passim.

Cusi, D., C. Barlassina, T. Azzani, G. Casari, L. Citterio, M. Devoto, N. Glorioso, C. Lanzani, P. Manunta, M. Righetti, R. Rivera, P. Stella, C. Troffa, L. Zagato & G. Bianchi (1997) Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet*, 349, 1353-7.

de Andrade Pinto, A. C., C. M. Barbosa, D. S. Ornellas, H. J. Novaira, J. de Souza-Menezes, T. M. Ortiga-Carvalho, P. Fong & M. M. Morales (2007) Thyroid hormones stimulate renal expression of CFTR. *Cell Physiol Biochem.*, 20, 83-90.

Deschênes, G. & M. Fila (2011) Primary molecular disorders and secondary biological adaptations in bartter syndrome. *Int J Nephrol*, 2011, 396209.

- Devuyst, O. & W. B. Guggino (2002) Chloride channels in the kidney: lessons learned from knockout animals. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283, F1176-91.
- Efendiev, R., R. T. Krmar, G. Ogimoto, J. Zwiller, G. Tripodi, A. I. Katz, G. Bianchi, C. H. Pedemonte & A. M. Bertorello (2004) Hypertension-linked mutation in the adducin alpha-subunit leads to higher AP2-mu2 phosphorylation and impaired Na⁺,K⁺-ATPase trafficking in response to GPCR signals and intracellular sodium. *Circ Res*, 95, 1100-8.
- Fu, L., A. Rab, L. P. Tang, S. M. Rowe, Z. Bebok & J. F. Collawn (2012) Dab2 is a key regulator of endocytosis and post-endocytic trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochem J*, 441, 633-43.
- Gadsby, D. C., P. Vergani & L. Csanady (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*, 440, 477-483.
- Guggino, W. B. & B. A. Stanton (2006) New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 426-36.
- Guyton, A. C. (1991) Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science*, 252, 1813-1816.
- Haggie, P. M., B. A. Stanton & A. S. Verkman (2004) Increased diffusional mobility of CFTR at the plasma membrane after deletion of its C-terminal PDZ binding motif. *J Biol Chem*, 279, 5494-500.
- Haggie, P. M., J. K. Kim, G. L. Lukacs & A. S. Verkman (2006) Tracking of quantum dot-labeled CFTR shows near immobilization by C-terminal PDZ interactions. *Mol Biol Cell*, 17, 4937-45.

- Hanrahan, J. W. & M. A. Wioland (2004) Revisiting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator structure and function. *Proc Am Thorac Soc*, 1, 17-21.
- Hubberstey, A. V. & E. P. Mottillo (2002) Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization. *FASEB J*, 16, 487-99.
- Jin, S., P. M. Haggie & A. S. Verkman (2007) Single-particle tracking of membrane protein diffusion in a potential: simulation, detection, and application to confined diffusion of CFTR Cl⁻ channels. *Biophys J*, 93, 1079-88.
- Karpushev, A. V., D. V. Ilatovskaya, T. S. Pavlov, Y. A. Negulyaev & A. Staruschenko (2010) Intact cytoskeleton is required for small G protein dependent activation of the epithelial Na⁺ channel. *PLoS One*, 5, e8827.
- Kunzelmann, K. (2003) ENaC is inhibited by an increase in the intracellular Cl⁻ concentration mediated through activation of Cl⁻ channels. *Pflugers Arch*, 445, 504-12.
- Kunzelmann, K., R. Schreiber, J. König & M. Mall (2002) Ion transport induced by proteinase-activated receptors (PAR2) in colon and airways. *Cell Biochem Biophys*, 36, 209-14.
- Lang, F., G. Capasso, M. Schwab & S. Waldegger (2005) Renal tubular transport and the genetic basis of hypertensive disease. *Clin Exp Nephrol*, 9, 91-9.
- Lawes, C. M., S. Vander Hoorn, A. Rodgers & I. S. o. Hypertension (2008) Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet*, 371, 1513-8.
- Lazrak, A., A. Jurkuvenaite, L. Chen, K. M. Keeling, J. F. Collawn, D. M. Bedwell & S. Matalon (2011) Enhancement of alveolar epithelial sodium channel activity

with decreased cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 301, L557-67.

Li, X., Y. Matsuoka & V. Bennett (1998) Adducin preferentially recruits spectrin to the fast growing ends of actin filaments in a complex requiring the MARCKS-related domain and a newly defined oligomerization domain. *J Biol Chem*, 273, 19329-38.

Lippincott-Shwartz, J., Patterson, G. H. (2009) Photoactivable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging. *Trends in Cell Biology*, 19(11), 555-565.

Luft, F. C. (2001) Molecular genetics of salt-sensitivity and hypertension. *Drug Metab Dispos*, 29, 500-4.

Lukacs, G. L., G. Segal, N. Kartner, S. Grinstein & F. Zhang (1997) Constitutive internalization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator occurs via clathrin-dependent endocytosis and is regulated by protein phosphorylation. *Biochem J*, 328 (Pt 2), 353-61.

Luo, T., B. L. Fredericksen, K. Hasumi, A. Endo & J. V. Garcia (2001) Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced CD4 cell surface downregulation is inhibited by ikarugamycin. *J Virol*, 75, 2488-92.

Mall, M., M. Bleich, R. Greger, R. Schreiber & K. Kunzelmann (1998) The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways. *J Clin Invest*, 102, 15-21.

- Manunta, P., C. Barlassina & G. Bianchi (1998) Adducin in essential hypertension. *FEBS Lett*, 430, 41-4.
- Matsuoka, Y., X. Li & V. Bennett (2000) Adducin: structure, function and regulation. *Cell Mol Life Sci*, 57, 884-95.
- Monterisi, S., M. Favia, L. Guerra, R. A. Cardone, D. Marzulli, S. J. Reshkin, V. Casavola & M. Zaccolo (2012) CFTR regulation in human airway epithelial cells requires integrity of the actin cytoskeleton and compartmentalized cAMP and PKA activity. *J Cell Sci*.
- Morales, M. M., D. Falkenstein & A. G. Lopes (2000) The cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) in the kidney. *An.Acad.Bras.Cienc.*, 72, 399-406.
- Moscatelli, A., F. Ciampolini, S. Rodighiero, E. Onelli, M. Cresti, N. Santo & A. Idilli (2007) Distinct endocytic pathways identified in tobacco pollen tubes using charged nanogold. *J Cell Sci*, 120, 3804-19.
- Mullins, L. J., M. A. Bailey & J. J. Mullins (2006) Hypertension, kidney, and transgenics: a fresh perspective. *Physiol Rev*, 86, 709-46.
- Naydenov, N. G. & A. I. Ivanov (2010) Adducins regulate remodeling of apical junctions in human epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 21, 3506-17.
- Penmatsa, H., W. Zhang, S. Yarlagadda, C. Li, V. G. Conoley, J. Yue, S. W. Bahouth, R. K. Buddington, G. Zhang, D. J. Nelson, M. D. Sonecha, V. Manganiello, J. J. Wine & A. P. Naren (2010) Compartmentalized cyclic adenosine 3',5'-monophosphate at the plasma membrane clusters PDE3A and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator into microdomains. *Mol Biol Cell*, 21, 1097-110.

- Prince, L. S., R. B. Workman & R. B. Marchase (1994) Rapid endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 5192-6.
- Procino, G., F. Romano, L. Torielli, P. Ferrari, G. Bianchi, M. Svelto & G. Valenti (2011) Altered expression of renal aquaporins and α -adducin polymorphisms may contribute to the establishment of salt-sensitive hypertension. *Am J Hypertens*, 24, 822-8.
- Qualmann, B. & M. M. Kessels (2002) Endocytosis and the cytoskeleton. *Int Rev Cytol*, 220, 93-144.
- Reddy, M. M., M. J. Light & P. M. Quinton (1999) Activation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) requires CFTR Cl⁻ channel function. *Nature*, 402, 301-4.
- Rogan, M. P., D. A. Stoltz & D. B. Hornick (2011) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation-specific treatment. *Chest*, 139, 1480-90.
- Shimkets, R. A., D. G. Warnock, C. M. Bositis, C. Nelson-Williams, J. H. Hansson, M. Schambelan, J. R. Gill, S. Ulick, R. V. Milora & J. W. Findling (1994) Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell*, 79, 407-14.
- Staessen, J. A. & G. Bianchi (2005) Adducin and hypertension. *Pharmacogenomics*, 6, 665-9.
- Stanton, B. A. (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and renal function. *Wien.Klin.Wochenschr.*, 109, 457-464.

- Super, M. (2000) CFTR and disease: implications for drug development. *Lancet*, 355, 1840-1842.
- Super, M., A. Irtiza-Ali, S. A. Roberts, M. Schwarz, M. Young, A. Smith, T. Roberts, J. Hinks & A. Heagerty (2004) Blood pressure and the cystic fibrosis gene: evidence for lower pressure rises with age in female carriers. *Hypertension*, 44, 878-883.
- Swiatecka-Urban, A., M. Duhaime, B. Coutermarsh, K. H. Karlson, J. Collawn, M. Milewski, G. R. Cutting, W. B. Guggino, G. Langford & B. A. Stanton (2002) PDZ domain interaction controls the endocytic recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, 277, 40099-105.
- Torielli, L., S. Tivodar, R. C. Montella, R. Iacone, G. Padoani, P. Tarsini, O. Russo, D. Sarnataro, P. Strazzullo, P. Ferrari, G. Bianchi & C. Zurzolo (2008) alpha-Adducin mutations increase Na/K pump activity in renal cells by affecting constitutive endocytosis: implications for tubular Na reabsorption. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295, F478-87.
- Trepiccione, F., M. Zacchia & G. Capasso (2012) The role of the kidney in salt-sensitive hypertension. *Clin Exp Nephrol*, 16, 68-72.
- Tripodi, G., F. Valtorta, L. Torielli, E. Chierigatti, S. Salardi, L. Trusolino, A. Menegon, P. Ferrari, P. C. Marchisio & G. Bianchi (1996) Hypertension-associated point mutations in the adducin alpha and beta subunits affect actin cytoskeleton and ion transport. *J.Clin.Invest*, 97, 2815-2822.

Weixel, K. M. & N. A. Bradbury (2001) Mu 2 binding directs the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the clathrin-mediated endocytic pathway. *J Biol Chem*, 276, 46251-9.

Xie, Y. & J. A. Schafer (2004) Inhibition of ENaC by intracellular Cl⁻ in an MDCK clone with high ENaC expression. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287, F722-31.

Ringraziamenti

Ringrazio il professor Meyer e il professor Bottà per avermi accolta e per avermi dato la possibilità di lavorare nel loro laboratorio e con il loro gruppo.

Ringrazio Claudia perché devo soprattutto a lei quello che ho imparato in questi tre anni, grazie per la pazienza, la disponibilità, la fiducia e i consigli.

Ringrazio Lisa perché mi ha dato quest'opportunità e, grazie a lei, ho intrapreso quest'avventura.

Grazie ai compagni di viaggio. A Chiara per avermi presa per mano agli inizi e per avermi insegnato tanto; a Davide, Luca, Annamaria, Valeria per essere stati colleghi ma soprattutto amici, per le risate, le merende, la musica, avete reso questi anni indimenticabili!! Un grazie particolare ad Annamaria che ha creduto in me e mi ha dato una grandissima opportunità.

Grazie a tutti gli altri del 6B, in particolare a Marina e Simona, per la compagnia e i pranzi condivisi.

Ringrazio mamma e papà per esserci sempre, per il loro amore e per tutto quello che mi hanno dato e continuano a darmi.

Grazie a Niccolò perché è il fratello e l'amico migliore, grazie per tutto.

Grazie agli zii e ad Alice per l'affetto e l'attenzione sempre dimostratomi.

Grazie ad Alice, per essere cresciuta con me e per essere una vera amica.

Grazie a tutti gli amici, quelli storici e quelli nuovi, per i momenti trascorsi insieme e quelli che trascorreremo.