



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN :Scienze veterinarie
INDIRIZZO: Scienze Biomediche Veterinarie e Comparete
CICLO: XXI

TITOLO TESI

**Analisi funzionale di isoforme native e mutanti della pompa
Ca²⁺-ATPasi della membrana plasmatica**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Massimo Morgante

Supervisore :dott.ssa Marisa Brini

Dottorando : Teuta Domi

31 gennaio 2009

SUMMARY

The plasma membrane Ca^{2+} -ATPase represents a primary system for the extrusion of Ca^{2+} ions from all eukaryotic cells. The PMCA pumps are the product of a multigenic family: 4 genes encode 4 different isoforms (PMCA1-4) and this diversity is further increased by mechanism of alternative splicing of the primary transcripts generating more than 30 variants. The level expression of splice variants changes during development and cell differentiation. PMCA1 and 4 are expressed ubiquitously while PMCA2 and 3 are mostly expressed in the central nervous system although they are also found in the skeletal muscle. The functional meaning of the existence of such a high number of isoforms of PMCA pumps has to be explored. General opinion is that each isoform plays a specific role depending on the specific needs of the cell. Furthermore it has been speculated that the specific cell or tissue localisation of the different isoforms is related to isoform specific interactors: specific partners could regulate the specific distribution of the isoforms and their activity as well.

Previous work in our Laboratory has demonstrated that one of the ubiquitous isoform, PMCA4, in contrast to the tissue-specific isoform PMCA2 interacts with a particularly interesting partner, the 14-3-3 protein, which has an inhibitory effect on the activity of the pump.

In the first part of my PhD program, the study of molecular partners was extended to the remaining isoforms, the tissue-specific PMCA3 pump and the ubiquitous PMCA1 pump. The research was performed through an interaction assay with the yeast two hybrid method using as a "bait" the N-terminal portion of PMCA3 and PMCA1. We found that the other tissue-specific isoform, PMCA3, by contrast with PMCA2, interacts with the 14-3-3 protein, while PMCA1 did not. Our research was then focused on identifying the reason why PMCA2 is the only isoform among the PMCA pumps that does not interact with 14-3-3 protein. Bioinformatics analysis of the N-terminal region of the 4 isoforms of PMCA, used as a bait in the yeast two hybrid assay, has revealed that all isoforms contain a consensus sequence for the binding of 14-3-3 proteins, but also that in the flanking region of this site the sequence of the PMCA2 pump contains two particular aminoacids that disturb the formation of the secondary structure necessary for the interaction. The hypothesis proposed by the bioinformatic analysis was confirmed experimentally. We constructed 2 baits for the yeast two hybrid assay by splitting in two equal portions the original bait of the N-terminal 90 aminoacids of the PMCA4 pumps that interacts with 14-3-3. One of the two probes contained the consensus site for the interaction, but not the sites flanking the consensus site which are responsible for the formation of the secondary structure of α -helix that, on the basis of the bioinformatics

analysis, has been proposed necessary for the interaction.. The other bait did not contain the consensus site for the interaction but contained the flanking region. The ability of the two baits to interact with the 14-3-3 protein was tested in a two hybrid system and none of them gave positive results. A third bait, including the consensus site and the flanking region but shorter than the original 90 aa bait, was also tested and it gave positive results confirming that both the portions included are necessary for the interaction and that the fact that the two short baits fail to interact is not dependent by their reduced length.

The next studies during my PhD program were concentrated to functionally characterize the PMCA2 pumps activity. This isoform is particularly interesting for different reasons: it has peculiar properties that distinguish it from other isoforms. It is also the only pump for which single point-mutations have been reported to generate a pathological phenotype: mice harbouring spontaneous mutations of the gene that encodes for PMCA2 display a phenotype associated to hearing loss and defects in coordination and balance.

The data obtained on the functional characterization of different splice variants of PMCA2 pump are presented in the second part of my thesis. The pumps were overexpressed in the natural environment of model cells and their ability to counteract the transient increase of Ca^{2+} concentration induced by a physiological stimulus was measured. The activity of some PMCA2 mutants identified in mice and humans has been also characterized.

Mammalian expression plasmids for splice variants *w/a*, *w/b*, *z/a* e *z/b* of PMCA2 of PMCA2 pump were co-transfected with a plasmid for the expression of a Ca^{2+} sensitive probe, the recombinant photoprotein aequorin (cytAEQ), in a stable cell line of hamster ovary (CHO). CHO cells were stimulated with ATP, a inositol, 1,4,5 triphosphate (InsP3)-linked agonist that acts on P2Y purinergic receptors coupled to G proteins and generates the production of the second messenger InsP3 (which opens the Ca^{2+} channels localized in the membranes of the Ca^{2+} intracellular stores), and a consequent transient increase of the cytosolic Ca^{2+} concentration. It was observed that isoforms *z/b*, *z/a* e *w/b* were particularly effective in reducing the height of the peak of the Ca^{2+} transient (they reduce it by 50%), reflecting the capacity of these splicing variants to respond with a rapid activation to the sudden increase of cytosolic Ca^{2+} concentration. By contrast, the doubly spliced variant *w/a* has a reduced ability to control the peak of Ca^{2+} : it only reduces it by 30% compared to control cells. The PMCA2*w/a* is less able to respond efficiently to a sudden increase of cytosolic Ca^{2+} concentration: this characteristic could justify its exclusive presence in the stereocilia of the hair cells of the inner ear. Indeed, the concentration of extracellular Ca^{2+} in the endolymph, the liquid that bathes the stereocilia, is significantly lower than those of the other extracellular fluids being in the order of 10-20 μ M instead of mM.

The characterization of the mutated pumps responsible for the phenotype of deafness in mice (3 mutants) and humans (1 mutant) has shown that the mutations do not affect the ability of the pump to counteract the height of the Ca^{2+} peak generated by cell stimulation, but rather reduce the activity of the pump in restoring Ca^{2+} basal levels: the mutations affect the declining phase of the Ca^{2+} transient. Thus, the basal levels of Ca^{2+} concentrations are restored more slowly, and, as a consequence, the cells that have the mutated PMCA2 pump are exposed to high cytosolic Ca^{2+} concentration longer than control cells. The data show that the PMCA2 mutations do not affect the capacity of the pump to respond to a sudden arrival of Ca^{2+} , but rather affect the basal activity of the pump. These alterations of the Ca^{2+} homeostasis have probably deleterious consequences on the phenomenon of adaptation of the sensory cells of the inner ear, that become “poorly ready” to receive repetitive sound stimuli and thus generate deafness.

RIASSUNTO

Le pompe PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPases) rappresentano un sistema di importanza primaria per l'estrusione del Ca^{2+} dal citoplasma delle cellule eucarioti.

Le pompe PMCA fanno parte di una famiglia multigenica: 4 geni codificano 4 diverse isoforme (PMCA1-4) e la diversità delle isoforme è aumentata da meccanismi di splicing alternativo dei trascritti primari che generano più di 30 isoforme diverse. L'espressione delle diverse isoforme, oltre ad essere tessuto specifica, è regolata durante lo sviluppo ed il differenziamento cellulare. Le isoforme PMCA1 e 4 hanno una distribuzione ubiquitaria, mentre le isoforme PMCA2 e 3 sono prevalentemente neuronali.

Il significato funzionale di un numero così elevato di isoforme è tuttora oggetto di studio nel campo delle pompe PMCA. Opinione generale è che ognuna delle isoforme svolga un ruolo specifico a seconda delle esigenze specifiche della cellula. Si ipotizza inoltre che la localizzazione e l'attività tessuto-specifica delle diverse isoforme possa essere influenzata da interazioni isoforma-specifiche con partner proteici diversi. I risultati ottenuti nel nostro Laboratorio hanno dimostrato che una delle isoforme ubiquitarie, la pompa PMCA4, a differenza dell'isoforma tessuto-specifica PMCA2, interagisce con un partner particolarmente interessante, la proteina 14-3-3, e che questa interazione ha un effetto inibitorio sull'attività della pompa. Nella prima parte del mio Dottorato di ricerca, l'indagine della ricerca di interattori molecolari è stata estesa alle rimanenti isoforme, quella tessuto-specifica PMCA3 e quella ubiquitaria PMCA1. La ricerca è stata condotta mediante un saggio di interazione di doppio ibrido in lievito usando come "esca" la porzione N-terminale delle pompe PMCA3 e PMCA1. È stato riscontrato che l'altra isoforma tessuto-specifica, la pompa PMCA3, a differenza della pompa PMCA2 interagisce con la proteina 14-3-3. La pompa PMCA1 invece non interagisce. La nostra ricerca si è quindi focalizzata nell'individuare il motivo per cui la PMCA2 è l'unica isoforma tra le PMCA a non interagire con la proteina 14-3-3. Un'analisi bioinformatica della regione N-terminale delle 4 isoforme delle PMCA usata come esca nel saggio del doppio ibrido in lievito ha rivelato che in tutte e 4 le isoforme si trova una sequenza consenso per il legame delle proteine 14-3-3, ma anche che la pompa PMCA2 possiede dei residui amminoacidi nelle regioni fiancheggianti il sito di consenso che disturbano la corretta struttura secondaria necessaria alla interazione. L'ipotesi proposta dall'analisi bioinformatica è stata confermata sperimentalmente. Sono state infatti costruite 2 esche per il saggio di interazione del doppio ibrido dividendo in 2 la sonda originale di 90aa nella parte N-terminale della PMCA4 che interagiva con 14-3-3. Una delle due sonde conteneva il sito consenso di interazione, ma non i siti di fiancheggianti

responsabili della formazione della struttura secondaria ad α -elica,, l'altra non conteneva il sito di interazione. Queste sonde sono state testate per loro capacità di interagire con la proteina 14-3-3 nel sistema del doppio ibrido in lievito e nessuna delle due ha dato risultati positivi. Una terza sonda, più corta della esca originale di 90 aa ma che conteneva sia il sito di consenso che le regioni fiancheggianti ha dato invece risultati positivi, confermando così che sia il sito di consenso che le regioni fiancheggianti sono necessarie all'interazione e che la non interazione non dipende dalla lunghezza ridotta delle sonde.

Gli studi successivi nel corso del mio dottorato di ricerca si sono quindi concentrati a caratterizzare funzionalmente la pompa PMCA2. Questa isoforma è particolarmente interessante in quanto possiede alcune proprietà che la distinguono dalle altre isoforme. E' inoltre l'unica isoforma per la quale sono state descritte mutazioni puntiformi del gene responsabili di un fenotipo patologico: topi che presentano mutazioni spontanee del gene della PMCA2 presentano un fenotipo associato a sordità e a difetti di equilibrio e coordinazione. Nella seconda parte della tesi sono presentati i dati ottenuti dalla caratterizzazione funzionale delle diverse varianti di splicing della pompa PMCA2. Le pompe sono state sovraesprese in un sistema cellulare omogeneo ed è stata misurata la loro capacità di contrastare l'aumento transiente della concentrazione di Ca^{2+} citosolico indotto da uno stimolo fisiologico. Successivamente è anche stata caratterizzata l'attività di alcune forme mutanti della PMCA2 individuate nel topo e nell'uomo.

I plasmidi di espressione per le varianti di splicing della PMCA2 *w/a*, *w/b*, *z/a* e *z/b* sono stati co-transfettati con un plasmide per l'espressione di una sonda per il Ca^{2+} , la fotoproteina ricombinante Ca^{2+} -sensible equorina (cytAEQ), in una linea stabile di cellule di ovario di criceto (CHO). Le cellule CHO sono state stimolate con ATP, un agonista fisiologico che agisce sui recettori purinergici P2Y accoppiati a proteine G e genera, in seguito alla produzione del secondo messaggero inositolo 1,4,5 trifosfato (che apre i canali per il Ca^{2+} dei depositi intracellulari) un aumento transiente della concentrazione di Ca^{2+} citosolico. E' stato osservato che le isoforme *z/b*, *z/a* e *w/b* sono particolarmente efficaci nel ridurre l'altezza del picco del transiente di Ca^{2+} (lo riducono infatti del 50%), caratteristica che riflette la capacità della pompa di rispondere con una rapida attivazione all'aumento improvviso della concentrazione di Ca^{2+} . La variante *w/a* invece sembra avere una minore capacità di controllare il picco di Ca^{2+} , lo riduce infatti solo del 30% rispetto alle cellule di controllo. La PMCA2*w/a* quindi risponde meno efficientemente ad un aumento improvviso della concentrazione di Ca^{2+} citoplasmatica. Questa caratteristica potrebbe giustificare l'esclusiva presenza della variante *w/a* della PMCA2 nelle stereocilia delle cellule sensoriali dell'orecchio interno. Infatti la concentrazione di Ca^{2+} extracellulare nell'endolinfa, il liquido che bagna le stereocilia, è notevolmente più bassa di

quella degli altri ambienti extracellulari essendo dell'ordine di 10-20 μM anziché mM.

La caratterizzazione delle pompe mutate responsabili di fenotipo di sordità nel topo (3 mutanti) e nell'uomo (un mutante) ha dimostrato che le mutazioni non modificano le capacità della pompa di contrastare l'altezza del picco del transiente di Ca^{2+} generato dalla stimolazione cellulare, ma riducono invece la sua velocità nel ripristinare i livelli basali: colpiscono cioè la fase discendente del transiente di Ca^{2+} . I livelli basali di Ca^{2+} vengono quindi ripristinati più lentamente e ciò determina che nelle cellule che presentano le PMCA2 mutate la concentrazione di Ca^{2+} citosolica resta elevata per tempi più lunghi rispetto alla situazione che si verifica nelle cellule di controllo. I dati dimostrano quindi che le mutazioni della PMCA2 non influiscono sulla capacità della pompa a rispondere ad un arrivo repentino di Ca^{2+} , ma invece alterano l'attività basale della pompa. Queste alterazioni dell'omeostasi del Ca^{2+} a livello delle cellule sensoriali dell'orecchio interno si ripercuotono probabilmente sul fenomeno dell'adattamento rendendo le cellule "meno pronte" a ricevere stimoli sonori successivi portando così ad un fenotipo di sordità.

INDICE

ABBREVIAZIONI.....	15
INTRODUZIONE.....	17
1. Sistemi che controllano l'omeostasi del Ca²⁺ nella cellula.....	18
1.1. I sistemi di trasporto del Ca ²⁺ della membrana plasmatica.....	19
1.2. Il trasporto di Ca ²⁺ attraverso il reticolo endoplasmatico.....	21
1.3. I mitocondri.....	25
1.4. Proteine EF-hand.....	26
2. La pompa Ca²⁺ ATPasi della membrana plasmatica.....	27
2.1. Struttura della PMCA e le sue caratteristiche funzionali.....	27
2.2. La regolazione dell'attività della PMCA.....	30
2.2.1. Azione della Calmodulina.....	30
2.2.2. Azione dei fosfolipidi acidi e degli acidi grassi insaturi a lunga catena.....	31
2.2.3. Il ruolo dei meccanismi di fosforilazione sulla PMCA.....	32
2.2.4. Il ruolo delle proteasi sulla attività della PMCA.....	32
2.2.5. Il ruolo dell'oligomerizzazione sulla attività della PMCA.....	33
2.3. Le isoforme della PMCA e la loro distribuzione.....	33
2.3.1. Le diverse isoforme della PMCA e la loro distribuzione.....	33
2.3.2. Le varianti di splicing delle pompe PMCA.....	34
2.4. Le proteine partner della PMCA.....	36
2.5. PMCA e malattie.....	38
2.5.1. PMCA e topi knockout.....	38
2.5.2. Forme di sordità ereditaria legate a mutazioni della isoforma 2 della PMCA.....	39

MATERIALI E METODI.....	41
1. Colture cellulari.....	41
1.1. Modelli cellulari e mantenimento in coltura.....	41
1.2. Trasfezione.....	41
2. BIOCHIMICA.....	42
2.1. Estrazione delle proteine di membrana per Western Blot.....	42
2.2. Estrazione delle proteine totali per il saggio di Co-immunoprecipitazione.....	42
2.3. SDS-PAGE.....	43
2.4. Western Blot.....	43
2.5. Immunofluorescenza.....	44
2.6. Co-Immunoprecipitazione.....	46
2.7. GST pull-down.....	46
2.7.1. L'espressione delle proteine di fusione con GST.....	46
2.7.2. Il saggio di GST pull-down.....	47
3. BIOLOGIA MOLECOLARE.....	47
3.1. Isolamento del DNA plasmidico da batteri. Mini-prep.....	47
3.2. Isolamento su vasta scala del DNA plasmidico dai batteri (Maxi-prep).....	48
3.3. PCR (Polimerase Chain Reaction).....	48
3.4. Digestione del DNA plasmidico e gel elettroforesi.....	49
3.5. Purificazione dei frammenti di DNA.....	49
3.6. Ligazione del DNA.....	49
3.7. Trasformazione del DNA in cellule batteriche competenti <i>E. Coli</i>	49
3.8. Plasmidi usati nei diversi clonaggio.....	51
3.9. Sequenziamento.....	51
4. MISURA DELLA [Ca²⁺] IN CELLULE VIVE.....	52
4.1. Ricostituzione dell'equorina in cellule vive.....	54

4.2. Misura della luminescenza dell'equorina.....	54
5. IL SISTEMA DEL DOPPIO IBRIDO.....	55
5.1. I ceppi di lieviti.....	56
5.2. Plasmidi.....	56
5.3. La libreria di cDNA.....	57
5.4. Materiali e reagenti.....	57
5.5. La costruzione delle esche nel vettore pGILDA.....	57
5.6. La trasformazione dei lieviti.....	58
5.6.1. preparazione dei lieviti competenti.....	58
5.6.2. Trasformazione delle cellule di lieviti competenti.....	59
5.7. Preparazione di estratti proteici da lieviti.....	59
5.8. Lo screening della libreria a cDNA.....	59
5.9. Estrazione di DNA da lieviti.....	60
6. ANALISI BIOINFORMATICA.....	60
 RISULTATI.....	 61
 I. RICERCA DI INTERATTORI MOLECOLARI DELLA PMCA ISOFORMA SPECIFICI.....	 61
1. CARATTERIZZAZIONE DELLE ESCHE.....	61
1.1. Controllo della idoneità delle sonde.....	61
1.1.1. Controllo dell'espressione proteica delle esche.....	62
1.1.2. Test di auto attivazione.....	62
1.1.3. Clonaggio e caratterizzazione delle esche P1.1 e P1.2.....	63
2. TRASFORMAZIONE DELLA LIBRERIA E SCREENING PER LA RICERCA DI INTERATTORI SPECIFICI DELLA POMPA PMCA3.....	64
3. INTERAZIONE DIRETTA DELLE ESCHE CON 14-3-3ε.....	65

3.1. Interazione tra PMCA1 e 14-3-3 ϵ	65
3.2. Interazione tra PMCA3 e 14-3-3 ϵ	65
4. CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE DI PMCA3 E PMCA1 CON LA PROTEINA 14-3-3ϵ.....	66
5. ANALISI DI CO-IMMUNOLOCALIZZAZIONE TRA PMCA E 14-3-3ϵ.....	67
6. INTERAZIONI <i>IN VITRO</i> TRAMITE LE PROTEINE 14-3-3 CON PMCA1 E PMCA3.....	68
6.1. Produzione di proteine di fusione GST-P1 e GST-P3.....	68
6.2. Saggio di GST pull-down per la ricerca di interazione tra proteina 14-3-3 ϵ e le pompe PMCA1 e PMCA3.....	69
6.3. Saggio di GST pull-down per la ricerca di interazione tra le altre isoforme della proteina 14-3-3 e le pompe PMCA1 e PMCA3.....	70
7. ANALISI BIOINFORMATICA DELLA REGIONE N-TERMINALE DI 90 AMMINOACIDI DELLE DIVERSE ISOFORME DELLA POMPA PMCA...71	71
7.1. Identificazione di un sito consenso per il legame della proteina 14-3-3.....	72
7.2. Interazione tra pGILDA-P4.36-83 e la proteina 14-3-3 ϵ	73
8. EFFETTO DELLA SOVRAESPRESSIONE DELLA PROTEINA 14-3-3ϵ SULL'ATTIVITA' DELLA POMPA PMCA3 IN CELLULE CHO.....	74
9. GLI EFFETTI DELLA SOVRAESPRESSIONE DELLA PROTEINA 14-3-3ϵ SULLA POMPA PMCA1 IN CELLULE CHO.....	75
10. INFLUENZA DELLA SOVRAESPRESSIONE DI 14-3-3ϵ SUI LIVELLI DI ESPRESSIONE DI PMCA1 E PMCA3 IN CELLULE CHO.....	76
II. ANALISI FUNZIONALE COMPARATIVA DELLE VARIANTI DI SPLICING DELLA ISOFORMA 2 DELLA POMPA PMCA E DI ALCUNE SUE FORME MUTANTI.....	78
1. ANALISI COMPARATIVA DI ALCUNE VARIANTI DI SPLICING DELLA POMPA PMCA2.....	78
1.1. Analisi dei livelli proteici delle varianti di splicing della PMCA2 sovraesprese in cellule CHO.....	79

1.2. Misura della concentrazione del Ca^{2+} nel citoplasma di cellule CHO che sovraesprimono le varianti di splicing della PMCA2.....	81
1.3. Il contributo delle diverse componenti che influiscono i transienti di Ca^{2+} nel citosol delle cellule CHO.....	83
2. ANALISI FUNZIONALE COMPARATIVA IN CELLULE CHO DELL'ATTIVITA' DEI MUTANTI PMCA2w/a (G283S) e PMCA2w/a (G293S) E LA VARIANTE PMCA2w/a NATIVA.....	85
2.1. Analisi di conservazione tramite ClustalW degli amminoacidi mutati nella PMCA2.....	86
2.2. Analisi quantitativa della sovraespressione delle pompe mutate in cellule CHO.....	88
2.3. Analisi immunocitochimica delle cellule CHO che esprimono le pompe PMCA2 mutate.....	89
2.4. Analisi funzionale comparativa del controllo della $[\text{Ca}^{2+}]_c$ da parte delle pompe mutate della PMCA2 e della variante WT in cellule CHO.....	90
3. ANALISI FUNZIONALE COMPARATIVA IN CELLULE CHO DELL' ATTIVITA' DEI MUTANTI PMCA2w/a(E584K) e PMCA2w/a(S877F) E DELLA VARIANTE PMCA2w/a NATIVA	92
3.1. Analisi di conservazione tramite ClustalW degli aminoacidi E584 e S877 mutati nella PMCA2.....	93
3.2. Analisi immunocitochimica delle pompe mutate PMCA2w/aE584K e PMCA2w/aS877F in cellule CHO.....	95
3.3. Analisi funzionale delle pompe mutate PMCA2w/aE584K e PMCA2w/aS877F sovraesprese in cellule CHO.....	96
DISCUSSIONE.....	99
REFERENZE.....	103

ABBREVIAZIONI

AA	Amminoacidi
ATP	Adenosine triphosphate
cDNA	DNA complementare
cytAEQ	Equorina indirizzata verso il citoplasma
bp	Paia di basi
BSA	Albumina di siero bovino
Ca ²⁺	Calcio
[Ca ²⁺] _c	Concentrazione di calcio
CaM	Calmodulina
cDNA	DNA complementare
DAG	Diacilglicerolo
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	Ditiotreitolo
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDTA	Acido etilendiaminotetraacetico
EGTA	Acido etilen glicol-bis(b-amminoetiletere)-N,N,N',N'-tetraacetico
ER	Reticolo endoplasmatico
FBS	Siero di bovino fetale
His (H)	Istidina
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-piperazineethanesulfonicacid</i>
Gal	Galattosio
GST	Glutathione S-transferasi
IP ₃	Inositol 3-Phosphate
IP ₃ R	IP ₃ Receptor
kb	Kilobasi
kDa	kiloDalton
KRB	Krebs-Ringer buffer
LB	Terreno Luria-Bertani
O.D.	Densità ottica
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ Exchanger
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMCA	Plasma Membrane Calcium Pump
PMSF	Phenylmethylsulphonyl fluoride
RyR	Ryanodine Receptor
ROCs	Receptor Operated Calcium Channel
Raf	Raffinosio
SERCA	Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPasi

SDS	Sodio Dodecil Solfato
SDS-PAGE	Elettroforesi in gel di poliacrilammide
SERCA	Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPasi
SOCs	Store Operated Calcium Channel
SR	Reticolo sarcoplasmatico
TAE	Tris-Acetato-EDTA
tBuBHQ	2,5-di-(tert-butyl)-1,4 benzohydroquinone
TE	Tris-EDTA
T _m	Temperatura di melting
Trp (T)	Triptofano
TWEEN	20 Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate
Tris	Tri[idrossimetil]aminometano
VOCs	Voltage Operated Calcium Channel
Ura (U)	Uracile
wt	Wild Type
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

INTRODUZIONE

Negli organismi pluricellulari, le cellule scambiano costantemente segnali e informazioni tra di loro. Infatti, mentre negli organismi monocellulari le cellule sono in contatto con l'ambiente circostante ed hanno accesso diretto ai nutrienti, negli organismi pluricellulari le cellule si sono specializzate a svolgere funzioni specifiche e quindi devono cooperare per permettere il corretto sviluppo e mantenimento dell'organismo. Le cellule possono scambiare informazioni secondo 2 modalità diverse: 1) per comunicazione diretta mediante strutture che connettono cellule adiacenti, 2) mediante segnali chimici che vengono scambiati anche tra cellule molto distanti e che sono chiamati "primi messaggeri". Queste molecole interagiscono con recettori localizzati sulla membrana plasmatica, i quali, a loro volta, generano all'interno della cellula altre molecole diffusibili chiamate "secondi messaggeri". A fronte di una varietà di mediatori extracellulari, i secondi messaggeri sono in numero molto limitato e fino ad oggi se ne conoscono circa una decina, tra le quali per esempio: i nucleotidi ciclici (cAMP, cGMP), l'inositolo 1,4,5-trifosfato (IP₃), il diacilglicerolo (DAG), lo ione calcio (Ca²⁺), etc. Lo ione Ca²⁺ svolge un ruolo di particolare importanza (Berridge, 1993) in quanto regola processi biologici fondamentali e diversi tra loro, che vanno dall'inizio della vita con la fecondazione dell'uovo, alla contrazione muscolare, alla secrezione, alla espressione genica, alla fosforilazione e defosforilazione di diverse proteine, a meccanismi complessi come memoria ed apprendimento fino alla morte cellulare (Fig1.1). Le proprietà chimiche del Ca²⁺ (dimensioni e carica) lo rendono un ligando ideale per strutture geometriche molto irregolari come quelle che si trovano nelle proteine (Carafoli and Penniston 1985).

La concentrazione del Ca²⁺ nel citoplasma delle cellule in condizioni di riposo è dell'ordine di 10⁻⁷ M, mentre la sua concentrazione nell'ambiente extracellulare supera valori di 1mM. Il mantenimento di questo gradiente di concentrazione ha un costo energetico per la cellula che, per questo, ha sviluppato ed evoluto una serie di proteine deputate al controllo della omeostasi del Ca²⁺ nel citoplasma, e negli organelli cellulari. Questo corredo proteico è rappresentato dai canali permeabili al Ca²⁺ della membrana plasmatica e del reticolo endo/sarcoplasmatico, dagli scambiatori, dalle pompe Ca²⁺-ATPasi e da una serie di proteine solubili che legano Ca²⁺ tra le quali la calmodulina è forse la più importante. L'omeostasi del Ca²⁺ nella cellula è quindi garantita dalla azione coordinata di proteine che trasportano o legano il Ca²⁺ alle quali si accompagnano altre proteine in grado di decodificarne l'informazione (sensori di Ca²⁺).

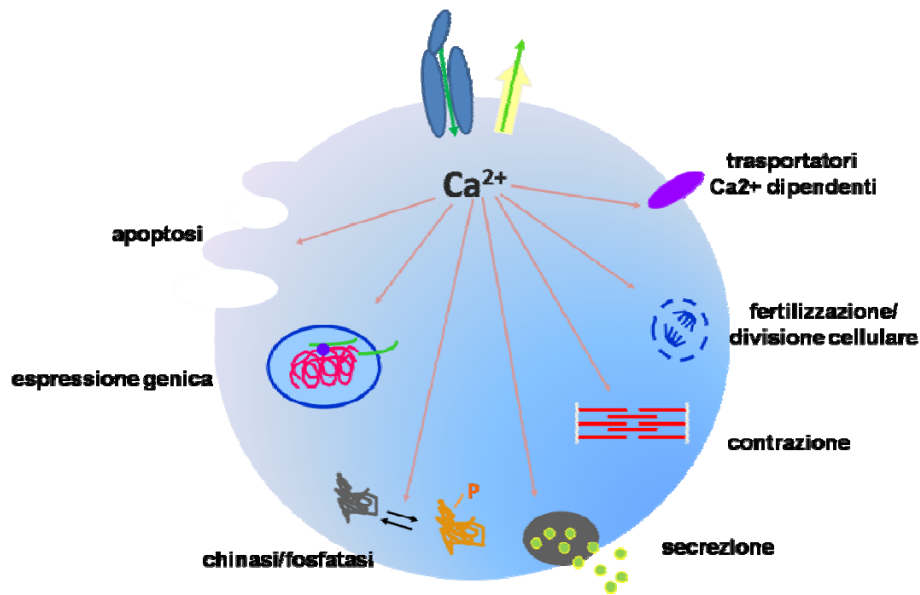


Fig. 1.1 Rappresentazione schematica delle funzioni regolate dal Ca^{2+} nella cellula eucariota.

1. SISTEMI CHE CONTROLLANO L'OMEOSTASI DEL Ca^{2+} NELLA CELLULA

In condizioni di riposo la concentrazione del Ca^{2+} nel citoplasma ha un valore che è 10000 volte più basso rispetto a quello dell'ambiente extracellulare. In seguito a stimoli di natura elettrica, meccanica o chimica il Ca^{2+} intracellulare aumenta grazie all'apertura di canali che si trovano sia a livello della membrana plasmatica che a livello della membrana del reticolo endo/sarcoplasmatico, il principale deposito intracellulare di Ca^{2+} . In condizioni di riposo i canali ionici che permettono il flusso del Ca^{2+} nel citosol sono prevalentemente nella conformazione "chiusa". La loro apertura viene regolata da cambiamenti di potenziale di membrana plasmatica (depolarizzazione), dall'interazione con ligandi specifici o dallo svuotamento dei depositi intracellulari di Ca^{2+} .

L'aumento della concentrazione del Ca^{2+} nel citoplasma deve essere transiente, perché un aumento prolungato della concentrazione di Ca^{2+} può avere effetti tossici e portare anche alla morte cellulare. Per questo la cellula ha sviluppato dei sistemi in grado di ripristinare le concentrazioni basali di Ca^{2+} trasportandolo nell'ambiente extracellulare o accumulandolo nei depositi intracellulari. A livello della membrana plasmatica ci sono 2 tipi di proteine che svolgono questa funzione: la pompa Ca^{2+} ATPasi (PMCA) e lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). A livello dei depositi intracellulari (il reticolo endosarcoplasmatico, ER/SR, e l'apparato di Golgi) questo ruolo è svolto dalle pompe Ca^{2+} -ATPasi (SERCA o/e

SPCA , rispettivamente. Anche gli altri organelli cellulari (mitocondri e nucleo) partecipano al controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} . In particolare i mitocondri accumulano Ca^{2+} attraverso un trasportatore che sfrutta il gradiente elettrochimico generato dalla catena respiratoria, l'uniporto, la cui identità molecolare non è ancora nota e lo estrudono grazie alla attività di due scambiatori ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, mNCX o mHCX) La Fig. 1.2 rappresenta in maniera grafica i diversi sistemi di trasporto del Ca^{2+} localizzati nei diversi compartimenti della cellula eucariote.

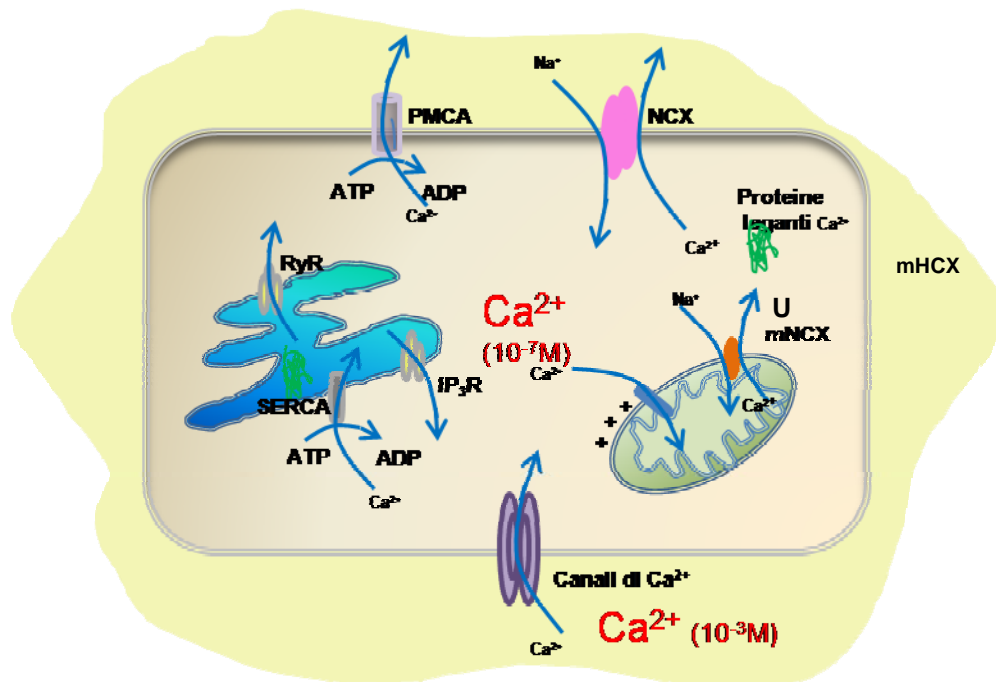


Fig 1.2 Rappresentazione schematica delle proteine di trasporto del Ca^{2+} nei diversi compartimenti della cellula eucariota. PMCA: pompa Ca^{2+} -ATP-asi della membrana plasmatica; NCX: scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ della membrana plasmatica; SERCA: pompa Ca^{2+} -ATP-asi del reticolo sarco/endoplasmatico; mNCX, mHCX scambiatori $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondriali; U, uniporto; IP_3R : recettore dell'inositolo 1,4,5-trisfosfato; RyR: recettore rianodinico.

1.1 I sistemi di trasporto del Ca^{2+} della membrana plasmatica

I canali della membrana plasmatica mediano l'ingresso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare secondo gradiente elettrochimico. Questi canali si dividono in 3 gruppi principali a seconda del meccanismo di regolazione che ne controlla la transizione dallo stato "chiuso" allo stato "aperto": 1) canali a controllo di ligando (ROCCs), 2) canali a controllo di potenziale (VOCCs), 3) canali attivati dallo svuotamento dei depositi intracellulari del Ca^{2+} (SOCCs).

I canali a controllo di ligando ROCCs (“Receptor Operated Ca²⁺ Channel”). Questi canali richiedono per la loro attivazione un segnale extracellulare di natura chimica (agonista) che interagisce in modo diretto o indiretto con il canale provocando così la sua apertura. Fanno parte di questo gruppo i recettori ionotropici (in cui il recettore per l'agonista è parte integrante del canale stesso), i canali accoppiati al recettore via secondo messaggero solubile, e i recettori metabotropici (accoppiati al recettore via proteine G).

I canali a controllo di potenziale VOCCs (“Voltage Operated Ca²⁺ Channel”). Questi canali mediano l'influsso del Ca²⁺ in seguito a depolarizzazione della membrana plasmatica e hanno un'alta selettività per il Ca²⁺ (Hess *et al.*, 1986). Essi sono tipici delle cellule eccitabili, quali le cellule muscolari e nervose, ma sono presenti anche in cellule non eccitabili, es i fibroblasti. Studi di tipo elettrofisiologico e farmacologico hanno permesso l'identificazione di 6 classi diverse di canali VOCCs: tipo L (rispondenti alla diidropiridina), tipo N (presenti soprattutto nelle cellule neuronali), tipo T (abbondanti nelle terminazioni dendritiche), e tipo P, R, Q (individuati nelle cellule del Purkinje). Questi canali si differenziano per la loro distribuzione tissutale e la loro diversa sensibilità ad inibitori specifici. Dal punto di vista strutturale i VOCCs sono formati da 4-5 subunità $\alpha 1$, $\alpha 2$, γ , β , δ codificate da 5 geni diversi le quali formano grandi complessi molecolari (~ 500kDa).

I SOCCs (“Store Operated Ca²⁺ Channel”) sono canali attivati dallo svuotamento dei depositi intracellulari del Ca²⁺ (es. del RE) e mediano l'ingresso di Ca²⁺ dall'ambiente extracellulare secondo un processo noto come influsso capacitivo del Ca²⁺ o CCE (Capacitative Calcium Entry). L'ingresso di Ca²⁺ tramite questi canali è importante per la regolazione temporanea di diversi processi come l'esocitosi, attività enzimatica, la trascrizione genica e la proliferazione (Parekh, 2003) e per il ripristino della concentrazione di Ca²⁺ dei depositi intracellulari.

Se le correnti di Ca²⁺ dai canali ionici SOCC sono stati ben caratterizzati dal punto di vista biofisico e farmacologico, l'identità molecolare di questi canali è rimasto un mistero per quasi due decenni. Studi molto recenti hanno messo luce sul meccanismo di attivazione dei SOCCs e su come lo svuotamento dell'ER da Ca²⁺ viene trasdotto a questi canali. STIM1, una proteina EF-hand localizzata sia a livello della membrana plasmatica che a livello della membrana del ER funziona come sensore dei livelli di Ca²⁺ del lume del ER (Liou *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). La riduzione della [Ca²⁺] dell'ER provoca la formazione di un “pattern a puncta” di STIM1 nell'ER in zone che si trovano vicino alla membrana plasmatica. Quindi STIM1 interagisce con ORAI1, un canale ionico altamente selettivo per il Ca²⁺, che viene in questo modo attivato permettendo l'influsso di ioni Ca²⁺ dall'ambiente extracellulare (Yeromin *et al.*, 2006).

L'estrusione del Ca^{2+} dal citoplasma è invece controllata da due tipi di trasportatori della membrana plasmatica: lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, tipico delle cellule eccitabili e la pompa Ca^{2+} -ATPasi (PMCA) presente in tutti i tipi cellulari. L'NCX è un sistema di trasporto a bassa affinità, e alta capacità per il Ca^{2+} e per questo è particolarmente adatto a contrastare i transienti di Ca^{2+} che si generano nelle cellule eccitabili. L'NCX espelle Ca^{2+} dal citosol contro gradiente di concentrazione scambiando 3 ioni di Na^+ con uno di Ca^{2+} . Lo scambiatore può funzionare anche nella direzione opposta a seconda del potenziale di membrana o del gradiente elettrochimico di Na^+ e di Ca^{2+} .

Nei mammiferi ci sono 3 geni che codificano 3 diverse isoforme: NCX1, NCX2 e NCX3 (Philipson *et al.*, 1998., Li *et al.*, 1994., Nicoll *et al.*, 1996). Meccanismi di splicing alternativo dei trascritti primari generano almeno 16 isoforme di NCX1 e 3 di NCX3. Invece per NCX2 non sono stati ancora individuate isoforme di splicing (Kofuji *et al.*, 1994). NCX1 ha una espressione elevata nel cuore e nel muscolo scheletrico, ma è presente anche in altri tessuti; NCX2 e NCX3 sono espressi essenzialmente nel cervello e nel muscolo scheletrico.

Diversi fattori sono coinvolti nella regolazione dell'attività di NCX: i due ioni da esso trasportati, Na^+ e Ca^{2+} ; il pH intracellulare; ATP; PIP_2 ; PKA e PKC; agenti redox; radicali idrossilici; H_2O_2 ; O^{2-} ; Fe^{3+} ; Fe^{2+} etc (Annunziato *et al.*, 2004).

La pompa PMCA è stata scoperta nel 1966 nella membrana negli eritrociti da Schatzman (Schatzman 1966) ed è stata poi trovata nella membrana plasmatica di tutti i tipi cellulari. La pompa PMCA appartiene alla famiglia delle pompe di tipo P che sono caratterizzate dalla formazione di un intermedio aspartil-fosfato come parte del loro ciclo di reazione.

Negli eucarioti, 4 geni codificano per 4 diverse isoforme e meccanismi di splicing alternativo generano più di 30 isoforme diverse. La ragione per un numero così alto di isoforme è ancora oggetto di studio, ma è probabilmente correlata alle diverse esigenze della cellula nel tempo e nello spazio.

Mentre lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ si trova nei tessuti eccitabili, la pompa PMCA si trova in tutti i tipi cellulari e regola la concentrazione del Ca^{2+} nel citosol molto finemente avendo una K_d di 0.4-0.5 μM e quindi funziona in maniera efficiente anche a concentrazione di Ca^{2+} basali (0.1-0.2 μM). Le PMCA e alcune sue varianti di splicing sono l'oggetto di studio di questa tesi di dottorato. Per questo l'introduzione verrà in gran parte dedicata alla descrizione della struttura, dei meccanismi di regolazione e delle caratteristiche delle diverse isoforme della PMCA.

1.2 Il trasporto di Ca^{2+} attraverso il reticolo endoplasmatico

Il reticolo endoplasmatico (ER) ed il suo equivalente nella cellula muscolare il reticolo sarcoplasmatico nel muscolo (SR) sono i depositi intracellulari di Ca^{2+}

per eccellenza. L'utilizzo della sonda ricombinante equorina, una fotoproteina Ca^{2+} sensibile indirizzata selettivamente al lume del ER ha permesso la misurazione diretta della concentrazione del Ca^{2+} in questo compartimento cellulare. I valori misurati sono valori dell'ordine di mM (Montero *et al.*, 1995).

ER contiene un'estesa superficie fatta di tubuli e cisterne ed è costituito da diversi compartimenti nei quali vengono svolte diverse funzioni: il reticolo rugoso, sulla cui membrana si trovano i ribosomi coinvolti nella sintesi proteica; il reticolo liscio, privo di ribosomi, e che rappresenta la sede di sintesi dei lipidi ed il principale deposito di Ca^{2+} . Numerose proteine sono responsabili dell'accumulo e del rilascio di Ca^{2+} da questo compartimento. La pompa SERCA (sarco/endoplasmatic reticulum Ca²⁺-transport ATPases) è coinvolta nell'accumulo di Ca^{2+} nell'ER a spese di ATP; una volta dentro il lume dell'ER, il Ca^{2+} viene sequestrato da particolari proteine, la calreticulina e calsequestrina, che lo legano con bassa affinità (K_d dell'ordine mM), e consentono così un dinamico immagazzinamento del catione. Il rilascio di Ca^{2+} dall'ER/SR è mediato dai canali attivati dall'inositolo 1,4,5-trisfosfato (IP₃R) o dalla rianodina (RyR). Tutti e due i tipi di canali richiedono la presenza di Ca^{2+} per essere attivati.

Stimoli extracellulari che agiscono sui recettori della membrana plasmatica accoppiati a proteine G o sui recettori tirosin-chinasici promuovono l'attivazione della fosfolipasi C (PLC) che a sua volta catalizza l'idrolisi del fosfolipide di membrana fosfoinositolo 4,5-bisfosfato (PIP₂) in IP₃ e diacilglicerolo (DAG). L'IP₃ è solubile e diffonde nel citosol e si lega ai canali IP₃R nell'ER attivandoli.

Il recettore dell'IP₃ è stato clonato per la prima volta da omogenati di cervelletto (Furuichi *et al.*, 1989a,b). Successivamente sono stati identificati 3 geni diversi per l'IP₃R, la cui espressione produce 3 isoforme caratterizzate da una diversa distribuzione tissutale (Patel *et al.*, 1999). IP₃R1 viene espresso nella muscolatura liscia e nel cervello, particolarmente nei neuroni di Purkinje; IP₃R2 presenta livelli di espressione molto bassi, tuttavia il suo mRNA si trova abbondantemente nel cervello, polmone e nella placenta; IP₃R3 viene espresso a livelli molto alti nel cervello e nel tratto gastrointestinale (Carafoli *et al.*, 2001). I recettori IP₃ vengono regolati da diverse fattori come Ca^{2+} , calmodulina e ATP che interagiscono dal lato citosolico della proteina (Mignery *et al.*, 1992; Maeda *et al.*, 1991) e da meccanismi come la fosforilazione, l'interazione con altre proteine ed altri messaggeri (Patterson *et al.*, 2004).

L'altro canale che permette il rilascio del Ca^{2+} dai depositi intracellulari è il RyR. Questi canali sono stati descritti per la prima volta nel SR del muscolo scheletrico e cardiaco (Fleischer *et al.*, 1985), ma poi si è visto che sono localizzati anche in cellule non muscolari. Sono delle proteine omotetrameriche di alto peso molecolare ~ 550kDa. Fino ad oggi si conoscono 3 isoforme di RyR codificate da 3 geni diversi. RyR1 è una isoforma tipica del muscolo scheletrico,

ma è espresso anche in altri tessuti come il cervello, RyR2 è stato trovato nel muscolo cardiaco e nel cervello, mentre RyR3 è largamente espresso anche in altri tessuti oltre che in diverse regioni del cervello.

Il meccanismo di apertura del canale RyR è diverso nel muscolo scheletrico e nel cuore. Nel muscolo scheletrico, l'accoppiamento eccitazione-contrazione avviene tramite l'accoppiamento meccanico che coinvolge le interazioni tra il canale di Ca^{2+} di tipo L (i recettori della diidropiridina, DHPR) nel tubulo trasverso (un elemento centrale formato da una invaginazione della membrana plasmatica) ed i recettori di rianodina nelle cisterne terminali della membrana del SR. Tale interazione è fondamentale nel processo di eccitazione-contrazione del muscolo scheletrico: la depolarizzazione della membrana dei tubuli trasversi è avvertita dai DHPR e trasmessa direttamente ai RyR come un segnale per rilasciare Ca^{2+} .

Il rilascio del Ca^{2+} da SR delle cellule cardiache richiede invece un reale passaggio degli ioni Ca^{2+} attraverso i DHPR dei tubuli trasversi innescando un meccanismo denominato "rilascio di calcio indotto da calcio" (CICR = Ca^{2+} - induced $-\text{Ca}^{2+}$ release"). Anche nelle cellule ventricolari le invaginazioni della membrana plasmatica (i tubuli T) prendono contatto con regioni specializzate del RS nelle zone giunzionali. L'apertura dei canali di tipo L nella membrana dei tubuli T in seguito alla depolarizzazione della membrana plasmatica innesca l'entrata di una piccola quantità di Ca^{2+} sufficiente ad attivare i RyR2 localizzati nelle cisterne terminali del SR. Si generano così dei " Ca^{2+} sparks" che vanno successivamente a stimolare la contrazione del sarcomero. Per promuovere il successivo rilasciamento della cellula cardiaca, una quantità di Ca^{2+} simile a quella entrata attraverso i DHPR è rimossa dallo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, mentre la restante parte è riaccumulata all'interno del SR dalla pompa SERCA, distribuita nelle regioni non-giunzionali. Questa quantità di Ca^{2+} viene successivamente trasferita alle regioni giunzionali per promuovere la successiva contrazione (Berridge, 2002).

Le pompe SERCA sono state scoperte più di 40 anni fa dopo ripetute osservazioni che frazioni di SR accumulavano Ca^{2+} a spese dell'idrolisi dell'ATP (Ebashi and Lipmann, 1962; Makinose and Hasselbach, 1971). Queste pompe sono codificate da una famiglia multigenica altamente conservata. Gli studi più importanti sulla pompa SERCA sono stati fatti nel muscolo scheletrico, dove essa rappresenta quasi 70% delle proteine totali del SR. La pompa SERCA è una proteina integrale di membrana di 110KDa costituita da un'unica catena polipeptidica. Possiede 10 domini transmembrana ed una estesa porzione che sporge nel citoplasma, e come la pompa PMCA appartiene alla famiglia delle pompe di tipo P che formano un intermedio fosforilato durante il ciclo di reazione (Carafoli and Brini, 2000). La pompa SERCA trasloca 2 ioni Ca^{2+} nell'ER/SR per ogni molecola di ATP idrolizzata. Il suo meccanismo di azione è

stato chiarito attraverso numerosi studi biochimici e di mutagenesi che hanno preceduto la cristallizzazione della pompa. L'esistenza di inibitori specifici quali tapsigargina (TG), l'acido ciclopiazonico (CPA) e dal 2,5-di(t-butyl)hydroquinone (tBHQ) ha rappresentato uno strumento fondamentale per questi studi e anche per la risoluzione della struttura 3D.

La struttura cristallografica della pompa ha rilevato che il grande dominio citoplasmatico consiste di 3 domini: A - il dominio attuatore; N - il dominio che lega i nucleotidi; P - il dominio di fosforilazione (Toyoshima *et al.*, 2003) (Fig. 1.3). Il dominio A è coinvolto nel meccanismo del "gating" che regola il legame ed il rilascio del Ca^{2+} ; Il dominio N contiene sito di legame per l'ATP, mentre il dominio P contiene il residuo Asp351 che viene fosforilato.

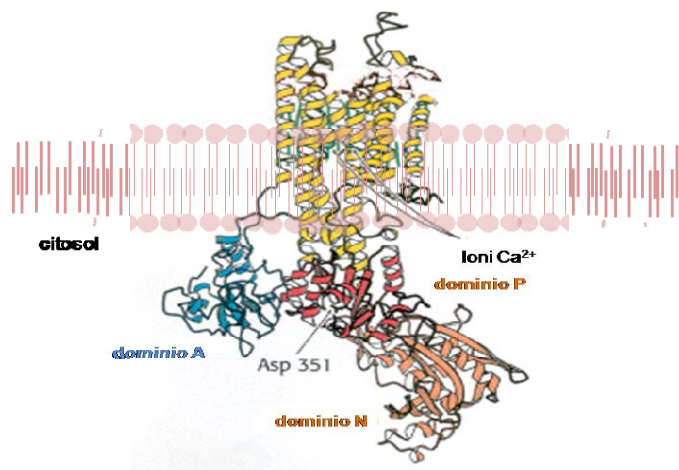


Fig 1.3. La struttura della pompa SERCA. Struttura 3D della pompa SERCA1 con i 3 domini citoplasmatici (A, N e P), Asp351 è il residuo che riceve il gruppo fosfato dell'ATP durante il ciclo catalitico. I 2 ioni Ca^{2+} che vengono traslocati in ogni ciclo di reazione sono indicati.

La SERCA è codificata da 3 geni diversi (Grover and Khan, 1992) i quali vengono espressi in maniera tessuto specifica. Il trascritto primario origina, attraverso meccanismi di "splicing" alternativo, da 2 a 3 varianti di splicing. Il meccanismo di splicing della SERCA1 genera le isoforme SERCA1a e SERCA1b che si trovano nel muscolo scheletrico (Brandt *et al.*, 1987). SERCA2a è espressa nel muscolo cardiaco (Lyttton and MacLennan, 1988) mentre SERCA2b è una proteina ubiquitaria. SERCA3 subisce splicing alternativo generando le isoforme a-f che sono espresse in un gruppo limitato di tessuti non muscolari tra cui le cellule linfocitarie e le piastrine (Bobe *et al.*, 1994; Wuytack *et al.*, 1994).

L'attività della SERCA, in particolare dell'isoforma cardiaca 2a, viene regolata dall'interazione con altre proteine, tra cui le più studiate il fosfolambano e sarcolipina. Il fosfolambano, una piccola proteina di 52 aa nella sua forma non

fosforilata interagisce con la SERCA2. L'interazione con il fosfolambano, riduce l'affinità della SERCA per il Ca^{2+} riducendone di conseguenza la capacità di trasporto nel lume dell'ER/SR. La fosforilazione del fosfolambano ne modifica l'interazione con la SERCA con conseguente inibizione dell'effetto inibitorio. Sarcolipina, una proteina di 31aa presenta alta omologia con il fosfolambano ed interagisce con la SERCA1 con il suo dominio citosolico. A differenza del fosfolambano la sua interazione con la pompa non è regolata dal suo stato di fosforilazione.

1.3 I mitocondri

I mitocondri sono le "centrali energetiche" della cellula in grado di convertire i nutrienti e l'ossigeno in ATP. Il mitocondrio è delimitato da due membrane: la membrana esterna è molto più permeabile di quella interna in quanto contiene molte copie di una proteina canale (VDAC), che permette il passaggio non selettivo di piccole molecole presenti nel citosol. La membrana interna, viceversa, è molto selettiva in termini di permeabilità: solo piccole molecole che devono essere metabolizzate nello spazio della matrice mitocondriale sono trasportate da trasportatori specifici.

Negli anni '60 quando il trasporto mitocondriale del Ca^{2+} è stato scoperto, i mitocondri erano considerati i depositi più importanti di Ca^{2+} . Tuttavia la caratterizzazione del sistema di trasporto di Ca^{2+} nel mitocondrio ha evidenziato che la sua affinità per il Ca^{2+} è molto bassa e quindi era difficile immaginare come potesse permettere l'ingresso di Ca^{2+} nei mitocondri, non solo in condizioni di riposo (a valori di $0,1\mu\text{M}$), ma anche quando la concentrazione di Ca^{2+} raggiunge valori $\sim 1-3\mu\text{M}$ di nel citosol in seguito a stimoli extracellulari. Il ruolo dei mitocondri nel controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} è stato rivalutato solo negli ultimi decenni grazie alla dimostrazione che i mitocondri possono accumulare efficientemente Ca^{2+} in cellule in quanto l'uniporto è esposto a microdomini di Ca^{2+} citosolico elevati (valori dell'ordine $10-100\mu\text{M}$) generati in seguito all'apertura dei canali del reticolo endoplasmatico (Rizzuto *et al.*, 1993). Lo sviluppo di una sonda ricombinante proteica per il Ca^{2+} indirizzata selettivamente alla matrice mitocondriale ha infatti permesso di misurare direttamente la concentrazione di Ca^{2+} mitocondriale.

Il potenziale negativo di membrana (-180mV) generato dalla catena respiratoria conduce il flusso del Ca^{2+} verso la matrice mitocondriale tramite l'uniporto, un trasportatore elettrogenico, localizzato nella membrana interna, che permette l'accumulo di Ca^{2+} secondo gradiente elettrochimico. Il gradiente elettrochimico viene mantenuto grazie all'attività di uno scambiatore elettroneutro che trasporta il Ca^{2+} fuori dalla matrice in scambio di ioni H^+ o Na^+ (Carafoli *et al.*, 1974)

I mitocondri che si trovano in stretta vicinanza con i canali dell'ER vengono quindi esposti a concentrazioni di Ca^{2+} molto elevate, sufficienti ad attivare l'uniporto. Il trasporto del Ca^{2+} nel mitocondrio è importante non solo per il controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} nel citosol, ma anche per le funzioni mitocondriali. L'attività di tre deidrogenasi del ciclo dell'acido citrico (la piruvico deidrogenasi, la α -chetoglutarico deidrogenasi e la citrico deidrogenasi) è infatti regolata dal Ca^{2+} mitocondriale che controlla quindi direttamente la sintesi di ATP e quindi il metabolismo energetico della cellula (DENTON and MacCormack 1995).

1.4 Proteine EF-hand

L'omeostasi del Ca^{2+} nella cellula oltre che da proteine che lo trasportano è garantita anche da proteine che ne decodificano l'informazione (sensori di Ca^{2+}), e da proteine che fungono da sistemi tampone. Le proteine definite sensori di Ca^{2+} appartengono a diverse classi: annessine, gelsoline, proteine contenenti domini C-2 e le proteine "EF hand". La classe più importante tra queste proteine che legano il Ca^{2+} sono le proteine "EF-hand" (Kretsinger *et al.*, 1973) che lo legano con affinità e specificità elevate, e regolano finemente e reversibilmente le variazioni della concentrazione di Ca^{2+} libero assicurando così specificità al segnale cellulare. I domini "EF hand" sono formati da due α -eliche orientate perpendicolarmente l'una rispetto all'altra e collegate fra di loro da un ponte di 12 amminoacidi che coordinano il Ca^{2+} attraverso 7 atomi di ossigeno. La famiglia delle "EF-hand" contiene circa 600 membri, tra cui la più conosciuta è la calmodulina (CALcium MODULated protEIN o CaM). CaM contiene quattro domini EF-hands ed è quindi in grado di legare quattro ioni Ca^{2+} attraverso la coordinazione da parte degli atomi di ossigeno, dei gruppi carbossilici, dei residui di glutammato e aspartato (Babu *et al.*, 1985). Questa proprietà consente alla CaM di svolgere un'azione tampone verso lo ione Ca^{2+} e regolatoria verso un centinaio di proteine che possiedono domini di legame per questa proteina. Il legame con il Ca^{2+} comporta infatti una modificazione conformazionale della CaM e l'esposizione di residui idrofobici di interazione con le sue proteine bersaglio

2. LA POMPA Ca^{2+} ATPasi DELLA MEMBRANA PLASMATICA

2.1 Struttura della PMCA e le sue caratteristiche funzionali

La PMCA è stata identificata per la prima volta nel 1966 da Schatzman (Schatzman, 1966) dalla membrana degli eritrociti e poi purificata nel 1979 usando una colonna di affinità per la calmodulina (Niggli et al., 1979). Quasi 10 anni dopo 2 gruppi indipendenti hanno isolato il cDNA della PMCA usando rispettivamente librerie di cervello di ratto e di teratoma (Shull and Greeb, 1988; Verma et al., 1988). La pompa è organizzata in 10 domini trans membrana, una parte N-terminale di 90aa, 2 regioni estese che collegano i domini transmembrana 2-3 e 4-5 ed una lunga coda citosolica C-terminale.

I domini citosolici della PMCA, analogamente a quelli della SERCA, sono organizzati in: un dominio attuatore A, un dominio di fosforilazione P e un dominio che lega i nucleotidi N. La regione citoplasmatica N-terminale, assieme al dominio intracellulare tra TM2 e TM3 forma il dominio A. Il dominio intracellulare tra TM2 e TM3 contiene una regione ricca di amminoacidi basici (quasi 40aa) e rappresenta uno dei siti che lega i fosfolipidi acidi (PI) che sono importanti attivatori della pompa. La porzione intracellulare tra TM4 e TM5 (400aa) contiene "il dominio catalitico" della pompa, rappresentato dal dominio P. Il dominio P contiene il residuo di aspartato (D) che viene fosforilato in seguito all'idrolisi di ATP durante il ciclo catalitico nel trasporto dello ione Ca^{2+} formando lo stato intermedio aspartil-fosfato. Nel dominio N si trova un residuo conservato di lisina (K) che fa parte del sito di legame per l'ATP.

La regione C-terminale della pompa (150aa) contiene il dominio di legame per la CaM, il principale attivatore della pompa PMCA (vedi Fig 2.1). Il dominio di legame per la calmodulina ha un forte carattere basico, per questo motivo è anche in grado di legare i fosfolipidi acidi. Nella regione C-terminale si trovano anche un residuo di serina ed uno di treonina importanti in quanto bersaglio di fosforilazione da parte delle proteine chinasi A e C, rispettivamente che svolgono funzione regolatoria sulla attività della pompa (Wang *et al.*, 1992)

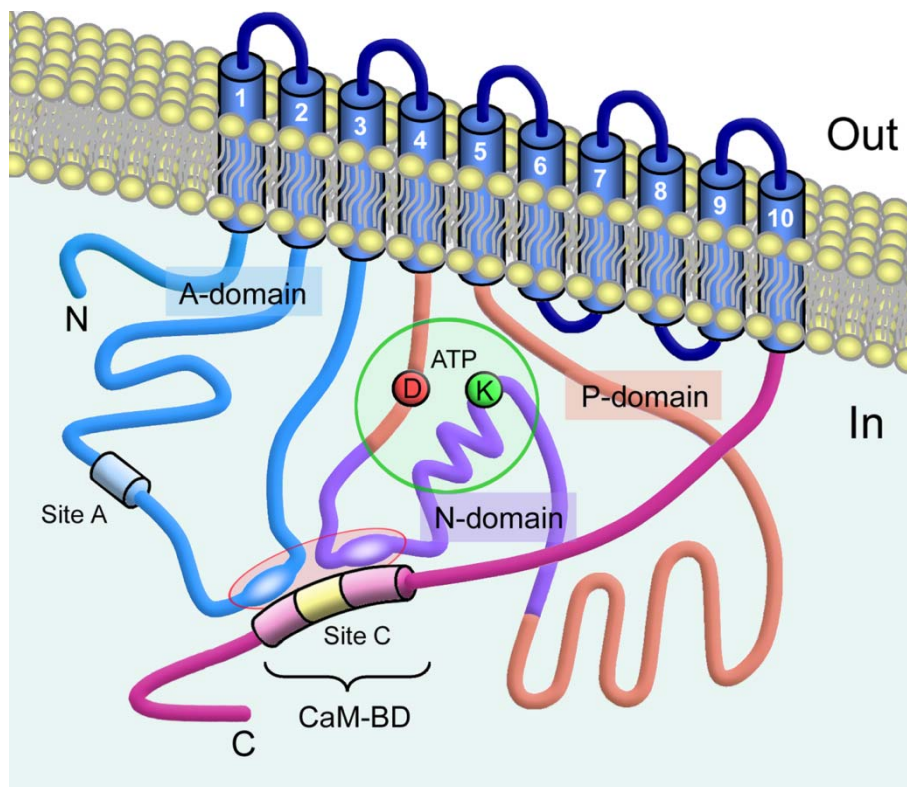


Fig . 2.1 Topologia della pompa PMCA. Uno schema della topologia della pompa PMCA. I 10 domini trans membrana sono stati rappresentati da cilindri numerati da 1-10. I 3 domini definiti dalla struttura 3D della SERCA sono indicati da diversi colori (blu, il dominio A; viola il dominio N e rosso il dominio P). Il dominio che lega la CaM (CaM-BD) è rappresentato legato ai due siti di legame intramolecolari si localizzati tra TM2 e TM3 e tra TM4 e TM5, rispettivamente. Nella figura approssimativa sono indicate anche le posizioni del residuo di Asp (D) e di lisina (K). La posizione dei siti di splicing (site A e site C) è indicata da due cilindri.

La PMCA appartiene alla famiglia delle pompe ATPasi di tipo P (Pedersen., 1987). Queste pompe sono caratterizzate dalla formazione di un intermedio di alta energia: il gruppo fosfato in posizione γ dell' ATP si trasferisce su un residuo di aspartato molto conservato e presente nel sito attivo dell'enzima portando così alla formazione di un gruppo aspartil-fosfato ad alta energia. Come per le altre pompe P, la PMCA oscilla fra 2 stati durante il ciclo di reazione: E1 con un'alta affinità per Ca^{2+} e E2 con una affinità per il Ca^{2+} più bassa. Il Ca^{2+} si lega dal lato citosolico della pompa quando essa ha un'alta affinità per il Ca^{2+} prima della fosforilazione da parte dell'ATP. La fosforilazione porta ad un cambiamento conformazionale $\text{E1} \sim \text{P} \rightarrow \text{E2-P}$ esponendo in questo modo i siti di legame per il Ca^{2+} verso il lato extracellulare e promuovendo il

rilascio dello ione legato prima che avvenga la de fosforilazione della pompa. Dopo il rilascio del gruppo fosfato, la pompa ritorna nella conformazione originale E1 ed è pronta per iniziare un nuovo ciclo di reazione (Fig. 2.2). Tutti questi processi sono ovviamente completamente reversibili.

A differenza della pompa SERCA, per la pompa PMCA non esistono inibitori specifici. Tuttavia 2 inibitori generici, che agiscono anche sui canali del Ca^{2+} , sono stati particolarmente utili negli studi biochimici che hanno permesso di elucidare il meccanismo di azione della PMCA. Questi inibitori sono l' ortovanadato ($[\text{VO}_3(\text{OH})]^{2-}$) e il La^{3+} . La pompa viene rapidamente inibita da concentrazioni micromolari di ortovanadato che si lega alla conformazione E2 della pompa impedendo così la transizione E2→E1 (Barrabin *et al.*, 1980). Gli ioni La^{3+} inibiscono le pompe di tipo P comportandosi da competitori per il sito di legame per il Ca^{2+} . IL La^{3+} inibisce anche la pompa SERCA, ma a differenza delle altre pompe P per le quali gli ioni La^{3+} diminuiscono la quantità dell'intermedio aspartil-fosfato, nelle PMCA l'interazione con La^{3+} aumenta la concentrazione del fosfoenzima. Questa caratteristica è molto vantaggiosa, perché permette l'identificazione della PMCA fosforilata in preparazioni di membrane che contengono le altre pompe (SERCA o altre pompe di tipo P) in quantità maggiore.

Altri due tipi di inibitori sono oggi più comunemente impiegati e sembrano avere una specificità maggiore per la PMCA e sono rispettivamente la carbossieosina (Gatto *et al.*, 1995) e degli inibitori che appartengono alla famiglia delle caloxine (Chaudhary *et al.*, 2001; Pande *et al.*, 2005). Questi inibitori si legano probabilmente a porzioni extracellulari della PMCA ed il fatto che agiscano da inibitori suggerisce che queste regioni extracellulari abbiano un ruolo importante nel controllo della attività della pompa.

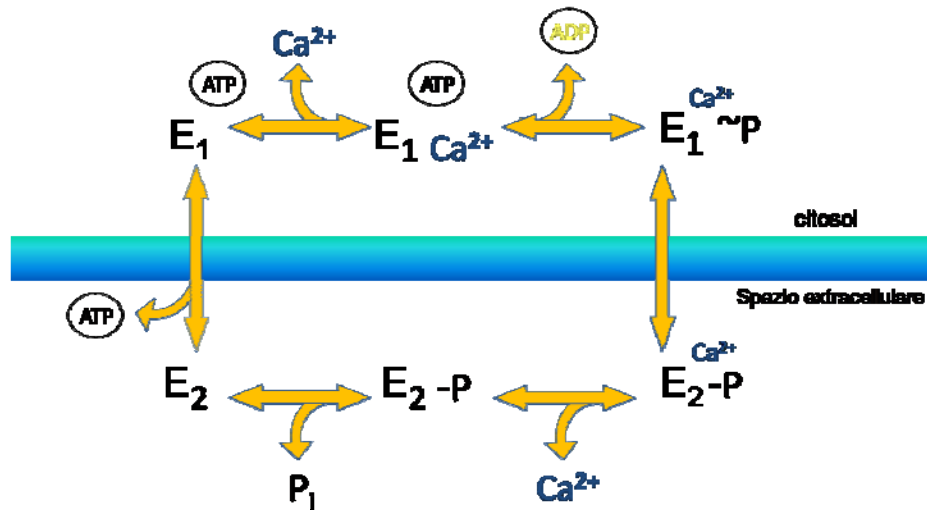


Fig. 2.2 Il ciclo catalitico della pompa PMCA. E1 e E2 rappresentano gli stati conformazionali della pompa ad alta e bassa affinità per il Ca^{2+} , rispettivamente. I simboli “~” e “-” negli stati intermedi fosforilati indicano rispettivamente i complessi ad alta e bassa energia tra la pompa ed il gruppo fosfato.

2.2 La regolazione dell'attività della PMCA

Una caratteristica importante della pompa PMCA che la distinguono dagli altri membri della famiglia delle ATPasi di tipo P, è la varietà dei meccanismi regolatori che ne controllano l'attività. La maggior parte di questi meccanismi alterano l'affinità della pompa per il Ca^{2+} . La K_d della pompa per il Ca^{2+} è 10-20 μM in condizioni di riposo, ma si riduce a valori inferiori a $1\mu\text{M}$ in seguito all'azione di diversi trattamenti fattori di regolazione, di cui il più importante è la calmodulina che si lega al suo sito di legame localizzato nella porzione C-terminale della pompa.

2.2.1 Azione della Calmodulina

In assenza di calmodulina (CaM), il dominio di legame per la calmodulina nella parte C-terminale della PMCA si lega a due siti della pompa: il primo sito si trova vicino alla regione che lega i fosfolipidi nel primo “loop” citosolico tra il secondo e terzo dominio transmembrana; il secondo sito di legame si trova nella regione catalitica tra il sito di formazione del fosfoenzima e la sequenza che lega l'ATP nel grande “loop citosolico” (Falchetto *et al.*, 1991; 1992) (Fig. 2.1). In condizioni di riposo, questo dominio svolge una funzione autoinibitoria impedendo il ciclo catalitico e quindi mantenendo la pompa in uno stato inattivo. In seguito ad uno stimolo e quindi all'aumento del Ca^{2+} nel citosol, il complesso Ca^{2+} -CaM si lega ad alta affinità con il dominio “autoinibitorio” rimuovendolo dai

siti di legami intramolecolari e portando la pompa allo stato attivo aumentando la sua affinità per il Ca^{2+} (da 10-20 μM a valori di 0.4-0.7 μM) e anche la sua V_{max} (Enyedi *et al.*, 1987; James *et al.*, 1988; Falchetto *et al.*, 1991).

A livello del dominio di legame della CaM è localizzato uno degli siti di splicing della PMCA, il sito C. L'inserzione di esoni addizionali durante il meccanismo di splicing genera lo spostamento del codice di lettura, che introduce così un un codone di "stop" prematuro e genera quindi una isoforma troncata nel dominio di legame per la CaM. Quindi lo splicing alternativo al sito C genera 2 isoforme della pompa: la forma *b*, "full-length" con alta affinità per la CaM e la forma troncata *a* con minore affinità per essa. Il cambiamento di affinità della PMCA per la CaM cambia di conseguenza anche l'affinità per il Ca^{2+} , modulando in questo modo la capacità di trasporto del Ca^{2+} della PMCA (Enyedi *et al.*, 1994). Esperimenti condotti in cellule CHO in cui erano state espresse le diverse isoforme di PMCA nella forma troncata e nella forma "full-length" hanno in realtà evidenziato che nelle cellule la calmodulina non è un fattore limitante per l'attivazione della PMCA, in quanto le forme troncate si sono dimostrate ugualmente efficienti rispetto alle forme full-length nel ripristinare il valori basali della concentrazione di Ca^{2+} basale dopo la stimolazione cellulare (Brini *et al.*, 2003). Questa osservazione suggerisce anche che la PMCA *in vivo* può essere regolata anche da altri attivatori (Tempel *et al.*, 2007).

2.2.2 Azione dei fosfolipidi acidi e degli acidi grassi insaturi a lunga catena

L'attività della PMCA è influenzata dalla composizione degli fosfolipidi della membrana plasmatica in cui risiede (Pang *et al.*, 2005; Tange *et al.*, 2006). I fosfolipidi acidi si legano alla pompa in 2 siti: un sito, come già detto, si trova nel dominio di legame per la CaM che ha un carattere basico (Brodi *et al.*, 1992), l'altro risiede nel primo "loop" citosolico della pompa in una regione ricca di aminoacidi basici (Pinto Fde T *et al.*, 2002). I fosfolipidi acidi, e tra questi in particolare, i polifosfoinositidi sono gli attivatori più potenti della PMCA: è stati infatti calcolato in saggio biochimici condotti sulla pompa purificata che riducono la K_d per il Ca^{2+} fino a valori di 0.1 μM (Missiaen *et al.*, 1989). L'effetto dei fosfolipidi ha probabilmente un ruolo molto importante *in vivo*: è stato stimato che nella membrana plasmatica la PMCA viene probabilmente attivata dai fosfolipidi per circa il 50% della sua attività massima (Niggli *et al.*, 1981). Quali siano tra i fosfolipidi acidi di membrana i reali attivatori della pompa non è chiaro. Certamente la fosfatidilserina ha un ruolo attivatorio, anche se dal punto di vista fisiologico è la meno interessante in quanto la sua concentrazione in membrana è costante. PIP_2 è invece di particolare interesse in quanto la sua concentrazione nella membrana plasmatica può cambiare rapidamente in

seguito a stimoli extracellulari e per questo potrebbe regolare in maniera dinamica l'attività della pompa.

2.2.3 Il ruolo dei meccanismi di fosforilazione sulla PMCA

La regione C-terminale della pompa è soggetta alla fosforilazione da parte delle proteine chinasi A (PKA) e C (PKC). La fosforilazione da parte della PKA aumenta sia la V_{max} che l'affinità della PMCA per il Ca^{2+} , diminuendo la K_m a circa $1\mu M$ in assenza della CaM (James *et al.*, 1989). Gli effetti della fosforilazione sulla pompa sono stati osservati per la prima volta nel sarcolemma delle cellule cardiache ed erano stati attribuiti alla PKA. Il sito consenso per PKA (KRNSS) si trova a valle del dominio che lega la CaM della regione C-terminale nelle isoforme PMCA1b e PMCA2b (James *et al.*, 1989).

PKC invece fosforila la PMCA su residui di treonina proprio nella regione che lega la CaM (Wang *et al.*, 1991). Le isoforme PMCA 2a, 3a, 4a e 4b vengono fosforilate da parte della PKC, mentre le isoforme PMCA2b e 3b non sono fosforilate da questa chinasi.

Studi *in vitro* hanno dimostrato che anche la chinasi Src fosforila l'isoforma 4 della PMCA su tirosina 1176 (Dean *et al.*, 1997) e suggerito che FAK (focal adhesion kinase) la fosforila sullo stesso residuo durante il processo di attivazione delle piastrine (Brown *et al.*, 2007). E' stato suggerito che la fosforilazione possa influenzare la regolazione della pompa sia in modo diretto (liberando la pompa dall'autoinibizione) che in modo indiretto (interferendo con la regolazione della CaM), tuttavia evidenze conclusive sul ruolo della fosforilazione della PMCA non sono ancora state ottenute.

2.2.4 Il ruolo delle proteasi sulla attività della PMCA

La regione C-terminale della PMCA è un bersaglio della proteasi Ca^{2+} -dipendente, calpaina (Molinari *et al.*, 1994) e delle caspasi 1 e 3 (Schwab *et al.*, 2002., Paszty 2002). Il sito di taglio della calpaina si trova nel dominio che lega la CaM e la proteolisi genera una forma troncata e rimuove metà della regione che lega la CaM generando una pompa permanentemente attiva (James *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1992). La proteolisi è irreversibile e sembra possa avere un ruolo fisiologico negli eritrociti umani (Salamino *et al.*, 1994) e nel processo di attivazione delle piastrine (Brown *et al.*, 2007).

Le caspasi sono delle proteasi la cui attivazione è legata al processo di morte cellulare per apoptosi. Studi effettuati su modelli cellulari diversi che esprimono isoforme di PMCA diverse, hanno dimostrato che sia l' isoforma neuronale 2 che quella ubiquitaria 4 sono le tagliate dalle caspasi 1 e 3. Il loro taglio porta

sia ad inattivazione (Schawb *et al.*, 2002) che attivazione (Paszty *et al.*, 2002) della PMCA.

2.2.5 Il ruolo dell'oligomerizzazione sulla attività della PMCA

Diversi studi hanno dimostrato che negli eritrociti le PMCA sono attivate anche dall'oligomerizzazione (Kosk-KosicKA *et al.*, 1988). Studi recenti propongono che la dimerizzazione potrebbe rappresentare un meccanismo di protezione per PMCA da processi di degradazione spontanea (Levi *et al.*, 2002). Nello stato di dimero, la PMCA può ancora legare la CaM, ma non viene più attivata da essa. Studi in vitro, utilizzando peptidi sintetici e forme troncate della PMCA, hanno dimostrato che la dimerizzazione avviene tramite il dominio che lega la CaM. Considerato che la percentuale di pompa PMCA nella membrana plasmatica è molto bassa (0.1-0.01%) rispetto alle altre proteine, non è chiaro come e se avvenga la dimerizzazione *in vivo*. Una possibilità è che la pompa potrebbe oligomerizzare a livello delle caveolae, dei microdominii specializzati della membrana plasmatica, dove si concentrano diversi lipidi e proteine coinvolte nella segnalazione cellulare, tra le quali anche la pompa PMCA (Fujimoto 1989; Schnitzer *et al.*, 1995).

2.3 Le isoforme della PMCA e la loro distribuzione

2.3.1 Le diverse isoforme della PMCA e la loro distribuzione

Le isoforme della PMCA e le sue varianti di splicing hanno diversi livelli di espressione durante lo sviluppo embrionale (Zacharias *et al.*, 1999) ed una distribuzione peculiare in tessuti e cellule. Nei mammiferi le PMCA sono codificate da 4 geni diversi (*Atp2b1-Atp2b4*). Le dimensioni dei 4 geni variano da ~60kb a ~350 kb (Brandt *et al.*, 1992; Heim *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1996), tuttavia, il numero e le dimensioni degli esoni sono molto conservati a suggerire che probabilmente i geni della PMCA derivano dalla duplicazione dello stesso gene ancestrale.

Le PMCA 1 e 4 hanno una distribuzione ubiquitaria nelle cellule animali. Studi effettuati su tessuti embrionali di topo hanno dimostrato che la PMCA1 è espressa in maniera ubiquitaria fin dai primi stadi dello sviluppo embrionale e viene considerata l'isoforma "housekeeping" della PMCA (Zacharias *et al.*, 1999). Nelle cellule dell'ippocampo è stata trovata una elevata quantità della PMCA1 suggerendo tuttavia un ruolo specifico per questa isoforma ubiquitaria. PMCA4 è molto diffusa nei tessuti umani ed è spesso presente insieme alla PMCA1, a suggerire che possa avere un ruolo di supporto verso la PMCA1 nel

mantenimento dell'omeostasi del Ca^{2+} . Nei tessuti umani PMCA 4 è particolarmente abbondante nel rene, negli eritrociti e negli spermatozoi (Stauffer *et al.*, 1995; Howard *et al.*, 1993; Okunade *et al.*, 2004). Le PMCA 2 e 3 sono isoforme prevalentemente neuronali, ma la loro espressione varia nei diversi tessuti e durante lo sviluppo embrionale. La PMCA 2 si trova in maggior quantità nelle cellule di Purkinje del cervelletto e nelle cellule sensoriali dell'orecchio interno (Furuta *et al.*, 1998., Street *et al.*, 1998). E' anche abbondantemente espressa a livello delle ghiandole mammarie in stato di allattamento e nei reni, mentre la PMCA3 ha una espressione elevata nell'abenuola e nei plessi coroidei (Stahl 1992; Stauffer *et al.*, 1997). L'isoforma PMCA3 è espressa in bassa quantità anche nel muscolo scheletrico (Greeb *et al.*, 1989).

2.3.2 Le varianti di splicing delle pompe PMCA

I trascritti primari di tutte le isoforme PMCA sono soggetti a meccanismi di splicing alternativo in 2 siti differenti: il sito A e il sito C. Fino ad oggi sono state individuate più di 30 varianti di splicing al livello di mRNA e di proteina (Strehler *et al.*, 2001). Il sito di splicing A si trova nella porzione N-terminale della proteina, in particolare, a livello del primo "loop" citosolico ed è localizzato a monte della regione che lega i fosfolipidi acidi. In questo sito può essere inserito o rimosso un esone nel trascritto della PMCA 3 e 4 e 3 esoni nel trascritto della PMCA2. Il trascritto della PMCA1 non viene sottoposto a splicing nel sito A e quindi un esone di 39 nt si trova in tutti i trascritti primari di PMCA1, che danno origine alla variante x. Nelle PMCA 3 e 4 c'è un singolo esone (rispettivamente di 36nt e 42nt nell'uomo e nel ratto) che può essere incluso o escluso dall'mRNA maturo generando rispettivamente varianti di splicing x (esone incluso) o z (esone escluso). Il pattern di splicing a livello di sito A è molto complesso per l'isoforma 2: infatti sono presenti 3 esoni diversi di 33, 60 e 42 nt che possono essere alternativamente inclusi o rimossi. Delle 8 possibili combinazioni tuttavia, solo 4 tipi di mRNA sono stati trovati a livello di diversi tessuti. Nella variante w sono inclusi tutti e tre gli esoni, nella variante z tutti e tre gli esoni vengono rimossi, nella variante x viene incluso l'esone di 42nt, mentre nella variante y vengono inclusi gli esoni di 33 e 60 nt. E' stato dimostrato che l'inclusione dei tre esoni che genera la variante w della PMCA2 è indispensabile per la localizzazione della pompa nella membrana apicale delle cellule polarizzate (Chicka and Strehler 2003)

Lo splicing alternativo nel sito di splicing C avviene in tutte le isoforme. Questo sito è localizzato nella porzione C-terminale della pompa e giace nel dominio di legame per la CaM. L'inserzione di un esone di 154-175nt in tutte le isoforme cambia il codice di lettura generando in questo modo delle varianti troncate

rispetto alle isoforme in cui non avviene l'inserzione. Le varianti troncate, chiamate varianti *a*, presentano il dominio di legame per la CaM troncato e quindi hanno una ridotta affinità di legame per quest'ultima. Le isoforme "full-length" (*b*) hanno un'attività basale più elevata rispetto alle forme troncate (*a*) (Elwes *et al.*, 1997; Seiz Preiano *et al.*, 1996; Verma *et al.*, 1996). Il meccanismo di splicing nel sito C può coinvolgere anche altri siti donori interni agli esoni canonici, complicando ulteriormente lo splicing alternativo nel sito C della PMCA. Nel caso del trascritto della PMCA1 si possono formare cinque varianti di splicing (*a, b, c, d, e*), in quello della PMCA 2 tre varianti (*a, b, c*), in quello della PMCA3 sei varianti (*a, b, c, d, e, f*) e in quello della PMCA4 tre varianti (*a, b, d*) (Fig. 2.3).

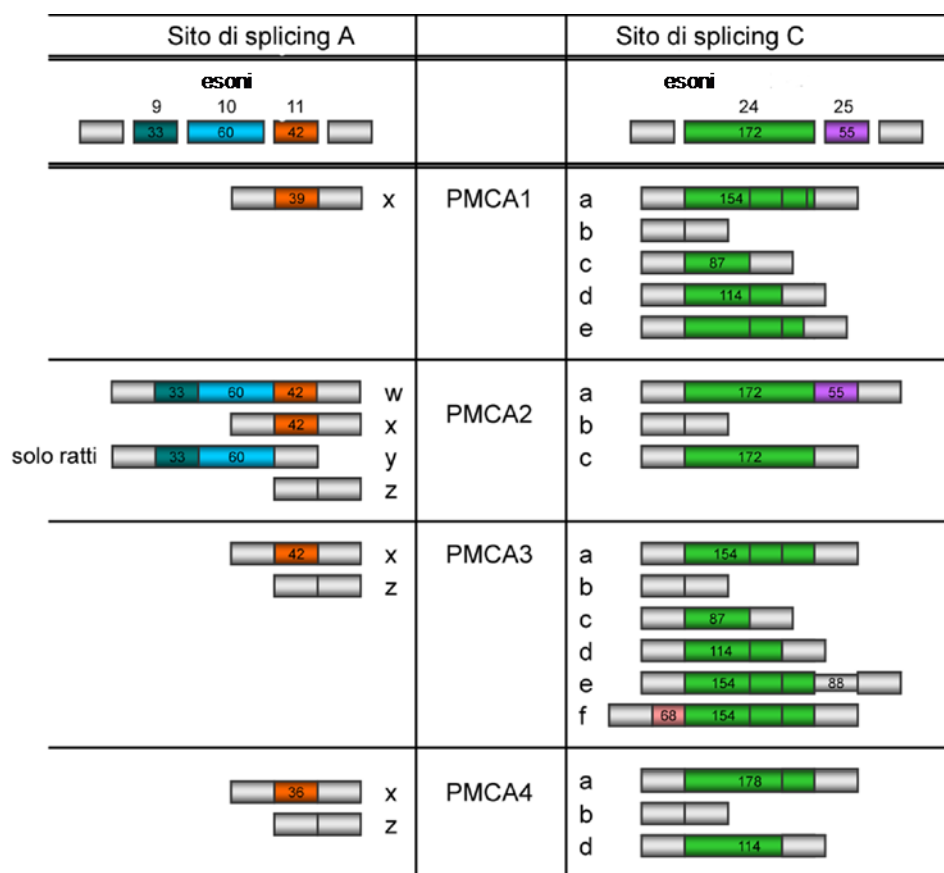


Fig. 2.3 Varianti di splicing della pompa PMCA. In questo schema vengono rappresentati le varianti di splicing generate da meccanismi di splicing nel sito A e C dei trascritti primari dei quattro gene che codificano la PMCA.

2.4 Le proteine partner della PMCA

Una questione ancora aperta nella area di studio delle pompe PMCA è il motivo dell'esistenza di un numero così alto di isoforme (circa 30). Molto probabilmente esse non sono il prodotto di un fenomeno di ridondanza ma la loro esistenza rispecchia le diverse esigenze della cellula che possono variare sia temporalmente che spazialmente.

Numerosi studi si sono rivolti alla ricerca di eventuali interattori molecolari delle pompe PMCA nel tentativo di identificare proteine che interagiscono con le diverse isoforme in maniera specifica e che siano in grado di regolarne l'attività ma anche la localizzazione in distretti specifici della membrana plasmatica. Numerose proteine sono ad oggi state identificate: alcune sono coinvolte nel reclutamento e nel mantenimento delle diverse isoforme della PMCA in zone specifiche della membrana plasmatica, altre proteine ne modulano la capacità della pompa di espellere Ca^{2+} e altre ancora sono a loro volta regolate dalla attività della pompa (De Marco *et al.*, 2001).

La maggior parte degli interattori della PMCA identificati fino ad oggi, interagiscono con una regione nella porzione C-terminale della pompa che lega domini PDZ. I domini PDZ sono dei domini strutturali di 80-90 amminoacidi che ancorano i domini transmembrana delle proteine che li contengono al citoscheletro. Proteine appartenenti alla famiglia delle chinasi MAGUK (Membrane-Associated Guanylate Kinase, SAP) che contengono domini PDZ interagiscono con le PMCA2*b* e PMCA4*b*. Queste proteine sono associate con il citoscheletro di actina della cellula ed è stato ipotizzato che siano coinvolte nel raggruppamento di vari recettori di membrana e trasportatori. L'interazione delle proteine MAGUK con PMCA potrebbe quindi servire per il reclutamento ed il mantenimento della pompa in domini della membrana specifici coinvolti nel controllo locale della concentrazione di Ca^{2+} (Kim *et al.*, 1998). NHERF2 (Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory factor-2) è un'altra proteina PDZ che interagisce con PMCA2*b*. Questa interazione è isoforma-specifica in quanto esperimenti di immunoprecipitazione usando sia PMCA2*b* e PMCA4*b* che NHERF1 e NHERF2 hanno dimostrato che le uniche isoforme che interagivano erano PMCA2*b* e NHERF2. NHERF sembra avere un ruolo nella stabilizzazione e nel mantenimento dei suoi partners molecolari nella membrana plasmatica (De Marco *et al.*, 2002). PMCA4*b* interagisce anche con un'altra proteina PDZ, l'isoforma I dell'enzima ossido nitrico sintetasi (NOS-I). In questo caso, l'interazione sembra importante per controllare l'attività di NOS-I. Infatti, esperimenti effettuati in modelli cellulari in cui la PMCA4*b* era sovraespressa hanno dimostrato che l'attività di NOS-I veniva ridotta, a suggerire un nuovo ruolo per la PMCA che agisce da modulatore della trasduzione del segnale mediata da ossido nitrico (Schuh *et al.*, 2001).

Di recente è stato individuato un altro membro appartenente alla famiglia MAGUK, CASK (Calcium/calmodulin dependent serine proteine kinases), che interagisce con PMCA4b. L'interazione con CASK, una proteina presente al livello delle sinapsi del cervello suggerisce un ruolo per la PMCA nell'attività sinaptica (Schuh *et al.*, 2003).

L'interazione con altre proteine potrebbe essere importante per lo smistamento della PMCA verso la membrana plasmatica (es. PISP, una proteina PDZ che interagisce con tutte le isoforme PMCA b (Schuch *et al.*, 2001)) o nel reclutamento della PMCA in regioni specializzate della membrana dei neuroni (es., la proteina Ania-3 (Sgambato-Faure *et al.*, 2006). Nelle piastrine è stata identificata molto recentemente un'altra proteina PDZ che interagisce con la PMCA4b. CLP36 sembra essere coinvolta nella traslocazione della PMCA nei filopodi durante l'attivazione delle piastrine per regolare i livelli del Ca²⁺ intracellulare in queste strutture (Bozulik *et al.*, 2007).

PMCA4b interagisce anche con una proteina soppressore di tumori RASSF1 (Rass-associated Factor 1) attraverso il grande "loop" citoplasmatico (tra TM4 e TM5) (Armesilla *et al.*, 2004). 2 altre proteine in grado di interagire con PMCA tramite questo dominio sono: la calcineurina e α 1-sintrophin (Buche *et al.*, 2005). Quest'ultima quando viene sovraespressa in modelli cellulari aumenta l'effetto inibitorio della PMCA sull'attività di NOS-1 (Williams *et al.*, 2006).

Uno studio recente effettuato nel nostro laboratorio ha dimostrato che la PMCA4b, l'isoforma ubiquitaria, ma non l'isoforma neuronale PMCA2b, interagisce con la proteina 14-3-3 ϵ tramite la sua regione N-terminale. Questa regione è stata usata come esca in un saggio del doppio ibrido in lievito in quanto rappresenta la regione con minor omologia tra le diverse isoforme (Rimessi *et al.*, 2005). Tale interazione ha un effetto inibitorio sulla attività della pompa.

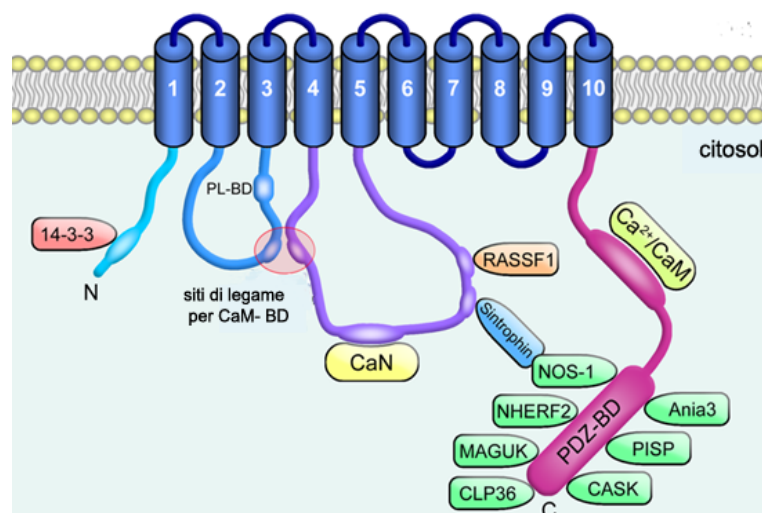


Fig. 5. Rappresentazione schematica della topologia della pompa PMCA con i suoi partner molecolari. La maggior parte delle proteine che interagiscono con la PMCA si legano

nella sua regione C-terminale capace di legarsi a domini PDZ. Altre proteine interagiscono anche con la parte N-terminale e il loop intracellulare della PMCA tra TM4 e TM5. Nella figura sono mostrati anche i siti di legame per il CaM-BD (il dominio che lega la calmodulina), la regione che lega domini PDZ (PDZ_BD) e il sito di legame per i fosfolipidi acidi (PL_BD).

2.5 PMCA e malattie

Numerose malattie umane, tra cui il diabete, l'ipertensione cardiaca, alcune forme di tumori, etc. sono state associate a difetti di espressione o di attività della pompa PMCA, tuttavia ad oggi le uniche mutazioni spontanee legate a forme patologiche nei mammiferi, sono le mutazioni individuate nel gene che codifica l'isoforma 2 della PMCA. Queste mutazioni sono generalmente responsabili di un fenotipo di sordità e di disordini nella attività di coordinazione dei movimenti e difetti di equilibrio. La produzione di topi knockout per le diverse isoforme della PMCA ha permesso di identificare alcuni fenotipi patologici associati a difetti delle diverse isoforme e di chiarire così il ruolo specifico delle diverse isoforme nel controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} *in vivo*.

2.5.1 PMCA e topi knockout

I topi knockout per la PMCA1 sono stati generati creando una delezione nell'esone che codifica il sito catalitico della pompa. Gli embrioni sopravvivono fino al terzo giorno della gestazione, ma muoiono durante il periodo dell'organogenesi (Okunade *et al.*, 2004), suggerendo così che l'isoforma 1 svolge un ruolo essenziale durante lo sviluppo embrionale e che la sua ablazione è incompatibile con la vita. I topi knockout per la PMCA4, diversamente da quelli per la PMCA1, non presentano un fenotipo evidente. Tuttavia i maschi di questi mutanti sono sterili, in quanto i loro spermatozoi hanno perso la capacità motoria. L'isoforma PMCA4 rappresenta infatti il 90% della PMCA negli spermatozoi. I topi PMCA4^{-/-} oltre a difetti nella mobilità degli spermatozoi, presentano anche alterazioni nella contrazione muscolare ed una maggiore predisposizione verso l'apoptosi delle cellule della muscolatura liscia (Okunade *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda l'isoforma 2 della PMCA, i topi knockout sono stati generati creando un'interruzione nell'esone 19. Questi topi appaiono normali alla nascita, ma crescono più lentamente degli topi wild type e degli eterozigoti e presentano problemi di equilibrio a partire dal decimo giorno dalla nascita (Kozel *et al.*, 1998). L'analisi istologica del cervelletto e dell'orecchio interno ha evidenziato che questi topi hanno una organizzazione normale del cervelletto, tuttavia presentano una leggera riduzione del numero di cellule di Purkinje

(nelle quali l' espressione della PMCA2 è particolarmente elevata), una riduzione nella formazione degli otoliti nel sistema vestibolare e una serie di anomalie nell'organo di Corti tra le quali la perdita delle cellule ciliate, che rappresentano l'apparato sensoriale dell'orecchio interno e sono deputate alla ricezione degli stimoli sonori. L'analisi del fenotipo di questi topi ha dimostrato che i topi knockout sono completamente sordi, mentre gli eterozigoti hanno comunque difetti dell'udito. L'assenza di otoconia nei topi PMCA2^{-/-} è dovuta probabilmente ad una riduzione della formazione dei cristalli di carbonato di calcio a causa della mancata espulsione di Ca²⁺ nell'endolinfa da parte della PMCA2. Questo difetto potrebbe in parte spiegare i disordini dell'equilibrio di questi topi. Per quanto riguarda il meccanismo molecolare alla base della sordità si pensa che il non corretto funzionamento della pompa porti ad una disomeostasi del Ca²⁺, la quale a sua volta perturba il corretto funzionamento delle cellule sensoriali dell'orecchio interno. L'isoforma 2 della PMCA rappresenta infatti l'unico sistema di estrusione del Ca²⁺ della membrana apicale di queste cellule (Yamoah *et al.*, 1998)

Il lavoro di questa tesi ha contribuito a chiarire il ruolo della PMCA2 nelle funzioni uditive.

Per quanto riguarda l'altra isoforma neuronale, la PMCA3, non sono ancora generati topi knockout.

2.5.2 Forme di sordità ereditaria legate a mutazioni della isoforma 2 della PMCA

Alcune mutazioni spontanee nel gene della PMCA2 erano state identificate nel topo prima dell'inizio del mio Dottorato di Ricerca. Altre mutazioni (*oblivion* e *tommy*) sono state identificate nel corso di questo Dottorato di ricerca in collaborazione con altri laboratori di ricerca ed il loro effetto sulla attività della pompa è stato oggetto di studio del mio Dottorato di ricerca. Le analisi di questi esperimenti sono quindi riportate nella sezione Risultati.

L'osservazione interessante è che queste mutazioni avvengono in regioni diverse della pompa e sono tutte associate ad un fenotipo di sordità e a problemi di equilibrio.

La prima mutazione nel gene della PMCA2 fu identificata nel topo deafwaddler (*dfw*). Si tratta di una mutazione nella porzione di gene che codifica il primo "loop" citosolico e porta alla sostituzione di un residuo di glicina con un residuo di serina nella posizione 283 della proteina (G283S). Questi topi sono completamente sordi e presentano atassia (Street Wa *et al.*, 1998). Questa mutazione altera l'abilità della pompa di espellere Ca²⁺. Esperimenti condotti su microsomi ottenuti da cellule trasfettate con un plasmide di espressione per la

PMCA2 G283S hanno dimostrato che, *in vitro* (a concentrazioni fisse di calmodulina e calcio), la sua attività è ridotta del 70% (Penheiter *et al.*, 2001)

Altre due mutazioni sono state descritte nei topi *dfw^{2j}* e *dfw^{3j}*. In questo caso le mutazioni producono delle forme di PMCA2 troncate che vengono degradate. L'analisi immunostochimica delle cellule ciliate con anticorpi anti-PMCA non rivela infatti la presenza della pompa nella loro membrana apicale. La mutazione dei topi *dfw^{2j}* consiste nella delezione di 2bp a valle del residuo di aspartato (D) che viene fosforilato durante il ciclo catalitico della PMCA (Street *et al.*, 1998). La mutazione dei topi *dfw^{3j}* consiste nella delezione di 4bp nel terzo esone e lo spostamento del codice di lettura inizia a livello del secondo dominio transmembrana (McCullough and Tempel, 2004).

In un altro modello murino, il topo "wriggle mouse Sagami" (*wri*), una mutazione puntiforme nel dominio TM4 causa la sostituzione di un acido glutammico con una lisina (E412K) (Takahashi and Kitamura, 1999). Questi topi presentano un fenotipo simile ai topi *dfw* con perdita dell'udito e di equilibrio.

Mutazioni della PMCA2 che causano sordità nell'uomo sono state descritte solo recentemente. In particolare, è stata individuata una mutazione che porta alla sostituzione di un residuo di valina con un residuo di metionina (V586M). Questo residuo si trova in prossimità del sito attivo della pompa. La mutazione di per sé non determina sordità, tuttavia si è osservato che nei pazienti della famiglia analizzata la presenza di questa mutazione contribuisce ad aggravare la sordità, causata da una mutazione nel gene della caderina 23 (CDH23), una proteina che (Schultz *et al.*, 2005). Nel corso del mio Dottorato di Ricerca, in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. P. Gasparini di Trieste, abbiamo identificato una nuova mutazione nel gene della PMCA2 (la sostituzione di un residuo di glicina con un residuo di serina nella posizione 293, G293S) che, insieme ad una mutazione nel gene di CDH23, causa la perdita di udito nel paziente affetto (Ficarella *et al.*, 2007). Nel nostro laboratorio è stata caratterizzata l'attività della pompa mutata ed i risultati ottenuti sono descritti in dettaglio nel capitolo Risultati.

MATERIALI E METODI

1. COLTURE CELLULARI

Le linee cellulari usate per gli esperimenti sono delle linee cellulari stabili. Tutte le operazioni con le cellule sono state effettuate in sterilità sotto la cappa a flusso laminare verticale.

1.1 Modelli cellulari e mantenimento in coltura

- CHO (Chinese Hamster Ovary) è una linea cellulare che deriva da cellule epiteliali di ovario di criceto; possiede i recettori per i diversi agonisti accoppiati alla generazione dell'IP₃ nel citoplasma tra cui l'ATP risulta essere il più sensibile. Vengono coltivate in terreno Ham's-F12 addizionato del 10% di siero bovino (FBS), 2mM L-gluttamina, 75U/ml penicillina, 50µg/ml streptomina.
- HeLa derivano da cellule di carcinoma umano trasformate dal virus 18 del papilloma umano. Le cellule sono state mantenute in terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) addizionato del 10% FBS, 2mM L-gluttamina e 75U/ml penicillina, 50µg/ml streptomina.

Le cellule sono state mantenute in incubatore Haereus a 37°C, in un'atmosfera umida contenente 5% CO₂. Quando le cellule raggiungevano 70-80% della confluenza cellulare, esse venivano lavate con PBS e successivamente staccate dalle fiasche usando una soluzione con 0.05% di tripsina e 0.2% EDTA in PBS (140mM NaCl, 2mM KCl, 1.5mM KHPO₄, 8mM Na₂HPO₄, pH=7.4) per 4' a 37°C nell'incubatore. La tripsinizzazione veniva inibita aggiungendo nelle fiasche una soluzione fresca del medium in cui le cellule venivano mantenute in coltura. In seguito le cellule sono state centrifugate a 1000rpm per 4' a RT in una centrifuga Beckman GS-15R (rotore S4180). Il pellet veniva risospeso nel medium di coltura e le cellule sono state lasciate a crescere per poi essere usate in esperimenti di trasfezione, Western Blotting, immunofluorescenza etc.

1.2 Trasfezione

Le cellule HeLa e CHO sono state trasfettate con il metodo del calcio fosfato. Un giorno prima della trasfezione, in condizioni di crescita logaritmica (50-60%), le cellule sono state seminate su vetrini da 13mm di diametro che erano già stati posizionati in piastre da 24 pozzetti. La soluzione di trasfezione veniva preparata in questo modo per ciascun pozzetto: 3µg di plasmide di DNA (1.5µg di ciascuno del DNA plasmidico nel caso delle co-trasfezioni), 5µl di CaCl₂ 2.5M e TE1X (Tris-EDTA) fino al volume finale di 50µl. La soluzione preparata in questo modo veniva aggiunta goccia a goccia con una pipettatrice Gilson su una soluzione contenente 50µl HBS2X sterile (280mM NaCl, 50mM Hepes,

1.5mM Na₂HPO₄, pH=7.12 con 0.5M NaOH) sotto agitazione. La soluzione di DNA precipitata è stata lasciata riposare 30' a RT e poi aggiunta alle cellule goccia a goccia. Dopo 18h le cellule sono state lavate 2 volte con PBS per eliminare i precipitati di calcio fosfato che non erano entrati nelle cellule (Sambrook *et al.*, 1989). Il terreno DMEM è stato sostituito con il terreno di crescita delle cellule. Il giorno dopo le cellule trasfettate sono state usate per esperimenti.

2. BIOCHIMICA

2.1 Estrazione delle proteine di membrana per Western Blotting

36 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state lavate 2 volte con PBS freddo e raccolte nel tampone di estrazione contenente 10mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM EDTA, 2mM PMSF (fenilmetilsulfonilfluoruro), 1mM DTT (ditiotreitolo) pre-raffreddato a 4°C. La lisi delle cellule è stata resa possibile tramite 3 cicli di congelamento/scongelo a -180°C/37°C e le proteine insolubili sono state sedimentate a 13000rpm per 30' a 4°C. Il pellet che conteneva proteine di membrana è stato risospeso nel medium di congelamento (5mM Tris-HCl, pH 8.0 e 10% saccarosio) e messo a -80°C fino al momento dell'uso. 5µl di ciascun campione sono stati prelevati per la determinazione della concentrazione delle proteine totali. La concentrazione proteica dei campioni è stata determinata con un metodo basato su variazioni colorimetriche del colorante Bradford (SIGMA): 1.5ml della soluzione del colorante è stata aggiunta a 5µl di ciascun campione. Dopo 5' nella soluzione colorante, per ogni campione è stata determinata l'assorbanza a 595nm allo spettrofotometro. La concentrazione delle proteine è stata misurata allestendo una retta di taratura con uno standard a concentrazione nota (siero di albumina bovina BSA 2mg/ml; SIGMA). Nel momento dell'uso, le proteine di membrana sono state solubilizzate nel tampone di corsa Laemmli (62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 0.2% SDS, 10%, glicerolo, 0.001% Blu di Bromofenolo, 5% β-mercaptoetanololo) e incubate a 95°C per 10' prima di essere caricate su gel di poliacrilammide.

2.2 Estrazione delle proteine totali per il saggio di Co-immunoprecipitazione

Le cellule HeLa sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (Falcon) e sono state lasciate a crescere fino a 60-70% di confluenza. Le cellule sono state lavate 2 volte con PBS pre-raffreddato a 4°C e successivamente lisate nella soluzione tampone RIPA (50mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.25% deossicolato di sodio) addizionato con una soluzione

che contiene gli inibitori delle proteasi (Roche Diagnostics Ltd), e 1mM PMSF. Le cellule sono state incubate per 30' in ghiaccio, raccolte dai pozzetti e centrifugate per 30' a 4°C a 13000rpm. Il surnatante è stato trasferito in un tubo pre-raffreddato a 4°C e la concentrazione delle proteine è stato determinata tramite il saggio di Bradford prima della solubilizzazione nel tampone di corsa Laemmli preparato come appena descritto sopra.

2.3 SDS-PAGE

Le proteine solubilizzate nel tampone di caricamento Laemmli sono state separate tramite SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) secondo il metodo convenzionale Laemmli (Laemmli, 1970). Per la separazione delle proteine sono stati usati diversi gel di separazione da 7.5, 10, 12.5% a secondo del peso molecolare delle proteine. Il tampone della corsa elettroforetica conteneva 25mM Tris-HCl pH 8.3, 192mM glicina e 0.1% SDS e l'apparecchio di elettroforesi è stato fornito da *BIO-RAD* (Criterion Precast Gel System). La corsa elettroforetica è avvenuta per 150V per 2 ore. Per ogni singolo pozzetto sono stati caricati approssimativamente 20µg di proteine totali. Gli standard di pesi molecolari utilizzati sono della ditta *BIO-RAD* (Precision Plus Protein Standard) e contengono una miscela di proteine il cui il peso molecolare è compreso da 10kDa fino a 250kDa. Dopo la corsa elettroforetica, il gel è stato colorato con Coomassie Brilliant Blue permettendo la visualizzazione delle proteine separate o è stato sottoposto ad un'analisi di Western BlotTING

2.4 Western Blotting

In seguito all'elettroforesi, le proteine separate sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa (Amersham Bioscience) mediante elettrotrasferimento per 1.5h a 70V nel tampone di trasferimento contenente 25mM Tris-HCl pH 8.4, 192 mM glicina, 0.03% SDS e 20% metanolo. Il trasferimento delle proteine è avvenuto nell'apparecchiatura "Criterion Plate Blotter" (*BIO-RAD*). Per controllare l'avvenuto trasferimento delle proteine, i filtri di nitrocellulosa sono stati incubati con un colorante idrosolubile (2% Rosso ponceau, 5% acido acetico in acqua, SIGMA) che si lega alle proteine, rimosso facilmente con acqua bidistillata. I filtri di nitrocellulosa sono stati successivamente incubati per 2h a RT (Room Temperature) o O/N (Over/Night) a 4°C in una soluzione saturante al 5% di latte in polvere scremato contenente 0.1% di Tween20 (SIGMA) in PBS per saturare i siti di legame idrofobici aspecifici sulla nitrocellulosa. In seguito è stato aggiunto l'anticorpo primario opportunamente diluito e lasciato ad incubare per 3h a 4°C.

Gli anticorpi primari utilizzati sono:

- anticorpo monoclonale 5F10 diretto contro le diverse isoforme di PMCA (Affinità BioReagents, Golden, CO)
- anticorpo policlonale 2N specifico contro l'isoforma PMCA2 (SIGMA)
- anticorpo contro 14-3-3
- l'anticorpo monoclonale di topo β -actina (SIGMA)
- l'anticorpo monoclonale di topo β -tubulina (Santa Cruz Biotechnology, inc)

Dopo 3 lavaggi da 10' con PBS con l'aggiunta di Tween20 0.1% (PBST), i filtri sono stati successivamente incubati per 1h a RT con l'anticorpo secondario coniugato al gruppo enzimatico HRP (HorseRadish-Peroxidase). Gli anticorpi secondari usati sono:

- anti-mouse HRP 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology, inc)
- anti-rabbit HRP 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology, inc)

Dopo l'incubazione con l'anticorpo secondario opportuno sono stati effettuati 3 lavaggi da 10' con PBST. La rivelazione delle bande proteiche è stata resa possibile tramite la chemiluminescenza che si ottiene incubando le membrane con il reagente "Immun-Star HRP substrate" (BIO-RAD) per 5'. L'analisi densitometrica delle bande è stata effettuata mediante il programma Kodak1D Image Analysis (Kodak Scientific Imaging System, New Haven, CT).

2.5 Immunofluorescenza

Le cellule trasfettate con i plasmidi di interesse cresciute su vetrini da 13mm di diametro sono state lavate con PBS e fissate con formaldeide 3.7% in PBS per 20'. Dopo 3 lavaggi in PBS le cellule sono state incubate in una soluzione 50mM NH_4Cl in PBS per 10' per abbassare la fluorescenza endogena dovuta a sostanze emittenti presenti nella cellula come NAD, alcuni aminoacidi etc. In seguito le membrane cellulari sono state rese permeabili incubandole in TritonX-100 diluita fino a 0.1% in PBS per 5' e poi lavate 3 volte per 10' con 1% gelatina in PBS (Tipo B estratta da pelle di vitello, SIGMA). Dopo 3 lavaggi da 10' in PBS, le cellule sono state incubate con l'anticorpo primario opportuno nella diluizione 1:100 per 1h a 37°C. Gli anticorpi primari usati per l'immunofluorescenza sono:

- anticorpo monoclonale 5F10 diretto contro le diverse isoforme di PMCA
- anticorpo anti-14-3-3 ϵ

Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario sono stati effettuati 3 lavaggi da 10' e successivamente le cellule sono state incubate a RT per 30' con gli anticorpi secondari coniugati con i cromofori AlexaFluor594 e AlexaFluor488 (Molecular Probes, Invitrogen) ad una diluizione 1:200. Dopo 3 lavaggi in PBS, i vetrini sono stati montati su vetrini portaoggetti mediante una soluzione di glicerolo

90% in PBS e sono stati osservati con un microscopio a fluorescenza ZEISS Axiovert S100TV (Carl Zeiss Vision), equipaggiata con una fotocamera digitale CCD 16-bit (Micromax, Princeton Instruments). Le immagini sono state acquisite mediante il software Axiovision (Carl Zeiss Vision).

2.6 Co-Immunoprecipitazione

La tecnica di co-immunoprecipitazione consiste nel permettere il legame tra una proteina di interesse presente in un estratto proteico (legata ad eventuali suoi partner molecolari) ad un anticorpo specifico e legare questo complesso ad una resina di agarosio. Di conseguenza, la proteina di interesse può venire isolata e rimossa dal resto dell'estratto proteico assieme ai suoi partner molecolari. La Figura 2.6.1 schematizza come si svolge il processo di co-immunoprecipitazione.

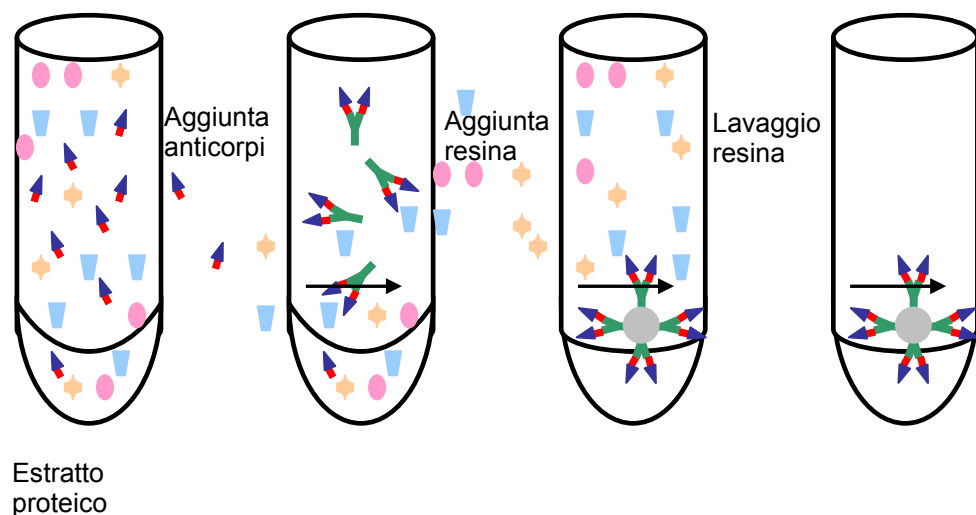


Fig. 2.6.1 Tecnica di co-immunoprecipitazione. Estratti proteici, contenenti la proteina di interesse (rosso) eventualmente legata ad altri fattori proteici (blu), vengono incubati con anticorpo specifico (verde). Una resina di agarosio riconosce e lega la regione Fc degli anticorpi. In seguito a centrifugazione, i complessi “resina-anticorpo-proteina complessata” vengono isolati e proteine aspecifiche eliminate mediante lavaggio.

48 ore dopo la trasfezione, le cellule HeLa sono state lavate con soluzione PBS pre-raffreddata e lisate nella soluzione tampone RIPA contenente 50mM Tris-HCl pH 7.4 1% Nonidet P-40, 0.25% deossicolato di sodio, 150mM NaCl, 1mM EDTA con l'aggiunta degli inibitori di proteasi (Roche Diagnostics) e 1mM PMSF. Le cellule sono state incubate per 30' in ghiaccio, raccolte e centrifugate per 30' a 4°C a 13000rpm. 2-3µl di anticorpo monoclonale 5F10 (Affinity Bio-

Reagents) sono stati aggiunti a 500µg di proteine del lisato cellulare. Dopo 2-3' in agitazione a 4°C, 50µl di resina di sefarosio A/G (Santa Cruz Biotechnology) sono state aggiunte e la soluzione contenente il lisato cellulare, l'anticorpo 5F10 e la resina di sefarosio è stata lasciata in agitazione O/N a 4°C. L'immunocomplesso è stato recuperato centrifugando a 13000rpm per 30sec e successivamente lavate per 3-4 volte con PBS freddo. Le proteine legate alla resina e 10% del lisato iniziale sono state separate in gel di poliacriamide di concentrazione 10% e analizzati tramite Western Blot.

2.7 GST pull-down

2.7.1. L'espressione delle proteine di fusione con GST

Per la produzione delle proteine di fusione GST-PMCA1 e GST-PMCA3, la porzione N-terminale di hPMCA1b (P1) e PMCA3a (P3) è stato clonato nei siti di restrizione *EcoRI-XhoI* dal vettore di espressione pGilda (Clontech) nel vettore pGEX4T1 (Amersham Biosciences). Le proteine di fusione con GST (Glutathione-S Trasferase), GST-P1 e GST-P3 sono state espresse nei batteri *E.coli* BL21. L'espressione proteica sotto il promotore *taq* è stato indotta aggiungendo al terreno di coltura 1mM IPTG (Isopropil 1-tio-β-D-galactopiranoside). Una delle singole colonie di *E. coli* trasformate con il vettore pGEX4T1/proteina di fusione è stato inoculato in 5ml del terreno di coltura LB (10g/l bacto-triptone, 5g/l estratto di lievito, 10g/l NaCl) addizionati con 100µg/ml di ampicillina. Le cellule sono state cresciute O/N a 37°C sotto agitazione. Il giorno dopo, è stata fatta una diluizione 1:100 di questa coltura con LB e le cellule sono state lasciate a crescere fino alla fase esponenziale (OD_{600} = 0.4-0.6). Per indurre la produzione delle proteine è stata aggiunta IPTG alla concentrazione finale di 1mM e le cellule sono state lasciate a crescere ancora per 1-2 ore a 37°C. Dopodiché le cellule sono state raccolte tramite centrifugazione a 4°C per 20' alla velocità 5000rpm (Beckman rotore JA10). Il pellet dove si trovano le cellule è stato risospeso nella soluzione tampone TBS (Tris-Buffered Saline: 50mM Tris-HCl e 150mM NaCl pH 7.4) in cui erano stati aggiunti gli inibitori delle proteasi e 1mM PMSF. Le cellule sono state lisate tramite l'apparecchio French Pressure Cell Press (ThermoSpectronic). Il lisato è stato sottoposto ad una centrifugata di 12000rpm per 30' a 4°C (Beckman Coulter rotore JA25.50) ed il surnatante è stato scartato. Prima di essere stata usata, la resina di Sefarosio 4B coniugata con il glutatione (Amersham Biosciences) è stata lavata 2 volte con H₂O e 2 volte con TBS. In seguito, a 10ml del lisato proteico di *E.coli* è stato aggiunto 500µl di resina di sefarosio coniugata con glutatione e sono stati lasciati in rotazione per 2h a 4°C. Dopodiché è stata effettuata una centrifugata da 5' a 2500rpm a 4°C. Il pellet dove si trovava la

resina di sefarosio coniugata con glutatione e le proteine legate è stata lavata 4 volte con TBS e la quantità e l'integrità delle proteine di fusione è stata stimata tramite SDS-PAGE e successiva colorazione con Coomassie Brilliant Blue.

2.7.2 Il saggio di GST pull-down

Le cellule HeLa sono state seminate su piastre da 6 pozzetti, lavate con PBS e lisate nella soluzione tampone di estrazione RIPA. Quantità equivalenti del lisato totale cellulare sono stati incubati con la resina di sefarosio coniugata con glutatione e legata alle proteine di fusione GST-P1 e GST-P3 per 2h a 4°C in rotazione. In seguito, tutto il complesso della resina di sefarosio è stato raccolto tramite centrifugazione a 3000rpm, lavate per 4 volte con TBS e risospeso nel tampone di caricamento Laemmli. Le proteine legate sono state separate tramite SDS-PAGE in gel di poliacrilammide di percentuale 12% e poi rivelate tramite analisi di Western Blotting.

3. BIOLOGIA MOLECOLARE

Per i clonaggi e per il mantenimento dei vettori plasmidici è stato usato il ceppo batterico TOP10 (Invitrogen). Per l'espressione elevata delle proteine di fusione con GST è stato usato il ceppo batterico BL21 che non contiene le proteasi.

3.1 Isolamento del DNA plasmidico da batteri. Mini-prep.

L'isolamento del DNA plasmidico su scala ridotta ha lo scopo di permettere la valutazione qualitativa del preparato. Allo scopo di amplificare il plasmide, le colonie batteriche vengono messe a crescere in 2ml di terreno LB (Luria-Bertani: 10g/l Bacto-triptone, 5g/l estratto di lievito, 10g/l NaCl) addizionato dell'opportuno antibiotico di selezione (ampicillina 75µg/ml, o kanamicina 40µg/ml) a 37°C O/N. L'estrazione del DNA da batteri è stata condotta mediante il kit commerciale "Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit" (Genomed) seguendo il protocollo fornito assieme al prodotto. Il protocollo è basato sulla lisi delle cellule *E.coli* con una soluzione alcalina/SDS e una successiva neutralizzazione che prevede l'impiego di colonnine per purificazione cromatografica del DNA plasmidico mediante una resina di silice a scambio anionico. L'eluizione finale del DNA è stata sempre eseguita in H₂O bidistillata.

3.2 Isolamento su vasta scala del DNA plasmidico dai batteri (Maxi-prep)

Questa procedura è analoga a quella della mini-prep, ma si effettua per isolare quantità del DNA plasmidico molto maggiori. Le cellule *E.coli* che contengono il plasmide di interesse sono stati incubati a 37°C O/N in 400ml LB con l'antibiotico opportuno. L'estrazione del DNA plasmidico da batteri è stata effettuata tramite il kit commerciale "Jetstar 2.0 Plasmid Maxiprep Kit" (Genomed). L'eluizione finale del DNA è stata eseguita in circa 200µl di H₂O. La quantificazione è stata effettuata mediante lettura spettrofotometrica dell'assorbanza dei campioni a 260nm, considerando che 1OD₂₆₀= 50mg/ml. Per controllare il livello di contaminazione del campione di DNA da parte delle proteine è stata effettuata una lettura dell'assorbanza del campione a valori di lunghezza d'onda di 280nm. Il valore di 2:1 tra il valore letto a 260nm e il valore letto a 280nm è indice della buona qualità del campione di DNA.

3.3 PCR (Polimerase Chain Reaction)

La reazione a catena della polimerasi consiste nella ripetizione di 25-35 cicli ed è costituita da 3 fasi:

- 1) una prima fase di denaturazione del DNA stampo a doppio filamento (denaturazione a 95°C)
- 2) una seconda fase in cui la temperatura viene abbassata ad un valore che permette l'attacco degli oligonucleotidi "primers" con il DNA stampo.
- 3) una reazione di estensione del DNA catalizzata da una DNA polimerasi termostabile (Taq polimerasi) a partire dai "primers" legati.

Queste reazioni sono rese possibili grazie all'utilizzo di un termociclatore che varia in modo ciclico la temperatura, per un numero di cicli pre-determinato. Le reazioni di PCR sono state condotte nelle seguenti condizioni: 20ng di DNA stampo, 200µM dNTPs, 0.25µM primers, 2mM MgCl₂, 1X tampone per la polimerasi (10mM Tris-HCl pH8.3, 50mM KCl, 0.001% gelatina), 2U Taq polimerasi (Platinum Taq DNA Polimerase, Invitrogen) in un volume finale di 50µl. Le dimensioni dei prodotti di PCR sono state controllate mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 2% nella soluzione tampone TAE (Tris 40mM, Na-acetato 25mM, acido acetico glaciale 0,1%, EDTA 1mM, Etidio di bromuro 0,5µg/ml).

Gli oligonucleotidi sintetici usati nelle reazioni di PCR sono stati prodotti dalla ditta (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO) e vengono elencati sotto:

- La parte N-terminale di 90 aa di PMCA1b
 - o senso: 5'-cgGGATCCtgggacatgg-3'
 - o ..antisenso: 5'-cgCTCGAGtataaaattcttcca-3'

- La parte N-terminale di 90 aa di PMCA3a
 - senso: 5'-cgGGATCCtgggcgacatgg-3'
 - antisenso: 5'-cgCTCGAGgatgaagttctgcccg-3'

- P1.1 (1-45aa della parte N-terminale di PMCA1)
 - senso: 5'-cgGGATCCtgggcgacatgg-3''
 - antisenso: 5'- cgCTCGAGtataaaattctttcca-3

- P1.2 (45-90aa della parte N-terminale di PMCA1)
 - senso: 5'-cgGGATCCtacgaaaaatac-3'
 - antisenso 5'-cgCTCGAGtataaaattctttcca-3'

- P4.1 (1-45aa della parte N-terminale di PMCA4)
 - senso: 5'-cgGAATTCacgaacctca-3'
 - antisenso 5'-cgGGATCCgacattaatctg

- P4.2 (45-90aa della parte N-terminale di PMCA4)
 - senso: 5'-cgGAATTCcactatggagggt-3'
 - antisenso: 5'-cgGGATCCcttgggctttt-3'

- PMCA4.36-82
 - senso: 5'-ggcGAATTCcgttcgagggatgca-3' '
 - antisenso 5'-ccgGGATCCgttgttccaaacac-3'.

In lettere maiuscole sono i siti di restrizione usati nel clonaggio dei frammenti.

3.4 Digestione del DNA plasmidico e gel elettroforesi

Il DNA è stato digerito con enzimi di restrizione che riconoscono sequenze palindromiche specifiche sul DNA a doppio filamento. Una reazione di digestione analitica conteneva:

- 1µg DNA (in H₂O)
- 2µl tampone 10X (variabile nel contenuto dei sali a seconda degli enzimi)
- 1µl enzima di restrizione (attività enzimatica 10unità/µl) H₂O sterile fino al volume finale di 20µl

La digestione è avvenuta per 1h a 37°C in bagno termostatico.

Per una reazione di digestione preparativa:

- 3-10 µg DNA (in H₂O)
- 8µl tampone 10X (variabile nel contenuto dei sali a seconda degli enzimi)

- 2 μ l enzima di restrizione (attività enzimatica 10unità/ μ l) H₂O sterile fino al volume finale di 100 μ l

La digestione è stata incubata per 2 ore a 37°C in un bagno termostatico.

I campioni con il DNA digerito sono stati caricati su gel di agarosio 1-2% (Type I Low EEO, SIGMA) in tampone di corsa TAE 1X. I campioni sono stati solubilizzati nel tampone di caricamento 1X (0.04% Blu di bromofenolo, 0.04% Xilene Cianolo, 5% glicerolo in H₂O) che oltre a favorire il depositarsi del DNA nei pozzetti, permette di seguire la migrazione dei campioni nel gel di agarosio. Il gel messo nell'apparecchio di elettroforesi è stato sottoposto ad un voltaggio di circa 100V ed è stato lasciato correre per circa 30'. Il peso molecolare dei frammenti di DNA è stato determinato dal confronto con indicatori standard (100bp DNA Ladder, 1kB DNA Ladder, England Biolabs).

3.5 Purificazione dei frammenti di DNA

Dopo la corsa elettroforetica, la banda di DNA di interesse è stata tagliata dal gel preparativo con un bisturi e purificata seguendo il protocollo di "Jetquick Gel Extraction Spin Kit" (Genomed). L'agarosio contenente il frammento di DNA di interesse è stato sciolto incubandolo a 50°C per 10', alla miscela è stata aggiunta una resina a scambio ionico in grado di legare il DNA. Dopo opportuni lavaggi, il DNA è stato eluito in 30 μ l di H₂O. Un'altra corsa elettroforetica è stata effettuata allo scopo di poter quantificare il frammento da clonare, confrontando l'intensità della banda in esame con quella di DNA a concentrazione nota.

3.6 Ligazione del DNA

Il vettore di clonaggio è stato tagliato per digestione enzimatica, purificato tramite estrazione dal gel di agarosio e risospeso in H₂O. Dopo la quantificazione del frammento del vettore digerito, è stato allestito una reazione di ligazione utilizzando inserto e plasmide nel rapporto stechiometrico molare 3:1 in presenza di 2-4U dell'enzima T4 DNA ligasi (3U/ μ l), 5X soluzione tampone dell'enzima contenente (50mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 25 μ g/ml BSA, 1mM ATP) e H₂O. sterile fino alla concentrazione finale di 20 μ l. La reazione di ligazione è stata lasciata per 4h a RT e successivamente è stata usata per la trasformazione batterica.

3.7 Trasformazione del DNA in cellule batteriche competenti *E.Coli*

Per inserire i plasmidi ricombinanti in cellule batteriche si è utilizzato il metodo chimico. Il trattamento consiste nel rendere la membrana delle cellule batteriche

temporaneamente permeabile al DNA esogeno. I batteri TOP10 (Invitrogen) sono fatti crescere a 37°C O/N in 2ml di terreno LB in agitazione. Il giorno dopo, la coltura batterica è stata diluita in 25ml di LB fresco e i batteri sono stati lasciati a crescere fino alla fase esponenziale ($OD_{600}=0.4-0.6$). In questa fase la coltura batterica è stata centrifugata per 10' a 3500rpm a 4°C e risospesa nella soluzione I di trasformazione fredda (MOPS 100mM, $RbCl_2$ 10mM, pH 7). La sospensione è stata centrifugata per altri 10' a 3500rpm a 4°C e successivamente risospesa in 4ml della soluzione II di trasformazione fredda (MOPS 100mM, $CaCl_2$ 50mM, $RbCl_2$ 10mM, glicerolo 10%, pH 6.5). La sospensione batterica è stata aliquotata in volumi di 100mM e conservata a -80°C.

Nel caso della trasformazione batterica, i batteri resi competenti sono stati lasciati scongelare e gli è stato aggiunto 20-100ng di DNA plasmidico. La miscela contenente i batteri competenti assieme al DNA plasmidico è stata lasciata per 30' in ghiaccio. In seguito è stato eseguito un "shock" termico per 1' a 42°C, sono stati aggiunti 500µl di LB e incubati a 37°C per 1h. La sospensione batterica è stata centrifugata a 4500rpm per 5' e il pellet con le cellule batteriche trasformate con il DNA plasmidico è stato risospeso in 50µl di LB. I batteri sono stati successivamente piastrati in piastre con LB solidificate dall'aggiunta di agar al 1.5% contenenti l'antibiotico appropriato per il quale il plasmide inserito contiene la resistenza.

3.8 Plasmidi usati nei diversi clonaggio

- **pcDNA3** (Invitrogen) – vettore plasmidico per l'espressione di PMCA2 (tutte le varianti di splicing e mutanti) e PMCA3
- **pSG5** (Stratagene) – vettore plasmidico per l'espressione di PMCA1, PMCA4
- **pEGFPc1** – plasmide per l'espressione della proteina 14-3-3ε
- **pGEX4T-1** (Amersham Biosciences) – vettore di espressione delle proteine di fusione GST-P3 and GST-P1
- **pGILDA** (Clontech) – vettore di espressione usato nel doppio ibrido per la trasformazione dei lieviti

3.9 Sequenziamento

Il DNA è stato sottoposto a sequenziamento per verificare la direzione di inserzione dell'inserito tramite il Servizio di Sequenziamento di DNA del C.R.I.B.I – Università di Padova.

4. MISURA DELLA $[Ca^{2+}]$ IN CELLULE VIVE

Nei nostri esperimenti abbiamo usato come strumento per misurare la $[Ca^{2+}]$ in cellule vive la fotoproteina Ca^{2+} sensibile equorina (AEQ). AEQ è una proteina naturalmente prodotta dalla medusa luminescente *Aequorea victoria* (Shimomura *et al.*, 1962). La sua forma completa è costituita da un'apoproteina di 21kDa e da un gruppo prostetico idrofobico di 400Da chiamato celenterazina, che lega la fotoproteina attraverso un legame perossidico. In seguito al legame dell'equorina con 3 ioni Ca^{2+} , mediante domini ad alta affinità di tipo "EF-hand", si ottiene la rottura del legame covalente e conseguente emissione di fotoni (Blinks *et al.*, 1972). Il gruppo prostetico si stacca sotto forma di celenterammide e questa reazione è di natura irreversibile (Blinks *et al.*, 1972) (Fig.5.1).

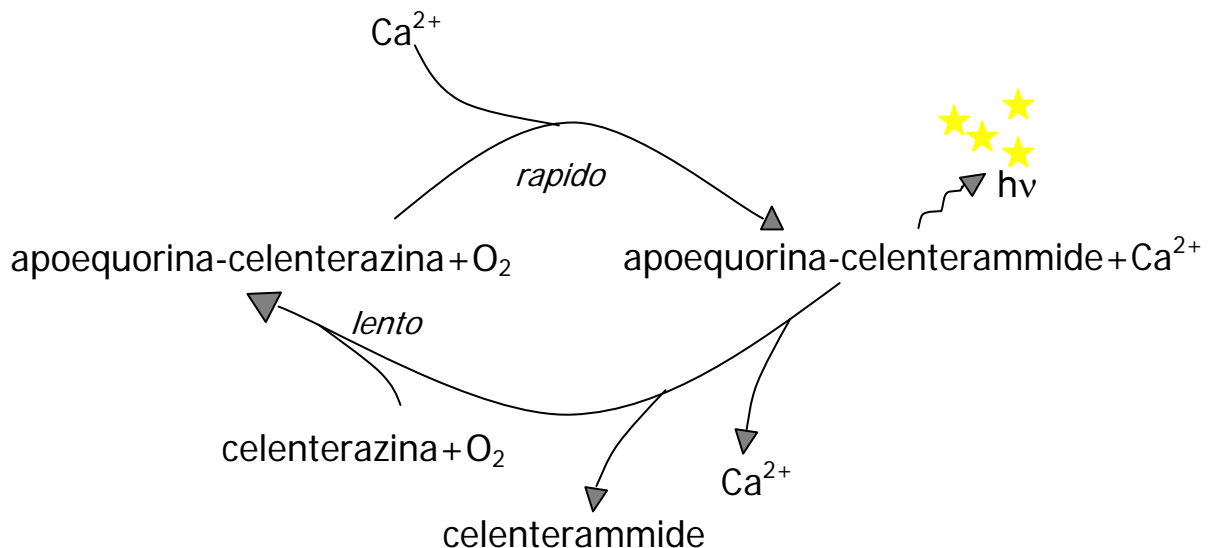


Fig. 5.1 Meccanismo di attivazione di AEQ. La proteina attiva si forma in seguito al legame dell'apoproteina con il gruppo prostetico celenterazina. Il legame del Ca^{2+} comporta l'emissione di fotoni e il distacco del gruppo prostetico sotto forma di celenterammide.

Tuttavia, nonostante la reazione luminosa Ca^{2+} sensibile sia una reazione irreversibile, è possibile misurare un parametro dinamico come la variazione della $[Ca^{2+}]$ grazie all'esistenza di una relazione tra il logaritmo della velocità di emissione di fotoni (L), (espressa come frazione rispetto alla velocità massima di luminescenza L_{max}), e il logaritmo della $[Ca^{2+}]_c$. Valori ottenuti attraverso misurazioni in vitro, in condizioni note di pH, forza ionica, $[Mg^{2+}]_c$ e temperatura consentono di costruire una curva di calibrazione di forma sigmoide sulla base della quale, nell'ambito fisiologico di concentrazioni di Ca^{2+} ($0.1-10\mu M$), è possibile correlare in ogni istante la frazione di equorina consumata con il valore di Ca^{2+} a cui la fotoproteina è esposta (Allen and Blinks, 1978) (Fig. 5.2).

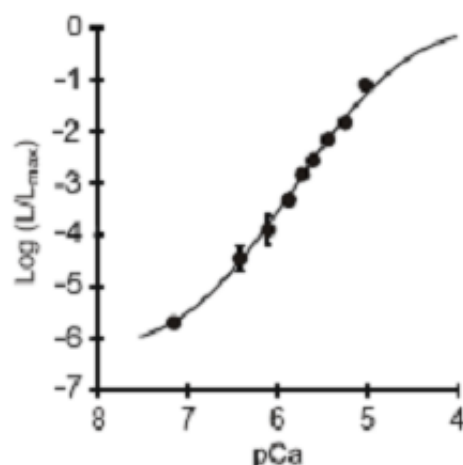


Fig. 5.2 Calibrazione della luminescenza di AEQ: relazione tra l'emissione di luce e la concentrazione di Ca²⁺. Nell'ambito di [Ca²⁺]_c fisiologiche (0.1-10μM), è possibile correlare in ogni istante la frazione di equorina consumata con il valore del Ca²⁺ a cui la fotoproteina è esposta, attraverso la relazione tra il logaritmo dell'emissione di fotoni in presenza di [Ca²⁺]_c nota (L), espressa come frazione rispetto alla massima luminescenza per [Ca²⁺]_c saturante (L_{max}), e il logaritmo della [Ca²⁺] (pCa).

Rispetto agli indicatori fluorescenti sintetici, la natura proteica di AEQ offre diversi vantaggi, tra i quali la localizzazione esclusivamente citoplasmatica nella sua forma nativa che evita l'inconveniente di segnali spuri provenienti dagli organelli subcellulari. Inoltre la sua sequenza amminoacidica può essere modificata in modo da includere una sequenza di localizzazione subcellulare o essere fusa ad una proteina che contiene già tutte le informazioni necessarie per il suo specifico direzionamento (Brini *et al.*, 1999). L'utilizzo delle chimere AEQ ha permesso di compiere notevoli passi avanti nella comprensione del ruolo del [Ca²⁺] nella cellula. Alcuni esempi hanno rivelato che i mitocondri sono in grado di accumulare Ca²⁺ a concentrazioni dell'ordine del μM, grazie alla presenza di microdomini ad elevata Ca²⁺ che si generano vicinissimo ai canali di rilascio del ER (Rizzuto *et al.*, 1993), che nella regione a ridosso della membrana plasmatica la [Ca²⁺] è un ordine di grandezza più elevata che nel resto della citoplasma (Marsault *et al.*, 1997) o hanno dimostrato che anche l'apparato di Golgi svolge il ruolo di deposito intracellulare di Ca²⁺ (Pinton *et al.*, 1998).

4.1 Ricostituzione dell'equorina in cellule vive

Le cellule sottoposte a misurazioni con il saggio di equorina sono state precedentemente seminate su vetrini 13mm di diametro. Il giorno dopo sono stati trasfettati con il plasmide che esprime l'equorina indirizzato al citoplasma (cytAEQ) o co-trasfettate con cytAEQ e i plasmidi che esprimono le diverse isoforme di PMCA con il metodo di calcio fosfato. Dopo 48h dalla trasfezione è stato possibile misurare la concentrazione del Ca^{2+} . Le cellule trasfettate sono state immerse in 200 μl di DMEM addizionato con FBS 1% a cui era stato aggiunto celenterazina 5 μM (Molecular Probes, Invitrogen). Le cellule sono state incubate per 3 ore in incubatore 37°C, in atmosfera satura di acqua e con 5% H_2O .

4.2 Misura della luminescenza dell'equorina

Tutte le misure fatte con equorina sono state eseguite nella soluzione fisiologica KRB (Krebs-Ringer) addizionato con 0.1% di glucosio e 1mM CaCl_2 . Le misure della concentrazione del Ca^{2+} libero nel citosol sono state effettuate in seguito alla stimolazione con l'agonista dei recettori purinergici IP_3 , l'ATP usata alla concentrazione 100 μM in KRB. Alla fine degli esperimenti singoli, le cellule sono state trattate con una soluzione iposmotica ricca di Ca^{2+} e con 100 μM digitonina in modo da provocare la rottura cellulare e da consumare così l'equorina residua. Infatti per convertire i dati di luminescenza in valori di Ca^{2+} assoluto, è necessario conoscere la quantità totale dell'equorina funzionale. Alcuni esperimenti sono stati condotti utilizzando l'inibitore specifica della pompa SERCA il 2,5-Di-tert-butilidrochinone (tBHQ) 20 μM (SIGMA) (Inesi *et al.*, 2005). La misura della luminescenza dell'AEQ si basa su un sistema di rivelazione descritta da Cobbold e Lee nel 1991. Le cellule sono state piastrate su vetrini che sono stati posizionati all'interno di una camera di perfusione posta a stretto contatto con un fotomoltiplicatore con amplificatore- discriminatore incorporato. Il segnale di uscita dall'amplificatore-discriminatore viene raccolto da un contatore di fotone EMI C660, inviato ad un computer e registrato per una successiva analisi. La camera di perfusione è termostata a 37°C e perfusa tramite una pompa peristaltica con le soluzioni fisiologiche a base di KRB. La conversione del segnale di fluorescenza in valori di concentrazione di Ca^{2+} è stato calibrato tramite un programma costruito su un modello matematico presentato da Brini *et al.*, 1995.

5. IL SISTEMA DEL DOPPIO IBRIDO

Il sistema del doppio ibrido permette lo studio di interazioni proteina-proteina e può essere usato sia nel caso si voglia testare l'interazione di 2 proteine clonate precedentemente, sia nel caso che si voglia fare uno "screening" di una libreria per un gene che codifica per una nuova proteina partner che interagisce con una proteina nota. Questo saggio si basa sul fatto che tanti regolatori trascrizionali eucariotici sono composti da domini funzionalmente indipendenti che in genere contengono: un dominio che lega il DNA (DNA-BD) che si lega ad una specifica sequenza sul promotore e un dominio attivatore (AD) che permette al complesso II della RNA polimerasi di trascrivere i geni a valle del sito di legame con il DNA. Tutti e due i domini sono richiesti nell'attivazione di un gene e normalmente sono parte integre di una proteina. Se separati con metodi di tecnologia di DNA ricombinante ed espressi nella stessa cellula ospite, il DNA-BD ed AD non interagiscono direttamente uno con l'altro, quindi non possono attivare i geni reporter (Brent e Ptashne, 1985). Comunque se questi 2 domini vengono portati in prossimità al promotore, la funzione dell'attività trascrizionale viene ristabilita. In principio l'AD di un regolatore trascrizionale potrebbe essere accoppiato con qualsiasi DNA-BD di un'altra proteina per attivare la trascrizione dei geni (Brent e Ptashne, 1985). Questo meccanismo viene sfruttato nel sistema del doppio ibrido. Nel sistema del doppio ibrido LexA, il DNA-BD è la proteina procariotica LexA che normalmente funziona come un repressore dei geni SOS in *E.coli* (nel doppio ibrido non agisce da repressore), mentre l'AD è un peptide (B42) che si trova in *E.coli* e che attiva la trascrizione nei lieviti. Per generare la fusione del cDNA di questi domini con il cDNA dei geni che codificano per proteine che sono dei potenziali interattori sono stati usati 2 vettori di clonaggio diversi. Un'eventuale interazione tra le 2 proteine (una fusa al DNA-BD e l'altra al AD) porterebbe vicino il DNA-BD e l'AD creando in questo modo un nuovo attivatore di trascrizione con affinità per gli operatori LexA (Fig.6.1). Questo fattore di trascrizione attiva geni reporter che hanno a monte operatori LexA e questo permette la "visualizzazione" di un'eventuale interazione di proteine. Il sistema LexA usa 2 diversi geni reporter: *LEU2* e *lacZ* sotto il controllo di diversi operatori LexA. Il gene reporter *LEU2* si trova integrato nel genoma del lievito e permette al ceppo di lievito EGY48 che è auxotrofico per l'amminoacido leucina di crescere nel terreno di coltura quando viene trasformato con i plasmidi che codificano per 2 proteine interattrici. Il gene reporter *lacZ* se attivato nei lieviti EGY48 produce la β -galattosidasi, l'attività della quale può essere monitorata mettendo Xgal nel terreno di coltura di lieviti.

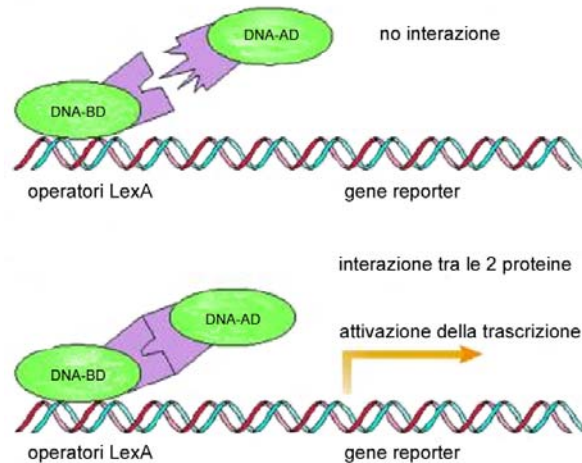


Fig. 6.1 Il sistema del doppio ibrido LexA. L'interazione tra il dominio che lega il DNA (DNA-BD) fusa in codice di lettura con la proteina di interesse e il dominio di attivazione fusa con un'eventuale proteina partner nota o espressa dal cDNA di una libreria costituisce un fattore di trascrizione che può attivare la trascrizione dei geni reporter.

5.1 I ceppi di lieviti

Il ceppo di lievito usato nel sistema del doppio ibrido è *Saccharomyces cerevisiae* EGY48 con il genotipo *MAT α* , *ura3*, *trp1*, *his3*, LexAop(x6)-LEU2, dove le mutazioni *his3*, *trp1*, *ura3* sono delle delezioni. Contiene il gene reporter *LEU2* che codifica per l'amminoacido leucina sotto un promotore con 6 copie di operatori LexA

5.2. Plasmidi

- **pGilda** il vettore di clonaggio che contiene la proteina esca. In questo vettore le diverse esche costruite sono state fuse in frame con la proteina da 202aa LexA. L'espressione delle proteine di fusione viene controllato dal promotore inducibile nei lieviti *GAL1*: la trascrizione della proteina esca viene repressa in presenza di glucosio e viene indotta in presenza di galattosio. Il vettore contiene 2 geni marcatori di selezione: per i lieviti il gene *HIS3* che codifica per l'amminoacido istidina e l'ampicillina nei batteri.
- **pSH18-34** contiene il promotore *GAL1* con 8 operatori LexA a monte del gene reporter che codifica per la β -galattosidasi. Il vettore contiene il gene che codifica per *URA3* per la selezione nei lieviti e il gene che codifica per l'ampicillina per la selezione in *E.coli*.
- **pYESTrp2** contiene: il dominio di attivazione (AD) B42 che è fuso in "frame" di lettura con la proteina "preda" o con il cDNA della libreria usata nello screening

per interattori proteici.; una sequenza per l'attivazione della trascrizione dei geni reporter e una sequenza segnale per la localizzazione nucleare (NLS) allo scopo di indirizzare le proteine di fusione B42/preda nel nucleo. Il vettore contiene il gene *TRP1* che codifica per il triptofano per la selezione nei lieviti e il gene per l'ampicillina per la selezione in *E.coli*. Il sito di "polilinker" nel vettore contiene 11 unici siti di restrizione incluso il sito non-palindromico BstX I per il clonaggio unidirezionale della libreria.

5.3 La libreria di cDNA

La libreria "Hybrid Hunter Premade cDna library" di cDNA usato nello screening per interattori con le pompe PMCA1 e PMCA3 usato nel saggio del doppio ibrido è stato acquistato dalla ditta Invitrogen ed ha le seguenti caratteristiche:

- provenienza di RNA: mRNA dal cervello umano normale (maschio adulto di 27 anni)
- il peso molecolare medio dei cloni: 0.3-1.6 Kb

5.4 Materiali e reagenti

- Terreno di coltura ricco, YPD: 20 g/L peptone, 10 g/L estratto di lievito, 20 g/L agar (solo per le piastre).
- Terreno di coltura minimale SD: 6.7 g/L di terreno di coltura senza amminoacidi (Yeast Nitrogen Base without aminoacids, Clontech), 100ml/L Dropout solution 10x (Clontech), 2% glucosio o 2% galattosio e 1% raffinoso, 20 g/L agar (solo per le piastre). Il terreno di coltura SD medium viene usato come terreno di base dove vengono aggiunte altre sostanze: istidina (20 mg/mL), leucina (10 mg/mL), triptofano (20 mg/mL) e uracile (20 mg/mL) a seconda dei cloni trasformanti da selezionare.
- soluzione salina BU10x: 70 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 g/L NaH_2PO_4 , pH = 7
- 20mg/mL Xgal: (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside in N-N dimethylformamide) (Applichem)
- soluzione PEG/LiAc (polyethylene glycol/lithium acetate): 40% PEG 4000, TE1X, LiAc 1X
- 10mg/mL DNA spezzato di sperma di salmone come vettore per la trasformazione nei lieviti (Herring testes carrier DNA, Clontech): deve essere denaturato prima dell'uso.

5.5. La costruzione delle esche nel vettore pGILDA

La parte N-terminale di 90 aa della hPMCA3a e PMCA1b è stato amplificato tramite PCR usando i seguenti oligonucleotidi (Sigma-Aldrich):
senso: 5'cgGGATCCtgggcatgg-3'

.antisenso: 5'-cgCTCGAGtataaaattctttcca-3' per PMCA1b; per PMCA3a .senso: 5'-cgGGATCCtgggcgacatgg-3', antisenso: 5'-cgCTCGAGgatgaagttctgccg-3'. I prodotti di PCR amplificati sono stati clonati in frame con il cDNA che codifica per la proteina LexA nei siti di restrizione *BamHI/XhoI* nel vettore di clonaggio pGilda. Per generare pGilda/PMCA1.1 e pGilda/PMCA1.2 (i primi 45aa della parte N-terminale della PMCA1 e gli ultimi 45aa della parte N-terminale di PMCA1) sono stati usati i seguenti primers: senso 5'-cgGGATCCtgggcgacatgg-3' e antisenso 5'-cgCTCGAGtgcacatctgtgga-3' per l'amplificazione di PMCA1.1 e senso 5'-cgGGATCCtacgaaaatac-3' e antisenso 5'-cgCTCGAGtataaaattctttcca per l'amplificazione di PMCA1.2. Per il clonaggio di PMCA4.1, PMCA4.2 e PMCA4.36/83 sono stati usati rispettivamente i seguenti primers: senso: 5'-cgGAATTCacgaacccatca-3' e antisenso 5'-cgGGATCCgacattaatctg 3' per PMCA4.1; senso 5'-cgGAATTCcactatggaggt-3' e antisenso 5'-cgGGATCCcttgggctttt-3' per PMCA4.2; senso 5'-ggcGAATTCcgttcgagggatgca-3' e antisenso 5'-ccgGGATCCgttgtgtccaaacac-3' per PMCA4.36/83. PMCA4.1, PMCA4.2 e PMCA4.36/83 sono stati clonati *in frame* con LexA nel vettore di clonaggio pGilda nei siti di clonaggio *EcoRI/BamHI*.

5.6. La trasformazione dei lieviti

Per la trasformazione dei lieviti è stato usato il metodo di litio acetato. Questo metodo è basato sul fatto che cationi alcalini rendono permeabile la parete cellulare di lieviti al DNA. Dopo aver incubato per poco tempo i lieviti nella soluzione di litio acetato, è stato aggiunto il DNA da trasformare assieme al DNA "carrier" da sperma di salmone. L'aggiunta di PEG che aumenta la pressione osmotica e il shock termico provocano l'entrata del DNA nel lievito.

5.6.1 La preparazione dei lieviti competenti

I lieviti sono stati cresciuti in 5ml di terreno di coltura YPD o di terreno SD opportuno e incubati per tutta la notte a 30°C in agitazione (250rpm). Il giorno dopo la coltura è stata diluita fino a OD₆₀₀= 0.1-0.2 e lasciata crescere fino ad un OD₆₀₀=0.5-0.6. La coltura cellulare è stata trasferita in tubi da 50ml e centrifugati per 5' a 3000rpm a RT. Il pellet che contiene le cellule di lievito è stato lavato 2-3 volte con H₂O sterile e successivamente risospeso in 1.5ml di soluzione TE1X/LiAc1X fresco.

5.6.2 Trasformazione delle cellule di lieviti competenti

100µl di cellule competenti sono stati mescolati con 0.1-0.5µg di DNA, 0.1mg di DNA di sperma di salmone e 600µl Peg/LiAc. La miscela è stata incubata a 30°C in agitazione. Dopo 30' è stato aggiunto 70µl di DMSO e le cellule sono state sottoposte a shock termico per 15' a 42°C. Le cellule sono state messe in ghiaccio per 1-2', centrifugate e risospese in 0.5ml di TE1X. Le cellule sono state incubate a 30°C per almeno 2 giorni fino alla comparsa di colonie trasformanti.

5.7 Preparazione di estratti proteici da lieviti

I lieviti sono stati cresciuti per tutta la notte nel terreno di coltura SD opportuno. Il giorno dopo, la coltura è stata diluita fino ad un OD₆₀₀= 0.1-0.2 ed è stata lasciata a crescere fino a raggiungere un OD₆₀₀=0.4-0.6. La coltura cellulare è stata centrifugata a 13000rpm per 3' a RT e il pellet è stato risospeso in tampone di corsa elettroforetica Laemmli e bollito a 100°C per 5'. Le proteine sono state analizzate tramite SDS-PAGE e Western Blotting.

5.8 Lo screening della libreria a cDNA

I lieviti *EGY48* già trasformati con pGilda/esca e il plasmide pSH18-34 che codifica per il gene reporter lacZ sono stati co-trasformati con 50µg della libreria di cervello umana e piastrate in 25 piastre 24x24 cm nel terreno di coltura SD-HUT con agar in presenza di glucosio come fonte di carbone. Le piastre sono state lasciate nell'incubatore a 30°C fino alla comparsa di colonie trasformanti. Le piastre con le colonie trasformanti sono state messe a 4°C per 12 ore in modo che il terreno con agar si solidificasse e in seguito le colonie sono state staccate dalle piastre e raccolte nella soluzione tampone TE1X (Tris-EDTA). Tutti i cloni trasformanti raccolti sono stati raccolti in tubi da centrifuga da 50 ml (Falcon). La libreria amplificata è stata conservata a -80°C in una soluzione sterile preparata in questo modo: 65% v/v glicerolo, 100mM MgSO₄, 25mM Tris pH=8.0. Per lo screening della libreria, i lieviti trasformanti nella soluzione di congelamento al glicerolo sono stati piastrati alla densità 0.5x10⁶ cellule per piastra in piastre con agar nel terreno di coltura selettivo SD/Gal/Raf/-HUTL e incubati a 30°C fino alla comparsa di colonie positive. Le colonie positive sono state messe in terreno di coltura selettivo per l'attivazione del gene reporter lacZ: SD/Glu-HUT+Xgal, SD/Glu-HUTL+Xgal, SD/Gal/Raf-HUT+Xgal, SD/Gal/Raf-HUTL+Xgal. Per monitorare l'attivazione del gene reporter lacZ è stato aggiunto nelle piastre la soluzione salina BU per il mantenimento di un valore di pH

ottimale per l'attività di β -galattosidasi e per fornire i ioni fosfati necessari per questo saggio.

5.9 Estrazione di DNA da lieviti

I plasmidi di DNA sono stati estratti dai lieviti con il kit di estrazione di DNA per lieviti "Y-DER Yeast DNA Extraction Reagent Kit" (Pierce Biotechnology). In seguito il DNA plasmidici sono stati trasformati nei batteri *E.coli*, estratti, sequenziati ed analizzati.

6. ANALISI BIOINFORMATICA

Le sequenze delle 4 pompe PMCA sottoposte all'analisi bioinformatica sono state ricavate da UniProt (Boeckmann *et al.*, 2003). I numeri di accesso in banca dati sono i seguenti: J04027 (PMCA1), M97260 (PMCA2), Q16720 (PMCA3) and M25874 (PMCA4). Le sequenze sono state allineate tramite il programma ClustalW (Thompson *et al* 1994).

L'analisi della struttura secondaria è stato effettuata con SPRITZ (Vullo *et al.*, 2006). Il diagramma idropatico (helical wheel analysis) è stato condotto con il servizio URL: <http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/>. La predizione del sito putativo di interazione con la proteina 14-3-3 è stato predetto tramite il programma ELM (Puntervoll *et al.*, 2003).

RISULTATI

I. RICERCA DI INTERATTORI MOLECOLARI DELLA PMCA ISOFORMA SPECIFICI

L'identificazione di proteine interattrici isoforma specifiche potrebbe contribuire a chiarire il ruolo delle numerose isoforme di PMCA presenti nella cellula eucariote. Come illustrato nell'Introduzione, fino ad oggi sono state identificate alcune di queste proteine, la maggior parte delle quali interagisce con la PMCA attraverso la sua porzione C-terminale e non in maniera isoforma specifica. Anche il nostro laboratorio ha contribuito all'identificazione di un partner molecolare per la PMCA, la proteina 14-3-3, attraverso esperimenti di screening di una libreria di cervello umana mediante il saggio del doppio ibrido in lievito. Lo screening ha individuato l'isoforma ϵ della proteina 14-3-3 come interattore specifico della PMCA4, ma non per PMCA2 (Rimessi et al., 2005). Esperimenti effettuati in linee cellulari hanno dimostrato che la proteina 14-3-3 ϵ ha un effetto inibitorio sulla attività della pompa PMCA4. Si è quindi deciso di estendere lo studio anche alle altre due isoforme: l'isoforma ubiquitaria PMCA1 e l'isoforma neuronale PMCA3. Anche in questo caso, la regione N-terminale di 90 aa, usata precedentemente per le 2 altre isoforme, è stata usata come esca per lo screening nel saggio del doppio ibrido.

1. CARATTERIZZAZIONE DELLE ESCHE

1.1 Controllo della idoneità delle sonde

La regione che codifica la parte N-terminale di 90 aa della isoforma 1 umana di PMCA (hPMCA1 o P1) e dell'isoforma 3 umana (hPMCA3 o P3) è stata clonata nel vettore di espressione per il lievito pGILDA "in frame" di lettura con LexA (il dominio che lega il DNA), in modo da produrre una proteina di fusione da usare come sonda.

Prima di effettuare lo screening della libreria di cervello umana ed il saggio di interazione diretta con la proteina 14-3-3 ϵ , le sonde sono state testate per valutare la loro idoneità per il saggio del doppio ibrido. I controlli effettuati servono per stabilire se la proteina di fusione (esca con LexA, la proteina che lega il DNA (vedi materiali e Metodi)) 1) viene espressa nei lieviti; 2) attiva la trascrizione dei geni reporter in modo non specifico (test di autoattivazione).

1.1.1 Controllo dell'espressione proteica delle esche

Il test per controllare il livello di espressione delle esche è stato effettuato per stabilire se le proteina di fusione, (LexA-P1 e LexA-P3) vengono espresse come proteine stabili nei lieviti, in quanto alcune proteine di fusione possono essere riconosciute e degradate dalle proteasi endogene del lievito. Per fare questo i lieviti (*S. cerevisiae*, ceppo EGY48) sono stati trasformati con i plasmidi che codificano le proteine di interesse. (pGilda-P1 e pGilda-P3) cresciuti in un terreno selettivo contenente glucosio o galattosio come fonte di carbonio. Da questi lieviti sono stati preparati estratti proteici da analizzare per Western Blotting. Le proteine totali sono state separate tramite gel elettroforesi SDS-PAGE e trasferite sul filtro di nitrocellulosa. Il filtro è quindi stato incubato con un anticorpo primario anti-LexA. La Figura 1.1 mostra l'espressione delle proteine di fusione: si osserva l'espressione solo nei lieviti cresciuti in presenza di galattosio (necessario ad indurre l'espressione proteica), ma non in quelli cresciuti in presenza di glucosio (che invece reprime l'espressione della proteina di fusione).

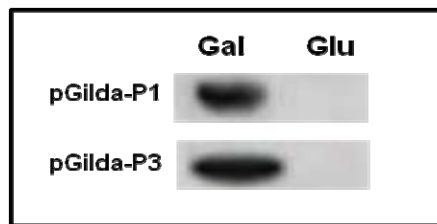


Fig 1.1. Espressione proteica di LexA-P1 e LexA-P3 nei lieviti. I lieviti sono stati cresciuti in medium selettivo (SD) con galattosio (gal) o glucosio (glu). Gli estratti proteici sono stati sottoposti a SDS-PAGE ed incubati con un anticorpo primario anti-LexA.

1.1.2 Test di autoattivazione

Questo test è molto importante in quanto consente di verificare se l'esca attiva la trascrizione dei geni reporter nei lieviti in assenza del dominio di attivazione (AD) e di determinare quindi la qualità dell'esca costruita. I geni reporter normalmente utilizzati sono *Leu2*, che codifica l'amminoacido leucina e la cui attivazione consente alle colonie di lievito di crescere in terreno selettivo senza questo amminoacido essenziale, ed il gene reporter *LacZ* che codifica l'enzima β -galattosidasi che, se attivo ed in presenza di un substrato cromogeno, conferisce colore blu intenso alle colonie di lievito. Per controllare l'attività del gene reporter *Leu2* i lieviti EGY48 precedentemente trasformati con il plasmide pSH18-34 che codifica la β -galattosidasi, sono stati trasformati con i vettori

pGilda-P1 o pGilda-P3 e piastrati su medium selettivo con galattosio in assenza di istidina, uracile e leucina. Le piastre sono state incubate a 30°C per 3 giorni. Dopo 3 giorni di incubazione nelle piastre con EGY48/pGilda-P1 erano cresciute delle colonie, mentre nel caso di EGY48/pGilda-P3 non è stato osservato crescita di colonie.

Per testare l'attivazione dell'altro gene reporter *lacZ*, i lieviti EGY48/pSH18-34 trasformati con pGilda-P1 e pGilda-P3 sono stati piastrati su terreno selettivo in assenza di uracile ed istidina ed in presenza del substrato cromogeno 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galattoside (X-gal) che quando viene scisso dall'enzima β -galattosidasi sviluppa colore blu. Le piastre sono state incubate a 30°C ed analizzate per lo sviluppo del colore blu. Le colonie ottenute dalle piastre con EGY48/pSH18-34/pGilda-P1 hanno sviluppato un colore blu intenso dopo 12h, mentre le colonie dei lieviti dalla piastra EGY48/pSH18-34/pGilda3 erano bianche (Fig. 1.2).

L'esca P1 attiva quindi sia il gene reporter *Leu2* che *LacZ*. Lo sviluppo del colore blu intenso è un'indicazione che la trascrizione del gene reporter *LacZ* avviene in maniera significativa. Quindi questa esca non è risultata idonea per il saggio del doppio ibrido in lievito nello screening della libreria del cervello per la ricerca di partner proteici. L'esca P3 non ha attivato invece nessuno dei due geni reporter e quindi è stata usata per gli esperimenti nel saggio del doppio ibrido in lievito.

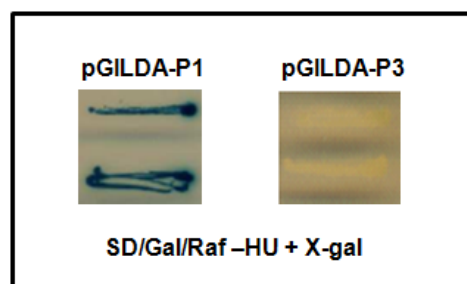


Fig 1.2 Il test di autoattivazione per pGilda-P1 e pGilda-P3. I lieviti EGY48/pSH18-34 sono stati trasformati con i vettori pGilda-P1 e pGilda-P3 e piastrati in un medium selettivo (SD) in assenza di istidina e uracile ed in presenza di X-gal, galattosio e raffiniosio come fonte di carbonio (SD/Gal/Raf-HU +X-gal).

1.1.3 Clonaggio e caratterizzazione delle esche P1.1 e P1.2

Considerato che l' esca P1 attiva tutti i due i geni reporter *Leu2* e *LacZ* in assenza del dominio di attivazione (AD), si è deciso di verificare quale porzione della esca P1 fosse responsabile della auto attivazione dei geni reporter *Leu2* e

LacZ. Per questo l'esca è stata divisa in 2 porzioni uguali da 45aa: la parte N-terminale dall'amminoacido 1 al 45, P1.1 e la parte C-terminale dall'amminoacido 46 al 90, P1.2. I lieviti EGY48/pSH18-34 sono stati trasformati con pGILDA-P1.1 e pGILDA-P1.2 e piastrati in terreni selettivi come descritto prima. I test di auto-attivazione ha dimostrato che solo l'esca P1.1 attiva la trascrizione dei geni reporter (Fig.1.3).

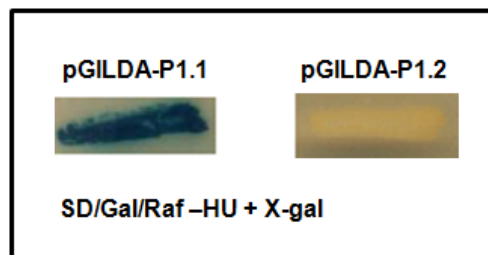


Fig.1.3 Il test di autoattivazione per pGILDA-P1.1 e pGILDA-P1.2. I lieviti EGY48/pSH18-34 sono stati trasformati con pGILDA-P1.1 e pGILDA-P1.2 e piastrati in medium selettivo (SD/Gal/Raf/ -HU +X-gal) e controllati per lo sviluppo del colore blu.

Anche se l'esca P1.2 è risultata idonea per il saggio del doppio ibrido si è preferito non utilizzarla nello screening della libreria del cervello perché avendo una lunghezza di soli 45aa avrebbe avuto poche probabilità di identificare degli interattori tramite questo tipo di saggio. E' stata invece utilizzata per testare direttamente l'interazione con la proteina 14-3-3 ϵ precedentemente individuata nei saggi di doppio ibrido con l'esca per l'isoforma 4 della PMCA (Rimessi *et al.*, 2005).

2. TRASFORMAZIONE DELLA LIBRERIA E SCREENING PER LA RICERCA DI INTERATTORI SPECIFICI DELLA POMPA PMCA3

L'esca P3 che contiene la parte N-terminale della PMCA3 è stata usata per lo screening di una libreria di cervello umana con il sistema del doppio ibrido in lievito alla ricerca di interattori proteici specifici per l'isoforma 3 della PMCA. I lieviti EGY48/pSH-18-34/pGILDA-P3 cresciuti tutta la notte a 30°C in medium selettivo (SD/glu -HU) sono stati trasformati con la libreria di cervello umana. Le colonie trasformanti sono state piastrate in terreno selettivo SD/glu/-HUT e incubati per 3-4 giorni a 30°C. Le colonie cresciute sono state raccolte e testate successivamente per l'attivazione dei 2 geni reporter *Leu2* e *LacZ*. Lo screening di 4×10^6 cloni di libreria umana non ha prodotto risultati positivi. Quindi non sono stati individuati interattori della PMCA3.

3. INTERAZIONE DIRETTA DELLE ESCHE CON 14-3-3 ϵ

Considerato che lo screening non aveva prodotto risultati positivi nella ricerca di interattori per la pompa PMCA3 e che l'esca per la PMCA1 non era idonea allo screening della libreria abbiamo deciso di verificare, mediante un saggio di interazione diretta, se anche queste due isoforme interagivano con la proteina 14-3-3 \square identificata precedentemente nel nostro laboratorio nei saggi di doppio ibrido come un interattore della isoforma 4 della PMCA (Rimessi et al., 2005).

3.1 Interazione tra PMCA1 e 14-3-3 ϵ

Per stabilire se PMCA1 interagisce con 14-3-3 ϵ , i lieviti EGY48/pSH18-34 sono stati co-trasformati con il plasmide pGILDA-P1.2 e il plasmide per l'espressione della proteina 14-3-3 ϵ e del dominio di attivazione (pYESTrp/14-3-3 ϵ) pYESTrp/14-3-3 ϵ e poi piastrati in terreni selettivi (SD) per controllare l'attivazione dei geni reporter. Nelle piastre in assenza di leucina, non sono cresciute colonie, quindi il gene reporter *Leu2* non viene attivato e nelle piastre con SD medium in presenza di X-gal, le colonie cresciute erano bianche, indicazione che non è avvenuta nemmeno l'attivazione dell'altro gene reporter *LacZ*.

Questi risultati suggeriscono che l'esca P1.2 non interagisce con 14-3-3 \square .

3.2 Interazione tra PMCA3 e 14-3-3 ϵ

I lieviti EGY48/pSH18-34 sono stati co-trasformati con pGILDA-P3 e pYESTrp/14-3-3 ϵ e successivamente sono stati piastrati in SD medium e testati per l'attivazione dei 2 geni reporter *Leu2* e *LacZ*. La comparsa di colonie bianche in piastre con SD medium per l'attivazione del gene reporter *Leu2* e di colonie color blu in piastre con SD medium in presenza di X-gal per l'attivazione del *LacZ* dimostrano che PMCA3 interagisce con la proteina 14-3-3 ϵ nel sistema del doppio ibrido (Fig.3.1).

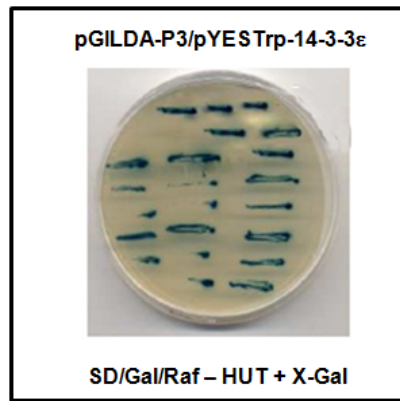


Fig.3.1 Test di interazione diretta con il saggio del doppio ibrido tra PMCA3 e 14-3-3 ϵ . I lieviti EGY48/pSH18/34 sono stati trasformati con i plasmidi pGILDA-P3 e pYESTrp/14-3-3 ϵ . Successivamente sono stati piastrati in piastre con SD medium in presenza di X-gal. Lo sviluppo del colore blu indica interazione fra le 2 proteine di interesse.

4. CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE DI PMCA3 E PMCA1 CON LA PROTEINA 14-3-3 ϵ

Prima di escludere definitivamente la possibilità di interazione tra PMCA1 e proteina 14-3-3 ϵ nell'ambiente cellulare e per confermare invece che l'interazione tra PMCA3 e 14-3-3 ϵ avviene anche nell'ambiente nativo sono stati effettuati degli esperimenti di co-immunoprecipitazione. Per questi esperimenti sono state usate cellule umane della linea cellulare HeLa, che esprimono la proteina 14-3-3 ϵ in elevata quantità. Le cellule HeLa sono state trasfettate transientemente con plasmidi di espressione che codificano rispettivamente l'isoforma 3 (pcDNA3/PMCA3) e l'isoforma 1 della PMCA (pSG5/PMCA1). Gli estratti proteici delle cellule trasfettate (500 μ g) sono stati incubati con un anticorpo monoclonale anti-PMCA (5F10) a 4°C per 3h in agitazione per permettere il legame tra anticorpo e PMCA. Successivamente agli estratti proteici è stata aggiunta la resina di sefariosio coniugata con proteine A/G e sono stati incubati tutta la notte in agitazione a 4°C. Gli immunoprecipitati sono stati sottoposti a SDS-PAGE e analisi di Western Blot. Le proteine sono state trasferite su filtro di nitrocellulosa ed incubate con un anticorpo anti-14-3-3 ϵ . Come si può vedere nella Fig. 4.1 PMCA3 e PMCA1 co-immunoprecipitano assieme alla proteina 14-3-3 ϵ endogena. Nella figura viene mostrata solo la forma monomerica della proteina 14-3-3 ϵ .

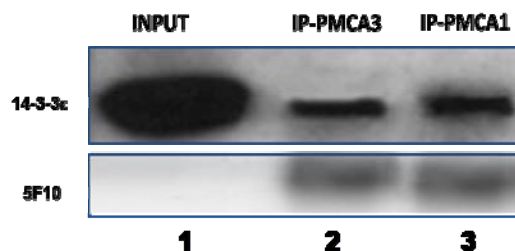


Fig. 4.1 Interazione tra la proteina 14-3-3 ϵ e le pompe PMCA1 e PMCA3. . Nella corsia 1 è stato caricato l'estratto proteico di cellule non trasfettate usato come input. Nella corsia 2 e 3 sono stati caricati gli immunoprecipitati (IP) rispettivamente per PMCA3 e PMCA1. Gli IP sono stati incubati con un anticorpo 14-3-3 ϵ e con l'anticorpo contro la PMCA, 5F10.

5. ANALISI DI CO-IMMUNOLOCAZZAZIONE TRA PMCA E 14-3-3 ϵ

Per rinforzare le conclusioni ottenute dagli esperimenti di co-immunoprecipitazione, le interazioni tra le PMCA e 14-3-3 ϵ sono state testate anche tramite saggi di immunocitochimica in cellule CHO. Le cellule CHO sono state trasfettate transientemente con i vettori che esprimono PMCA3 e GFP-14-3-3 ϵ o PMCA1 e GFP-14-3-3 ϵ . L'espressione delle pompe PMCA3 e PMCA1 è stata rilevata mediante incubazione con l' anticorpo primario 5F10 (che riconosce tutte le isoforme di PMCA) e con l'anticorpo secondario anti-topo coniugato con il cromoforo Alexa Fluor594. Le proteine 14-3-3 ϵ sono state rilevate tramite la fluorescenza della proteina GFP con cui sono fuse in "frame" di lettura. La sovrapposizione delle immagini rivela che PMCA3 e PMCA1 co-localizzano con la proteina 14-3-3 ϵ a livello della membrana plasmatica. La co-localizzazione è indicata dal colore arancione. La Fig. 5.1 mostra che le pompe PMCA1 e PMCA3 sono distribuite solamente nella membrana plasmatica, mentre il segnale fluorescente di 14-3-3 ϵ è diffuso anche nella citoplasma.

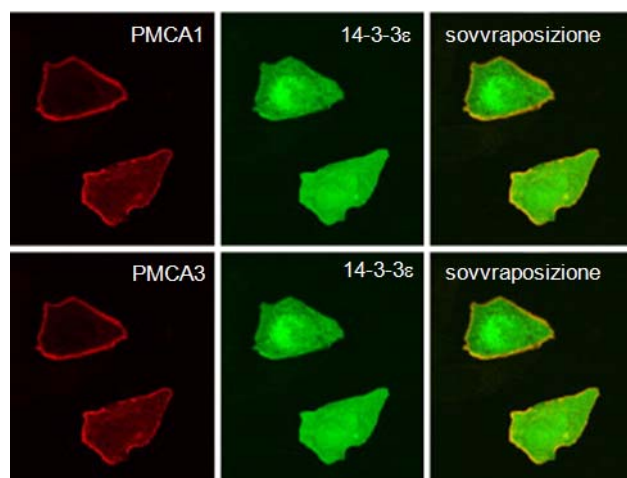


Fig. 5.1. Immunolocalizzazione di PMCA1 e PMCA3 con 14-3-3 ϵ in cellule CHO. Le pompe PMCA1 e PMCA3 sono state visualizzate tramite incubazione con un anticorpo primario 5F10 e

l'anticorpo secondario anti-topo coniugato con il cromoforo AlexaFluor594 (rosso). La proteina 14-3-3 ϵ è stata rilevata tramite la fluorescenza della proteina GFP (verde). Le immagini a destra mostrano la sovrapposizione delle 2 immagini a sinistra.

6. INTERAZIONI *IN VITRO* TRAMITE LE PROTEINE 14-3-3 CON PMCA1 E PMCA3

Le interazioni tra 14-3-3 ϵ con le pompe PMCA1 e PMCA3 sono state ulteriormente verificate tramite l'approccio *in vitro* di GST pull-down. Il saggio di GST-pull down è stato condotto anche per altre isoforme della proteina 14.3.3, in particolare per le isoforme β , θ , σ , e ζ oltre alla isoforma ϵ .

La porzione N-terminale di 90aa della PMCA1 e PMCA3 è stata fusa "in frame" di lettura con la proteina GST nel vettore di espressione pGEX4T1 ed espressa in cellule BL21 come descritto nella sezione Materiali e Metodi.

6.1 Produzione di proteine di fusione GST-P1 e GST-P3

La produzione di elevate quantità di proteine solubili fuse con GST per il saggio di GST pull-down richiede l'ottimizzazione di diversi parametri. Quindi i primi esperimenti sono stati indirizzati verso la messa a punto di questi parametri come: la densità cellulare al tempo di induzione, la concentrazione di induttore (isopropil1-tio- β -D-galattopiranoside, IPTG), la temperatura e la durata dell'induzione. E' stato valutato che 3 ore di incubazione e induzione con 1mM IPTG a 30 °C dei batteri in fase esponenziale di crescita ($OD_{600} \sim 0,6$) sono sufficienti per una espressione ottimale delle proteine solubili GST-P1 e GST-P3.

Le proteine GST-PMCA1 e GST-PMCA3 sono state purificate tramite incubazione con resina di sefarosio coniugata con glutatione. La concentrazione e l'integrità delle proteine di fusione sono state stimate tramite SDS-PAGE e colorazione con Commassie Blue (Fig. 6.1). Per il saggio di GST pull-down è stata preparata una coltura batterica di 500ml. Dopo 3 h di induzione con IPTG a 30°C sono stati ottenuti 0,5-1 mg/ml di proteine fuse GST-P1 e GST-P3.

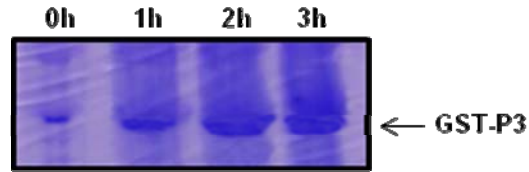


Fig. 6.1 L'espressione delle proteine GST-P3 in cellule BL21. L'espressione delle proteine GST-P3 nelle colture batteriche è stata controllata dopo ogni ora in seguito all'induzione con IPTG. Le proteine di fusione sono state analizzate tramite SDS-PAGE e colorazione dei gel con Blue Comassie.

6.2 Saggio di GST pull-down per la ricerca di interazione tra proteina 14-3-3 ϵ e le pompe PMCA1 e PMCA3

Le proteine di fusione GST-PMCA1 e GST-PMCA3 purificate sono state incubate con estratti proteici di cellule HeLa. In questo saggio sono state utilizzate cellule HeLa in quanto esprimono quantità elevate di proteina 14-3-3 ϵ endogena. Come mostrato nella Fig. 6.2 le proteine 14-3-3 ϵ interagiscono con PMCA1 e PMCA3 *in vitro*. La proteina 14-3-3 ϵ esiste sia nella forma monomerica (30 kDa) che nella forma dimerica (60 kDa). Dall'immagine (Fig. 6.2) si può vedere che PMCA1 e PMCA3 interagiscono con tutte e due le forme della proteina 14-3-3 ϵ . Tuttavia, nella maggior parte degli esperimenti sembra favorita l'interazione con la forma monomerica.

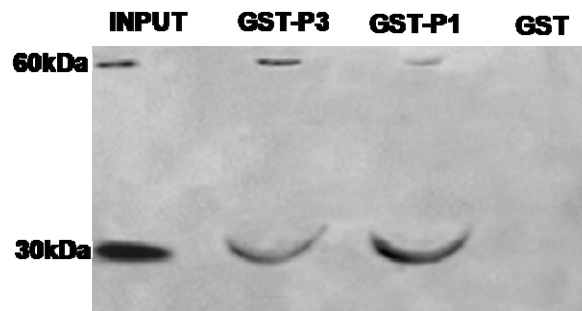


Fig. 6.2. Interazione tra 14-3-3 ϵ e le pompe PMCA1 e 3 con il saggio di GST pull-down. Aliquote uguali di lisati cellulari HeLa sono stati incubate con le proteine GST-P1 e GST-P3 legate con la resina di sefarosio, Dopo incubazione le proteine sono state separate in gel NuPage Bis Tris 12% e rivelate tramite anticorpo anti-14-3-3 ϵ . Nel gel è stato caricato anche l'estratto proteico di cellula HeLa (INPUT) e anche GST da solo (GST).

6.3 Saggio di GST pull-down per la ricerca di interazione tra le altre isoforme della proteina 14-3-3 e le pompe PMCA1 e PMCA3

Nelle cellule HeLa esistono diverse isoforme della proteina 14-3-3. Per vedere se anche altre isoforme della 14-3-3 interagiscono con le proteine PMCA1 e PMCA3 sono stati effettuati altri esperimenti di GST pull-down utilizzando anticorpi specifici per le isoforme β , θ , σ , e ζ della proteina 14-3-3. Gli estratti proteici di cellule HeLa sono stati incubati come prima con le proteine GST-P1 e GST-P3 legati con resina di sefarosio. Dopo la separazione delle proteine con SDS PAGE, le eventuali bande delle diverse isoforme della proteina 14-3-3 sono stati rivelati con anticorpi isoforma specifici.. Di tutte le isoforme testate solo l'isoforma ζ interagisce con PMCA3, ma non con PMCA1 (Fig. 6.3A). L'interazione con PMCA3 è stata osservata sia per la forma monomerica che per quella dimerica della proteina 14-3-3 ζ . Il fatto che PMCA3 interagisce con tutte e due le isoforme ε e ζ della proteina 14-3-3 è consistente con il fatto che le due isoforme possono formare eterodimeri sia *in vivo* che *in vitro*. Le altre isoforme della proteina 14-3-3 (β , θ , σ) non hanno dato risultati positivi (Fig. 6.3B).



Fig. 6.3 Esperimenti di GST Pull-down per verificare l'interazione tra le pompe PMCA1 e PMCA3 e le diverse isoforme di proteina 14-3-3 rispettivamente. Le proteine di fusione GST-PMCA1 e GST-PMCA3 sono state espresse in cellule BL21 e purificate tramite incubazione con resina di Sefarosio coiniugata con glutatione. In seguito aliquote uguali di lisati cellulari ottenuti cellule HeLa sono state incubate con la resina di sefarosio–glutatione legata a GST-PMCA3 o GST-PMCA1, il lisato da solo (INPUT) o con GST da solo. Le proteine legate sono state rilevate tramite anticorpo contro le isoforme specifiche delle proteine 14-3-3: A) incubazione con l'anticorpo anti-14-3-3 ζ ; B) incubazione con gli anticorpi contro le isoforme β , θ , σ .

7. ANALISI BIOINFORMATICA DELLA REGIONE N-TERMINALE DI 90 AMMINOACIDI DELLE DIVERSE ISOFORME DELLA POMPA PMCA

7.1 Identificazione di un sito consenso per il legame della proteina 14-3-3

Tutte le isoforme della PMCA, tranne l'isoforma 2 interagiscono con la proteina 14-3-3 ϵ . Per spiegare la ragione per cui la PMCA 2 non interagisce con la proteina 14-3-3, è stata condotta un'analisi bioinformatica sulla regione N-terminale di 90aa (usata come esca nel saggio del doppio ibrido) di ciascuna isoforma. L'analisi condotta con il programma ELM ha rilevato una regione di consenso per l'interazione con proteine 14-3-3 in tutte le 4 isoforme della pompa PMCA: la sequenza amminoacidica [R/K]RLKTSP (Fig. 7.1A). Questa sequenza consenso giace vicino a 2 sequenze che si organizzano con un struttura secondaria ad α -elica e, sorprendentemente, è presente anche nella regione N-terminale della pompa PMCA2 che, tuttavia, non interagisce con la proteina 14-3-3. Per comprendere il motivo di questa apparente discrepanza, la regione che contiene la sequenza consenso per l'interazione con la proteina 14-3-3 ed una delle regioni ad α -elica fiancheggiate sono state sottoposte all'analisi bioinformatica "helical wheel" (diagramma idiopatico) in modo da predire la prossimità spaziale tra amminoacidi non consecutivi. Quest'analisi ha rivelato una distribuzione anfipatica degli amminoacidi (Fig. 7.1B). Nella sequenza analizzata della pompa PMCA2 sono presenti 2 sostituzioni, un residuo di treonina (T) ed uno di acido glutammico (E) nelle posizioni 56 e 57 (la numerazione è basata sulla sequenza di PMCA1), che, secondo la predizione dell'analisi bioinformatica disturbano il carattere anfipatico della α -elica. Il residuo di T è localizzato al centro della regione idrofobica, mentre il residuo di E di potrebbe formare un ponte salino con il residuo di arginina (R) che si trova subito a valle del sito di interazione con la proteina 14-3-3 ϵ , destabilizzando così la struttura secondaria che potrebbe essere importante nel legame con la proteina 14-3-3 ϵ . Considerato che è stato proposto che l'interazione con la proteina 14-3-3 è mediata oltre che dalla presenza di sequenze consenso anche dalla presenza di una regione anfipatica (Ferl et al., 2002) si può spiegare il motivo per cui la pompa PMCA2 non interagisce con la proteina 14-3-3 pur avendo una sequenza consenso per l'interazione.

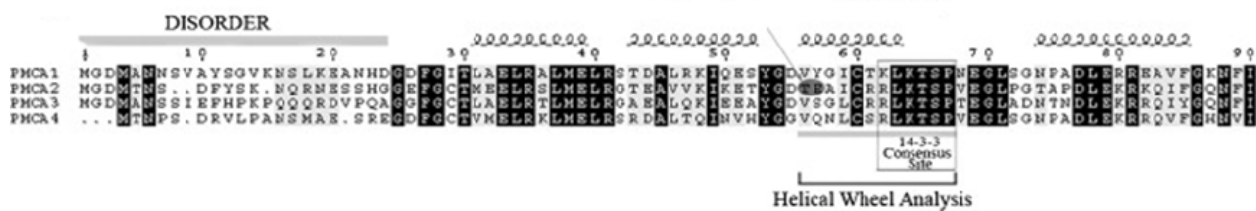
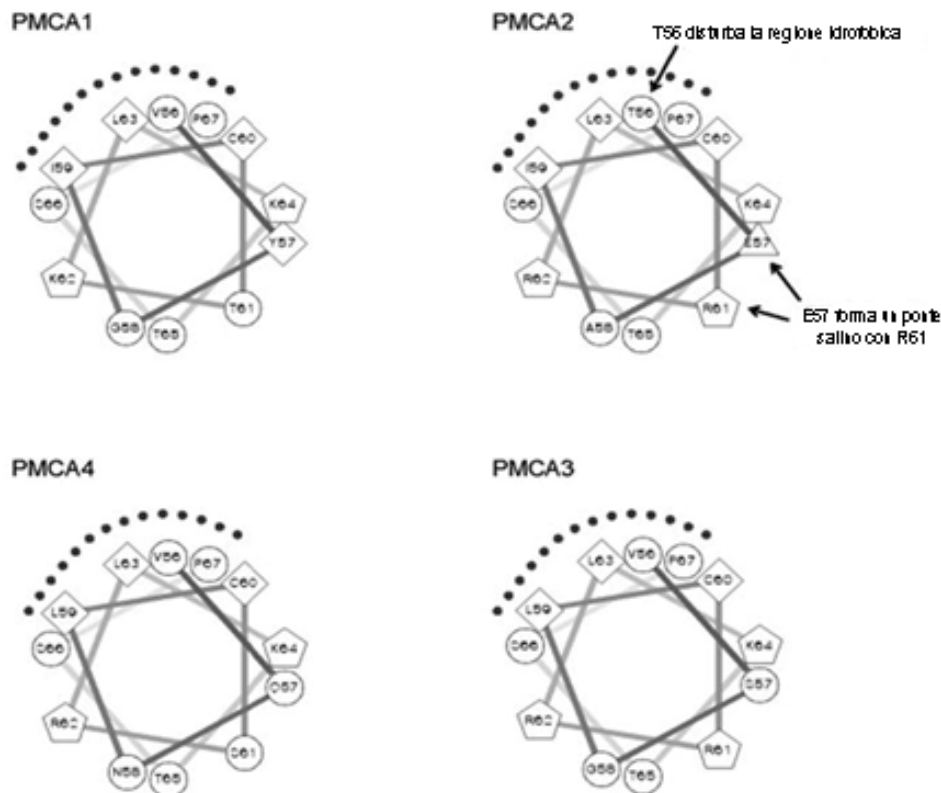
A**B**

Fig. 7.1 A) Allineamento della regione N-terminale di 90aa delle 4 isoforme di PMCA. Sopra l'allineamento delle sequenze delle PMCA vengono mostrate le strutture secondarie predette secondo l'analisi bioinformatica. Il sito consenso di interazione conservato in tutte e 4 le isoforme della PMCA è mostrato in un pannello e la regione usata nell'analisi di idropaticità è sottolineata. Le regioni colorate in nero e in grigio indicano rispettivamente regioni di identità e di similarità. Una freccia che indica un cerchio indica gli amminoacidi unici per la PMCA2 T e E.

B) Diagramma di idropaticità della regione ad α -elica e del sito di consenso per l'interazione delle proteina 14-3-3 ϵ nelle quattro isoforme di PMCA. La regione punteggiata sopra la diagramma dell'analisi idropatica indica la parte idrofobica dell' α -elica, mentre le 2 frecce indicano le sostituzioni nella PMCA2.

7.2 Interazione tra pGILDA-P4.36-83 e la proteina 14-3-3ε

Secondo l'analisi bioinformatica, nella pompa PMCA2 la presenza di residui idrofilici (T e E) nella regione idrofobica della sequenza di interazione con la proteina 14-3-3ε altera il corretto riconoscimento della sequenza consenso, impedendo così il legame tra le 2 proteine. Per verificare sperimentalmente che questa predizione fosse corretta sono state costruite altre 3 esche. La regione N-terminale di 90 amminoacidi della PMCA4 precedentemente che interagisce con la proteina 14-3-3ε (Rimessi et al., 2005) è stata divisa in due porzioni da 45 aa per costruire le esche pGILDA-P4.1 (aa 1-45) e pGILDA-P4.2 (aa 46-90). L'esca pGILDA-P4.1 non contiene la sequenza consenso per il legame con la proteina 14-3-3, l' pGILDA-P4.2, invece, pur contenendo il sito di consenso non contiene la regione ad α -elica fiancheggiante. La terza esca (pGILDA-P4.36-83) è stata costruita includendo gli aa 36-83 della regione N-terminale della pompa PMCA4. Questa porzione comprende il sito consenso di interazione [R/K]RLKTSP, sia le regioni fiancheggianti necessarie, secondo l'analisi bioinformatica, alla formazione della struttura secondaria della regione di interazione. I plasmidi con le 3 esche sono stati co-trasformati assieme al plasmide pYESTrp/14-3-3ε nei lieviti EGY48 ed è stata testata la loro abilità di attivare i geni reporter *Leu2* e *LacZ*. Le esche pGILDA-P4.1 e pGILDA-P4.2 non hanno attivato nessuno dei geni reporter (risultato non mostrato), invece la co-trasformazione con l'esca pGILDA-P36-83 ha attivato tutti e 2 i geni reporter (Fig. 7.3). Questo risultato conferma quindi la predizione bioinformatica: per l'interazione tra PMCA e 14-3-3ε è necessario non solo il sito consenso di interazione RLKTSP, ma anche che venga mantenuta la corretta struttura secondaria della regione di interazione.

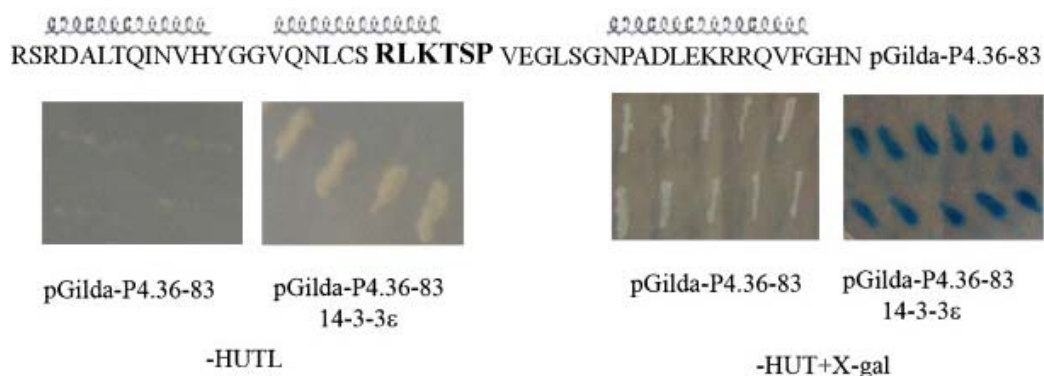


Fig. 7.2 Interazione tra la regione aa 36-83 della PMCA4 e 14-3-3ε. I lieviti EGY48 sono stati co-trasformati con i plasmidi di espressione per il gene reporter *LacZ* (pSH18-34), per l'esca pGILDA-p36-83 e per la proteina 14-3-3ε. I lieviti trasformati sono stati piastrati in un medium selettivo in assenza di, istidina, uracile, triptofano e leucina (--HUTL) per l'attivazione del gene

reporter *Leu2* e $-HUT + X-Gal$ per l'attivazione del gene reporter *LacZ*. I pannelli a sinistra indicano che l'esca da sola non è in grado di attivare i geni reporter, mentre i co-transformanti inducono l'attivazione dei 2 geni reporter (pannelli di destra).

8. EFFETTO DELLA SOVRAESPRESSIONE DELLA PROTEINA 14-3-3 ϵ SULL'ATTIVITA' DELLA POMPA PMCA3 IN CELLULE CHO

Gli esperimenti successivi sono stati condotti per indagare gli effetti funzionali dell'interazione della proteina 14-3-3 ϵ sull'attività della PMCA3 e sull'omeostasi del Ca^{2+} . Questi esperimenti sono stati effettuati in cellule CHO, in quanto esprimono solo quantità molto basse di pompa PMCA4 endogena (Guerini et al., 1995). Le CHO sono state transfettate con un plasmide che esprime la fotoproteina Ca^{2+} -sensibile equorina citosolica (cytAEQ), o co-transfettate con cytAEQ e un plasmide che esprime la pompa PMCA3, oppure co-transfettate con i vettori di espressione per cytAEQ, PMCA3 e 14-3-3 ϵ . 36 ore dopo essere transfettate, alle cellule è stato aggiunto il gruppo prostetico celenterazina in modo da ricostituire l'equorina nella sua forma attiva. Successivamente le cellule sono state incubate in una soluzione fisiologica (KRB modificato) con addizionata di $CaCl_2$ 1mM e stimulate con ATP, un agonista dei recettori purinergici che genera IP_3 e quindi il rilascio del Ca^{2+} dall'ER. La stimolazione cellulare causa un incremento rapido della concentrazione del Ca^{2+} nel citoplasma dovuta al suo rilascio dal reticolo endoplasmatico ed il conseguente ingresso dall'ambiente extracellulare. L'altezza e l'ampiezza del transiente generato dipendono dalla quantità del Ca^{2+} rilasciato dai canali IP_3 , ma anche dalla capacità della pompa PMCA e della pompa SERCA endogena di contrastare tale aumento (Fig. 8.1). Subito dopo il picco, il transiente comincia ad abbassarsi grazie all'azione coordinata della pompa PMCA (endogena e sovraespressa) che estrude Ca^{2+} dal citoplasma e della pompa SERCA endogena che lo accumula nei depositi intracellulari. Il contributo della SERCA endogena è poco significativo in cellule che sovraesprimono la PMCA (Rimessi et al., 2005). Nelle cellule CHO transfettate solo con il plasmide che esprime cytAEQ, il picco raggiunto dopo stimolazione con ATP raggiunge un valore di $3.36 \pm 0.38 \mu M$ (n=15). Questo valore viene ridotto fino a $1.74 \pm 0.25 \mu M$ (n=18) nelle cellule che sovraesprimono la pompa PMCA3. La sovraespressione della PMCA3 assieme alla proteina 14-3-3 ϵ aumenta il valore di questo picco fino a $2.10 \pm 0.40 \mu M$ (n=14), $p < 0.01$, indicando un ruolo inibitorio della proteina 14-3-3 ϵ sulla funzione della PMCA3.

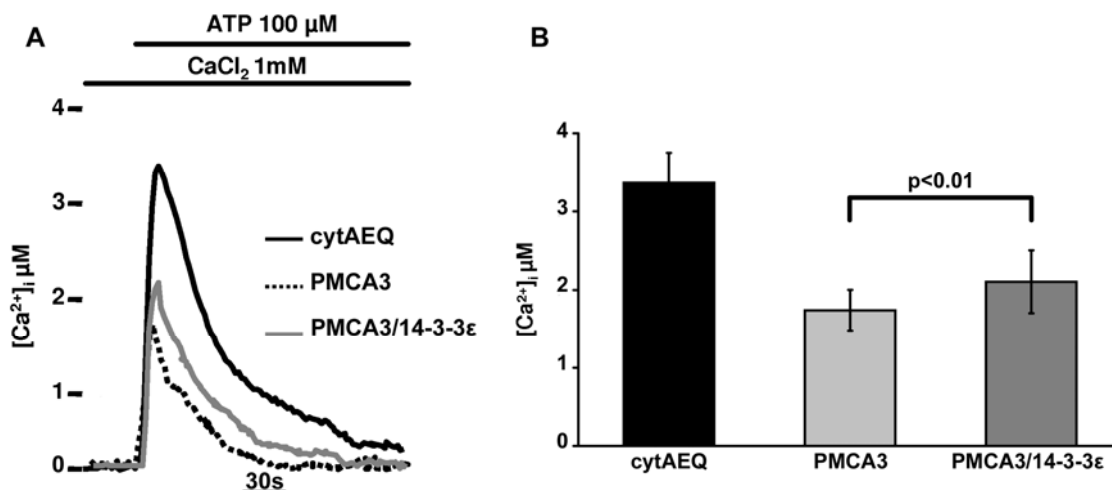


Fig. 8.1 Gli effetti della sovraespressione della proteina 14-3-3 ϵ sull'omeostasi del Ca²⁺ in cellule CHO transfettate con PMCA3. Le cellule CHO sono state transfettate con il vettore di espressione per cytAEQ, co-transfettate con cytAEQ/PMCA3 e co-transfettate con cytAEQ/PMCA3/14-3-3 ϵ . Dove indicato le cellule sono state stimolate con ATP, un agonista dei recettori purinergici che genera IP₃ e quindi il rilascio di Ca²⁺ dall'ER. Il valore medio del picco della concentrazione di Ca²⁺ raggiunto dal transiente viene ridotto nelle cellule transfettate con PMCA3. La co-transfezione con 14-3-3 ϵ riduce la capacità della pompa PMCA3 di contrastare il picco del transiente di Ca²⁺. A) Tracce dei transienti di Ca²⁺ generati dopo stimolazione con ATP in un esperimento rappresentativo. B) Istogrammi rappresentanti il valore medio dei picchi raggiunti dai transienti di Ca²⁺ (\pm S.D).

9. GLI EFFETTI DELLA SOVRAESPRESSIONE DELLA PROTEINA 14-3-3 ϵ SULLA POMPA PMCA1 IN CELLULE CHO

Gli esperimenti di co-immunoprecipitazione ed il saggio GST pull-down *in vitro* hanno dimostrato che PMCA1 e 14-3-3 ϵ interagiscono. Quindi si è deciso di esaminare se la proteina 14-3-3 ϵ modifica l'attività della PMCA1 in modelli cellulari. Le cellule CHO sono state transfettate con il plasmide di espressione per cytAEQ, o co-transfettate con vettori di espressione per cytAEQ e PMCA1 oppure co-transfettate con cytAEQ/PMCA1/14-3-3 ϵ . Le cellule sono state trattate come negli esperimenti precedenti: i transienti di Ca²⁺ sono stati indotti stimolando le cellule con ATP in un medium KRB in presenza di 1mM di CaCl₂. Nel caso delle cellule transfettate con cytAEQ (controllo) il valore del picco del transiente di Ca²⁺ è $3.69 \pm 0.08 \mu\text{M}$ (n=4), nelle cellule transfettate con i vettori di espressione cytAEQ e PMCA1 il valore medio è $3.07 \pm 0.22 \mu\text{M}$ (n=9), mentre nelle cellule trasfettate con tutti e 3 i vettori di espressione (cytAEQ/PMCA1/14-3-3 ϵ) il picco è di $3.42 \pm 0.27 \mu\text{M}$ n=9, (p<0.01). Questi esperimenti dimostrano

che 14-3-3 ϵ ha un effetto inibitorio anche sull'attività della pompa PMCA1 (Fig.9.1).

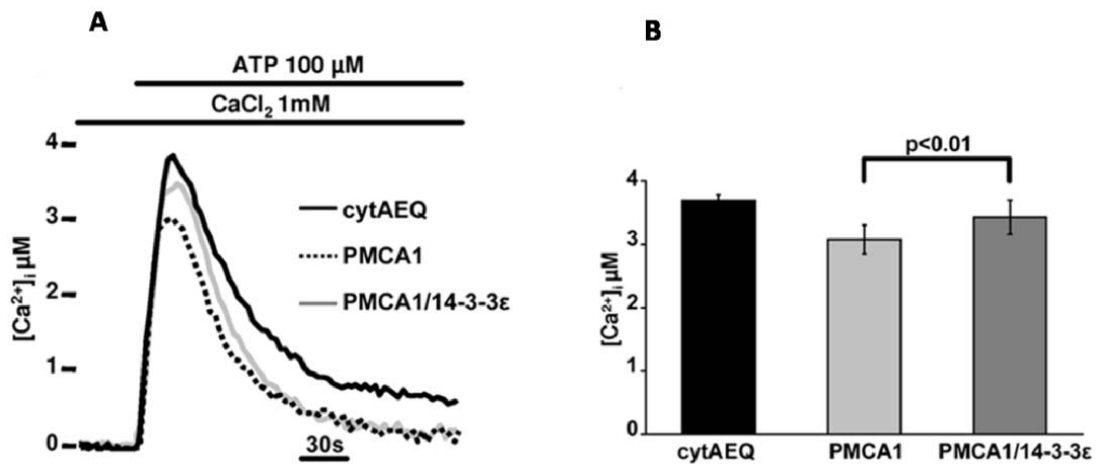


Fig. 9.1 Gli effetti della sovraespressione della proteina 14-3-3 ϵ sull'omeostasi del Ca²⁺ in cellule CHO transfettate con PMCA1. Le cellule CHO sono state transfettate con il vettore di espressione per cytAEQ, co-transfettate con cytAEQ/PMCA1 e co-transfettate con cytAEQ/PMCA1/14-3-3 ϵ . Dove indicato le cellule sono state stimulate con 100 μ M ATP. Il valore medio del picco della concentrazione di Ca²⁺ raggiunto dal transiente viene ridotto nelle cellule che sovra esprimono la pompa PMCA3 rispetto alle cellule di controllo, la sovraespressione della proteina 14-3-3 ϵ contrasta l'azione della PMCA1. A) Tracce dei transienti di Ca²⁺ B) Istogrammi rappresentativi del valore medio dei picchi raggiunti dai transienti di Ca²⁺ (\pm S.D).

10. INFLUENZA DELLA SOVRAESPRESSIONE DI 14-3-3 ϵ SUI LIVELLI DI ESPRESSIONE DI PMCA1 E PMCA3 IN CELLULE CHO

Per escludere che l'effetto inibitorio della proteina 14-3-3 ϵ sull'attività delle pompe PMCA1 e PMCA3 fosse dovuto ad un effetto della proteina 14-3-3 ϵ sulla espressione o sulla localizzazione delle pompe si è verificato che i livelli di espressione delle pompe fossero paragonabili in presenza o in assenza della proteina 14-3-3 ϵ (dati non dimostrati). L'analisi per Western Blotting ha rivelato che i livelli sono paragonabili e l'analisi di immunocitochimica ha rivelato che la quantità di pompa sovraespressa che si localizza a livello della membrana plasmatica è equivalente in entrambi i casi. Una quota di pompa è ritenuta a livello dell'ER. Questa frazione della pompa è inattiva e quindi non influenza l'omeostasi del Ca²⁺. Per valutare i livelli di pompa sulla membrana plasmatica le cellule CHO sono state transfettate con i plasmidi per l'espressione di PMCA1 o PMCA3 o co-transfettate con i vettori di espressione delle pompe e della proteina 14.3.3 ϵ . Le cellule sono state fissate ed incubate con gli anticorpi

primari anti-PMCA1 e anti-PMCA3. La rivelazione è stata fatta con un anticorpo secondario coniugato al cromoforo Alexa-Fluor594 e l'analisi del segnale è stata condotta osservando le cellule al microscopio confocale (Fig. 10.1).

I livelli di espressione sono stati analizzati usando un software sviluppato nel nostro laboratorio come descritto nella parte di Materiali e Metodi. Come si può vedere dalla quantificazione dei livelli di fluorescenza riportata nella Fig. 10.1, la quantità di pompa PMCA1 e PMCA3 nella membrana plasmatica non viene influenzata dalla sovraespressione della proteina 14-3-3 ϵ .

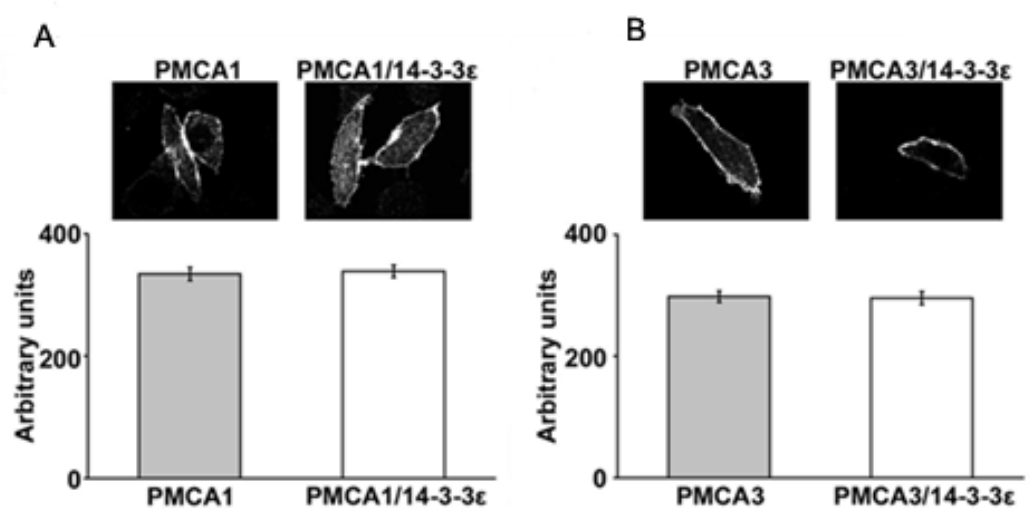


Fig. 10.1 Immunolocalizzazione delle pompe PMCA1 e PMCA3 in cellule CHO. Le cellule CHO sono state transfettate con il plasmide di espressione per PMCA1 o co-trasfettate con i plasmidi di espressione per PMCA1 e 14-3-3 ϵ (A); con il plasmide di espressione per la PMCA3 e co-trasfettate con i plasmidi di espressione per PMCA3 e 14-3-3 ϵ (B). Le cellule sono state marcate con anticorpo primario anti-PMCA1 (A) e anti-PMCA3 (B) e l'anticorpo secondario coniugato con AlexaFluor594. Gli istogrammi rappresentano la quantità di fluorescenza (espressa in unità arbitrarie) presente a livello della membrana plasmatica.

II. ANALISI FUNZIONALE COMPARATIVA DELLE VARIANTI DI SPLICING DELLA ISOFORMA 2 DELLA POMPA PMCA E DI ALCUNE SUE FORME MUTANTI

Dallo studio precedente emerge che, diversamente dalle altre isoforme, l'isoforma neuronale PMCA2 non interagisce con la proteina 14-3-3 ϵ probabilmente a causa di alcune sue peculiarità nella struttura secondaria. Oltre a questo, la PMCA2 possiede delle proprietà che la distinguono dalle altre isoforme: ha una elevata affinità per la calmodulina, una elevata attività in assenza degli attivatori e, come descritto precedentemente, il suo trascritto primario presenta un pattern di splicing alternativo complesso. Inoltre, la PMCA2 è l'unica isoforma tra le PMCA per la quale sono state riportate patologie in caso di mutazioni. Nel topo e nell'uomo, mutazioni puntiformi nella PMCA2 sono associate ad un fenotipo di sordità e a problemi vestibolari.

Nella seconda parte del lavoro del mio Dottorato di ricerca abbiamo deciso di studiare dal punto di vista funzionale l'isoforma "speciale" PMCA2 e alcune sue forme mutanti che abbiamo identificato in collaborazione con altri gruppi di ricerca. In uno studio recente è stato dimostrato che nelle stereocilia delle cellule sensoriali dell'orecchio interno, (l'organello deputato alla trasduzione dello stimolo meccanico in impulso neurale) è espressa la variante *w/a* della PMCA2 (Hill *et al.*, 2006) e che questa isoforma rappresenta l'unico meccanismo deputato all'estrusione degli ioni Ca^{2+} dalla porzione apicale di queste cellule. Nel corso delle ricerche svolte durante il mio Dottorato, l'attività funzionale di questa variante di splicing è stata paragonata con quelle di altre varianti di PMCA2. Inoltre sono stati analizzati gli effetti di alcune sue forme mutanti: il mutante G283S responsabile di sordità nei topi (topi *dfw*) (Street *et al.*, 1998) il mutante G293S che in associazione con una mutazione nella CDH23 genera sordità nell'uomo (Ficarella *et al.*, 2007), il mutante S877F ed il mutante E584K che generano sordità nei topi (topi *oblivion*, Spiden *et al.*, 2008; e topi *tommy*, S.Brown, UK, rispettivamente).

L'attività funzionale delle varianti di splicing della PMCA2 e dei suoi mutanti è stata misurato in cellule intatte, quindi nel loro ambiente nativo, sovrareprimendole in cellule CHO che non esprimono l'isoforma PMCA2 endogena.

1. ANALISI COMPARATIVA DI ALCUNE VARIANTI DI SPLICING DELLA POMPA PMCA2

La PMCA2 come le altre isoforme è sottoposta allo splicing alternativo in 2 siti: sito A e sito C. L'inserzione di 3 diversi esoni e delle loro combinazioni nel sito A genera le varianti di splicing *x*, *y* e *w*, mentre l'inclusione di 2 esoni nel sito C

genera la forma troncata della pompa: *a*. Le varianti di splicing *z* e *b* sono varianti di splicing senza inserzioni di esoni rispettivamente nel sito di splicing A e C (Fig.1.1).

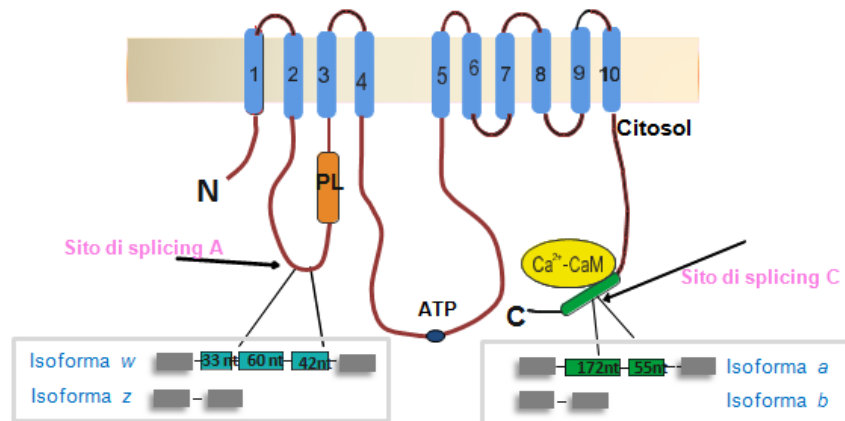


Fig. 1.1 Rappresentazione schematica delle varianti della PMCA2 generate da meccanismi di splicing alternativo ai siti A e C. Lo schema delle varianti di splicing si riferisce alla struttura genomica della pompa: Gli esoni interessati allo splicing sono indicati con rettangoli colorati, i rettangoli grigi indicano gli esoni fiancheggianti. Nella Figura vengono indicati anche il sito di legame per la CaM, il sito di legame per l'ATP, e il dominio di legame per i fosfolipidi acidi.

Le varianti di splicing *w/a*, *w/b*, *z/a* e *z/b* sono state analizzate in base alla loro capacità di controllare il transiente di Ca^{2+} generato dalla stimolazione cellulare delle cellule CHO nelle quali sono state sovraesprese. Prima di effettuare questa analisi sono stati condotti degli esperimenti di controllo per verificare che le pompe sovraesprese fossero correttamente localizzate a livello della membrana plasmatica e che il loro livello di sovra espressione fosse equivalente.

1.1 Analisi dei livelli proteici delle varianti di splicing della PMCA2 sovraesprese in cellule CHO

Le cellule CHO sono state transfettate con i plasmidi di espressione per le isoforme di PMCA2 *w/a*, *w/b*, *z/a*, *z/b*. Gli estratti proteici ottenuti dalle cellule sono stati separati tramite SDS-PAGE e trasferiti su filtro di nitrocellulosa. Le bande proteiche sono state rivelate mediante incubazione con l'anticorpo primario policlonale 2N isoforma specifico e con l'anticorpo secondario anti-coniglio coniugato con HRP (Fig. 1.2A). Considerato che una parte delle pompe espresse viene ritenuta nell'ER e che l'analisi di Western Blot rivela la quantità di PMCA totale, sono stati effettuati degli esperimenti di immunocitochimica

quantitativa per valutare se le diverse isoforme di splicing fossero espresse in quantità equivalenti a livello della membrana plasmatica. Le varianti di splicing *w/a*, *w/b*, *z/a*, *z/b* sono state incubate con l'anticorpo primario 2N e le proteine sono state visualizzate con l'anticorpo secondario anti-coniglio coniugato con il cromoforo AlexaFluor488 (Fig. 1.2B). L'analisi ha rivelato che le cellule positive alla colorazione sono una percentuale di 10-15% e tra queste, circa il 50% hanno un'espressione della PMCA2 unicamente sulla membrana plasmatica. I livelli di fluorescenza al livello della membrana plasmatica per le varianti di splicing *w/a* e *z/b* sono stati quantificati come descritto nella parte dei Materiali e Metodi (Fig. 1.2C).

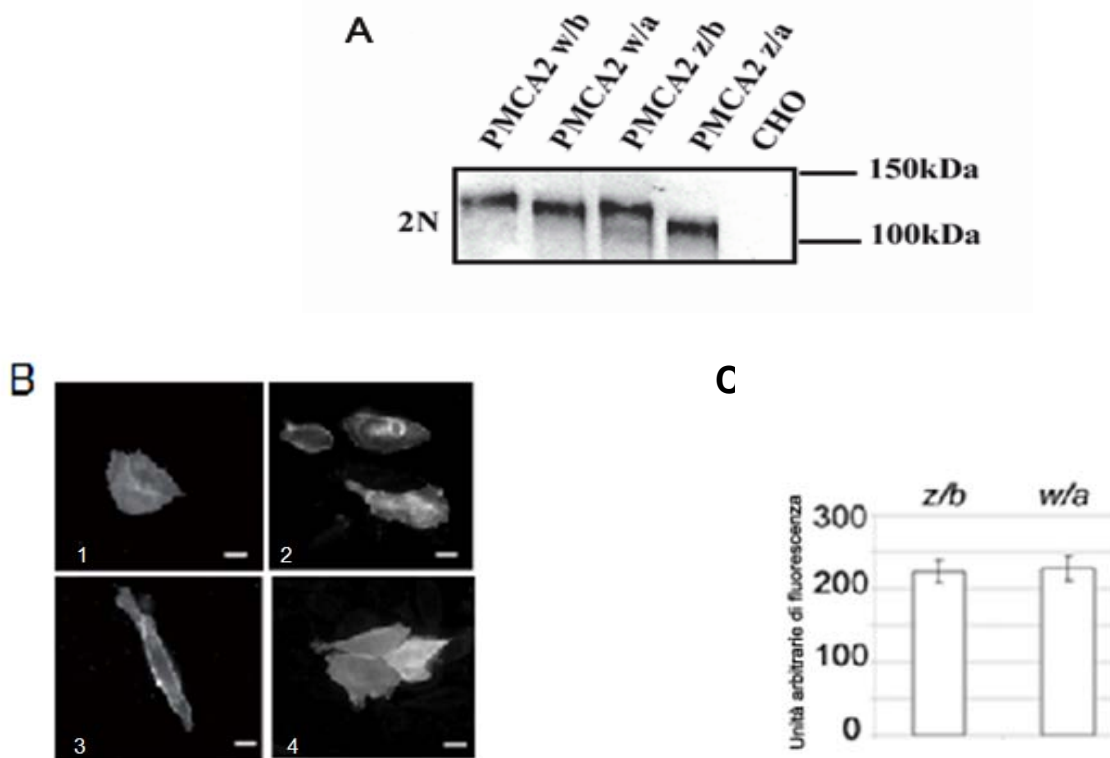


Fig. 1.2 A) Analisi dell'espressione delle diverse isoforme di splicing della PMCA2 tramite Western Blotting. I lisati proteici delle cellule CHO transfettate con i plasmidi di espressione per le diverse isoforme di splicing *w/a*, *w/b*, *z/a*, *z/b* sono stati separati tramite la corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide. Le bande proteiche della PMCA2 sono state visualizzate tramite incubazione con l'anticorpo policlonale isoforma-specifico 2N e l'anticorpo secondario coniugato con HRP. Come controllo negativo è stato usato un campione di lisato cellulare delle cellule CHO non transfettate che non esprimono l'isoforma PMCA2 (ultima corsia). **B) Immunolocalizzazione delle proteine PMCA2 *w/a*, *w/b*, *z/a*, *z/b*.** Le cellule CHO sono state transfettate transientemente con i vettori di espressione delle varianti di splicing *w/a* (1), *w/b* (2), *z/a* (3), *z/b* (4) e successivamente sono state fissate. L'immunocitochimica è stata condotta utilizzando l'anticorpo 2N e la localizzazione cellulare è stata rivelata tramite un

anticorpo anti-coniglio coniugato con il cromoforo AlexaFluor488. **C) Misurazione dei livelli di fluorescenza sulla membrana plasmatica.** L'istogramma mostra i livelli di fluorescenza a livello della membrana plasmatica per le varianti di splicing *w/a* e *z/b* quantificate secondo un metodo sviluppato nel nostro laboratorio.

L'analisi di Western Blotting ha visualizzato delle bande proteiche dal peso molecolare ~ 130kDa come atteso per la PMCA (Fig. 1.2A). Si può osservare che le bande proteiche delle varianti di splicing della PMCA2 si trovano ad altezze leggermente diverse a causa della diversa dimensione degli esoni inseriti nei siti di splicing A e C. Dalla Fig. 1.2A si nota che i livelli di espressione delle diverse varianti di splicing della PMCA2 sono paragonabili.

Gli esperimenti di immunolocalizzazione dimostrano che le proteine PMCA2 *w/a*, *w/b*, *z/a*, *z/b* sovraesprese si localizzano correttamente al livello della membrana plasmatica (Fig. 1.2B). Una percentuale della pompa sovraespressa viene ritenuta anche nell'ER ma è inattiva. Sono stati comunque quantificati anche i livelli di fluorescenza al livello della membrana plasmatica. Gli istogrammi nella Fig. 1.2C dimostrano che le pompe PMCA2 *w/a*, *z/b* sono espresse a livelli equivalenti nella membrana plasmatica.

1.2 Misura della concentrazione del Ca^{2+} nel citoplasma di cellule CHO che sovraesprimono le varianti di splicing della PMCA2

Le cellule CHO sono state piastrate su vetrini di 13mm di diametro e transfettate con i plasmidi di espressione dell'equorina citosolica (cytAEQ) o cotransfettate con cytAEQ e i plasmidi di espressione per le diverse isoforme della PMCA2 (*w/a*, *w/b*, *z/a*, *z/b*). Dopo 36 ore dalla transfezione, l'equorina è stata ricostituita con 5 μM di celenterazina per circa 3 ore. In seguito le cellule sono state incubate e perfuse con la soluzione salina Krebs-Ringer (KRB) contenente 1mM CaCl_2 . Le cellule sono state stimulate con ATP. Come si può osservare nella Fig. 1.3, la sovraespressione delle 4 varianti di splicing modifica il transiente di Ca^{2+} influenzando sia sulla sua altezza che sulla sua durata. La riduzione dell'altezza del picco del transiente di Ca^{2+} nelle cellule transfettate con le diverse varianti di splicing della PMCA2 rispetto alle cellule non transfettate riflette la capacità della pompa di rispondere velocemente all'arrivo improvviso del Ca^{2+} nella cellula. La fase di ritorno al livello basale del transiente di Ca^{2+} è dovuta alla somma di due componenti con effetto opposto: l'estrusione del Ca^{2+} dal citoplasma tramite la pompa PMCA (ed il riaccumulo nel lume dell'ER da parte della pompa SERCA) e l'influsso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare attraverso i canali SOCCs nella membrana plasmatica attivati dalla riduzione della concentrazione del Ca^{2+} nell'ER.

Come si può osservare dalla Fig. 1.3 le 2 varianti di splicing *w/b*, *z/a* hanno la stessa capacità di rispondere ad un arrivo improvviso di Ca^{2+} della variante “full-length” PMCA2*z/b*, che è una pompa molto attiva (vedere gli istogrammi nella Fig. 1.3). In contrasto la variante PMCA2*w/a* ha un’attività ridotta rispetto alle altre varianti di splicing nel controllare l’arrivo repentino di ioni Ca^{2+} . Comunque nella fase in cui viene ridotta l’ampiezza del transiente del Ca^{2+} , quindi nella fase in cui viene richiesta solo l’attività a lungo termine della pompa, tutte le varianti di splicing diventano equivalenti (la variante PMCA2*z/b* è leggermente più attiva, istogrammi della Fig.1.3).

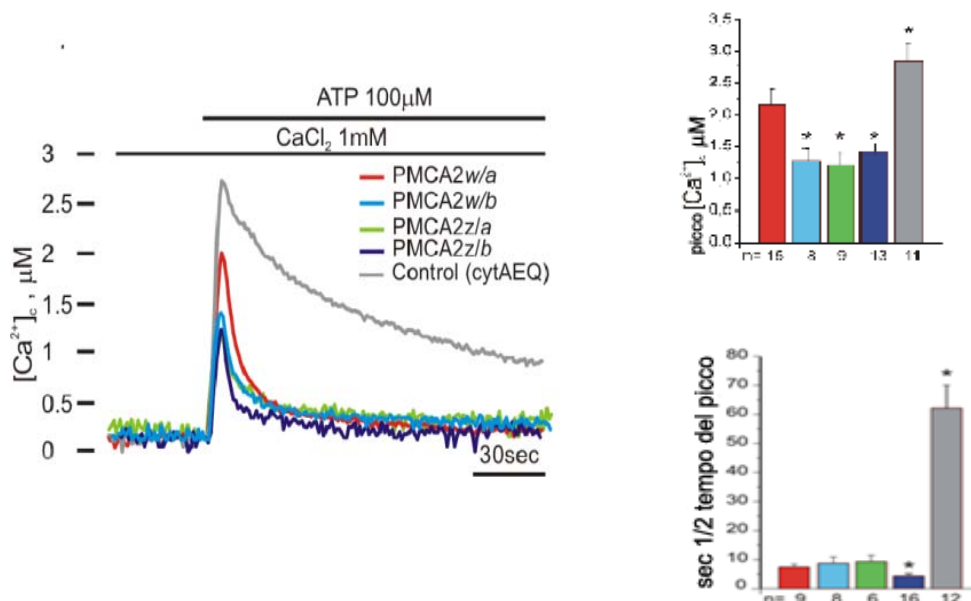


Fig. 1.3 Misura della variazione della $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in cellule CHO transfettate con cytAEQ o cotransfettate con cytAEQ e i plasmidi che codificano le diverse varianti di splicing della PMCA2. Le cellule CHO sono state perfuse con KRB addizionato con CaCl_2 1mM. Dove indicato le cellule sono state stimulate con ATP 100 μM . Gli istogrammi a destra mostrano i valori medi dei picchi ($\pm\text{SD}$) del transiente del Ca^{2+} generati dall’aggiunta dell’ATP e i valori del tempo richiesto per dimezzare l’altezza del. Le barre rappresentano la deviazione standard: *, $P < 0,01$ calcolato rispetto alla PMCA2*w/a*.

Il ripristino della concentrazione di ioni Ca^{2+} a livelli basali è dovuto in parte anche alla attività della pompa SERCA. Per eliminare il contributo della SERCA, in alcuni esperimenti di controllo l’attività della SERCA è stata abolita stimolando le cellule in presenza dell’inibitore specifico 2,5-di-*tert*-butyl-1,4benzohydroquinone. Le tracce riportate in Fig. 1.3 mostrano che nelle condizioni sperimentali utilizzate il contributo della pompa SECA è trascurabile.

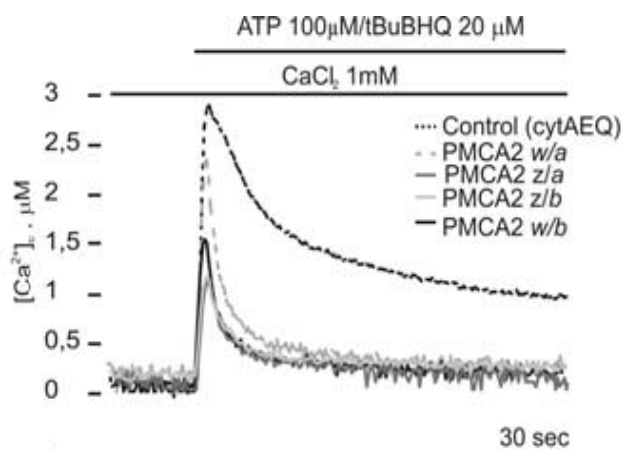


Fig. 1.4 Misura della variazione della $[Ca^{2+}]_i$ in cellule CHO transfettate con cytAEQ e i plasmidi che codificano le diverse varianti di splicing della PMCA2 in presenza dell'inibitore specifico della SERCA (tBuBHQ). 36 ore dopo la transfezione delle cellule CHO con cytAEQ e i plasmidi di espressione per w/a, w/b, z/a, z/b le cellule sono state incubate e perfuse con la soluzione salina Krebs-Ringer (KRB) contenente 1mM $CaCl_2$. Dove indicato le cellule sono state stimolate con 100 μ M ATP e 20 μ M 2,5-di-*tert*-butyl-1,4benzohydroquinone (tBuBHQ), che inibisce specificamente l'attività della pompa SERCA.

1.3 Il contributo delle diverse componenti che influiscono i transienti di Ca^{2+} nel citosol delle cellule CHO

I transienti di Ca^{2+} nel citoplasma generati dallo stimolo con ATP sono dovuti sia al rilascio del Ca^{2+} dai depositi intracellulari tramite l'apertura dei canali IP_3 sia all'influsso del Ca^{2+} dal ambiente extracellulare attraverso i canali SOCCs che si aprono in seguito allo svuotamento dei depositi intracellulari. Il contributo specifico delle 2 componenti e la capacità delle varianti di splicing della PMCA2 di contrastare ciascuno delle due 2 componenti è stato analizzato grazie all'utilizzo di un opportuno protocollo sperimentale: quando l'ATP viene aggiunto in assenza di Ca^{2+} extracellulare (in un medium contenente 100 μ M EGTA), il transiente generato dalla stimolazione cellulare dipende unicamente dal rilascio del Ca^{2+} dai depositi intracellulari. Quando nel medium viene riaggiunto $CaCl_2$ 1mM si genera un secondo transiente di Ca^{2+} dovuto all'influsso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare mediato dai canali SOCCs (Fig. 1.5).

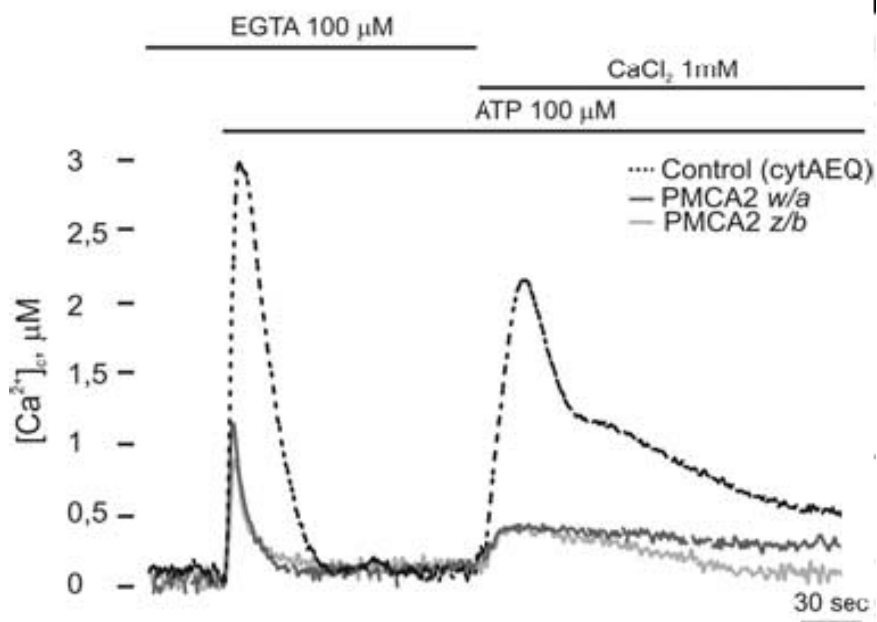


Fig. 1.5

Effetti della sovraespressione della PMCA2w/a e z/b nel controllo dei transienti del Ca^{2+} generati rispettivamente dal rilascio dai depositi intracellulari e dall'ingresso dall'ambiente extracellulare. Le cellule CHO sono state transfettate con il plasmide che esprime cytAEQ (controllo) o cotransfettate con cytAEQ e i plasmidi di espressione per PMCA2w/a e z/b; dopo 36h le cellule sono state incubate con celenterazina $5\mu\text{M}$ per la ricostituzione dell'equeorina e successivamente sono state perfuse con KRB addizionato di EGTA $100\mu\text{M}$. Dove indicato alle cellule è stato aggiunto $100\mu\text{M}$ ATP in presenza di 1mM CaCl_2 . Il primo transiente riflette il rilascio del Ca^{2+} dall'ER dovuto alla stimolazione con ATP, mentre il secondo transiente viene generato dall'entrata di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare.

Come si nota dalla Fig. 1.5 tutte e due le varianti di splicing riducono il picco del primo transiente generato dall'apertura dei recettori dell' IP_3 nell'ER. Tuttavia si può osservare una ridotta capacità della variante w/a nel contrastare l'aumento del Ca^{2+} nel primo transiente rispetto alla variante full-length PMCA2z/b. Per quanto riguarda l'abilità delle due isoforme nel ridurre il secondo picco generato dall'influsso del Ca^{2+} dai SOCCs, le pompe sembrano avere un'attività equivalente nella prima parte, ma successivamente la w/a sembra più lenta nel ripristinare i livelli basali del Ca^{2+} rispetto all'isoforma z/b.

2. ANALISI FUNZIONALE COMPARATIVA IN CELLULE CHO DELL' ATTIVITA' DEI MUTANTI PMCA2w/a(G283S) e PMCA2w/a(G293S) E DELLA VARIANTE PMCA2w/a NATIVA

Diversi studi hanno dimostrato che mutazioni nella PMCA2 generano sordità nei topi e nell'uomo (Street *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1999; Kozel *et al.*, 1998; Schultz *et al.*, 2005).

La prima mutazione caratterizzata è quella nel topo "deafwaddler" (*dfw*) in cui una mutazione G283S nel secondo "loop" citosolico della PMCA2w/a altera la funzione della pompa (Street *et al.*, 1998). La sostituzione della glicina molto conservata in una serina (G283S) potrebbe disturbare la struttura secondaria coinvolta nel posizionamento di una sequenza invariabile TGE che è stata trovata in tutte le pompe di tipo P. Questa breve sequenza viene posizionata vicino al sito di fosforilazione durante il ciclo catalitico (Kuhlbrandt, 2004).

In collaborazione con il Prof. P. Gasparini (Università di Trieste) è stato condotto uno screening mutazionale per il gene di PMCA2 in 450 soggetti da differenti paesi ed è stata trovata una mutazione missenso associata a sordità autosomale dominante (Ficarella *et al.*, 2007). La mutazione riguarda la sostituzione di una glicina altamente conservata con una serina (G293S). Questa mutazione che si trova 10aa a valle della mutazione *dfw* (G283S) del topo ed è stata trovata in un paziente italiano che presenta danni profondi dell'udito. La mutazione era stata ereditata dalla madre che aveva udito normale. Tutta la famiglia è stata sottoposta ad uno screening per mutazioni in altri geni che spesso sono coinvolti nella perdita dell'udito, considerando il fatto che lavori precedenti hanno riportato che una mutazione in PMCA2 (V586M) aumenta la perdita dell'udito in pazienti con una mutazione nella cadherina 23 (Schultz *et al.*, 2005). L'analisi per i geni della myos6 (MYO6), connessina 30 (GJB6) e CDH23 ha rivelato una mutazione nella CDH23 (T1999S) nel figlio affetto, ma non nella madre (Fig 2A). Questa mutazione che era stata descritta precedentemente come un polimorfismo nella banca dati era presente nel padre e nel fratello che presentavano udito normale (Ficarella *et al.*, 2007). Solo il figlio che ha ereditato entrambe le mutazioni è sordo, suggerendo così un meccanismo digenico alla base di questa forma di sordità ereditaria.

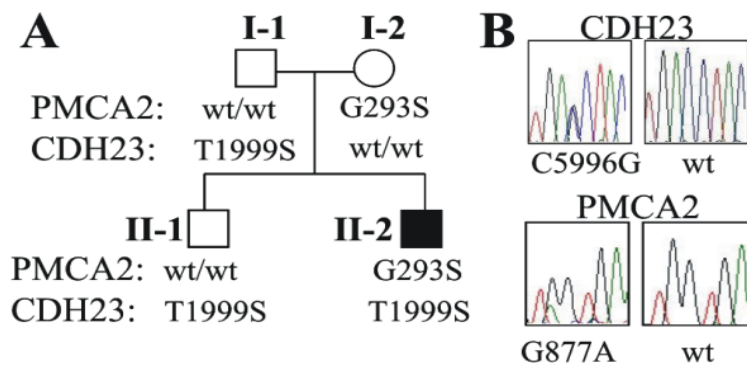


Fig. 2A) Pedigree della famiglia italiana. Il simbolo nero indica il soggetto affetto di sordità. Per tutti gli individui della famiglia è indicato il genotipo per la PMCA2 e CDH23. **B) I cromatogrammi per il gene di CDH23 e PMCA2.** Nella figura è mostrato solo la parte del cromatogramma che rivela una mutazione rispettivamente nel gene per CDH23 e PMCA2.

Per valutare la capacità della pompa *dfw* (G283S) nel topo e della pompa umana mutata (G293S) nel controllare l'omeostasi del Ca^{2+} sono stati generati dei plasmidi di espressione per le due forme mutanti di PMCA tramite esperimenti di mutagenesi sitospecifica. Questi plasmidi di espressione assieme a quello che esprime la pompa PMCA2_{w/a} WT e il plasmide che codifica cytAEQ sono stati transfettati in cellule CHO e la attività delle diverse pompe espresse è stata paragonata tramite il saggio dell'equorina.

2.1 Analisi di conservazione tramite ClustalW degli amminoacidi mutati nella PMCA2

Tramite il programma ClustalW è stato analizzato il grado di conservazione della glicina 283 e 293 nelle pompa PMCA di diverse specie (Fig 2.1 A) e nelle diverse pompe di tipo P (Fig. 2.1 B).

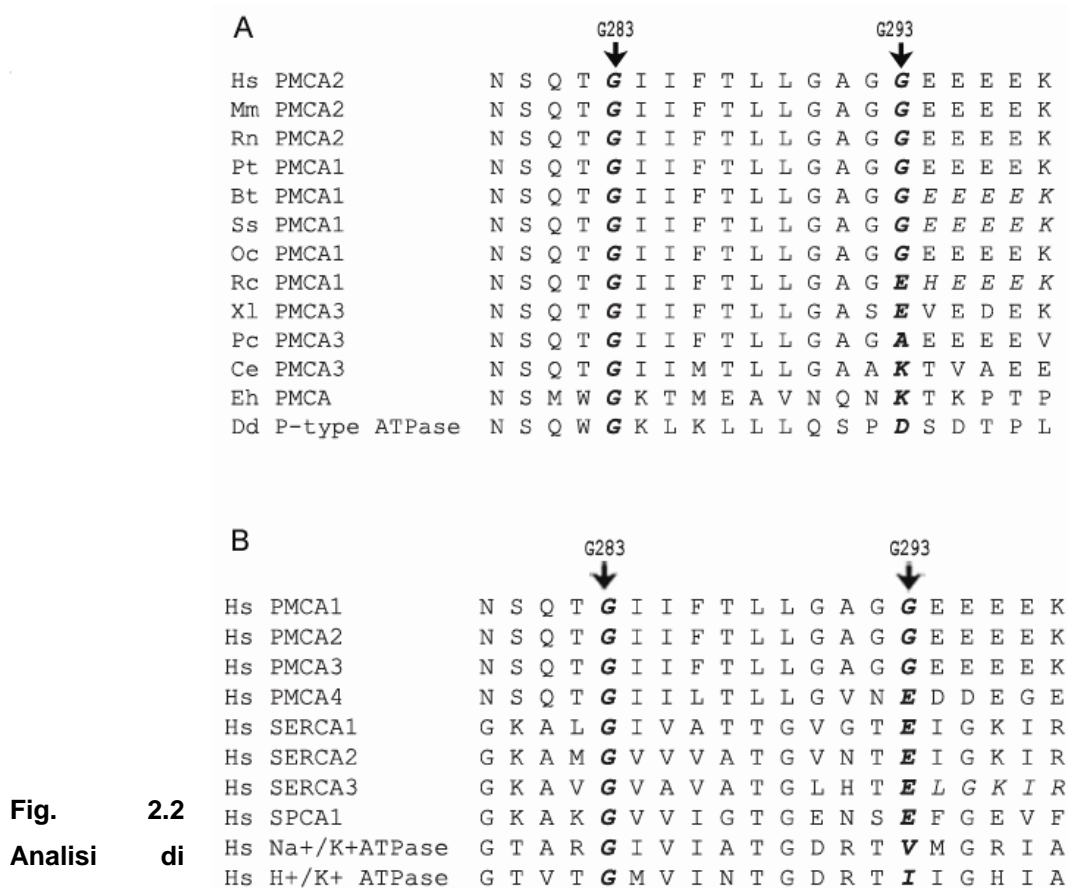


Fig. 2.2
Analisi di

conservazione con ClustalW degli amminoacidi mutati nella PMCA2. Tramite il programma di ClustalW è stato possibile condurre un'analisi di similarità tra la sequenza di PMCA2 (Nr di accesso nella banca dati GenBank. NP_001674) con le PMCA di altre specie **(A)** e le altre pompe di tipo P **(B)**. I nr di accesso per le specie qui elencate nella banca dati di Genbank sono: AAH75643 (*Mus musculus*), NP_036640 (*Rattus norvegicus*), XP_509257 (*Pan troglodytes*), NP_777121 (*Bos taurus*), NP_999517 (*Sus scrofa*), Q00804 (*Oryctolagus cuniculus*), AAK11272 (*Rana catesbeiana*), AAH77905 (*Xenopus laevis*), AAR28532 (*Procambarus clarkii*), AAK68551 (*Caenorhabditis elegans*), XP_653525 (*Entamoeba histolytica*), EAL62716 (*Dictyostelium discoideum*), NP_001001323 (PMCA1), NP_068768 (PMCA3), NP_001675 (PMCA4), NP_004311 (SERCA1), NP_733765 (SERCA2), NP_777615 (SERCA3), AAF35375 (SPCA1), NP_000693 (Na⁺/K⁺ ATPase), and AAH31609 (Na⁺/K⁺ ATPase).

Dall'analisi si può osservare che la glicina in posizione 283 è molto conservata sia tra le diverse specie che tra le altre pompe di tipo P. Invece l'amminoacido G293 della PMCA2 è conservato solo in 3 isoforme della PMCA. L'analisi mostra anche che G293 viene maggiormente conservato tra i mammiferi (Fig. 2.2A).

2.2 Analisi quantitativa della sovraespressione delle pompe mutate in cellule CHO

I livelli di espressione delle proteine PMCA2 w/a e delle pompe mutate PMCA w/a (G283S) e PMCA w/a (G293S) sono state valutate tramite esperimenti di Western Blotting e analisi densometrica. Le cellule CHO sono state transfettate con i vettori di espressione per PMCA2 w/a , PMCA w/a (G283S) e PMCA w/a (G293S) e dopo 36 ore le cellule sono state raccolte e sono stati preparati gli estratti proteici. Le proteine totali sono state denaturate in un tampone di solubilizzazione contenente il detergente SDS e l'agente riducente β -mercaptoetanololo per 5' a 95°C. La separazione delle proteine è stata effettuata su gel di poliacrilammide 10% e successivamente le proteine sono state trasferite su filtro di nitrocellulosa. Le bande proteiche di interesse sono state visualizzate tramite incubazione delle proteine con l'anticorpo policlonale 2N preparato in coniglio, con un anticorpo secondario coniugato con HRP e con successivo trattamento con ECL. L'analisi densometrica delle bande proteiche è stata effettuata tramite il programma Kodak1D Image analysis (Kodak Scientific Imaging System). Successivamente la stessa membrana di nitrocellulosa è stata incubata con l'anticorpo anti- β -actina di topo (una proteina che si esprime in maniera costitutiva) e lo specifico anticorpo secondario coniugato con HRP, in modo da normalizzare il segnale di ogni campione rispetto alla quantità di proteina caricata in ogni corsia. Come controllo negativo di espressione della PMCA2 è stato usato un campione di lisato proteico da cellule CHO non transfettate con PMCA2. I risultati ottenuti sono mostrati nella Fig. 2.3

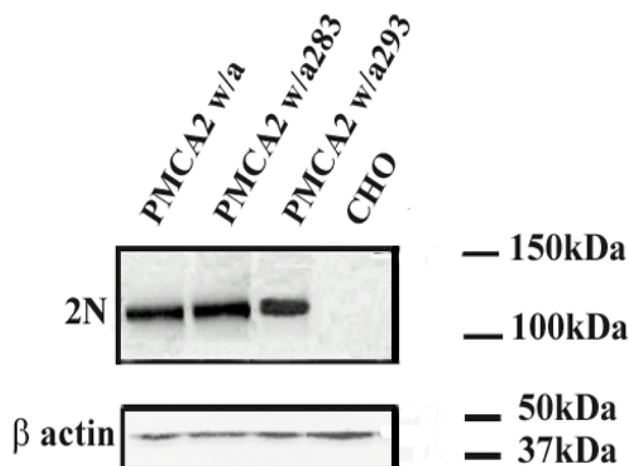


Fig. 2.3 Analisi dei livelli di espressione proteica delle pompe PMCA2. I lisati totali di cellule CHO transfettate transientemente con i vettori di espressione che codificano PMCA2 w/a , PMCA w/a (G283S) e PMCA w/a (G293S) sono stati caricati su gel di poliacrilammide SDS-

PAGE. Nell'ultima corsia è stato caricato il lisato cellulare di cellule CHO non transfettate che non esprimono la PMCA2. Le bande proteiche sono state rivelate con incubazione con l'anticorpo primario isoforma specifico 2N e l'anticorpo secondario coniugato con HRP. L'analisi dei livelli di espressione di PMCA è stata condotta normalizzando l'intensità delle bande su livelli di β -actina (pannello inferiore).

L'anticorpo 2N ha riconosciuto delle proteine di dimensioni intorno a 130 kDa, peso molecolare che corrisponde a quello della proteina PMCA. L'analisi quantitativa dell'espressione delle proteine PMCA2w/a, PMCAw/a(G283S) e PMCAw/a(G293S) è stata condotta normalizzando l'intensità delle bande della proteina di interesse sui valori di intensità della proteina di β -actina (42kDa). L'analisi densometrica ha dimostrato che le forme mutate della PMCA2 si esprimono a livelli equivalenti a quelli della pompa PMCA2w/a WT.

2.3 Analisi immunocitochimica delle cellule CHO che esprimono le pompe PMCA2 mutate

Gli esperimenti di immunocitochimica sono stati eseguiti allo scopo di verificare che PMCAw/a(G283S) e PMCAw/a(G293S) venissero localizzate correttamente sulla membrana plasmatica. Le cellule CHO sono state seminate su vetrini di 13mm di diametro e transfettate transientemente con i plasmidi di espressione per PMCA2w/a, PMCAw/a(G283S) e PMCAw/a(G293S). 36ore dopo la transfezione le cellule sono state fissate e successivamente incubate con l'anticorpo primario 2N. L'immunorivelazione è stata effettuata incubando le cellule con un anticorpo secondario anti-coniglio coniugato con il cromoforo AlexaFluor488. La distribuzione cellulare delle proteine è mostrata nella Fig. 2.4.

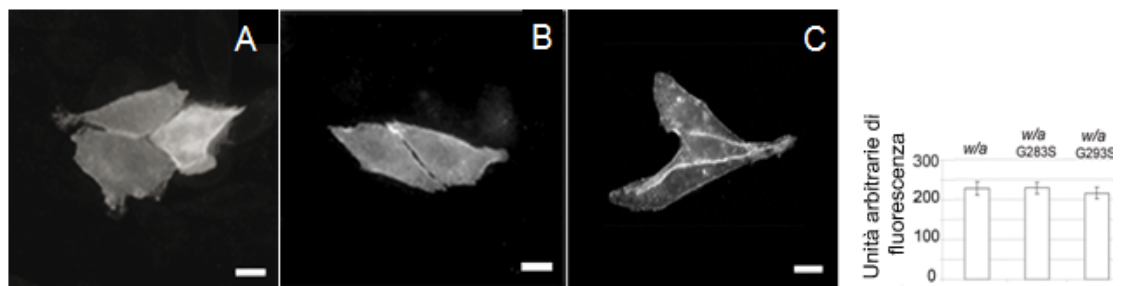


Fig. 2.4 Immunolocalizzazione delle pompe PMCA2w/a, PMCA2w/a(G283S) e PMCA2w/a(G293S) in cellule CHO. Le cellule CHO sono state transfettate transientemente con i plasmidi di espressione che codificano le pompe mutate e la PMCA2 WT. L'immunoistochimica è stata condotta utilizzando l'anticorpo policlonale 2N e l'anticorpo secondario coniugato con AlexaFluor488. I pannelli mostrano rispettivamente l'immunolocalizzazione di PMCAw/a (A), PMCAw/aG283S (B) e PMCAw/aG293S (C).

L'istogramma a destra mostra la quantificazione dei livelli di fluorescenza a livello della membrana plasmatica. Barra, 20 μ m.

Come si può osservare dalla Fig. 2.4 il segnale di fluorescenza è distribuito sul contorno della cellula sia per le pompe mutate che per quella WT ad indicare che PMCA2w/a(G283S) e PMCA2w/a(G293S), ugualmente alla pompa PMCAw/a WT, vengono localizzate correttamente a livello della membrana plasmatica. L'istogramma a destra che rappresenta la quantificazione dei livelli di fluorescenza a livello della membrana plasmatica (espressi in unità arbitrarie) e dimostra che tutte le PMCA2 vengono espresse a livelli equivalenti al livello della membrana plasmatica.

2.4 Analisi funzionale comparativa del controllo della $[Ca^{2+}]_c$ da parte delle pompe mutate della PMCA2 e della variante WT in cellule CHO

Le cellule CHO sono state cotrasfettate con i plasmidi di espressione per cytAEQ e i plasmidi di transfezione per PMCA2w/a, PMCA2w/a(G283S) e PMCA2w/a(G293S). Dopo 36ore dalla transfezione sono stati analizzati i transienti di Ca^{2+} generati dalla stimolazione con ATP. Nella Fig 2.5 viene paragonata l'attività delle pompe mutate nel controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} nel citoplasma di cellule CHO alla attività della pompa PMCA2w/a WT. Le pompe mutate PMCA2w/a(G283S) e PMCA2w/a(G293S) hanno la stessa abilità della pompa WT di ridurre il picco del transiente di Ca^{2+} , quindi di rispondere velocemente ad un arrivo improvviso di Ca^{2+} nella cellula. Nella fase della discesa della concentrazione del Ca^{2+} le pompe mutate presentano invece una cinetica diversa dalla pompa WT: le pompe mutate sono più lente e non sono in grado di riportare il livello del Ca^{2+} nella citoplasma ai livelli basali nei tempi di durata degli esperimenti (Fig. 2.5). Il mutante *dfw* (G283S) rispetto al mutante umano G293S dimostra ancora meno capacità nell'espellere il Ca^{2+} nella fase discendente del transiente, quando cioè è richiesta l'attività a lungo termine della pompa PMCA2. Nella Tabella I vengono riassunti le medie dei valori massimi della concentrazione del Ca^{2+} raggiunti dal transiente di Ca^{2+} assieme ai valori medi del tempo in cui il picco del transiente di Ca^{2+} viene dimezzato.

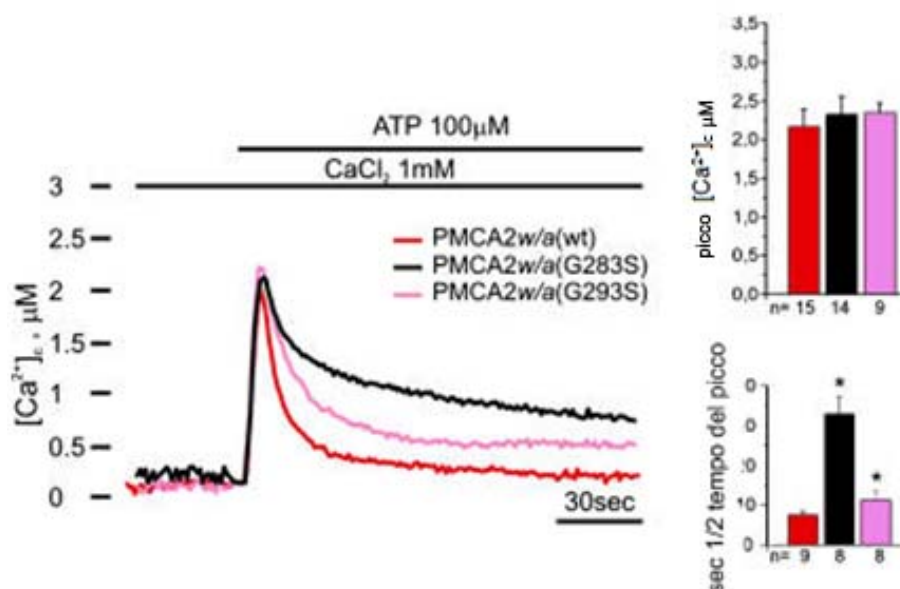


Fig. 2.5 Effetti della sovraespressione delle pompe PMCA2 mutate sul controllo dell'omeostasi del Ca²⁺. Le cellule CHO sono state cotrasfettate con i vettori di espressione per PMCA2w/a, PMCA2w/a(G283S) e PMCA2w/a(G293S). Dopo 36ore dalla transfezione le cellule sono state perfuse con KRB addizionato di 1mM CaCl₂. I transienti di Ca²⁺ sono stati generati dall'aggiunta nel medium di quantità di ATP 100µM. A destra viene mostrata la rappresentazione ad istogrammi dei valori medi dei picchi dei transienti di Ca²⁺ (±SD) e dei tempi in cui i valori dei picchi vengono dimezzati. Le barre rappresentano la deviazione standard: *, P<0,01 calcolato rispetto alla PMCA2w/a.

	Valori massimi dei transienti di Ca ²⁺	Sec del tempo 1/2 picco
PMCA2w/a	2,2 ± 0,2 µM (n=15)	* 7,4 ± 1s
PMCA2w/a(G283S)	2,3 ± 0,2 µM (n=14)	32,9 ± 4,4s
PMCA2w/a(G293S)	2,3 ± 0,1 µM (n=9)	* 11,3 ± 2,3s

Tabella I. Nella Tabella I vengono riassunti le medie dei valori dell'altezza del picco dei transienti di Ca²⁺ generati dalla stimolazione delle cellule con ATP. Vengono anche riportati in secondi i valori medi del tempo in cui il picco del transiente di Ca²⁺ viene dimezzato.

Le mutazioni *dfw* (G283S) e la mutazione umana G293S sono state introdotte anche nella variante di splicing PMCA2z/b. Prima di effettuare gli esperimenti di misurazione di Ca²⁺ nella cellula, sono stati condotti esperimenti di Western Blotting e di immunolocalizzazione per controllare i livelli di espressione della pompe mutate (dati non mostrati). E' interessante notare che se la mutazione *dfw* viene introdotta nella isoforma "full-length" PMCA2z/b, l'attività della pompa

è quasi completamente abolita: infatti nelle cellule che esprimono PMCAz/b G283S il picco del transiente di Ca^{2+} è uguale a quello delle cellule di controllo che esprimono solo la pompa endogena (Fig. 2.6).

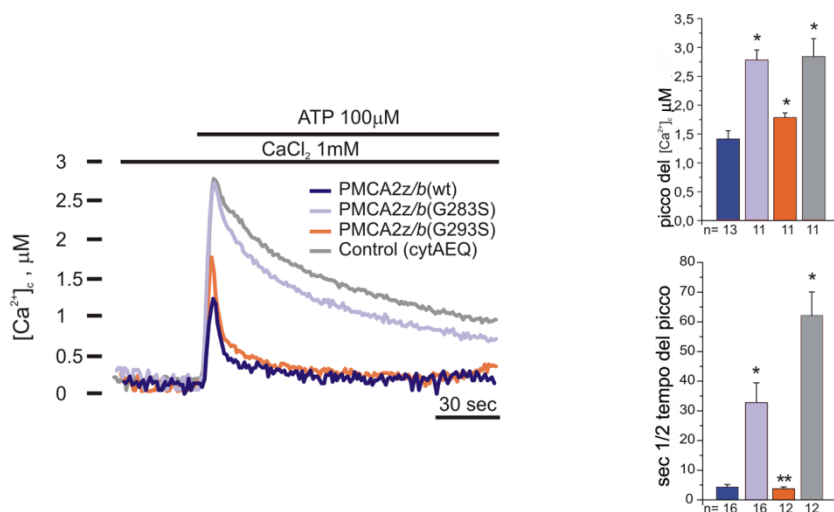


Fig. 2.6

Controllo dell'omeostasi Ca^{2+} in cellule CHO che sovraesprimono PMCA2z/b(G283S) e PMCA2z/b(G293S). Le cellule CHO sono state transfettate con i vettori di espressione per cytAEQ o cotransfettate con cytAEQ e i vettori di espressione per PMCA2z/b, PMCA2z/b(G283S) e PMCA2z/b(G293S). 36 ore dopo la transfezione l'equorina è stata ricostituita con 5 μM celenterazina. I transienti di Ca^{2+} sono stati generati da ATP 100 μM . A destra viene mostrata la rappresentazione ad istogrammi dei valori medi dei picchi dei transienti di Ca^{2+} ($\pm SD$) e dei tempi in cui i valori dei picchi vengono dimezzati. Le barre rappresentano la deviazione standard: *, $P < 0,01$ calcolato rispetto alla PMCA2w/a.

3 ANALISI FUNZIONALE COMPARATIVA IN CELLULE CHO DELL' ATTIVITA' DEI MUTANTI PMCA2w/a(E584K) e PMCA2w/a(S877F) E DELLA VARIANTE PMCA2w/a NATIVA

In collaborazione con due laboratori di ricerca in Inghilterra sono state identificate 2 nuove mutazioni in diverse regioni della pompa PMCA2: i topi sono stati sottoposti a mutagenesi ENU (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea) ed analizzati in base al fenotipo di sordità. I risultati di questa analisi hanno permesso di individuare una mutazione puntiforme nella regione di legame per l'ATP (*tommy*) che genera la sostituzione di un acido glutammico conservato nella posizione 584 con una lisina (E584K) ed un'altra mutazione chiamata *oblivion* che avviene nel dominio TM6 della PMCA2w/a dove una serina nella posizione 877 viene sostituita con una fenilalanina. I topi mutanti "tommy" e "oblivion" presentano problemi di sordità e di equilibrio (Spiden et al., 2008). Anche in

questo caso gli effetti delle due pompe mutanti “tommy” e “oblivion” sono state caratterizzate dal punto di vista funzionale in cellule CHO, paragonando la loro attività a quella della pompa PMCA2w/a WT.

3.1 Analisi di conservazione tramite ClustalW degli aminoacidi E584 e S877 mutati nella PMCA2

Tramite il programma ClustalW è stata effettuata un’analisi per valutare il grado di conservazione dell’acido glutammico nella posizione 584 e della serina 877 nel TM6 nelle pompe PMCA di diverse specie (Fig 3.1 A, 3.2A) e nelle diverse pompe di tipo P (Fig. 3.1 B e 3.2B).

Da quest’analisi si può osservare che l’acido glutammico nella posizione 584 e la serina 877 nella PMCA2 sono altamente conservati sia tra le pompe PMCA delle diverse specie che tra le diverse pompe di tipo P.

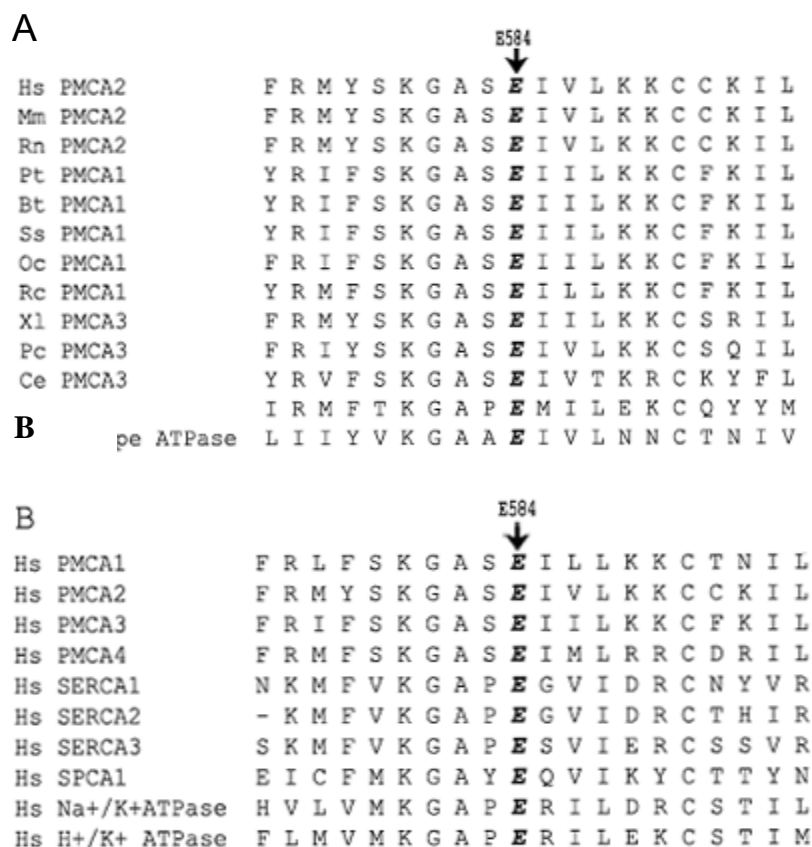


Fig. 3.1 Analisi di conservazione con ClustalW dell’acido glutammico nella posizione 584 nella PMCA2. Tramite il programma di ClustaW è stato possibile condurre un’analisi di similarità tra la sequenza di PMCA2 (Nr di accesso nella banca dati GenBank. NP_001674) con le PMCA di altre specie (**A**) e le altre pompe di tipo P (**B**). I nr di accesso nella banca dati di Genbank per le specie qui elencate sono: AAH75643 (*Mus musculus*), NP_036640 (*Rattus*

norvegicus), XP_509257 (*Pan troglodytes*), NP_777121 (*Bos taurus*), NP_999517 (*Sus scrofa*), Q00804 (*Oryctolagus cuniculus*), AAK11272 (*Rana catesbeiana*), AAH77905 (*Xenopus laevis*), AAR28532 (*Procambarus clarkii*), AAK68551 (*Caenorhabditis elegans*), XP_653525 (*Entamoeba histolytica*), EAL62716 (*Dictyostelium discoideum*), NP_001001323 (PMCA1), NP_068768 (PMCA3), NP_001675 (PMCA4), NP_004311 (SERCA1), NP_733765 (SERCA2), NP_777615 (SERCA3), AAF35375 (SPCA1), NP_000693 (Na⁺/K⁺ ATPase), and AAH31609 (Na⁺/K⁺ ATPase).

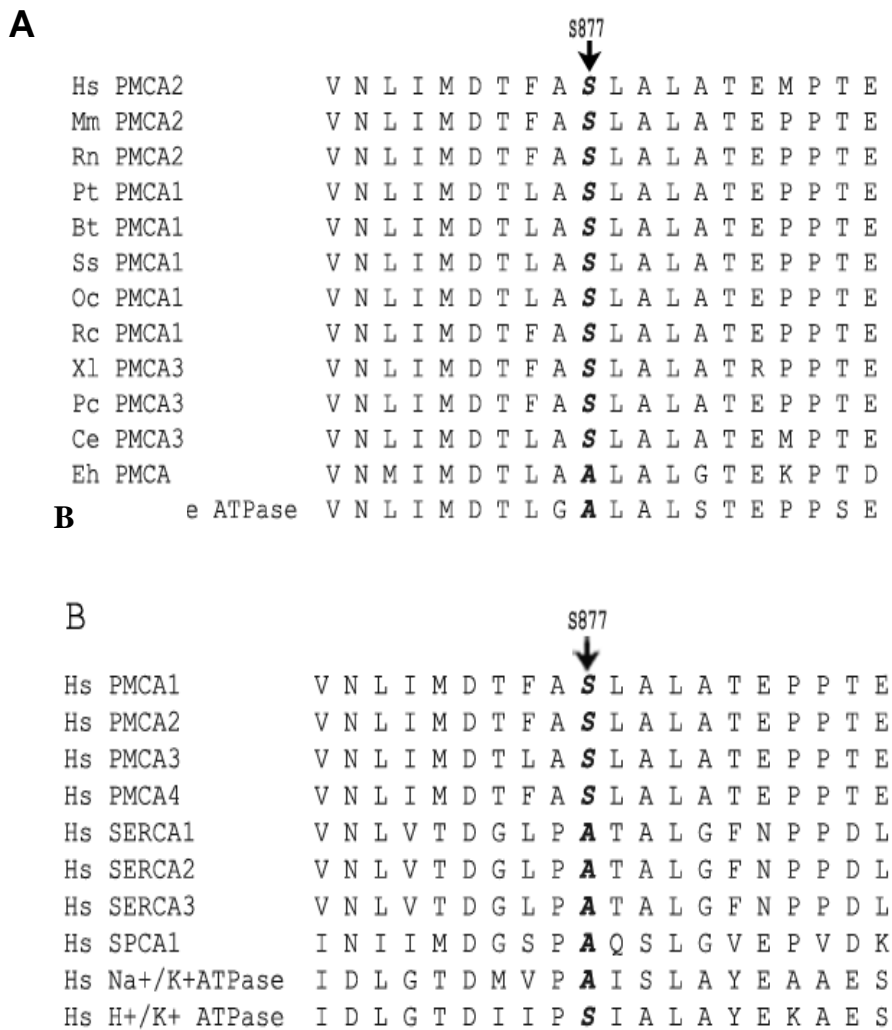


Fig. 3.2 Analisi di conservazione con ClustalW della serina nella posizione 877 nel dominio transmembrana 6 nella PMCA2. Tramite il programma ClustalW è stata condotta un'analisi di similarità tra la sequenza di PMCA2 (Nr di accesso nella banca dati GenBank. NP_001674) con le PMCA di altre specie **(A)** e di altre pompe di tipo P **(B)**. I nr di accesso nella banca dati di Genbank per le specie qui elencate sono: AAH75643 (*Mus musculus*), NP_036640 (*Rattus norvegicus*), XP_509257 (*Pan troglodytes*), NP_777121 (*Bos taurus*), NP_999517 (*Sus scrofa*), Q00804 (*Oryctolagus cuniculus*), AAK11272 (*Rana catesbeiana*), AAH77905 (*Xenopus laevis*), AAR28532 (*Procambarus clarkii*), AAK68551 (*Caenorhabditis*

elegans), XP_653525 (*Entamoeba histolytica*), EAL62716 (*Dictyostelium discoideum*), NP_001001323 (PMCA1), NP_068768 (PMCA3), NP_001675 (PMCA4), NP_004311 (SERCA1), NP_733765 (SERCA2), NP_777615 (SERCA3), AAF35375 (SPCA1), NP_000693 (Na⁺/K⁺ ATPase), and AAH31609 (Na⁺/K⁺ ATPase).

Dall'analisi di conservazione con ClustalW degli amminoacidi mutati E584 (Fig 3.1) e S877 (Fig.3.2) e delle loro regioni fiancheggianti si può notare che tutte e sia il residuo di acido glutammico che il residuo di serina sono altamente conservati sia tra geni ortologi sia in tutti i tipi di pompe ATPasi di tipo P.

3.2 Analisi immunocitochimica delle cellule CHO che esprimono le pompe mutate PMCA2w/a E584K e S877F

La capacità delle pompe mutate PMCA2w/aE584K e PMCA2w/aS877F di espellere ioni Ca²⁺ è stata paragonata con quella della pompa PMCA2w/a nativa in cellule modello CHO. Prima di fare questa analisi sono stati condotti esperimenti delle analisi di immunocitochimica per controllare se le due pompe mutate fossero espresse correttamente a livello della membrana plasmatica e, come in precedenza, se fossero espresse in quantità equivalente in questo compartimento cellulare. Per questo il segnale di fluorescenza sulla membrana plasmatica è stato quantificato ed il risultato dell'analisi è riportato in Fig 3.3 A e B.

Le cellule CHO sono state transfettate con i vettori di espressione per la pompa PMCA2 w/a e PMCA2w/a mutate. 36 ore dopo la transfezione le cellule sono state processate per gli esperimenti di immunofluorescenza. Le pompe sovraespresse PMCA2w/a sono state visualizzate tramite incubazione con anticorpo monoclonale anti-PMCA 5F10 e con l'anticorpo secondario AlexaFluor488. I livelli di fluorescenza sulla membrana plasmatica sono stati quantificati tramite un software sviluppato nel nostro laboratorio (Fig 3.3).

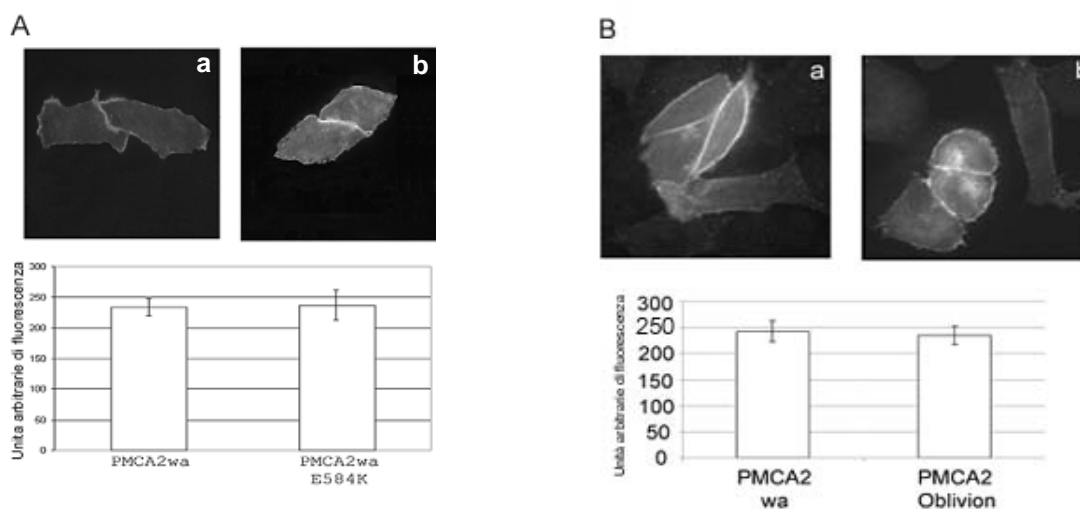


Fig. 3.3 Immunolocalizzazione delle pompe PMCA2w/a, PMCA2w/a(E584K) e PMCA2w/a(S877F) in cellule CHO. Dopo 36 ore dalla transfezione con i plasmidi di espressione che codificano le pompe mutate e la PMCA2w/a WT, le cellule sono state fissate ed incubate con anticorpo primario 5F10 e secondario coniugato con AlexaFluor488. I pannelli mostrano rispettivamente l'immunolocalizzazione di PMCAw/a (A.a), PMCAw/aE584F (A.b), PMCAw/a (B.a) e PMCAw/aS877F (B.b). Gli istogrammi sotto i pannelli mostrano i livelli di fluorescenza (espressi in unità arbitrarie) del segnale delle PMCA mutate e WT a livello della membrana plasmatica.

Come si può osservare dalla Figura 3.3 nessuna delle due mutazioni altera il “targeting” delle pompe mutate verso la membrana plasmatica. Precedentemente era stato suggerito che sostituzioni di amminoacidi nei domini transmembrana della PMCA possono modificare il corretto direzionamento della pompa verso la membrana plasmatica (Guerini *et al.*, 2000): ci pareva quindi particolarmente opportuno effettuare questo esperimento di controllo che ha dimostrato che la mutazione S877F nel TM6 non modifica il “targeting” della pompa verso la membrana plasmatica.

Gli istogrammi nella Fig. 3.3 dimostrano anche che le pompe mutate sono espresse nella membrana plasmatica in quantità paragonabili alla pompa PMCA2w/a WT.

3.3 Analisi funzionale delle pompe mutate PMCA2w/aE584K e PMCA2w/aS877F sovraespresse in cellule CHO

Dopo aver stabilito che le pompe mutate PMCA2w/aE584K e PMCA2w/aS877F vengono espresse sulla membrana plasmatica e che i livelli proteici di espressione sono equivalenti tra di loro e a quelli della pompa PMCA2w/a WT, sono stati effettuati dei saggi funzionali per misurare l'attività delle pompe mutate e per paragonare la loro attività a quella della pompa PMCA2w/WT.

Le cellule CHO sono state piastrate su vetrini di 13mm di diametro e transfettate con il plasmide che codifica l'equorina indirizzata al citoplasma (cytAEQ) o cotransfettate con cytAEQ e il vettore di espressione per le pompe mutate e quella WT. Dopo 36 ore dalla transfezione l'equorina è stata ricostituita aggiungendo 5µM celenterazina al terreno di coltura DMEM addizionato dell'1% di FBS ed incubando le cellule a 37°C per 3 ore circa. Dopo il periodo di ricostituzione il vetrino con le cellule è stato trasferito nella cassetta termostata del luminometro e perfuso con la salina Krebs-Ringer contenente CaCl₂ 1mM, le cellule sono quindi state stimulate con ATP.

Come si può vedere dalla Fig. 3.4 A e B le 2 pompe mutate hanno la stessa capacità della pompa nativa di contrastare il picco del transiente di Ca²⁺ generato dalla stimolazione cellulare. Dai grafici della Fig. 3.4 che illustrano degli esperimenti rappresentativi, si può osservare che entrambe le pompe mutate sono parzialmente attive (si veda la fase di discesa del transiente di Ca²⁺ rispetto alle cellule di controllo che esprimono solo equorina, traccia grigio scura) ma la loro capacità di contrastare il transiente è quasi completamente abolita (si veda la fase di discesa del transiente di Ca²⁺ rispetto alle cellule che esprimono PMCA w/a WT, traccia nera).

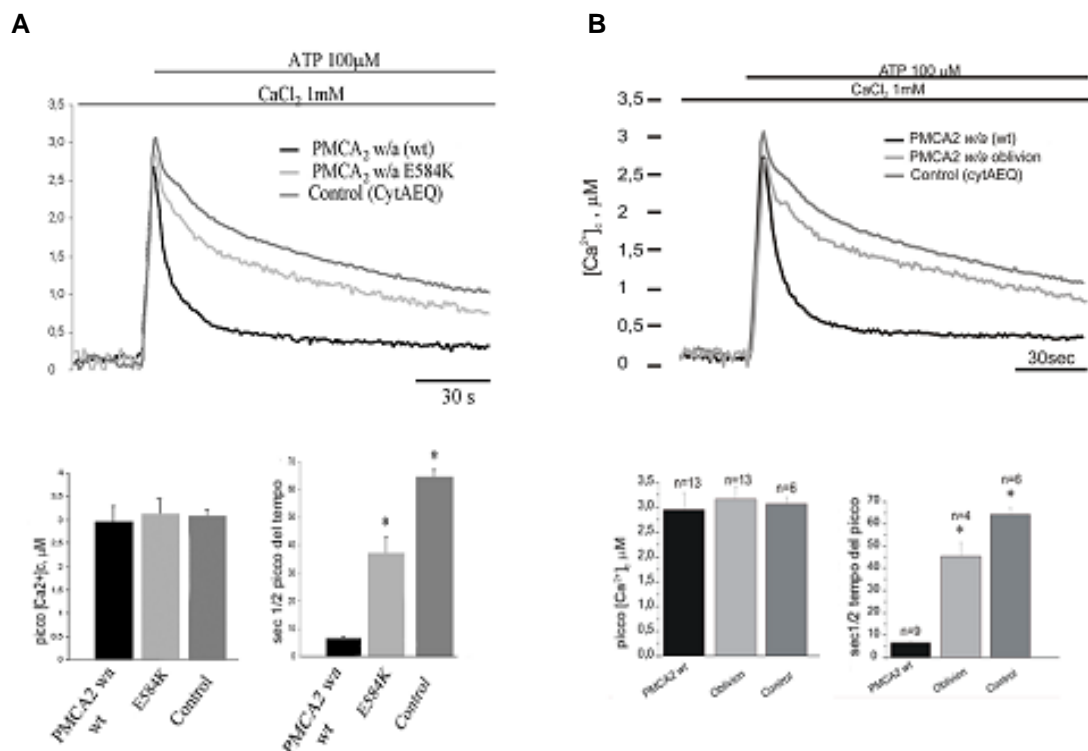


Fig. 3.4 Misura della concentrazione della [Ca²⁺]_i in cellule CHO che sovraesprimono le pompe mutate tommy e oblivion. Le cellule CHO sono state transfettate con il vettori di espressione per cytAEQ o cotransfettate con cytAEQ e i vettori di espressione per PMCA2w/a, PMCA2w/a(E584K) (A) e PMCA2w/a(S877F) (B). 36 ore dopo la transfezione l' equorina è

stata ricostituita con 5 μ M celenterazina e le cellule sono state perfuse con KRB addizionato di 1mM CaCl₂. Dove è indicato le cellule sono state stimulate con ATP 100 μ M. Sotto i grafici viene mostrata la rappresentazione ad istogrammi dei valori medi dei picchi dei transienti di Ca²⁺ (\pm SD) e dei tempi in cui i valori dei picchi vengono dimezzati. Le barre rappresentano la deviazione standard: *, P<0,01 calcolato rispetto alla PMCA2w/a. I tempi dei dimezzamenti dei picchi sono: controllo 64.15 \pm 3.02s (n=6) nelle cellule di controllo, 6.55 \pm 0.72 s (n=9) nelle cellule che esprimono la pompa nativa, 37.1 \pm 5.78s (n=9) nelle cellule che esprimono la pompa "tommy" E584K e. 45.5 \pm 5.97s (n=4) nelle cellule che esprimono il mutante "oblivion" S877F, p<0.001

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti durante questo Dottorato di ricerca hanno contribuito a chiarire il motivo della esistenza di un numero molto elevato di isoforme della pompa PMCA ed a caratterizzare l'isoforma neuronale PMCA2. L'isoforma 2 è l'unica a non interagire con la proteina 14-3-3 ϵ : anche se possiede il sito consenso di interazione per questa proteina, alcune peculiarità nella sequenza amminoacidica della regione fiancheggiante il sito di consenso perturbano il carattere anfipatico della sua struttura secondaria ad alfa elica impedendone così l'interazione con la proteina 14-3-3 ϵ . Questa caratteristica suggerisce che la PMCA2 possa avere un ruolo peculiare nel controllo dell'omeostasi del Ca²⁺ cellulare rispetto alle altre isoforme e che nel controllo della sua attività possano intervenire fattori specifici e unici per questa isoforma. Anche i meccanismi di splicing rendono ancora più particolare l'isoforma 2. Lo splicing nel sito A è molto complesso per la PMCA2 e non è condiviso dalle altre isoforme. Per questo si è deciso di caratterizzare dal punto di vista funzionale le diverse isoforme di splicing della PMCA2. L'analisi delle isoforme *w/a*, *w/b*, *z/a* e *z/b* ha mostrato che l'isoforma di splicing *w/a*, che si trova nelle stereocilia delle cellule sensoriali dell'orecchio interno e alla quale è stata rivolta un'attenzione particolare in quanto se mutata dà origine a sordità genetica, è in grado di contrastare con minore efficienza l'aumento transiente della concentrazione di Ca²⁺ generato dalla stimolazione cellulare. Tale caratteristica potrebbe dipendere dal fatto che l'inserzione degli esoni di 33, 60 e 42 nt nel sito A potrebbe influenzare l'attivazione della pompa da parte degli acidi fosfolipidi perturbando la struttura del loro sito di legame a livello del "loop" citosolico tra il dominio TM2 e TM3 della pompa. L'attivazione da parte dei fosfolipidi acidi potrebbe essere ulteriormente ridotta in questa variante in quanto l'altra regione deputata al loro legame è a livello del dominio di legame per la CaM che nella pompa *w/a* è in forma troncata a causa dello splicing che avviene a livello del sito C. La presenza di questa isoforma come unico sistema di estrusione del Ca²⁺ dalle stereocilia delle cellule sensoriali dell'orecchio interno è probabilmente dettata dalle esigenze particolari del controllo di omeostasi di Ca²⁺ richieste da queste cellule. L'endolinfa, il liquido extracellulare che bagna queste cellule e che media la trasmissione dello stimolo sonoro, è caratterizzata dalla presenza di Ca²⁺ in concentrazioni molto più basse (dell'ordine di 20 μ M) di quelle normalmente presenti nei fluidi extracellulari che sono dell'ordine di valori mM. La presenza di una pompa che estrude Ca²⁺ con scarsa efficienza è quindi probabilmente legata a

questa esigenza. Questa pompa tuttavia deve anche controllare l'omeostasi del Ca^{2+} a livello intracellulare. Infatti, nelle cellule ciliate dell'orecchio interno il Ca^{2+} svolge un ruolo molto importante come modulatore dei canali di meccano-elettro-trasduzione (canali MET) che mediano la trasduzione meccano-elettrica dei segnali sonori. Gli stimoli sonori vengono infatti percepiti come uno stimolo meccanico che porta al movimento ciliare delle stereocilia a livello della membrana apicale delle cellule ciliate. Il movimento delle stereocilia aumenta la tensione dei "tip-links" (i filamenti che collegano le stereocilia assieme formando un "ciuffo sensoriale"). Questa tensione viene trasmessa ai canali MET che si aprono permettendo così l'ingresso degli ioni Ca^{2+} dall'endolinfa. La concentrazione di Ca^{2+} intracellulare è quindi ripristinata grazie alla attivazione della PMCAw/a della membrana apicale (Lumpkin et al., 1998; Ricci et al., 1998) e in misura minore alla diffusione degli ioni Ca^{2+} nel resto della cellula, dalla quale vengono poi estrusi mediante l'attivazione della isoforma PMCA1b che è espressa esclusivamente a livello della membrana basolaterale delle cellule ciliate e delle cellule di supporto.

Il controllo locale a livello delle stereocilia dell'omeostasi del Ca^{2+} ha un ruolo chiave nei processi di meccanotrasduzione ed in particolare nella regolazione del processo di adattamento dei canali MET (Fettiplace R et al., 2003, Assad JA et al., 1989). La capacità di percepire stimoli sonori consecutivi con elevata sensibilità attraverso i movimenti del "cuffo ciliare" dipende dalla inattivazione dei canali MET e dal loro ritorno nello stato di conformazione chiuso (Fettiplace et al., 2006).

I saggi funzionali della attività delle pompe presentati in questa tesi hanno dimostrato che le mutazioni analizzate non compromettono la capacità della pompa PMCA2 di rispondere ad un aumento repentino di Ca^{2+} nella cellula, ma compromettono la sua capacità di operare nel ripristino rapido delle concentrazioni di Ca^{2+} basale: in altre parole le cellule che possiedono la pompa PMCA2 mutata restano esposte ad un concentrazione di Ca^{2+} citosolica elevata per un tempo più lungo rispetto alle cellule che esprimono la pompa WT. Come conseguenza della difettosa estrusione di Ca^{2+} dalle stereocilia, viene a mancare l'inattivazione Ca^{2+} -dipendente dei canali MET che quindi restano aperti per più tempo. diminuendo La riduzione della concentrazione di Ca^{2+} vicino ai "tip-links" che si verifica in presenza di pompe mutate porta quindi ad un aumento della probabilità di apertura dei canali MET e alla conseguente riduzione del loro tasso di adattamento (Fig.1). Questo difetto compromette probabilmente la capacità di percepire stimoli sonori successivi e quindi determina sordità.

Molte questioni restano ancora aperte sulla isoforma PMCA2w/a: una di queste, alla quale abbiamo tentato di rispondere, è come tale isoforma sia indirizzata e mantenuta in un compartimento specializzato della cellula come le stereocilia, quindi nella parte apicale, e non venga invece anche espressa nella membrana plasmatica basolaterale delle cellule ciliate in cui prevale la pompa PMCA1b. E' noto che l'inserzione degli esoni che determinano la variante w è una caratteristica essenziale al targeting della pompa alla membrana apicale (Chicka, M.C., and Strehler, E.E. 2003) ma se siano necessari altri determinanti molecolari per direzionarla e mantenerla correttamente in questa sede specifica al momento è solo un ipotesi di lavoro. Abbiamo cercato di indagare questa possibilità conducendo uno screening di interattori con il saggio del doppio ibrido in lievito utilizzando un'esca specifica che comprende la regione di inserzione w ma la ricerca non ha dato risultati positivi.

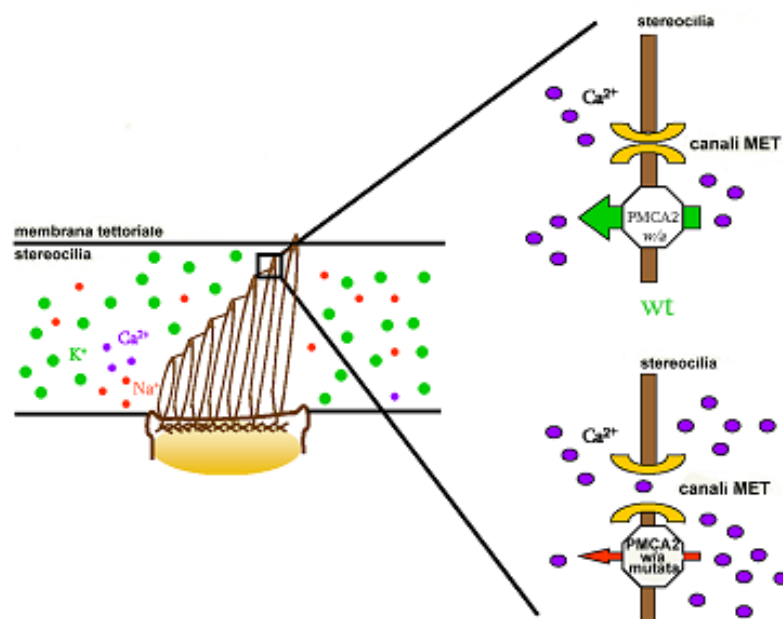


Figura 1. Rappresentazione schematica del meccanismo di trasduzione dei segnali sonori. Nella figura vengono indicati la PMCA2w/a e i canali MET. Le mutazioni nella pompa PMCA2w/a riducono l'abilità della pompa di rimuovere Ca^{2+} dalle stereocilia, riducendo così anche la concentrazione di Ca^{2+} nell'endolinfa ed aumentando in questo modo la probabilità di apertura dei canali MET (Ficarella *et al.*, 2007).

REFERENZE

- Algenstaedt, P., Antonetti, D.A., Yaffe, M. B., and Kahn, C.R. Insulin receptor substrate proteins create a link between the tyrosine phosphorylation cascade and the Ca²⁺-ATPases in muscle and heart (1997). *J Biol Chem* **272**:23696:702
- Allen, D.G., and Blinks, J.R. Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle (1978). *Nature* **273**:509-13
- Armesilla, A.L., Williams, J.C., Buch, M.H., Pickard, A., Emerson, M., Cartwright, E.J., Oceandy, D., Vos, M.D., Gillies, S., Clark, G.J., and Neyses, L. Novel functional interaction between the plasma membrane Ca²⁺ pump 4b and the proapoptotic tumor suppressor Ras-associated factor 1 (RASSF1) (2004). *J Biol Chem* **279**:31318-28
- Annunziato, L., Pignataro, G., and Di Renzo, G.F. Pharmacology of brain Na⁺/Ca²⁺ exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives (2004). *Pharmacological reviews* **56**: 633-54
- Asturias, F.J., Fischetti R.F., and Blasie, J.K. Changes in the profile structure of the sarcoplasmic reticulum membrane induced by phosphorylation of the Ca²⁺-ATPase enzyme in the presence of terbium: a time resolved X-ray diffraction study (1994). *Biophys J.* **66**:1653-64
- Assad, J.A., Hacoen, N., and Corey, D.P. Voltage dependence of adaptation and active bundle movement in bullfrog saccular hair cells (1989). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**:2918-22
- Babu, Y.S., Sack, J.S., Greenhough, T.J., Bugg, C.E., Means, A.R., and Cook, W.J. Three-dimensional structure of calmodulin (1985). *Nature* **317**:37-40
- Barrabin, H., Garrahan, P.J., and Rega, A.F. Vanadate inhibition of the Ca²⁺-ATP-ase from human red cell membranes (1980). *Biochim Biophys Acta* **600**:796-804
- Bassik, M.C., Scorrano, L., Oakes, S.A., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. Phosphorilation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis (2004) *EMBO J* **23**:1207-16
- Berridge, M.J. Cell signalling. A tale of two messengers (1993). *Nature* **365**:388-9
- Berridge, M.J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle (2002). *Cell calcium* **32**: 235-49
- Bobbe, R., Bredoux, R., Wuytack, F., Quarck, R., Kovacs, T., Papp, B., Corvazier, E., Magnier, C., and Enouf, J. The rat platelet 97-kDa Ca²⁺ATPase isoform is the sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase 3 protein (1994). *J. Biol.Chem.* **269**:1417-24

Boeckmann, B., Bairoch, A., Apweiler, R., et al., The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL. *Nucleic Acids Res.* **31**:365–370

Bozulic, L.D., Malik, M.T., Powell, D.W., Nanez, A., Link, A.J., Ramos, K.S., and Dean, W.L. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase associates with CLP36, alpha-actinin and actin in human platelets (2007). *Thromb Haemost* **97**:587-97

Brandl, C.J., deLeon, S., Martin, D.R., and MacLennan, D.H. Adult forms of the Ca^{2+} ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle (1987). *J Biol Chem* **262**:3768-74

Brandt, P., Ibrahim, E., Bruns, G.A. and Neve, R.L. Determination of the nucleotide sequence and chromosomal localization of the ATP2B2 gene encoding human Ca^{2+} -pumping ATPase isoform PMCA2 (1992). *Genomics* **14**:484-487

Brent, R., and Ptashne, M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor (1985). *Cell* **43**:279:36.

Brini, M., Marsault, R., Bastianutto, C., Alvarez, J., Pozzan, T., and Rizzuto, R. Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$). A critical evaluation (1995). *J Biol Chem* **270**: 9896-9903

Brini, M., Pinton, P., Pozzan, T., and Rizzuto R. Targeted recombinant aequorins: tools for monitoring Ca^{2+} in the various compartments of a living cell (1999). *Microsc Res Tech*.**46**:380-9

Brini, M., Coletto, L., Pierobon, N., Kraev, N., Guerini, D., and Carafoli, E. A comparative functional analysis of plasma membrane Ca^{2+} pump isoforms in intact cells (2003). *J. Biol. Chem.* **278**: 24500-08

Brini M. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase:from a housekeeping function to a versatile signaling role (2008). *Pflugers Arch* **457**:657-64

Brodin, P., Falchetto, R., Vorherr, T., and Carafoli, E. Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca^{2+} pump (1992). *Eur. J. Biochem.* **204**: 939–46

Brown, B.J. Hilfiker, H., DeMarco, S.J., Zacharias, D.A., Greenwood, T.M., Guerini, D., and Strehler, E.E. Primary structure of human plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 3 (1996). *Biochim. Biophys. Acta* **1283**:10-13

Brown, C.S., and Dean, W.L., Regulation of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in human platelets by calpain (2007). *Platelets* **18**:207-11

Buch, M.H., Pickard, A., Rodriguez, A., Gillies, S., Maass, A.H., Emerson, M., Cartwright, E.J., Williams, J.C., Oceandy, D., Redondo, J.M., Neyses, L., and Armesilla, A.L. The sarcolemmal calcium pump inhibits the calcineurin/nuclear factor of activated T-cell pathway via interaction with the calcineurin A catalytic subunit (2005). *J Biol Chem* **280**:29479-87

Carafoli, E., Tiozzo, R., Lugli, G., Crovetti, F., and Kratzing C. The release of calcium from heart mitochondria by sodium (1974). *J Mol Cell Cardiol* **6**:361-71

Carafoli, E., and Penniston, J.T. The calcium signal (1985). *Sci Am* **250**: 70-78

Carafoli, E., and Brini, M. Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport (2000). *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2** 152-61

Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., and Brini, M. Generation, control, and processing of cellular calcium signals (2001). *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **36**: 107-260

Chaudhary, J., Walia, M., Matharu, J., Escher, E., and Grover, A.K. Caloxin: a novel plasma membrane Ca^{2+} pump inhibitor (2001). *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **280**: C1027-C1030

Chicka, M.C., and Strehler, E.E. Alternative splicing of the first intracellular loop of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 2 alters its membrane targeting (2003). *J Biol Chem* **278**:18464-70

Dean, W.L., Chen, D., Brandt, P.C., and Vanaman, T.C. Regulation of platelet plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by cAMP-dependent and tyrosine phosphorylation (1997). *J. Biol.Chem* **272**:15113-9

DeMarco, S.J., and Strehler, E.E. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoforms 2b and 4b interact promiscuously and selectively with members of the membrane-associated guanylate kinase family of PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) domain-containing proteins (2001). *J. Biol. Chem.* **276**: 21594-21600

DeMarco, S.J., Chicka, M.C., and Strehler, E.E. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 2b interacts preferentially with Na^+/H^+ exchanger regulatory factor 2 in apical plasma membranes (2002). *J. Biol. Chem.* **277**:10506-11

Denton, R.M., and McCormack, J.G. Fuel selection at the level of mitochondria in mammalian tissues (1995). *Proc Nutr Soc* **54**:11-22

Ebashi, S., and Lipmann, F. Adenosine-trisphosphate-linked concentration of rabbit muscle (1962). *J. Cell Biol.* **14**: 389-400

Elwess, N.L., Filoteo, A.G., Enyedi, A. and Penniston, J.T. Plasma membrane Ca^{2+} pump isoforms 2a and 2b are unusually responsive to calmodulin and Ca^{2+} (1997). *J. Biol. Chem.* **272**: 17981-17986

Enyedi, A., Flura, M., Sarkadi, B., Gardos, G., and Carafoli, E. The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently (1987). *J Biol Chem* **262**: 6425-3

Enyedi, A., Verma, A.K., Heim, R., Adamo, H.P., Filoteo, A.G., Strehler, E.E., and Penniston, J.T. The Ca^{2+} affinity of the plasma membrane Ca^{2+} pump is controlled by alternative splicing (1994). *J Biol Chem* **269**:41-43

Falchetto, R., Vorherr, T., Brunner, J., and Carafoli, E. The plasma membrane Ca^{2+} pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain (1991). *J. Biol. Chem.*, **266**:2930-6

Falchetto, R., Vorherr, T., and Carafoli, E. The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts with the transduction domain of the enzyme (1992). *Protein Sci.* **1**:1613-1621

Ferl, R.J., Manak, M.S., and Reyes, M.F. The 14-3-3s (2002). *Genome Biol* **27**

Fettiplace, R., and Ricci, A.J. Adaptation in auditory hair cells (2003). *Curr Opin Neurobiol* **13**:446-51

Fettiplace, R., and Hackney, C.M. The sensory and motor roles of auditory hair cells (2006). *Nat Rev Neurosci* **7**:19-29

Fleischer, S.E., Ogunbunmi, E.M., Dixon, M.C., and Fler, E.A.. Localization of Ca^{2+} release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:7256-9

Fujimoto, T. Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae (1993). *J. Cell Biol.* **120**:1147-1157

Furuichi, T., Yoshikawa, S., and Mikoshiba, K. Nucleotide sequence of cDNA encoding P400 protein in the mouse cerebellum (1989a). *Nucleic Acids Res.* **17**:5385-6

Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N., and Mikoshiba, K. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400 (1989b). *Nature* **342**:32-38

Furuta, H., Luo, L., Hepler, K., and Ryan, A.F. Evidence for differential regulation of calcium by outer versus inner hair cells: plasma membrane Ca^{2+} -ATPase gene expression (1998). *Hear. Res.* **123**: 10-26

Gatto, C., Hale, C.C., Xu, W., and Milanick, M.A. Eosin, a potent inhibitor of the plasma membrane Ca pump, does not inhibit the cardiac Na-Ca exchanger (1995). *Biochemistry* **34**:965-72

Goellner, G.M., DeMarco, S.J., and Strehler, E.E. Characterization of PISP, a novel single-PDZ protein that binds to all plasma membrane Ca^{2+} -ATPase b-splice variants (2003). *Ann N Y Acad Sci* **986**:461-71

Greeb, J., and Shull, G.E. Molecular cloning of a third isoform of the calmodulinsensitive plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle (1989). *J. Biol. Chem.* **264**:18569-18576

Grover, A.K. and Khan, I. Calcium pump isoforms: diversity, selectivity and plasticity (1992). *Cell Calcium* **13**:9-17

Guerini, D., Schrider, S., Foletti, D., and Carafoli, E. Isolation and characterization of a stable Chinese hamster ovary cell line overexpressing the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (1995). *J. Biol. Chem.* **270**:14643-14650

Guerini, D. The significance of the isoforms of plasma membrane calcium ATPase. (1998). *Cell Tissue Res* **292**: 191-7

Guerini, D., Zecca-Mazza, A., and Carafoli, E. Single amino acid mutations in transmembrane domain 5 confer to the plasma membrane Ca^{2+} pump properties typical of the Ca^{2+} pump of endo(sarco)plasmic reticulum (2000). *J Biol Chem* **275**:31361-8

Heim, R., Hug, M., Iwata, T., Strehler, E.E., and Carafoli, E. Microdiversity of human plasma-membrane calcium-pump isoform 2 generated by alternative RNA splicing in the N-terminal coding region (1992). *Eur. J. Biochem.* **205**, 333-340

Hess, P., Lansman, J.B., and Tsien, R.W. Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells (1986). *J. Gen. Physiol.* **88**:293-319

Hill, J.K., Williams, D.E., Lemasurier, M., Dumont, R.A., Strehler, E.E., and Gillespe, P.G. Splice-site A choice targets plasma-membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2 to hair bundles (2006). **26**:6172-80

Howard, A., Legon, S., and Walters, J.R. Human and rat intestinal plasma membrane calcium pump isoforms (1993). *Am J Physiol* **265**:917-25

Inesi, G., Hua, S., Xu, C., Ma, H., Seth, M., Prasad, A.M., and Sumbilla C. Studies of Ca²⁺ ATPase (SERCA) inhibition (2005). *J Bioenerg Biomembr.* **37**:365-8.

James, P., Maeda, M., Fischer, R., Verma, A.K., Krebs, J., Penniston, J.T., Carafoli, E. Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca²⁺ pump of human erythrocytes. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**: 2905-10

James, P.H., Pruschy, M., Vorherr, T., Penniston, J.T., and Carafoli, E. Primary structure of the cAMP-dependent phosphorylation site of the plasma membrane calcium pump (1989). *Biochemistry* **28**: 4253-8

Kim, E., DeMarco, S.J., Marfatia, S.M., Chisti, A.H., Sheng, M., and Strehler, E.E. Plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform 4b binds to membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) proteins via their PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domains (1998). *J.Biol. Chem.* **273**:1591-5

Kofuji, P., Lederer, W.J. and Schulze, D.H. Mutually exclusive and cassette exons underlie alternatively spliced isoforms of the Na/ Ca²⁺ exchanger (1994). *J.Biol.Chem.* **269**:5145-9

Kosk-Kosicka, D. and Bzdega, T. Activation of the erythrocyte Ca²⁺-ATPase by either self-association or interaction with calmodulin (1988). *J. Biol. Chem.* **263**:18184-18189

Kozel, P.J., Friedman, R.A., Erway, L.C., Yamoah, E.N., Liu, L.H., Riddle, T., Duffy, J.J., Doetschman, T., Miller, M.L., Cardell, E.L., and Shull, G.E. Balance and hearing deficits in mice with a null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2 (1998). *J. Biol. Chem.* **273**:18693-6

Kretsinger, R.H. and Nockholds, C.E. Carp muscle calcium binding protein. II. Structure determination and general description (1973). *J. Biol. Chem.* **248**:3313-26

Kühlbrandt W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases (2004). *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:282-95

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 (1970). *Nature* **227**:680-5

Levi, V., Rossi, J.P., Castello, P.R., and González Flecha, F.L. Structural significance of the plasma membrane calcium pump oligomerization (2002). *Biophys J.* **82**:437-46

Li, Z., Matsuoka, S., Hryshko, L.V., Nicoll, D.A., Bersohn, M.M., and Burke, E.P. Cloning of the NCX2 isoform of the plasmamembrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger (1994). *J. Biol. Chem.* **269**: 1116-9

Liou, J., Kim, M.L.; Heo, W.D.; Jones, J.T.; Myers., J.W., Ferrell, J.E.Jr., and Meyer, T. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx (2005). *Curr. Biol* **15**:1235-41.

Lytton, J., and MacLennan, D.H.. Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca²⁺-ATPase gene (1988). *J. Biol. Chem.***263**:15024-31

Lumpkin, E.A., and Hudspeth, A.J. Regulation of free Ca²⁺ concentration in hair cell stereocilia (1998). *J Neurosci* **18**:6300-18

Maeda, N., Kawasaki, T., Nakade, S., Yokota, N., Taniguchi, T., Kasai, M., and Mikoshiba, K. Structural and functional characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel from mouse cerebellum (1991). *J. Biol. Chem.* **266**:1109-16

Marsault, R., Murgia, M., Pozzan, T., Rizzato, R. Domains of high Ca²⁺ beneath the plasma membrane of A7r5 cells. (1997). *EMBO J.* **16**: 1575-1581

Makinose, M., Hasselbach, W. ATP synthesis by the reverse of the sarcoplasmic calcium pump. (1971). *FEBS lett.* **12**: 271-272

McCullough, B.J and Tempel, B.L. Haplo-insufficiency revealed in deafwaddler mice when tested for hearing loss and ataxia (2004). *Hear Res* **195**:90-102

Mignery, G.A., Johnston, P.A., and Südhof, T.C. Mechanism of Ca²⁺ inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) binding to the cerebellar InsP3 receptor (1992). *J. Biol. Chem.* **267**:7450-55

Missiaen, L., Droogmans, G., De Smedt, H., Wuytack, F., Raeymaekers, L., and Casteels, R. Alkalinization stimulates the purified plasma membrane Ca^{2+} pump by increasing its Ca^{2+} affinity (1989). *Biochem J* **262**: 361-4

Molinari M, Anagli J, Carafoli E. Ca^{2+} activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form (1994). *J Biol Chem* **269**:27992-5

Montero, M., Brini, M., Marsault, R., Alvarez, J., Sitia, R., Pozzan, T., and Rizzuto, R. Monitoring dynamic changes in free Ca^{2+} concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells (1995). *EMBO J.* **14**: 5467-5475

Most, P., Pleger, S.T., Völkers, M., Heidt, B., Boerries, M., Weichenhan, D., Löffler, E., Janssen, P.M., Eckhart, A.D., Martini, J., Williams, M.L., Katus, H.A., Remppis, A., Koch, W.J., Cardiac adenoviral S100A1 gene delivery rescues failing myocardium (2004). *J.Clin.Invest* **114**:1550-63

Nicoll, D.A., Quednau, B.D., Qui, Z., Xia, Y.R., Lusic, A.J., and Philipson, K.D. Cloning of a third mammalian $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, NCX3 (1996). *J. Biol. Chem.* **271**:24914-21

Niggli, V., Penniston, J.T., and Carafoli, E. Purification of the $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{-ATPase}$ from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column (1979). *J. Biol. Chem.* **254**:9955-8

Niggli, V., Adunyah, E.S., Penniston, J.T., Carafoli, E. Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca^{2+} - ATPase (1981). *J. Biol. Chem.* **256**: 395-401

Okunade, G.W., Miller, M.L., Pyne, G.J., Sutliff, R.L., O'Connor, K.T., Neumann, J.C., Andringa, A., Miller, D.A., Prasad, V., Doetschman, T., Paul, R.J., and Shull, G.E. Targeted ablation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4 (2004). *J Biol Chem* **279**:33742-50

Pande, J., Mallhi, K.K., and Grover, A.K. A novel plasma membrane Ca^{2+} -pump inhibitor: caloxin 1A1 (2005). *Eur. J. Pharmacol.* **508**: 1-6

Pang, Y., Zhu, H., Wu, P., and Chen, J. The characterization of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in rich sphingomyelin-cholesterol domains (2005). *FEBS Lett* **579**:2397-403

- Parekh, A.B. Store-operated Ca^{2+} entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane (2003). *J.Physiol.* **547**:333-48.
- Pastzy, K., Verma, A.K., Padanyi, r., Filoteo, A.G., Penniston, J.T., and Enyedi, A. Plasma membrane Ca^{2+} ATPase isoform 4b is cleaved and activated by caspase-3 during the early phase of apoptosis (2002). *J Biol Chem* **277**:6822-9
- Patel, S., Joseph, S.K., and Thomas, A.P. Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (1999). *Cell Calcium* **25**:247-64
- Patterson, R.L., Boehning, D., Snyder, S.H. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. (2004). *Ann. Rev. Biochem.* **73**: 437-65
- Pedersen, P.L. and Carafoli, E. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function (1987a). *Trends Biochem Sci.* **12**:146-50
- Penheiter, A.R., Filoteo, A.G., Croy, C.L., and Penniston, J.T. Characterization of the deafwaddler mutant of the rat plasma membrane calcium-ATPase 2 (2001). *Hear Res* **162** :19-28
- Pinto, Fde T., and Adamo, H.P. Deletions in the acidic lipid-binding region of the plasma membrane Ca^{2+} pump. A mutant with high affinity for Ca^{2+} resembling the acidic lipid-activated enzyme (2002). *J Biol Chem* **277**:12784-9
- Pinton, P., Brini, M, Bastianutto, C., Tuft, R.A., Pozzan, T., and Rizzuto R. New light on mitochondrial calcium (1998). *Biofactors* **8**:243-53.
- Philipson, K.D., Longoni, S., Ward, R. Purification of the cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange protein (1988). *Biochim. Biophys. Acta* **945**:298-306
- Puntervoll, P., Linding R., Gemund C., Chabanis-Davidson, P.S., Mattingsdal, M., Cameron, S., Martin, D.M., Ausiello, G., Brannetti, B., Costantini, A., Ferrè, F., Maselli, V., et al., ELM server: a new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins (2003). *Nucleic Acids Res.* **31**
- Ricci, A.J., and Fettiplace, R. Calcium permeation of the turtle hair cell mechanotransducer channel and its relation to the composition of endolymph (1998). *J Physiol (Lond)* **507**:939

Rimessi, A., Coletto, L., Pinton, P., Rizzato, R., Brini, M., Carafoli, E. Inhibitory interaction of the 14-3-3 ϵ protein with isoform 4 of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase pump (2005). *J. Biol. Chem.* **280**: 37195-203

Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., and Pozzan, T. Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃ sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria (1993). *Science* **262**:744-7

Salamino, A., Sparatore, B., Melloni, E., Michetti, M., Viotti, P.L., Pontremoli, S., and Carafoli, E. The plasma membrane calcium pump is the preferred calpain substrate within the erythrocyte (1994). *Cell Calcium* **15**: 28-35

Sambrook, J., and Gething M.J. Protein structure. Chaperones, paperones (1989). *Nature* **342**:248:51.

Schatzmann, H.J. ATP-dependent Ca²⁺ extrusion from human red cells (1966). *Experientia* **22**: 364-8

Schnitzer, J., Oh, P., Jacobson, B.S., and Dvorak, A.M. Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: microdomains enriched in caveolin, Ca²⁺-ATPase, and inositol trisphosphate receptor (1995). *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* **92**:1759-63

Schuh, K., Uldrijan, S., Gambaryan, S., Roethlein, N. and Neyses, L. Interaction of the plasma membrane Ca²⁺ pump 4b/Cl with the Ca²⁺/calmodulin-dependent membrane-associated kinase CASK (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 9778-3

Schuh, K., Uldrijan, S., Telkamp, M., Rothlein, N., and Neyses, L. The plasmamembrane calmodulin-dependent calcium pump: a major regulator of nitric oxide synthase I (2001). *J Cell Biol* **155**:201-5

Schultz, J.M., Yang, Y., Caride, A.J., Filoteo, A.G., Penheiter, A.R., Lagziel, A., Morell, R.J., Mohiddin, S.A., Fananapazir, L., Madeo, A.C., Penniston, J.T., Griffith, A.J. of human hearing loss by plasma-membrane calcium pump PMCA2 (2005). *N Engl J Med* **352**:1557-64

Schwab, B.L., Guerini, D., Didszun, C., Bano, D., Ferrando-May, E., Fava, E., Tam, J., Xu, D., Xanthoudakis, S., Nicholson, D.W., Carafoli, E., and Nicotera P. Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis (2002). *Cell Death Differ.* **9**:818-31

Sgambato-Faure, V., Xiong, Y., Berke, J.D., Hyman, S.E., and Strehler, E.E. The Homer-1 protein Ania-3 interacts with the plasma membrane calcium pump (2006). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**: 630-637

Silverstein, R.S., and Tempel, B.L. Atp2b2, encoding plasma membrane Ca²⁺-ATPase type 2, (PMCA2) exhibits tissue-specific first exon usage in hair cells, neurons, and mammary glands of mice (2006). *Neuroscience* **141**:245-57

Shimomura, O., Johnson, F.H. e Seiga, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea (1962). *J Cell Comp Physiol* **59**: 223-239.

Squier TC, Bigelow DJ, Fernandez-Belda FJ, deMeis L, and Inesi G. Calcium and lanthanide binding in the sarcoplasmic reticulum ATP-ase (1990). *J Biol Chem* **265**:13713-20

Stahl, W.L., Eakin, T.J., Owens, J.W.M., Breininger, J.F., Filuk, P.E., and Anderson, W.R. Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms: distribution of mRNAs in rat brain by in situ hybridization (1992). *Mol.Brain Res.* **16**: 223-231

Stauffer, T., Guerini, D., and Carafoli, E. Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca²⁺ pump. A study using specific antibodies (1995). *J. Biol. Chem.* **270**: 12184–90

Stauffer, T.P., Guerini, D., Celio, M.R., and Carafoli, E. Immunolocalization of the plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms in the rat brain (1997) *Brain Res.* **748**:21-29

Street, V.A., McKee-Johnson, J.W., Fonseca, R.C., Tempel, B.L., and Noben-Trauth, K. Mutations in a plasma membrane Ca²⁺-ATPase gene cause deafness in deafwaddler mice (1998). *Nature Genet.* **19**: 390-394

Strehler, E.E., and Zacharias, D.A. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps (2001). *Physiol Rev.* **81**:21-50.

Shull, G.E. and Greeb, J. Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase from rat brain. Structural and functional domains exhibit similarity to Na⁺,K⁺- and other cation transport ATPases (1988). *J.Biol. Chem.* **263**:8646-57

Takahashi, K. and Kitamura, K. A point mutation in a plasma membrane Ca^{2+} -ATPase gene causes deafness in Wriggle Mouse Sagami (1999). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**:773-78

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice (1994). *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680

Toyoshima, C., Asahi, M., Sugita, Y., Khanna, R., Tsuda, T., and MacLennan, D.H. Modeling of the inhibitory interaction of phospholamban with the Ca^{2+} ATPase (2003). *PNAS* **100**: 467-72

Verma, A.K., Filoteo, A.G., Stanford, D.R., Wieben, E.D., Penniston, J.T., Strehler, E.E., Fischer, R., Heim, R., Vogel, G., Mathews, S., Strehler-Page, M.A., James, P., Varherr, T., Krebs, J., and Carafoli, E. Complete primary structure of a human plasma membrane Ca^{2+} pump (1988). *J. Biol. Chem.* **263**: 14152-19

Verma AK, Enyedi A, Filoteo AG, Strehler EE, Penniston JT. Plasma membrane calcium pump isoform 4a has a longer calmodulin-binding domain than 4b (1996). *J Biol Chem.* **271**:3714-8

Vullo, A., Bortolami, O., Pollastri, G. and Tosatto, S.C. Spritz: a server for the prediction of intrinsically disordered regions in protein sequences using kernel machines (2006). *Nucleic Acids Res.* **34**

Wang, K., Wright, L.C., Machan, C.L., Allen, B.G., Conigrave, A.D., and Roufogalis, B.D. Protein kinase C phosphorylates the carboxyl terminus of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase from human erythrocytes (1991). *J. Biol. Chem.* **266**: 9078-85

Wang, K.K., Villalobo, A. & Roufogalis, B.D. The plasma membrane calcium pump: a multiregulated transporter (1992). *Trends Cell Biol.* **2**, 46-52

Williams, J.C., Armesilla, A.L., Mohamed, T.M., Hagarty, C.L., McIntyre, F.H., Schomburg, S., Zaki, A.O., Oceandy, D., Cartwright, E.J., Buch, M.H., Emerson, M., and Neyses, L. The sarcolemmal calcium pump, alpha-1 syntrophin, and neuronal nitric oxide synthase are parts of a macromolecular protein complex (2006). *J. Biol. Chem* **281**: 23341-8

Wuytack F., Papp, B., Verboomen, H., Raeymaekers, L., Dode, L., Bobe, R., Bokkala, S., Authi, K.S., and Casteels, R. A sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 3-type

Ca²⁺ pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells (1994). *J. Biol. Chem.* **269**:1410-6.

Yamoah, E.N., Lumpkin, E.A., Dumont, R.A., Smith, P.J., Hudspeth, A.J., and Gillespie, P.G. Plasma membrane Ca²⁺-ATPase extrudes Ca²⁺ from hair cell stereocilia (1998). *J Neurosci.* **18**:610-24

Yeromin, A.V., Zhang, S.L.; Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., and Cahalan, M.D. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai (2006). *Nature.* **443**:226–9.

Zhang, S.L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J.A., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Stauderman, and K.A., Cahalan, M.D. STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane (2005). *Nature* **437**:902–5