



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Scuola di Specializzazione in Patologia Clinica

*Ruolo della secrezione di bicarbonato nell'iperplasia mucosa
dell'epitelio bronchiale*

Relatori: Prof.ssa Maria Cristina Mingari
Prof. Luis J. V. Galietta

Candidato: Dr. Paolo Scudieri

Anno accademico 2014/2015

RIASSUNTO

L'iperplasia delle cellule mucipare è una caratteristica di asma e altre patologie dell'apparato respiratorio ed è causata dall'azione delle citochine di tipo Th-2, in particolar modo IL-4 e IL-13. Nello studio oggetto di questa tesi, è stato osservato come, in cellule epiteliali bronchiali umane, la citochina IL-4 induca l'espressione di molti geni codificanti per canali ionici e trasportatori, inclusi TMEM16A, SLC26A4, SLC12A2 e ATP12A. A livello funzionale, il trattamento con IL-4 determina un forte incremento della secrezione di cloruro e bicarbonato dipendente da calcio e AMPc, con conseguente maggiore concentrazione di bicarbonato e pH alcalino nel fluido che riveste la superficie apicale dell'epitelio. Inoltre, il rilascio di muco indotto da stimolazione purinergica richiede la presenza di bicarbonato ed è risultato difettivo in cellule derivanti da pazienti affetti da fibrosi cistica.

In conclusione, i risultati di questo studio mostrano che le citochine Th-2 inducono un profondo cambiamento dell'espressione e della funzione di numerosi canali ionici e trasportatori che determina a sua volta un'aumentata capacità di trasporto di bicarbonato. Questo cambiamento è necessario per favorire il rilascio e la *clearance* del muco.

INDICE

➤	INTRODUZIONE	pag. 4
➤	MATERIALI E METODI	pag. 12
➤	RISULTATI	pag. 17
➤	DISCUSSIONE	pag. 35
➤	BIBLIOGRAFIA	pag. 40

INTRODUZIONE

L'epitelio respiratorio: struttura e funzione cellulare

La superficie delle vie aeree è formata da una varietà di cellule specializzate che svolgono numerose funzioni importanti per il mantenimento della normale omeostasi. Queste funzioni includono la regolazione dell'idratazione delle vie aeree, il metabolismo e l'eliminazione degli agenti inalati, il reclutamento e l'attivazione delle cellule infiammatorie in risposta ad un danno e la regolazione della contrattilità della muscolatura liscia delle vie respiratorie attraverso la secrezione di vari mediatori (Proud e Leigh, 2011).

La superficie delle vie aeree è ricoperta da un epitelio la cui struttura e composizione cellulare varia al variare del calibro delle vie aeree. A livello tracheo-bronchiale l'epitelio è di tipo cilindrico pseudo-stratificato, mentre nelle vie aeree inferiori si osserva un progressivo assottigliamento dell'epitelio che diventa cilindrico semplice nei bronchioli primari, quindi cubico nei bronchioli terminali e infine squamoso a livello alveolare. Il cambiamento nella struttura si accompagna a variazioni nella composizione cellulare.

L'epitelio respiratorio è, infatti, costituito da molti tipi cellulari, morfologicamente e funzionalmente distinti, che possono essere classificati in tre categorie principali: cellule basali, cellule cigliate e cellule secretorie (Knight e Holgate, 2003). Le cellule basali sono ubiquitariamente distribuite nell'epitelio delle vie aeree, sebbene il loro numero diminuisca progressivamente nelle vie aeree di calibro inferiore. Queste cellule, oltre ad avere importanti ruoli strutturali, rappresentano le cellule staminali delle vie aeree, deputate alla generazione degli altri tipi cellulari che costituiscono l'epitelio respiratorio. Le cellule cigliate sono il tipo cellulare predominante a livello tracheo-bronchiale e possono derivare dalle cellule basali o dalle cellule secretorie. Tipicamente, queste cellule presentano sulla loro superficie apicale numerose ciglia che ne evidenziano la funzione primaria: il trasporto direzionale del muco sovrastante l'epitelio dai polmoni verso l'orofaringe. Le cellule mucipare sono ricche di granuli contenenti mucine che vengono secreti per intrappolare gli agenti esogeni presenti nel lume delle vie aeree. La produzione della corretta quantità di muco e le proprietà visco-elastiche dello stesso sono importanti per

un'efficiente *clearance* mucociliare. Oltre alle cellule mucipare esistono almeno altri due tipi di cellule secernenti, rappresentati dalle cellule sierose e dalle cellule Clara (Jeffery e Li, 1997). In particolare, le ultime sono abbondanti nelle vie aeree di calibro inferiore, dove svolgono anche il ruolo di cellule staminali, progenitrici sia di cellule cigliate che di cellule secernenti. Infine, l'epitelio respiratorio contiene cellule neuroendocrine e cellule del sistema immunitario (mastociti, linfociti intraepiteliali, cellule dendritiche e macrofagi).

Fisiologia del liquido di superficie delle vie aeree

L'epitelio delle vie aeree bronchiali è ricoperto da un liquido, chiamato *airway surface liquid* (ASL), prodotto in parte dalle cellule epiteliali sottostanti e in parte dalle ghiandole della sottomucosa. L'ASL è costituito da due parti: un sottile strato di liquido periciliare, dello spessore di circa 7-10 μm , adiacente all'epitelio, e il sovrastante strato di muco, di spessore maggiore – circa 30-50 μm – che rappresenta la prima barriera protettiva verso gli agenti esogeni che raggiungono le vie aeree con l'aria inalata. Le ciglia delle cellule epiteliali sono immerse nel liquido periciliare e con il loro movimento sincrono permettono il trasporto del muco sovrastante, e del materiale in esso intrappolato, dal polmone verso l'orofaringe.

L'ASL è una soluzione acquosa contenente ioni, glicoproteine, come le mucine, e altre proteine incluse lattoferrina, difensine, lisozima, IgA e altre proteine antimicrobiche. Oltre ad essere importante per mantenere idratate le vie aeree, esso gioca un ruolo fondamentale nei meccanismi di difesa innata che proteggono l'organismo da microrganismi patogeni e agenti nocivi inalati con l'aria inspirata (Knowles e Boucher, 2002).

Le proprietà dell'ASL, come ad esempio lo spessore e la composizione, sono finemente regolate da complessi meccanismi di trasporto ionico (Knowles e Boucher, 2002). In questi processi, la secrezione anionica riveste un ruolo particolarmente importante. La secrezione di cloruro attraverso canali ionici presenti sulla membrana apicale delle cellule epiteliali genera un gradiente elettrico che favorisce il trasporto di sodio per via paracellulare. Questo trasporto transepiteliale netto di sodio cloruro genera a sua volta un gradiente osmotico che richiama acqua sulla superficie dell'epitelio. Questo processo mantiene la superficie delle vie aeree adeguatamente

idratata per consentire il trasporto mucociliare. Recentemente, il bicarbonato è emerso come altro anione importante oltre al cloruro. La secrezione di bicarbonato è necessaria per l'attività battericida del fluido che bagna le vie aeree (Pezzulo et al., 2012) e per il rilascio e la corretta espansione delle mucine secrete (Garcia et al., 2009; Gustafsson et al., 2012; Hoegger et al., 2014).

La secrezione di anioni nel fluido periciliare è mediata da una grande varietà di canali e trasportatori presenti nella membrana apicale delle cellule epiteliali (Boucher, 2004). Tra questi, un ruolo fondamentale è svolto dalle proteine-canale CFTR e TMEM16A e dal trasportatore SLC26A4/pendrina. Altri tipi di trasportatori e canali localizzati nella membrana basolaterale sono coinvolti in questi meccanismi di trasporto attraverso la generazione dei gradienti elettrochimici necessari per la secrezione anionica sulla superficie apicale (Boucher, 2004). In questo caso, vanno ricordati il co-trasportatore sodio-potassio-cloruro (NKCC1 o SLC12A2), la pompa sodio/potassio e i trasportatori del bicarbonato.

Principali canali e trasportatori implicati nella regolazione dell'ASL

La **CFTR** è una glicoproteina transmembrana appartenente alla famiglia dei trasportatori ABC (ATP Binding Cassette) e si trova espressa sulla membrana apicale di vari epitelii: bronchiale, intestinale, tubuli delle ghiandole sudoripare, acini pancreatici, dotti biliari ed epididimo. Dal punto di vista strutturale, presenta due domini transmembrana (MSD1 e 2) composti da 6 α -eliche ciascuno, due domini leganti nucleotidi (NBD1 e 2) e un dominio regolatorio (R) contenente numerosi siti di fosforilazione (Sheppard e Welsh, 1999). Dal punto di vista funzionale, CFTR è un canale anionico voltaggio-indipendente, la cui attivazione richiede il legame di ATP ai NBD e la fosforilazione AMPc-dipendente del dominio R (Sheppard e Welsh, 1999).

Mutazioni nel gene CFTR sono causa della fibrosi cistica (CF), la malattia genetica più frequente nella popolazione caucasica, caratterizzata a livello polmonare da infezione batterica e infiammazione cronica che col tempo porta a perdita di funzione d'organo. Nell'epitelio delle vie respiratorie, la perdita di funzione della proteina CFTR, con conseguente riduzione della secrezione di cloruro e bicarbonato, determina gravi alterazioni nella composizione e nello spessore del liquido della superficie delle vie aeree (Riordan, 2008). Conseguentemente, le ciglia, il cui battito è

necessario per muovere lo strato di muco che copre le vie aeree, sono immobilizzate. L'accumulo di muco immobile favorisce quindi la sopravvivenza e la proliferazione batterica (Boucher, 2007).

Ad oggi sono state riportate 2008 mutazioni del gene CFTR (www.genet.sickkids.on.ca). Le mutazioni causa di fibrosi cistica vengono classificate in cinque classi. Le mutazioni di classe 1 sono mutazioni non senso che, introducendo un codone di stop prematuro, portano alla generazione di una proteina tronca non funzionale (es. G542X). Le mutazioni di classe 2 alterano il processo di maturazione della proteina CFTR. L'esempio più importante per gravità e frequenza è la mutazione F508del. Questa mutazione causa difetti multipli della proteina CFTR, quali mal ripiegamento e ritenzione nel reticolo endoplasmatico, difetto di apertura del canale e aumentato *turnover* della piccola quota di proteina che riesce a raggiungere la membrana plasmatica. Le mutazioni di classe 3 sono mutazioni missenso che producono proteine correttamente espresse in membrana ma con difetto di apertura del canale e conseguente ridotta o assente attività funzionale (es. G551D). Le mutazioni di classe 4 generano proteine caratterizzate da una riduzione della capacità del poro del canale di condurre ioni (es. R117H). Le mutazioni di classe 5 alterano lo *splicing* del mRNA. Le mutazioni di classe 1, 2 e 3 sono associate a fenotipi gravi caratterizzati da insufficienza pancreatica e problemi respiratori severi, mentre le mutazioni di classe 4 e 5 sono associate a fenotipi più lievi.

Oltre alla proteina-canale CFTR, esiste almeno un altro tipo di canale del cloruro nell'epitelio respiratorio. Questo canale è attivato da un aumento della concentrazione citosolica di calcio determinata dall'interazione di ATP e UTP con i recettori purinergici presenti sulla superficie epiteliale (Mason et al., 1991; Tarran et al., 2002). L'identità molecolare dei canali del cloruro attivati da calcio (CaCC) è rimasta sconosciuta fino al 2008, quando tre laboratori indipendenti hanno identificato, con approcci diversi, la proteina **TMEM16A** quale forte candidato al ruolo di CaCC (Caputo et al., 2008; Schroeder et al., 2008; Yang et al., 2008). In uno di questi studi, la proteina-canale TMEM16A è stata identificata attraverso un approccio di genomica funzionale partendo dall'osservazione che il trattamento dell'epitelio bronchiale con l'interleuchina 4 (IL-4) determina un aumento della corrente del cloruro attivata da calcio. L'ipotesi di partenza è stata che l'effetto di IL-4 fosse basato sull'iperpressione dei geni codificanti per i CaCC. Quindi è stata effettuata l'analisi

del profilo di espressione genica mediante microarray che ha identificato diversi geni codificanti per proteine di membrana la cui espressione è stimolata da IL-4, tra le quali TMEM16A. Il ruolo di TMEM16A come CaCC è stato poi confermato mediante esperimenti di silenziamento con siRNA in diverse linee cellulari con attività endogena di CaCC, come ad esempio CFPAC-1 e CFBE41o, e mediante espressione eterologa in altri tipi cellulari (HEK-293, FRT, COS-7) (Caputo et al., 2008).

La proteina TMEM16A, chiamata anche anoctamina 1, appartiene ad una famiglia di proteine composta da 10 membri (da TMEM16A a TMEM16K, o anoctamina 1-10) (Pedemonte e Galiotta, 2014). Dal punto di vista strutturale, TMEM16A presenta una topologia putativa costituita da 10 segmenti transmembrana con le estremità carbossi- e amino-terminali citosoliche. Esistono diverse isoforme prodotte da splicing alternativo: Caputo et al. (2008) hanno descritto l'esistenza di un'isoforma minima, denominata TMEM16A(0), formata da 840 amminoacidi e contenente tutti i domini transmembrana predetti; questa può essere espansa attraverso l'inclusione di quattro regioni denominate segmento *a*, *b*, *c*, *d*, rispettivamente di 116, 22, 4 e 26 amminoacidi. Il segmento *a* è aggiunto all'N-terminale, il *b* prima del primo dominio transmembrana, il *c* e il *d* nella prima ansa intracellulare, tra il secondo e il terzo dominio transmembrana.

Dal punto di vista funzionale, TMEM16A è un canale anionico calcio- e voltaggio-dipendente. Come CFTR, oltre ad essere permeabile al cloruro, è stato implicato anche nella secrezione di bicarbonato (Jung et al., 2013). L'importanza del ruolo di questa proteina-canale nelle vie aeree può essere dedotta dallo studio del modello murino privo di TMEM16A. L'animale TMEM16A^{-/-} mostra un fenotipo grave con ritardo di crescita, morte precoce dopo la nascita e importanti malformazioni degli anelli cartilaginei della trachea. Quest'ultima alterazione è molto probabilmente la causa del collasso della trachea e della successiva asfissia che si verifica nei primi stadi di vita postnatale. I topi TMEM16A^{-/-} esibiscono anche una forte riduzione (> 60%) della secrezione epiteliale di cloruro calcio-dipendente, non solo a livello dell'epitelio respiratorio ma anche nell'epitelio del colon, in epatociti e in cellule acinari salivari e pancreatiche (Rock et al., 2009 e Ousingsawat et al., 2009). Rock et al. (2009) hanno osservato anche un significativo accumulo di muco nel lume della trachea, soprattutto nei due terzi inferiori, con un lieve interessamento anche dei bronchi, a sottolineare il ruolo di TMEM16A nella *clearance* mucociliare.

L'accumulo di muco nelle vie aeree è una caratteristica di varie patologie respiratorie. Oltre alla già citata fibrosi cistica, anche l'asma bronchiale è caratterizzata da ipersecrezione mucosa e iperplasia delle cellule caliciformi, le cellule deputate alla produzione di mucine. Nell'induzione dell'iperplasia mucosa gioca un ruolo determinante l'azione delle citochine di tipo Th-2, IL-4 e IL-13 (Kim et al., 2009; Lachowicz-Scroggins et al., 2010; Turner et al., 2011). Queste citochine sono anche modulatori del trasporto ionico nell'epitelio bronchiale. In particolare, è stato osservato che il trattamento in vitro con IL-4 o IL-13 per 24 ore determina l'aumento della secrezione di cloruro e la diminuzione dell'assorbimento di sodio (Danahay et al., 2002; Galietta et al., 2002). L'aumento della secrezione di cloruro è almeno in parte dovuto all'aumentata espressione della proteina TMEM16A (Caputo et al., 2008). È interessante riportare come un'elevata espressione di TMEM16A sia stata osservata anche in vivo nelle vie aeree di soggetti asmatici o in topi sensibilizzati con ovalbumina (Huang et al., 2012). Queste alterazioni del trasporto ionico possono rappresentare una risposta adattativa da parte dell'epitelio volta a favorire la secrezione e un'adeguata idratazione del muco.

Un'altra proteina implicata nella regolazione del liquido di superficie delle vie aeree e la cui espressione è indotta dall'IL-4 è **SLC26A4** o **pendrina**. La pendrina appartiene alla famiglia SLC26 di trasportatori e canali anionici. Gli 11 membri di questa famiglia di proteine di membrana presentano una topologia simile, costituita da un dominio transmembrana formato da 10-14 α -eliche e le estremità amino- e carbossi-terminali rivolte verso il citoplasma. Dal punto di vista funzionale, la pendrina è deputata al trasporto elettroneutro di anioni, quali bicarbonato, ioduro, tiocianato, cloruro e altri (Nofziger et al., 2011; Pedemonte et al., 2007). Questa proteina è espressa prevalentemente nell'orecchio interno, nella tiroide e nel rene (Nofziger et al., 2011). Mutazioni con perdita di funzione della proteina pendrina sono causa della Sindrome di Pendred, una malattia autosomica recessiva caratterizzata da sordità neurosensoriale e gozzo (Coyle et al., 1996; Kopp et al., 2011). Più recentemente, l'aumentata espressione di pendrina nell'epitelio delle vie aeree è stata associata a malattie respiratorie quali sinusite, asma e broncopneumopatia cronica ostruttiva (Seshadari et al., 2015; Ishida et al., 2012; Nakagami et al., 2008; Nakao et al., 2008). Nell'epitelio respiratorio l'espressione di pendrina è fortemente stimolata dal trattamento con citochine Th2 quali IL-4 e IL-13 (Pedemonte et al., 2007). In

queste condizioni si osserva un aumentato trasporto di tiocianato, in cambio di cloruro, nel liquido di superficie delle vie aeree. Qui, in presenza di perossido di idrogeno generato da NADPH dual-ossidasi e di lattoperossidasi, il tiocianato è ossidato a ipotiocianato, un potente agente antimicrobico (Pedemonte et al., 2007). La proteina pendrina gioca, inoltre, un ruolo fondamentale nel trasporto di bicarbonato e quindi nella regolazione del pH dell'ASL e nella secrezione ed espansione delle mucine (Garnett et al., 2011).

La secrezione transepiteliale di anioni richiede, oltre all'azione dei canali e trasportatori presenti sulla membrana apicale, l'attività di proteine espresse sulle membrane basolaterali. Tra queste, un ruolo fondamentale è svolto dal trasportatore **NKCC1**, codificato dal gene **SLC12A2**. NKCC1, insieme a NKCC2, appartiene al sottogruppo di trasportatori sodio-dipendenti SLC12 (Gamba G. et al., 1994; Xu J-C et al., 1994; Igarashi P. et al., 1994; Delpire E. et al., 1994). Si tratta di co-trasportatori che mediano il movimento elettro-neutro di sodio, potassio e cloruro attraverso le membrane cellulari. Agiscono attraverso un meccanismo di trasporto attivo secondario, sfruttando i gradienti elettrochimici generati dalla pompa sodio/potassio per trasportare sodio, potassio e cloruro (in rapporto 1:1:2) dall'esterno verso l'interno delle cellule (Markadieu e Delpire, 2014). Entrambi i trasportatori sono bloccati da bumetanide e furosemide, farmaci comunemente utilizzati in clinica (Markadieu e Delpire, 2014). NKCC2, bersaglio dei diuretici, presenta un'espressione molto ristretta, limitata alle membrane apicali delle cellule epiteliali della parte ascendente dell'ansa di Henle, dove media il riassorbimento di sodio cloruro. Al contrario, NKCC1 è largamente espresso in molti tessuti, si trova localizzato sulle membrane basolaterali delle cellule epiteliali secernenti cloruro, e anche in vari tipi cellulari non epiteliali, dove svolge un ruolo importante nella regolazione del volume cellulare e dell'omeostasi del cloruro (Markadieu e Delpire, 2014).

In questo lavoro di tesi, attraverso un approccio multidisciplinare, è stato valutato dettagliatamente l'effetto che l'IL-4 ha sui meccanismi di trasporto ionico dell'epitelio bronchiale, in particolare dopo 72 ore di trattamento, condizione che promuove un'accentuata iperplasia mucosa. I risultati ottenuti rivelano profondi cambiamenti nell'espressione e nella funzione di molti canali ionici e trasportatori che portano ad un'aumentata capacità di trasportare bicarbonato. Inoltre, viene sottolineata l'importanza della proteina-canale CFTR in questo processo, dato che la sua perdita di funzione altera fortemente il processo di rilascio del muco.

MATERIALI E METODI

Colture cellulari

Per isolare le cellule epiteliali bronchiali umane, i bronchi derivanti da individui CF e non-CF sottoposti a trapianto di polmone vengono sezionati, lavati e incubati a 4°C in una soluzione di proteasi XIV per una notte. Le cellule epiteliali vengono quindi distaccate meccanicamente, dissociate in tripsina e seminate in fiasche in un mezzo di coltura privo di siero (LHC9/RPMI 1640). Dopo 4-5 passaggi, le cellule vengono seminate ad alta densità (500,000/cm²) su supporti porosi Snapwell 3801. Dopo 24 ore, il mezzo di coltura viene cambiato con DMEM/F12 (1:1) più 2% siero bovino fetale New Zealand (Life Technologies), ormoni e supplementi (Scudieri et al., 2012). Il terreno viene cambiato giornalmente da entrambi i versanti dei supporti permeabili per 8-10 giorni (coltura liquido-liquido, LLC). Successivamente, il terreno sul lato apicale viene rimosso completamente (coltura aria-liquido, ALC). Questa condizione favorisce il differenziamento muco-ciliare dell'epitelio. Le cellule vengono mantenute in questa condizione per ulteriori 2-3 settimane. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti su cellule non-CF. Dove specificatamente indicato, gli esperimenti sono stati eseguiti anche su cellule CF (genotipo F508del/F508del).

L'intera procedura di isolamento, coltura e conservazione delle cellule epiteliali bronchiali, compreso il consenso informato dei pazienti, è stato approvato dal Comitato Etico dell'Istituto Giannina Gaslini sotto la supervisione del Ministero della Salute.

Microarray

Per l'analisi del profilo di espressione genica, gli esperimenti di ibridazione su microarray sono stati eseguiti su tre replicati biologici di cellule epiteliali bronchiali differenziate su supporti Snapwell e trattati con e senza IL-4 per 6, 12, 24 e 72 ore. L'RNA totale per ciascuna condizione è stato utilizzato per l'ibridazione su microarray Affymetrix GeneChip Human Genome 133A2 utilizzando protocolli standard come descritto in precedenza (Sondo et al., 2011). I geni la cui espressione viene modificata dal trattamento con IL-4 sono stati rilevati attraverso Bayesian t-test, Cyber-t (Baldi e Long, 2001) seguito da correzione FDR. La soglia utilizzata è FDR < 0.05 (se non diversamente specificato).

Registrazioni della corrente di corto-circuito

I supporti Snapwell contenenti gli epitelii bronchiali differenziati sono stati montati in una camera verticale, tipo sistema di Ussing, con circolazione interna del fluido. Entrambe le emicamere (basolaterale e apicale) sono state riempite con 5 ml di soluzione di Krebs contenente (in mM): 126 NaCl, 0.38 KH₂PO₄, 2.13 K₂HPO₄, 1 MgSO₄, 1 CaCl₂, 24 NaHCO₃, e 10 glucosio. Entrambi i lati vengono gorgogliati di continuo con una miscela di gas contenente 5 % CO₂ e 95 % aria e la temperatura della soluzione è mantenuta a 37°C. Il potenziale transepiteliale viene azzerato tramite un amplificatore per *voltage-clamp* (DVC-1000, World Precision Instruments) connesso alle camere apicale e basolaterale attraverso elettrodi di Ag/AgCl e ponti agar (1 M KCl in 1 % agar). L'offset tra gli elettrodi di potenziale e la resistenza del fluido viene cancellato prima di iniziare gli esperimenti. La corrente di corto-circuito viene registrata con convertitore analogico-digitale PowerLab 4/25 (ADInstruments) connesso ad un computer Macintosh.

Western blot

Per valutare l'espressione delle proteine TMEM16A e CFTR, le cellule epiteliali bronchiali, trattate e non con IL-4 per 72 ore, e le cellule CFBE41o- sono state lisate in tampone RIPA 1X (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) contenente una miscela di inibitori di proteasi (Complete Protease Inhibitor Cocktail; Roche, NJ). La concentrazione proteica dei lisati è stata quantificata con il kit Quantum Protein Assay (Euroclone). 50 µg di lisato totale è stato quindi caricato e separato su Criterion TGX precast Gels 4-15% (Biorad) e trasferito su membrane di nitrocellulosa (Biorad) utilizzando lo strumento Trans-Blot Turbo system (Biorad). La proteina TMEM16A è stata rivelata utilizzando l'anticorpo primario SP31 (Abcam) diluito 1:500, seguito da anticorpo secondario anti-coniglio coniugato a HRP, diluito 1:10000; per la proteina CFTR è stato utilizzato l'anticorpo primario 596 (Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics e University of North Carolina, Chapel Hill) diluito 1:2000, seguito da anticorpo secondario anti-topo coniugato ad HRP, diluito 1:10000 (Abcam). Le membrane sono state anche ibridate con anticorpo anti Na⁺/K⁺-ATPase β1 (1:6000). Tutti gli anticorpi sono stati diluiti in TBS-latte 5%. Le bande proteiche vengono visualizzate utilizzando Super Signal West Femto Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc). La registrazione diretta della

chemiluminescenza è stata eseguita utilizzando il sistema Molecular Imager ChemiDoc XRS (Biorad).

Immunofluorescenza

Le cellule epiteliali bronchiali differenziate sui supporti Snapwell sono state fissate tramite l'aggiunta sul versante apicale di 200 µl di formalina 10% (05-01005Q, Bio-Optica) per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi in PBS, le cellule sono state sottoposte a smascheramento antigenico in tampone citrato pH = 6 a 95 °C per 5 minuti. I campioni, una volta raffreddati, sono stati permeabilizzati con PBS-Triton X-100 0.3% per 5 minuti. Si procede quindi con una fase di saturazione in PBS-BSA 1% per due ore a temperatura ambiente e poi con l'incubazione per tutta la notte con gli anticorpi primari diluiti sempre in PBS-BSA 1%: anti-TMEM16A [SP31] (ab64085, Abcam) diluito 1:200, anti-CFTR (ab570, J.R. Riordan, University of North Carolina at Chapel Hill, e Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics) diluito 1:250, anti-SLC26A4 (H00005172-A01, Abnova) diluito 1:200, anti-SLC12A2 (HPA020130, Sigma-Aldrich) diluito 1:1000, anti-CA2 [EPR5195] (ab124687, Abcam) diluito 1:500, anti-MUC5AC (NCL-HGM-45M1, Novocastra) diluito 1:100, anti-acetylated tubulin (7451, Sigma Aldrich) diluito 1:300, anti-ATP12A (HPA039526, Sigma-Aldrich) diluito 1:400. Dopo l'incubazione con gli anticorpi primari, le cellule vengono lavate tre volte in PBS e quindi incubate con una miscela di anticorpi secondari coniugati a fluorofori Alexa Fluor (Invitrogen) diluiti 1:200 in PBS-BSA 1% per un'ora al buio. Dopo ulteriori tre lavaggi in PBS, la membrana porosa contenente le cellule viene tagliata dal supporto Snapwell e posizionata su un vetrino porta-oggetto. Si aggiungono quindi un paio di gocce di montante contenente DAPI (Fluoroshield with 4',6-diamidino-2-phenylindole - Sigma-Aldrich) e si chiude il vetrino con copri-oggetto e smalto.

Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio confocale TCS SP8 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). L'analisi e il montaggio delle immagini è stata eseguita con i programmi Leica ed ImageJ.

Misurazione del pH intracellulare

La misurazione del pH intracellulare è stata eseguita utilizzando una sonda sensibile al pH, BCECF/AM (2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxy-fluorescein acetoxymethylester; Life Technologies) e l'intensità della fluorescenza è stata

registrata da uno spettrofluorimetro controllato da computer (Cary Eclipse Varian). Il campione è stato stimolato a due lunghezze d'onda d'eccitazione, 440 e 500 nm, e l'emissione è stata raccolta a 535 nm. Le cellule epiteliali bronchiali cresciute su supporti permeabili (BD falcon) e caricate con la sonda BCECF, sono state montate in una cuvetta che permette la perfusione indipendente di entrambi i versanti dell'epitelio, basolaterale e apicale. La soluzione era così costituita (in mM): 115 NaCl, 5 KCl, 25 NaHCO₃, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 D-glucose. Il pH veniva portato a 7.4 attraverso il gorgogliamento con 95% O₂ e 5% CO₂. Per le condizioni prive di cloruro, NaCl è stato sostituito con sodio gluconato, CaCl₂ con calcio gluconato, e KCl con 2.5 mM K₂SO₄. Gli esperimenti sono stati eseguiti ad una temperatura di 37°C. La calibrazione per la conversione tra la fluorescenza misurata alle due lunghezze d'onda di eccitazione e il pH intracellulare è stata eseguita dopo ciascun esperimento utilizzando nigericina (10 µM) e potassio (150 mM) a valori di pH esterno compresi tra 6.0 e 8.0, come riportato in precedenza (Bagorda et al., 2002).

Valutazione della composizione del fluido apicale

Gli epitelii bronchiali differenziati in ALC sono stati trattati per 72 ore con e senza IL-4 (10 ng/ml). Dopo 24 ore dall'inizio del trattamento, sono stati aggiunti 150 µl di soluzione di Krebs sul lato apicale degli epitelii. Alla fine del trattamento, il fluido aggiunto è stato recuperato e la sua composizione ionica è stata analizzata con Cobas 6000 analyzer (Roche Diagnostics). Il pH è stato valutato tramite cartine tornasole (6.0-8.1 e 7.2-8.8). La lettura del valore di pH è stata eseguita in cieco.

Saggio per la valutazione del rilascio di muco

Gli epitelii bronchiali differenziati su supporti Snapwell in condizioni ALC sono stati incubati per 3 ore con terreno Coon's modified Ham's F12 (privo di siero) sul versante basolaterale. Il mezzo di coltura era tamponato con bicarbonato (2.68 g/L) o con HEPES 25 mM (pH = 7.2). Dopo l'incubazione, i supporti Snapwell sono stati inclinati di 10 gradi e 50 µL di PBS contenente ATP 100 µM e nanosfere verdi di 200 nm di diametro diluite 1:1000 (F8811, Life Technologies) sono stati iniettati sul versante apicale degli epitelii, appena sopra il centro del supporto permeabile. Dopo due minuti il liquido in eccesso è stato rimosso e i supporti Snapwell sono stati

riposizionati orizzontalmente e trasferiti sul tavolino di un microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse TiE equipaggiato con obiettivo 20X e filtro per GFP. È stata quindi eseguita una acquisizione automatizzata “a mattonella” (5 x 5 campi per una superficie totale di 5.8 mm²) nel centro del supporto permeabile per ogni epitelio. Il Nikon perfect focus system (PFS) è stato utilizzato per mantenere il piano focale. L’analisi delle immagini è stata eseguita con il programma Image J implementato con un plugin per la *texture analysis* basato sul metodo Gray Level Co-occurrence Matrices (GLCM texture). I valori di GLCM per 0° e 90° e per 1 pixel di distanza sono stati calcolati e mediati. Le caratteristiche di struttura ricavate sono state le seguenti: angular second moment, contrasto, correlation, inverse difference moment e entropia.

RISULTATI

Il trattamento di cellule epiteliali bronchiali con IL-4 induce iperplasia mucosa, ossia un aumento del numero di cellule caliciformi mucipare (Fig. 1). Questo fenomeno è particolarmente evidente se il trattamento con IL-4 viene protratto nel tempo. Infatti, la percentuale di cellule mucipare aumenta dal 2 al 7% dopo 24 ore di trattamento e raggiunge il 30% dopo 72 ore (Fig. 1).

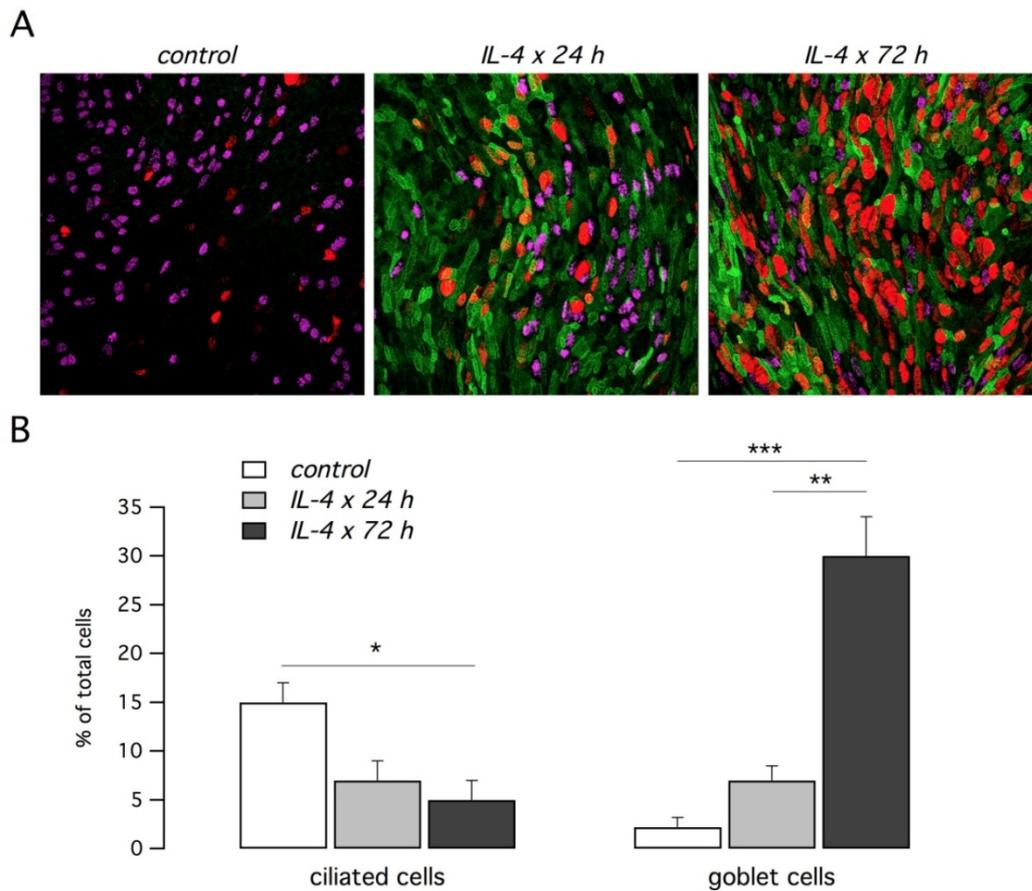


Figura 1. Metaplasia mucosa indotta da IL-4. (A) Immagini di immunofluorescenza rappresentative di cellule bronchiali umane trattate con IL-4 per tempi diversi e colorate per diversi marcatori cellulari: tubulina acetilata (marcatore delle ciglia, magenta), MUC5AC (marcatore delle cellule mucipare, rosso), TMEM16A (verde). (B) Grafico a barre mostrante la percentuale di cellule cigliate e mucipare ai diversi tempi di trattamento con IL-4 (10 ng/ml). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Per valutare gli effetti che l'iperplasia mucosa ha sui meccanismi di trasporto ionico dell'epitelio bronchiale sono stati eseguiti esperimenti di elettrofisiologia in diverse condizioni. La figura nella pagina seguente (Fig. 2) mostra delle tracce rappresentative di esperimenti di misura della corrente di corto-circuito su epitelii bronchiali ben differenziati e montati in camera di Ussing.

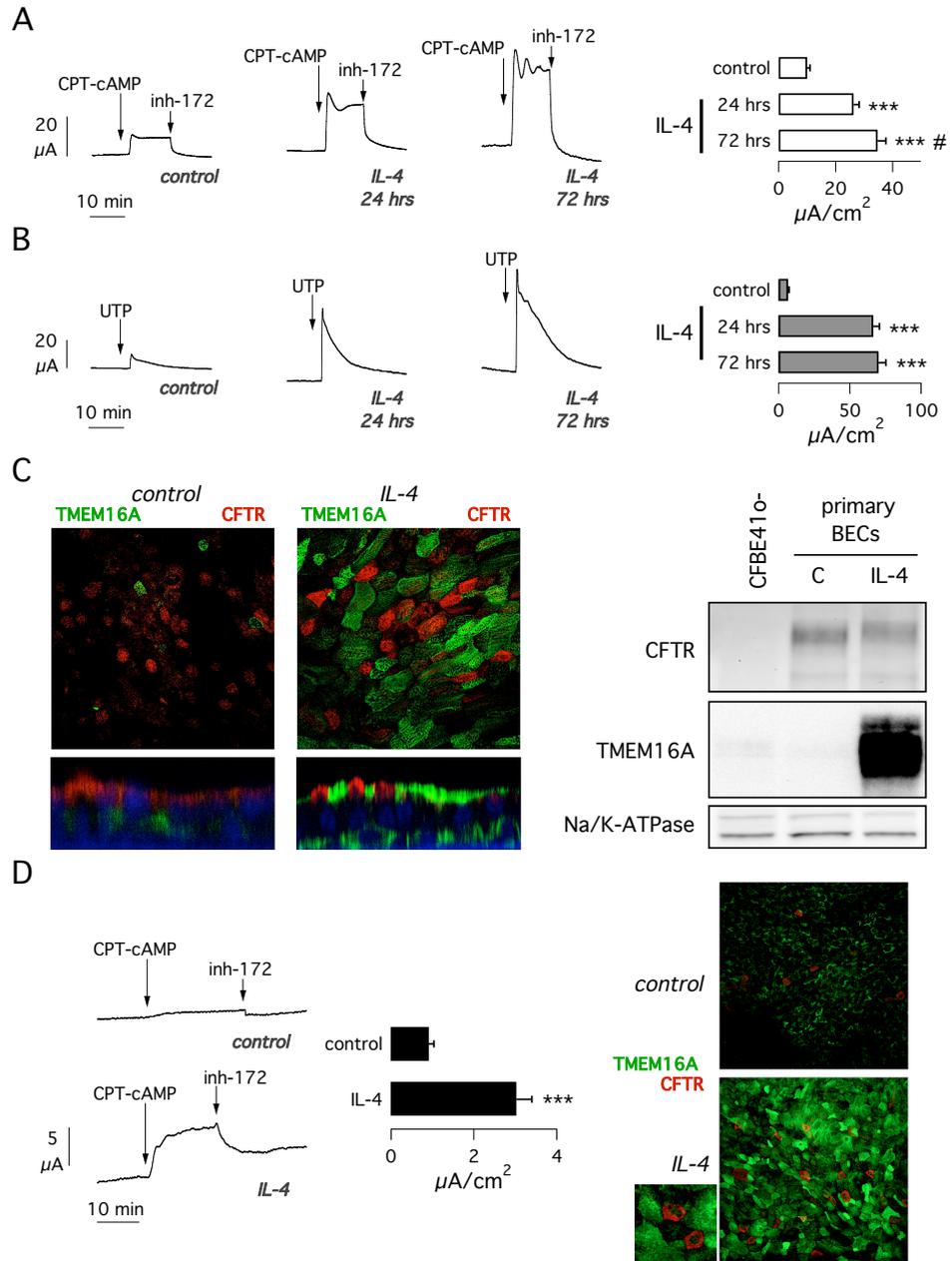


Figura 2. Aumento della funzione di CFTR e TMEM16A indotto da IL-4. (A,B) Le tracce rappresentative (sinistra) e i grafici a barre (destra) mostrano le correnti ioniche dipendenti da CFTR e TMEM16A misurate in camera di Ussing (correnti di corto-circuito) su cellule bronchiali umane tenute in condizioni di riposo o incubate con IL-4 per 24 e 72 ore (10 ng/ml). Le correnti CFTR-dipendenti vengono attivate con CPT-cAMP (100 μM) e poi bloccate con l'inibitore specifico CFTR_{inh-172} (10 μM). Le correnti mediate da TMEM16A vengono invece attivate con UTP 100 μM (in presenza dell'inibitore di CFTR). I grafici a barre riportano l'ampiezza della caduta di corrente indotta dall'inibitore CFTR_{inh-172} (A) o l'ampiezza massima della corrente attivata da UTP (B). I dati mostrati sono medie \pm sem di 13-21 esperimenti. ***, $p < 0.001$ rispetto al controllo. #, $p < 0.05$ rispetto al trattamento con IL-4 per 24 ore. (C) Rivelazione delle proteine TMEM16A e CFTR mediante immunofluorescenza (sinistra) e western blot (destra). Le immagini di immunofluorescenza mostrano campi xy (alto) o sezioni xz (basso). (D) Misurazione delle correnti di corto-circuito e immagini di immunofluorescenza da cellule bronchiali ottenute da un paziente con fibrosi cistica (genotipo F508del/F508del). Le correnti CFTR-dipendenti sono aumentate significativamente dal trattamento con IL-4 ($n = 15-16$; $p < 0.001$). L'espressione di CFTR e TMEM16A è aumentata dal trattamento con IL-4 anche in cellule CF.

Dopo aver bloccato l'assorbimento di sodio con amiloride (non mostrato nella traccia), l'epitelio viene stimolato con CPT-cAMP per indurre la fosforilazione, e quindi l'attivazione, della proteina-canale CFTR (Fig. 2A). La corrente risultante viene poi inibita dall'inibitore specifico CFTRinh-172. In presenza di questo inibitore, l'aggiunta di UTP sul versante apicale dell'epitelio genera un veloce incremento di corrente che raggiunge un picco massimo in pochi secondi e poi decade ai valori precedenti alla stimolazione in 10-20 minuti (Fig. 2B). L'effetto dell'UTP è mediato dalla mobilizzazione del calcio intracellulare che determina a sua volta l'attivazione transiente dei canali del cloruro formati dalla proteina TMEM16A. Gli stessi esperimenti eseguiti su epitelii trattati con IL-4 per 24 e 72 ore mostrano un considerevole aumento della secrezione attivata da AMPc e da calcio, come indicato dall'ampiezza delle correnti rispettivamente bloccate dall'inibitore specifico CFTRinh-172 (Fig. 2A) e attivate da UTP (Fig. 2B). La corrente mediata dall'attivazione della proteina-canale CFTR aumenta significativamente di 2.6 e 3.5 volte a 24 e 72 ore di trattamento, rispettivamente (Fig. 2A). L'aumento della corrente attivata da UTP è, invece, essenzialmente lo stesso (circa 10 volte) ai due tempi di trattamento con IL-4. È interessante notare che negli epitelii trattati con IL-4 per 72 ore, la corrente mediata da CFTR mostra inizialmente delle oscillazioni che poi progressivamente scompaiono (Fig. 2A).

L'espressione delle proteine-canale CFTR e TMEM16A è stata valutata mediante esperimenti di immunofluorescenza e western blot (Fig. 2C). Le immagini ottenute mediante microscopia confocale mostrano che il trattamento con IL-4 determina un marcato aumento dell'espressione di TMEM16A e, in misura molto minore, di CFTR. Entrambe le proteine appaiono localizzate sul versante apicale delle cellule, ma mai all'interno della stessa cellula (Fig. 2C, a sinistra). In accordo con i dati funzionali e di immunofluorescenza, gli esperimenti di western blot hanno rilevato un forte aumento dell'espressione di TMEM16A in cellule trattate con IL-4 (Fig. 2C, a destra). Al contrario, l'espressione della proteina CFTR non sembra essere modificata dal trattamento con la citochina. Gli esperimenti di western blot mostrano, in questo caso, soltanto un leggero spostamento nella mobilità elettroforetica che potrebbe riflettere una modificazione nella glicosilazione della proteina CFTR (Fig. 2C, a destra). L'espressione di TMEM16A e CFTR è stata valutata anche a livello di mRNA mediante real time RT-PCR. L'mRNA di CFTR non è risultato alterato dal trattamento con IL-4, mentre l'mRNA di TMEM16A è risultato aumentato di 7 volte.

Visto l'aumento dell'attività di CFTR indotto dal trattamento con IL-4, si è andati a valutare l'effetto di questa citochina su cellule prelevate da pazienti con fibrosi cistica omozigoti per la mutazione F508del che causa un grave difetto nella maturazione della proteina CFTR. Come atteso, in cellule non trattate l'attività di CFTR è risultata molto bassa, meno di $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Fig. 2D, sinistra). Il trattamento con IL-4 per 72 ore induce un aumento di circa 3 volte della funzione di CFTR, un effetto proporzionalmente simile a quello che l'IL-4 ha sulle cellule normali. Attraverso esperimenti di immunofluorescenza, è stato osservato come il trattamento con IL-4 determini un aumento dell'espressione di CFTR anche nelle cellule CF (Fig. 2D, destra). Comunque, l'attenta osservazione delle immagini ha rivelato che l'aumento del segnale di CFTR è evidente soprattutto a livello intracellulare, dato il *pattern* perinucleare di marcatura (Fig. 2D, immagine ingrandita).

Per valutare l'estensione e l'andamento temporale dei cambiamenti dell'espressione genica indotti da IL-4, è stato estratto l'mRNA da cellule trattate a diversi tempi, da 6 a 72 ore. I campioni di RNA sono stati quindi analizzati mediante microarray. In particolare, è stata analizzata l'espressione di geni coinvolti nel trasporto ionico transepiteliale (Fig. 3).

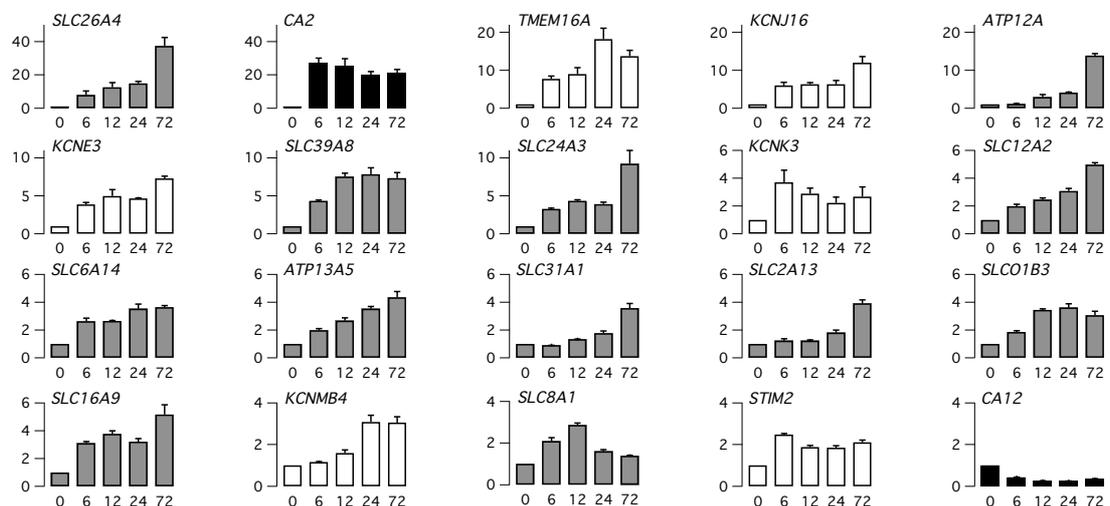


Figura 3. Canali e trasportatori indotti da IL-4. Grafici a barre riportanti l'incremento relativo di espressione dei geni indicati dopo il trattamento di cellule bronchiali con IL-4 (10 ng/ml) per 6, 12, 24 e 72 ore. I dati sono ottenuti dall'analisi mediante microarray di tre preparazioni diverse di cellule bronchiali.

Come riportato in precedenza, il trattamento con IL-4 aumenta fortemente l'espressione della proteina-canale TMEM16A (Caputo et al., 2008) e della proteina-trasportatrice elettro-neutra pendrina (SLC26A4) (Pedemonte et al., 2007). I nuovi

dati mostrano come l'induzione di TMEM16A e pendrina sia già rilevabile dopo 6 ore di trattamento e che l'espressione continua ad aumentare con un diverso andamento temporale (Fig. 3). La pendrina mostra l'espressione più elevata a 72 ore di trattamento, con un aumento di 37 volte rispetto alle cellule non trattate. Invece, l'espressione di TMEM16A ha un picco a 24 ore (aumento di 18 volte) seguito da una lieve diminuzione a 72 ore.

È importante notare come l'analisi dei microarray abbia rivelato l'induzione di altri sistemi di trasporto ionico. Alcuni geni mostrano una risposta relativamente tardiva, con una particolare iper-espressione a 72 ore di trattamento. È il caso dei geni codificanti per ATP12A, SLC31A1, SLC2A13 e KCNMB4 (Fig. 3). Il gene ATP12A codifica per la forma non-gastrica della pompa protonica H^+/K^+ -ATPasi, responsabile della secrezione di protoni dalla membrana apicale delle cellule epiteliali (Wang et al., 2015). SLC31A1 è un trasportatore ad alta affinità per il rame. SLC2A13 agisce come co-trasportatore H^+ /mio-inositolo. KCNMB4 funziona da subunità β del canale del potassio a larga conduttanza attivato da calcio. Altri geni mostrano un'induzione più rapida. Questa lista include i geni codificanti per: KCNJ16, un canale del potassio sensibile al pH (D'Adamo et al., 2011); KCNE3, una subunità del canale del potassio KCNQ1; SLC39A8, un trasportatore di zinco e ferro dipendente da bicarbonato (Wang et al., 2012); SLC24A3, uno scambiatore sodio/calcio dipendente da potassio (Schnetkamp, 2004); KCNK3, canale del potassio inibito dal pH acido (Bayliss et al., 2001); SLC12A2, il co-trasportatore NKCC1 (Markadieu e Delpire, 2014); SLC6A14, il trasportatore di amino acidi $ATB^{0,+}$ (Hatanaka et al., 2001); ATP13A5, una ATPasi poco caratterizzata; SLCO1B3, un trasportatore di anioni organici; SLC16A9, il trasportatore di acidi mono-carbossilici MTC9; STIM2, una proteina del reticolo endoplasmatico coinvolta nella regolazione della concentrazione intracellulare di calcio. Rispetto agli altri geni finora elencati, SLC8A1, codificante per uno scambiatore sodio/calcio, mostra un'induzione transiente con un modesto aumento di espressione solo a 12 ore. Inoltre, è importante evidenziare come il trattamento con IL-4 determini una forte induzione anche dell'anidrasi carbonica 2 citosolica (CA2), con un aumento di espressione di oltre 20 volte già dopo 6 ore (Fig. 3). Al contrario, un'altra anidrasi carbonica, la forma legata alla membrana CA12, risulta regolata negativamente. Va infine notato, come, in accordo con i dati di real time RT-PCR, l'espressione di CFTR non sia alterata dal trattamento con IL-4.

Attraverso esperimenti di immunofluorescenza combinata con microscopia confocale, è stata analizzata l'espressione di alcune delle proteine la cui iper-espressione è suggerita dai dati di microarray. Dapprima si è voluto approfondire l'analisi dell'espressione della proteina TMEM16A. È stato già mostrato nella figura 1 come l'espressione della proteina-canale TMEM16A sia fortemente aumentata dal trattamento con IL-4 e come tale espressione sia mutualmente esclusiva con quella della proteina CFTR. Dato che l'epitelio bronchiale è caratterizzato dalla presenza di diversi tipi cellulari, è stato valutato se l'espressione di TMEM16A sia associata ad uno specifico tipo cellulare. A tale scopo, sono stati utilizzati due marcatori, la tubulina acetilata e la mucina 5AC (MUC5AC), specifici rispettivamente di cellule cigliate e cellule mucipare. Com'è possibile osservare nelle immagini della figura 4, le cellule cigliate sono risultate prive dell'espressione di TMEM16A, sia in condizioni di controllo che dopo trattamento con IL-4.

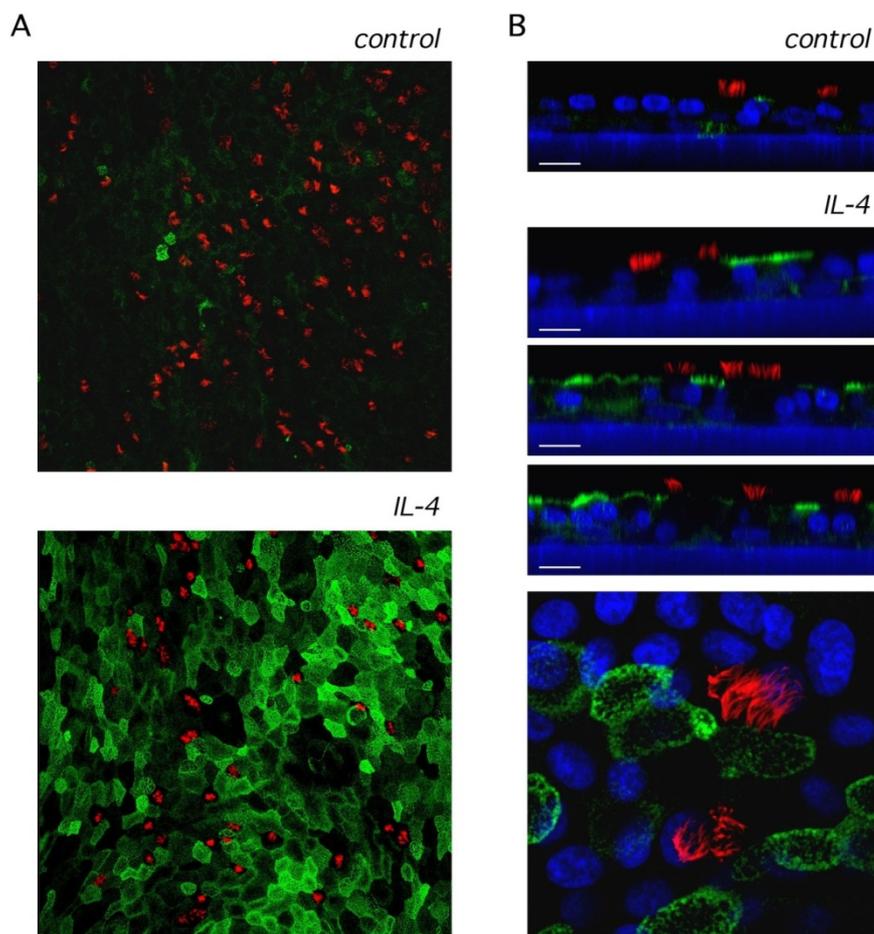


Figura 4. Espressione della proteina TMEM16A in cellule non cigliate. Immagini di microscopia confocale sul piano *xy* (A) o *xz* (B, in alto) di cellule bronchiali trattate e non con IL-4 e marcate per TMEM16A (verde) e tubulina acetilata (rosso, marcatore delle ciglia). I nuclei sono colorati con DAPI. Barra: 10 μ m.

Al contrario, le cellule mucipare sono risultate fortemente positive per l'espressione di TMEM16A, soprattutto dopo il trattamento con la citochina di tipo Th2. Più precisamente, le cellule esprimenti MUC5AC dopo 24 ore di trattamento rappresentano una frazione (circa il 15%) delle cellule esprimenti TMEM16A (Fig. 5). Dopo 72 ore di trattamento, il numero di cellule esprimenti TMEM16A rimane essenzialmente lo stesso mentre la percentuale di cellule positive per TMEM16A che esprimono anche MUC5AC aumenta al 60% (Fig. 6A).

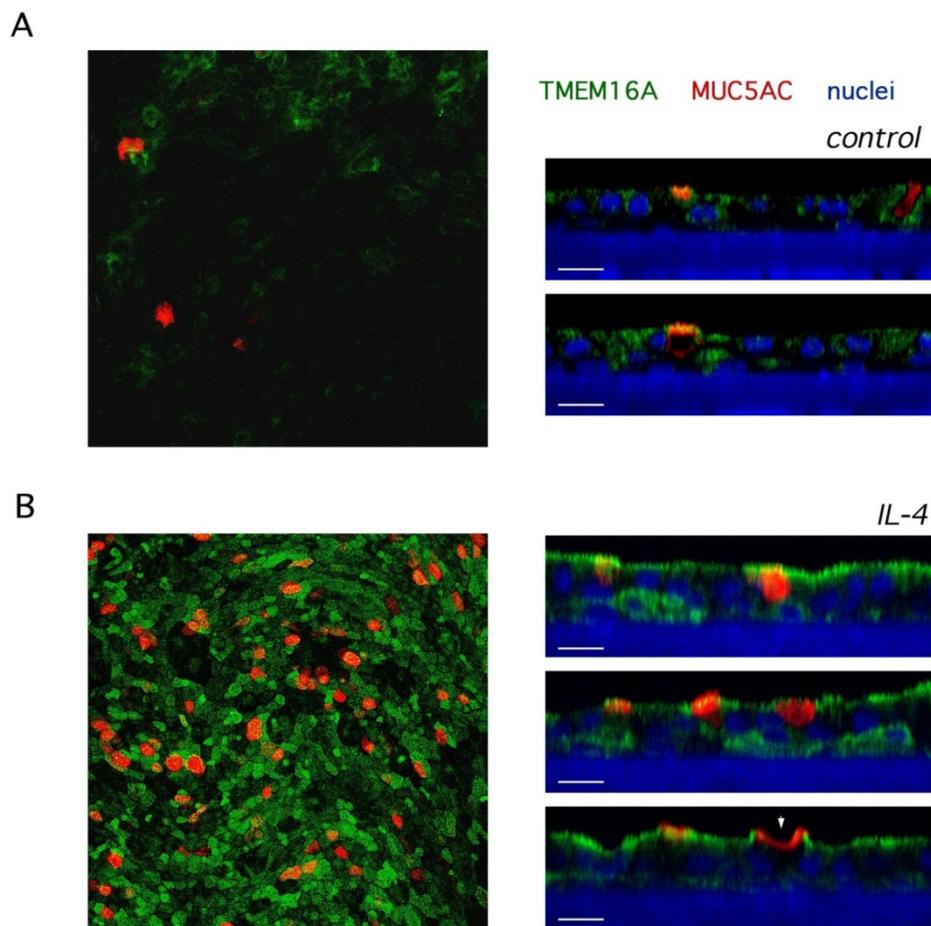


Figura 5. Espressione della proteina TMEM16A in cellule mucipare. (A,B) Immagini di microscopia confocale sull'asse *xy* e *xz* di cellule bronchiali trattate e non con IL-4 e marcate per TMEM16A (verde) e MUC5AC (rosso, marcatore delle cellule mucipare). I nuclei sono colorati con DAPI. Barra: 10 μ m.

Le immagini della figura 6B mostrano infine come le proteine TMEM16A e CFTR non siano mai co-espresse nello stesso tipo cellulare. Infatti, la marcatura con la tubulina acetilata svela come la proteina CFTR sia espressa in maniera predominante in cellule cigliate, che mancano dell'espressione della proteina TMEM16A (Fig. 6B).

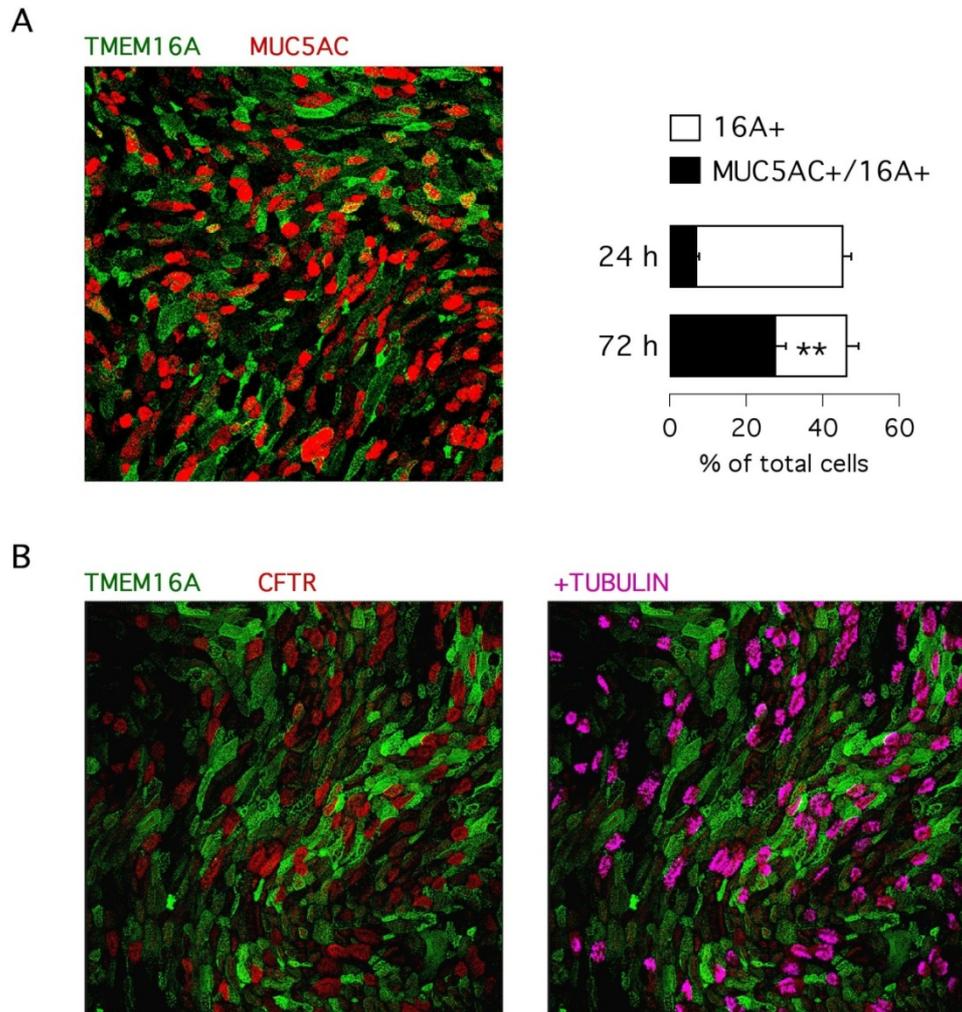


Figura 6. Espressione di TMEM16A e CFTR in cellule mucipare e cigliate, rispettivamente. (A) Immagine rappresentativa (a sinistra) e grafico a barre (a destra) mostranti la co-espressione di TMEM16A e MUC5AC in cellule bronchiali trattate con IL-4 per 72 ore (confrontare con l'effetto dell'IL-4 per 24 ore nella figura 5B). n=6, ** p<0.01. (B) Immagini rappresentative mostranti la diversa espressione di TMEM16A (verde) e CFTR (rosso). Le cellule sono state tratte con IL-4 per 72 ore. L'immagine sulla sinistra mostra come le due proteine siano espresse in cellule diverse, con poca o nessuna sovrapposizione del segnale. L'immagine sulla destra, acquisita sullo stesso campo, mostra anche la marcatura per le ciglia (tubulina acetilata, magenta). Il confronto delle due immagini rivela una perfetta sovrapposizione tra le marcature per CFTR e ciglia.

Come la proteina TMEM16A, anche la proteina SLC26A4 risulta fortemente iper-espressa dopo trattamento con IL-4, con una localizzazione nella membrana apicale (Fig. 7). Le due proteine mostrano un certo grado di co-localizzazione in alcune cellule ma anche un'espressione separata in molte altre. La marcatura della proteina CA2 rivela una forte espressione indotta da IL-4, con una localizzazione preferenziale nelle cellule mucipare identificate dalla marcatura per MUC5AC (Fig. 7). Altre due proteine mostrano invece una distribuzione più uniforme: SLC12A2 e ATP12A sono fortemente sovra-regolate da IL-4 in quasi tutte le cellule, anche se con

una diversa localizzazione sub-cellulare (Fig. 7). Come atteso, SLC12A2 è localizzata nella membrana basolaterale. Invece, ATP12A viene espressa nella regione apicale, con una più marcata espressione in cellule non cigliate.

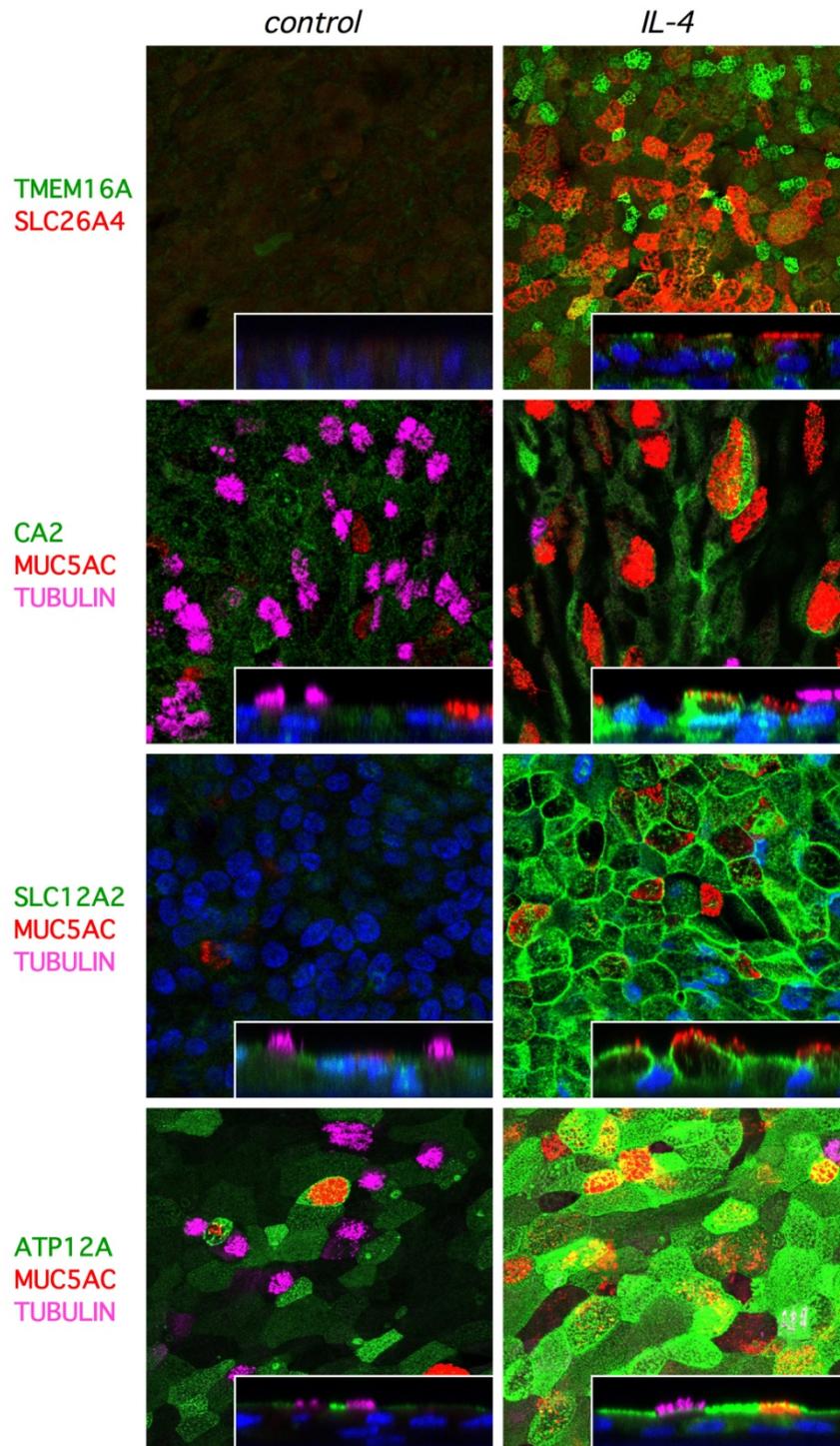


Figura 7. Espressione delle proteine indotte da IL-4. Immagini rappresentative mostrandoti l'espressione e la localizzazione sub-cellulare di TMEM16A, SLC26A4, anidrasi carbonica 2 (CA2), SLC12A2 e ATP12A. Quando la combinazione degli anticorpi primari lo permetteva, la tubulina acetilata e la MUC5AC sono state utilizzate come marcatori di cellule cigliate e mucipare, rispettivamente. Gli epiteli bronchiali sono stati tenuti in condizioni di controllo o trattati con IL-4 per 72 ore. Immagini grandi: piani xy (dimensioni: 185 x 185 μm). Immagini piccole: sezioni xz.

L'analisi del profilo di espressione genica ha rivelato come la citochina IL-4 stimoli l'espressione di molte proteine coinvolte nel trasporto anionico. Questi cambiamenti di espressione potrebbero determinare un aumento della capacità di secrezione di bicarbonato. Quindi, è particolarmente interessante andare ad analizzare il contributo del trasporto di bicarbonato nelle correnti attivate da AMPc e calcio. A tal proposito, sono stati ripetuti gli esperimenti di misurazione della corrente di cortocircuito, utilizzando questa volta una soluzione priva di cloruro, una condizione che è stata già utilizzata per valutare il trasporto netto di bicarbonato (Shamsuddin e Quinton, 2014). In cellule non trattate, l'assenza di cloruro extracellulare ha determinato la diminuzione delle correnti dipendenti da AMPc e calcio rispettivamente al 11 e 5% della loro ampiezza in condizioni di controllo (Fig. 8A,C). Il trattamento delle cellule con IL-4 per 72 ore ha determinato il cambiamento della percentuale di corrente residua al 20 e 41%, rispettivamente, rappresentando quindi un aumento proporzionale di circa 2 e 8 volte rispetto alle cellule non trattate (Fig. 8B,C). Data la natura transiente della corrente dipendente da calcio, è stata stimata la sua ampiezza non solo in termini di dimensione del picco massimo ma anche come area sotto la curva, AUC (Fig. 8D). Utilizzando questo parametro, la componente indipendente dal cloruro attivata da UTP è risultata ancora maggiore in cellule trattate rispetto a cellule di controllo (13% rispetto 1% del valore misurato in presenza di cloruro).

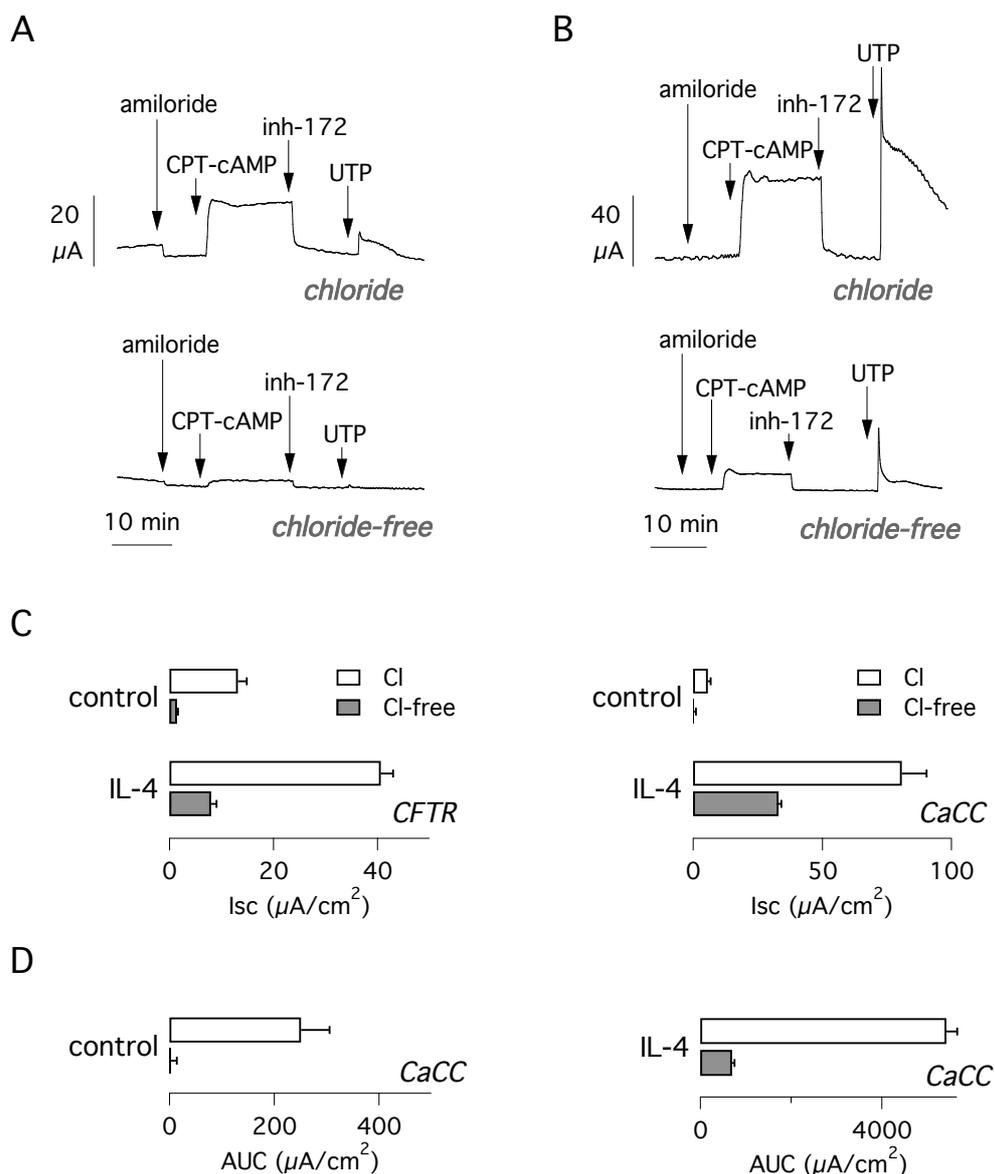


Figura 8. Effetto della rimozione del cloruro extracellulare. (A,B) Le tracce rappresentative delle registrazioni della corrente di corto circuito mostrano le correnti CFTR- e TMEM16A-dipendenti in cellule tenute in condizioni di controllo (A) e trattate con IL-4 per 72 ore (B). Notare la diversa barra (20 e 40 μA). Gli esperimenti sono stati eseguiti con una normale soluzione salina (tracce superiori) o in assenza di cloruro (tracce inferiori). (C) I grafici a barre mostrano i dati relativi alle correnti dipendenti da CFTR (a sinistra) e da TMEM16A (a destra) nelle diverse condizioni. (D) Le correnti dipendenti dall'attivazione di TMEM16A sono state quantificate anche come integrale (area sotto la curva AUC) della risposta all'UTP.

Per analizzare ulteriormente i cambiamenti indotti da IL-4, è stato utilizzato il bumetanide come bloccante del co-trasportatore NKCC1 e l'S0859 come inibitore generico dei trasportatori basolaterali di bicarbonato. È stata studiata prima la corrente attivata da AMPc. Come atteso, dato il ruolo di NKCC1 nel supportare la secrezione di cloruro, il bumetanide diminuisce marcatamente la corrente attivata da AMPc in cellule non trattate (Fig. 9A). La successiva aggiunta dell'inibitore CFTR_{inh}-172

permette di stimare la componente CFTR-dipendente rimanente dopo l'azione del bumetanide. Considerando gli effetti relativi di bumetanide e CFTR_{inh}-172, si può calcolare come l'inibizione di NKCC1 rimuova circa il 60% della secrezione totale mediata da CFTR (Fig. 9A). In un altro gruppo di esperimenti, è stato aggiunto l'inibitore S0859 dopo il bumetanide. La traccia rappresentativa mostrata in figura 9A mostra come l'effetto di S0859 consista in un piccolo picco transiente seguito da una modesta diminuzione della corrente. L'inibizione totale ottenuta dall'azione di bumetanide e S0859 è solo leggermente maggiore di quella determinata dal solo bumetanide (Fig. 9A). In cellule trattate con IL-4 per 72 ore, gli effetti relativi di bumetanide e S0859 risultano modificati. Infatti, l'inibizione ottenuta con il bumetanide è risultata significativamente inferiore (meno del 40%) se confrontata con quella ottenuta in cellule non trattate (Fig. 9A,B). Questo risultato suggerirebbe un maggior contributo di altri tipi di trasportatori anionici basolaterali. In accordo con questa interpretazione, l'aggiunta di S0859 ha determinato un'inibizione più marcata nelle cellule trattate con IL-4 (Fig. 9B).

È stato studiato l'effetto degli inibitori dei trasportatori basolaterali anche sulla corrente attivata da calcio. L'UTP è stato aggiunto sul versante apicale dell'epitelio in presenza e assenza di bumetanide da solo o in combinazione con S0859. In cellule non trattate, la corrente attivata da UTP, soprattutto se misurata come AUC, risulta parzialmente inibita dal bumetanide e quasi totalmente bloccata dalla combinazione di bumetanide e S0859 (Fig. 9C). Una risposta simile (effetto additivo di bumetanide e S0859) è stata ottenuta anche in cellule trattate con IL-4. Tuttavia, in queste ultime, la risposta all'aggiunta di UTP in presenza dei due inibitori è risultata sensibilmente maggiore (Fig. 9D).

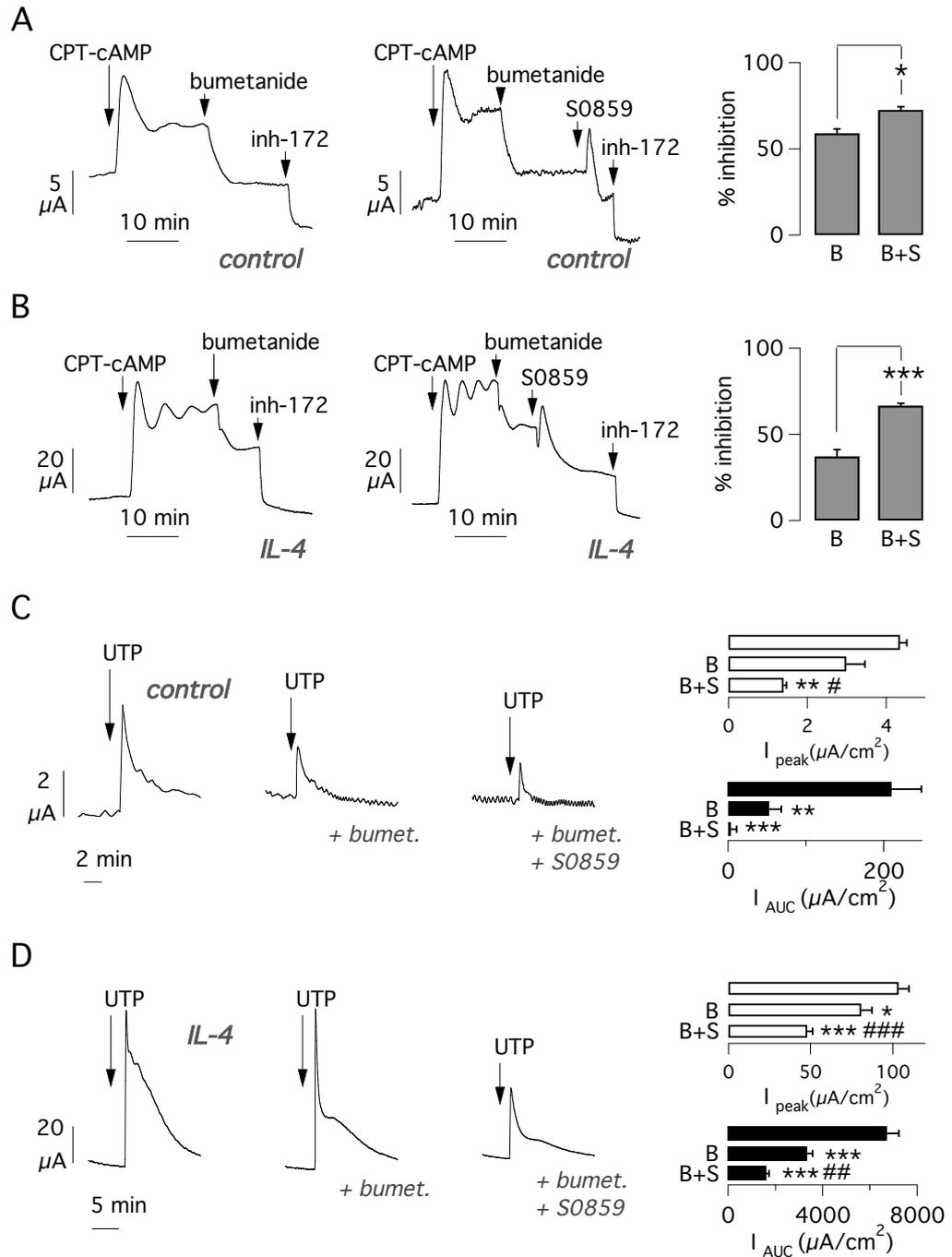


Figura 9. Effetto degli inibitori del trasporto anionico. (A,B) Tracce rappresentative delle registrazioni della corrente di corto circuito e grafici a barre mostrandoti l'effetto di bumetanide e S0859 sulle correnti CFTR-dipendenti in cellule in condizioni di controllo (A) o trattate con IL-4 per 72 ore. (B) Il valore di inibizione riportato nei grafici a barre è calcolato sul totale della corrente dipendente da CFTR (differenza tra la corrente attivata da CPT-cAMP e la corrente rimanente dopo l'inibitore CFTR_{inh-172}). B: bumetanide. B+S: bumetanide + S0859. *, p < 0.05; ***, p < 0.001 rispetto a bumetanide da solo (n = 8 per condizione). (C,D) Tracce rappresentative delle registrazioni della corrente di corto circuito e grafici a barre mostrandoti l'effetto di bumetanide e S0859 sulle correnti attivate da UTP in cellule in condizioni di controllo (C) o trattate con IL-4 per 72 ore (D). L'attività di TMEM16A è stata valutata come picco di corrente o come AUC, area sotto la curva. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001 rispetto alla corrente in assenza di inibitori. #, p < 0.05; ##, p < 0.01; ###, p < 0.001 rispetto alle correnti dopo bumetanide da solo (n = 8 per condizione).

Si può notare come, anche in presenza di bumetanide e S0859, siano presenti delle correnti residue AMPc- e calcio-dipendenti, soprattutto in cellule trattate con IL-4. Per inibire ulteriormente il trasporto anionico transepiteliale, è stato testato l'acetazolamide come inibitore dell'anidraasi carbonica. Quando viene aggiunto dopo bumetanide e S0859, l'acetazolamide determina un'ulteriore diminuzione della corrente dipendente da CFTR (Fig. 10). L'inibizione totale ottenuta con i tre composti è risultata essere di circa l'85%. Anche la corrente attivata da UTP è risultata sensibile ad acetazolamide. Il picco di corrente indotto da UTP in presenza dei tre inibitori è risultato minore di quello misurato con la combinazione di bumetanide e S0859 (27.8 ± 2.2 vs. $47.9 \pm 3.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$).

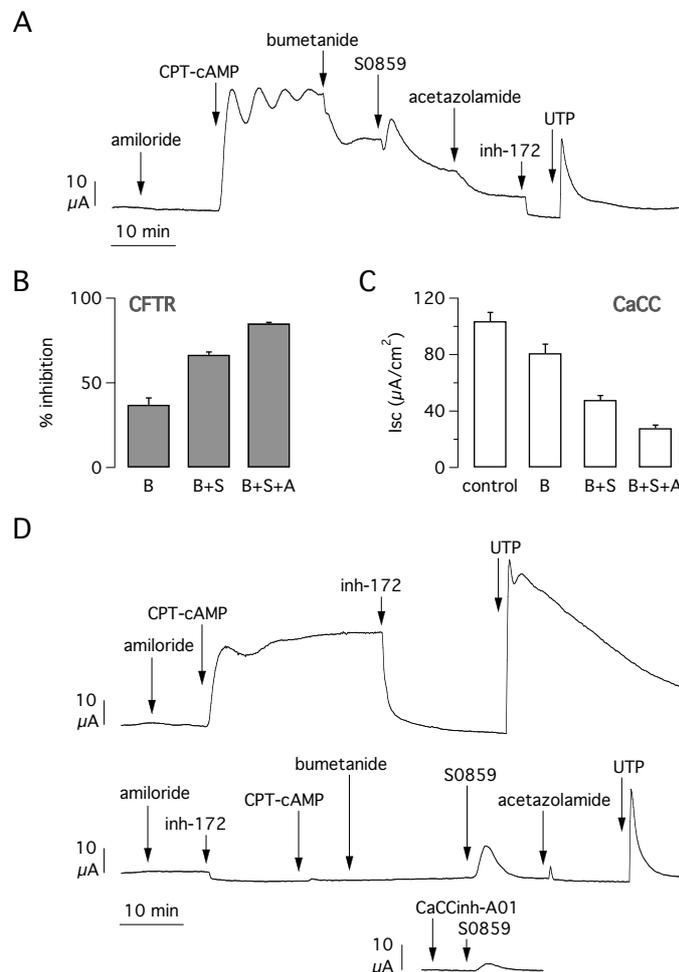


Figura 10. Inibizione farmacologica del trasporto anionico. (A) Tracce rappresentative mostranti gli effetti additivi causati dall'aggiunta sequenziale di bumetanide, S0859 e acetazolamide su cellule trattate con IL-4 per 72 ore. (B) Inibizione causata dai modulatori farmacologici sulla secrezione CFTR-dipendente. (C) Inibizione della secrezione calcio-dipendente causata dai modulatori farmacologici. (D) Analisi della secrezione CFTR-dipendente. L'aggiunta iniziale di $\text{CFTR}_{\text{inh-172}}$ previene l'attivazione da parte di CPT-cAMP e elimina la risposta inibitoria a bumetanide, S0859 e acetazolamide. Come mostrato in basso, l'attivazione transiente stimolata da S0859 viene fortemente inibita da $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$.

Come osservato in questo studio, SLC26A4/pendrina è uno dei geni più fortemente indotti da IL-4 dopo trattamento prolungato. Tuttavia, l'attività della proteina SLC26A4 non può essere rilevata nelle registrazioni di corrente di cortocircuito, in quanto il suo meccanismo di trasporto ionico è elettro-neutro. Di conseguenza, per avere una stima del trasporto di bicarbonato è stato utilizzato un diverso approccio sperimentale volto a misurare il pH intracellulare con la sonda BCECF e sostituendo il cloruro con il gluconato. Per escludere il possibile effetto determinato dal trasporto di bicarbonato tramite CFTR, questi esperimenti sono stati eseguiti su epitelii CF. In cellule non trattate tenute in condizioni di riposo, la sostituzione del cloruro apicale con gluconato non ha determinato alcun cambiamento. (Fig. 11A).

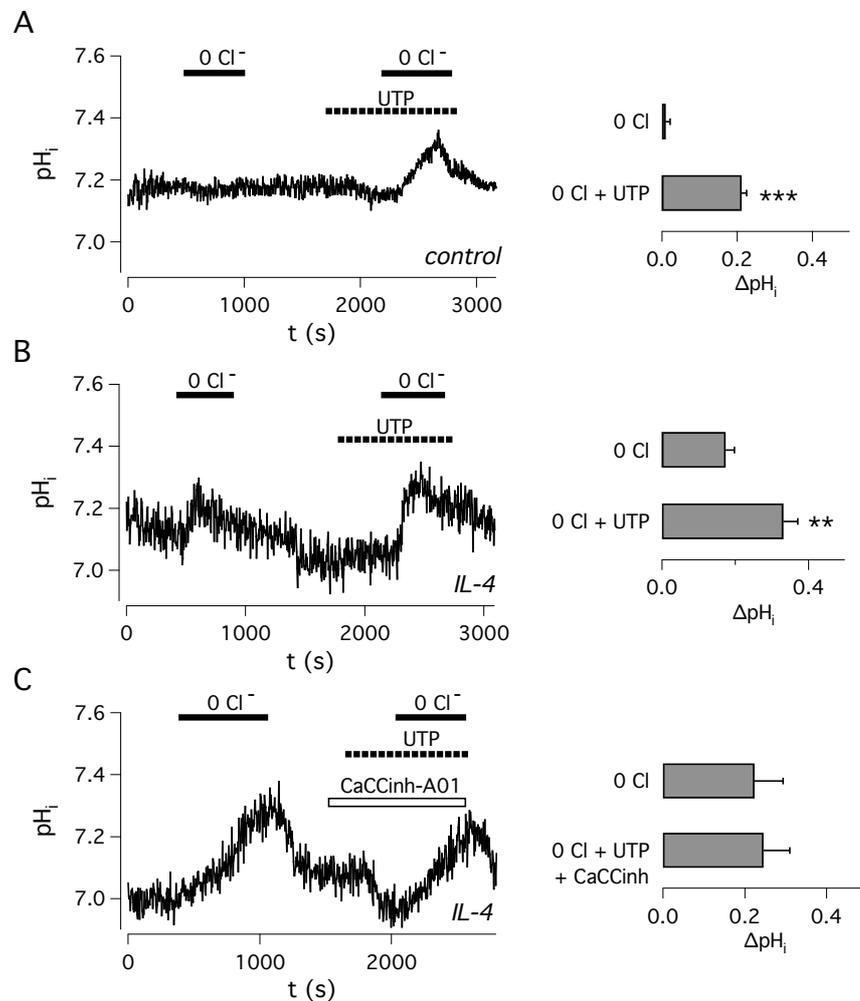


Figura 11. Misurazione del pH intracellulare negli epitelii bronchiali. Tracce rappresentative mostranti i valori di pH intracellulare misurati con la sonda BCECF in presenza e in assenza di cloruro sul versante apicale. I grafici a barre riportano i cambiamenti di pH dopo la rimozione di cloruro sul lato apicale in assenza e in presenza di UTP. (A) Cellule epiteliali bronchiali in condizioni di controllo. (B) Cellule trattate con IL-4 per 72 ore. (C) Cellule trattate con IL-4 per 72 ore, UTP aggiunto in presenza dell'inibitore CaCC_{inh}-A01.

Invece, un'alcalinizzazione significativa è stata osservata in cellule trattate con IL-4, indicando così l'induzione dell'espressione di un trasportatore apicale di bicarbonato (Fig. 11B). Negli stessi esperimenti, le cellule sono state stimulate anche con l'aggiunta di UTP sul versante apicale. In queste condizioni, la sostituzione del cloruro ha determinato un'alcalinizzazione intracellulare maggiore in cellule trattate con IL-4 (Fig. 11A,B). Questo effetto può essere determinato dall'ingresso di bicarbonato tramite i canali del cloruro attivati da calcio. Infatti, in presenza dell'inibitore di questi canali ($\text{CaCC}_{\text{inh}}\text{-A01}$) l'alcalinizzazione successiva all'aggiunta di UTP non è risultata diversa da quella indotta dalla sola rimozione di cloruro (Fig.11C) suggerendo quindi un'azione sinergica di pendrina e TMEM16A nella secrezione di bicarbonato.

Per valutare più direttamente la capacità delle cellule bronchiali di secernere bicarbonato, sono stati eseguiti esperimenti in cui la superficie apicale degli epitelii veniva ricoperta con 150 μl di soluzione Ringer contenente cloruro 128 mM e bicarbonato 24 mM. Dopo 48 ore di incubazione in atmosfera al 5% di CO_2 , il fluido apicale veniva recuperato per procedere alla misurazione della sua composizione ionica (Fig. 12). Una marcata differenza è stata notata tra le cellule trattate con e senza IL-4. In cellule non trattate, la concentrazione di cloruro è aumentata a 143 mM e quella di bicarbonato è diminuita a 16 mM. In cellule trattate, la concentrazione di cloruro è invece diminuita a 107 mM, mentre quella di bicarbonato è aumentata a 42 mM (Fig. 12). In accordo con l'aumentata concentrazione di bicarbonato, il fluido apicale delle cellule trattate con IL-4 è risultato più alcalino (pH = 8.03 rispetto a 7.05 delle cellule non trattate). Un altro cambiamento significativo ha riguardato il potassio: dal valore iniziale di 4.6 mM, la concentrazione di potassio è risultata moderatamente modificata nel fluido delle cellule non trattate (3.2 mM), e marcatamente diminuita (0.3 mM) nel fluido delle cellule trattate (Fig. 12). Le concentrazioni di sodio e calcio sono, invece, rimaste inalterate.

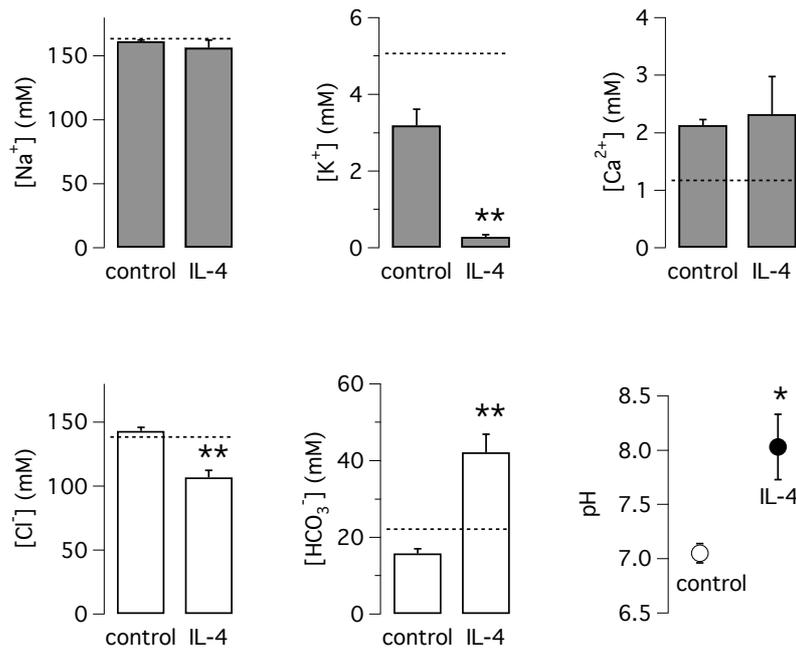


Figura 12. Modificazione del fluido apicale da parte dell'IL-4. Composizione ionica e pH del fluido apicale di cellule trattate e non con IL-4. Un volume fisso (150 μ l) di soluzione salina è stato applicato sul versante apicale degli epitelii e poi recuperato dopo 48 ore. Le linee tratteggiate rappresentano la concentrazione iniziale di ciascuna specie ionica nella soluzione originale. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ rispetto al controllo ($n = 3-4$).

Infine, è stato valutato il ruolo della modificazione del trasporto anionico in cellule trattate con IL-4 sul rilascio di muco. A questo proposito, è stato messo a punto un saggio in cui ATP e nanosfere fluorescenti (in 50 μ l di soluzione salina) venivano aggiunti sul versante apicale degli epitelii. Gli epitelii erano inclinati di 10 gradi per permettere il flusso unidirezionale della soluzione per gravità. Dopo la rimozione del fluido in eccesso il muco colorato dalle nanosfere veniva visualizzato attraverso un microscopio a fluorescenza. In epitelii non trattati è stato possibile rilevare un segnale piuttosto blando (Fig. 13A). In epitelii trattati con IL-4, invece, è risultata visibile una complessa rete di filamenti di muco (Fig. 13B). È rilevante sottolineare come una marcata riduzione dei filamenti di muco sia stata osservata quando gli epitelii venivano precedentemente esposti per 3 ore ad una soluzione basolaterale priva di bicarbonato (Fig. 13C) oppure quando gli esperimenti venivano condotti su epitelii CF (Fig. 13D).

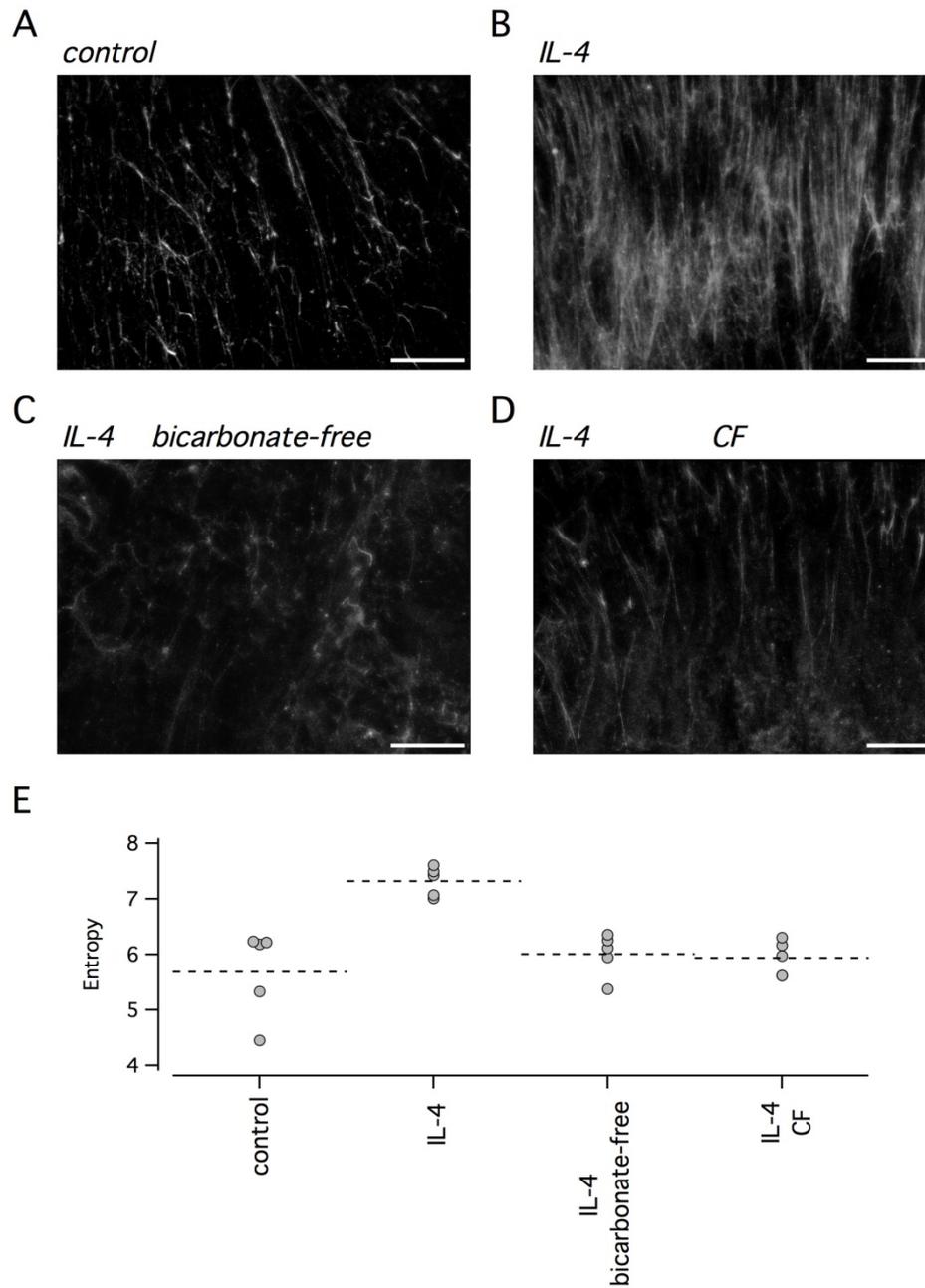


Figura 13. Rilascio di muco dagli epitelii bronchiali. (A-D) Immagini rappresentative mostranti la colorazione del muco con nanosfere fluorescenti. Barra: 500 μm . (E) Quantificazione dei filamenti di muco formati nelle diverse condizioni. L'effetto del trattamento con IL-4 è risultato statisticamente significativo ($p < 0.01$).

DISCUSSIONE

Il trattamento prolungato (72 ore) di cellule epiteliali bronchiali con IL-4 induce profondi cambiamenti morfologici che ricapitolano l'iperplasia mucosa che avviene in individui affetti da asma bronchiale. Lo studio riportato in questa tesi, attraverso l'analisi dell'espressione genica e numerosi saggi sperimentali, evidenzia come a livello funzionale l'iperplasia mucosa sia accompagnata da marcate modificazioni dei meccanismi di trasporto ionico. A livello di trascrittoma, il trattamento con IL-4 regola positivamente l'espressione di numerosi geni codificanti per canali ionici e trasportatori. Oltre a indurre l'aumentata espressione del canale del cloruro TMEM16A e dello scambiatore anionico pendrina/SLC26A4, l'IL-4 aumenta l'espressione di SLC12A2 che codifica per NKCC1. Questo co-trasportatore basolaterale, la cui overespressione è stata osservata in soggetti asmatici (Dolganov et al., 2001), genera l'accumulo intracellulare di cloruro accoppiando il suo ingresso a quello di sodio e potassio. Per questo motivo, NKCC1 è un determinante importante della *driving force* per la secrezione di cloruro. Degno di nota, come rivelato dagli esperimenti di immunofluorescenza, l'aumento di espressione di NKCC1 indotto da IL-4 avviene sia in cellule cigliate che in cellule mucipare. È interessante poi sottolineare come tra gli altri geni regolati positivamente da IL-4 vi siano la pompa protonica ATP12A, i canali del potassio sensibili al pH KCNJ16 e KCNK3, e l'anidrasi carbonica CA2, tutte proteine che possono essere coinvolte nell'omeostasi di bicarbonato e pH.

A livello funzionale, l'IL-4 aumenta fortemente la secrezione di cloruro dipendente da calcio e AMPc. Mentre il primo processo appare fortemente correlato con l'aumentata espressione della proteina-canale TMEM16A, il secondo sembra sorprendente visto che l'espressione della proteina CFTR non risulta alterata nei lisati di cellule trattate con IL-4. Inoltre, la proteina CFTR è espressa nelle cellule cigliate, le quali vanno incontro ad una significativa riduzione del loro numero negli epiteli trattati con IL-4 per 72 ore. Per spiegare l'aumento di secrezione di cloruro AMPc-dipendente, si può ipotizzare che la diminuzione del numero di cellule esprimenti CFTR sia controbilanciata dalla sovra-regolazione dei trasportatori basolaterali di cloruro (come NKCC1), la quale determina una maggiore *driving force* per la secrezione di cloruro. Inoltre, come suggerito dagli esperimenti di immunofluorescenza, è anche possibile che l'IL-4 determini un aumento

dell'espressione della proteina CFTR sulla superficie cellulare, un'osservazione che potrebbe indicare un aumentato trasporto intracellulare della proteina verso la superficie apicale oppure una sua ridotta internalizzazione. A tal proposito, è interessante sottolineare come l'aumentata funzione di CFTR sia stata osservata anche in cellule di pazienti CF con mutazione F508del, a dispetto dell'aumentata ritenzione nel reticolo endoplasmatico causata da questa mutazione.

Diverse linee di evidenza suggeriscono come uno dei maggiori effetti dei cambiamenti indotti dal trattamento con IL-4 sia un'aumentata capacità dell'epitelio di secernere bicarbonato. In particolare, la rimozione del cloruro extracellulare mette in evidenza una corrente transepiteliale residua, rappresentante la secrezione di bicarbonato, che è aumentata da IL-4. Poi, gli inibitori S0859 e acetozolamide, i quali riducono la concentrazione intracellulare di bicarbonato attraverso vie diverse, causano un forte effetto inibitorio sulle correnti transepiteliali AMPc- e calcio-dipendenti. Inoltre, la misurazione del pH intracellulare rivela un'aumentata permeabilità al bicarbonato in cellule trattate con IL-4 dovuta probabilmente all'espressione della proteina pendrina sulla membrana apicale. Infine, l'analisi della composizione del fluido apicale mostra una concentrazione di bicarbonato fortemente aumentata e, di conseguenza, una significativa alcalinizzazione. A riguardo questo ultimo punto, è importante notare come l'elevata concentrazione di bicarbonato, largamente maggiore di quella presente sul versante basolaterale, è stata misurata usando un volume relativamente grande. Quest'osservazione sottolinea l'aumentata capacità dell'epitelio trattato con IL-4 di secernere e generare una distribuzione asimmetrica di bicarbonato.

Altro aspetto molto importante, è l'osservazione che il trasporto di bicarbonato in cellule trattate con IL-4 riveste un ruolo rilevante nel meccanismo di rilascio del muco. Quando vengono stimulate con un agonista purinergico, le cellule rilasciano muco rapidamente, come indicato dalla colorazione con nanosfere fluorescenti. Questo processo viene significativamente inibito se le cellule sono incubate in una soluzione basolaterale priva di bicarbonato. Una simile inibizione del rilascio di muco è stata osservata anche quando il saggio è stato eseguito su cellule CF. Questo risultato indica che l'attività della proteina CFTR è particolarmente importante in condizioni di iperplasia mucosa. È interessante riportare come un difetto nel rilascio di muco sia stato recentemente osservato anche nelle cellule mucipare intestinali di topi CF (Liu et al., 2015). Questo tipo di difetto sembra sorprendente dato che la malattia CF è invece caratterizzata dall'accumulo di muco extracellulare. Tuttavia, è possibile

che un difetto primario dipendente da CFTR impedisca il normale rilascio di muco che viene successivamente secreto in uno stato più condensato. È intrigante che nei nostri studi la proteina CFTR sia espressa selettivamente in cellule cigliate e non in cellule mucipare. Di conseguenza, la proteina CFTR può alterare il muco attraverso la modulazione della composizione ionica dell'ambiente extracellulare. Alternativamente, è possibile che un'espressione bassa ma fisiologicamente significativa di CFTR nei granuli di mucina delle cellule mucipare (LeSimple et al., 2013) sia importante per il rilascio del muco.

Riassumendo, i risultati riportati in questo lavoro rivelano profondi cambiamenti dei meccanismi di trasporto ionico che avvengono nell'epitelio bronchiale in condizioni di iperplasia delle cellule mucipare. Questi cambiamenti sembrano favorire la secrezione di bicarbonato e il rilascio di muco. La figura 14 propone un modello ipotetico del processo di trasporto di cloruro e bicarbonato.

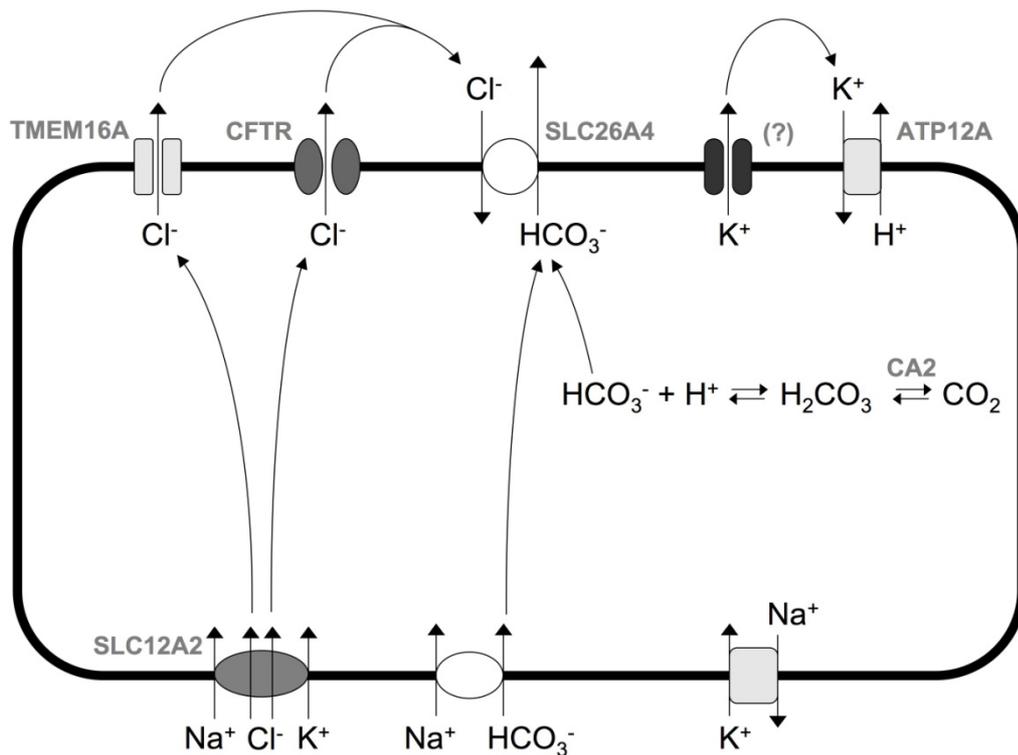


Figura 14. Meccanismi di secrezione anionica in cellule epiteliali bronchiali trattate con IL-4. Per semplicità, la figura mostra tutti i canali e i trasportatori all'interno della stessa cellula, sebbene alcuni di questi (ad esempio TMEM16A e CFTR) siano localizzati in tipi cellulari diversi. Il trasportatore NKCC1 (SLC12A2) promuove l'accumulo intracellulare di cloruro che viene poi secreto attraverso i canali del cloruro TMEM16A e CFTR. Il bicarbonato viene accumulato all'interno della cellula per azione dei trasportatori basolaterali e per conversione da CO₂. La proteina pendrina media lo scambio tra il cloruro extracellulare e il bicarbonato intracellulare. La membrana apicale contiene anche la pompa K⁺/H⁺ ATP12A e un canale del potassio. La secrezione di potassio può rappresentare il meccanismo di controllo dell'acidificazione del fluido apicale mediata da ATP12A.

Parte delle informazioni mostrate nella figura sono supportate da osservazioni effettuate in questo lavoro e in studi precedenti. Altre informazioni, in particolare il sito di espressione di alcune delle proteine indotte da IL-4 (membrana apicale o basolaterale, cellule cigliate o cellule non cigliate/mucipare), rimangono da chiarire in studi futuri.

L'aumentata e diffusa espressione di NKCC1 indica un generale aumento del trasporto basolaterale di cloruro che promuove la sua secrezione attraverso le proteine-canale espresse sulla membrana apicale (TMEM16A e CFTR). Il cloruro secreto può poi essere ri-internalizzato attraverso la pendrina in cambio di bicarbonato. In tal proposito, è stato precedentemente mostrato in cellule Calu-3 come la pendrina formi insieme a CFTR un'unità funzionale deputata alla secrezione di bicarbonato (Garnett et al., 2011). Per quanto riguarda la fonte del bicarbonato intracellulare, che viene poi secreto dalla pendrina, i risultati di questo lavoro suggeriscono il contributo di trasportatori basolaterali sensibili all'inibitore S0859 e la conversione da CO₂ mediata dall'anidrasi carbonica 2. Nel contesto del modello presentato nella figura 14, risultante in una secrezione netta di bicarbonato, l'aumentata espressione di ATP12A è particolarmente interessante. ATP12A, la forma non gastrica di H⁺/K⁺-ATPasi, è espressa nella membrana apicale dell'epitelio delle vie aeree dove è coinvolta nell'acidificazione del fluido apicale, accoppiando la secrezione di protoni al riassorbimento di potassio (Smith e Welsh, 1993; Shah et al., 2016).

L'aumento di espressione di ATP12A che abbiamo osservato in cellule trattate con IL-4 potrebbe sembrare in contrasto con gli elevati livelli di bicarbonato e il pH alcalino misurati nel fluido apicale. Tuttavia, abbiamo osservato anche una ridotta concentrazione di potassio nel fluido apicale, la quale può limitare l'attività di ATP12A e quindi permettere l'accumulo di bicarbonato. Di conseguenza, la secrezione di potassio attraverso la membrana apicale sembra essere il fattore limitante che controlla la secrezione di protoni. L'identità molecolare del canale responsabile della secrezione di potassio rimane da identificare; tuttavia, possibili candidati possono essere ricercati tra i geni regolati positivamente da IL-4. I meccanismi con cui la secrezione di potassio e protoni regolano il pH e la concentrazione di bicarbonato del fluido apicale e il rilascio di muco andranno investigati in studi successivi.

In conclusione, il chiarimento dei processi molecolari che accompagnano l'iperplasia delle cellule mucipare potrà aiutare la comprensione delle alterazioni patologiche che sono causa di asma, fibrosi cistica e altre malattie respiratorie croniche caratterizzate da aumentata secrezione di muco, portando così al possibile sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

BIBLIOGRAFIA

Bagorda A, Guerra L, Di Sole F, Helmle-Kolb C, Favia M, Jacobson KA, Casavola V, Reshkin SJ. 2002. Extracellular adenine nucleotides regulate Na^+/H^+ exchanger NHE3 activity in A6-NHE3 transfectants by a cAMP/PKA-dependent mechanism. *Journal of Membrane Biology***188**: 249-259.

Baldi P, Long AD. 2001. A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: Regularized t-test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics***17**: 509–519.

Bayliss DA, Talley EM, Sirois JE, Lei Q. 2001. TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive 'leak' K^+ channel expressed in brainstem respiratory neurons. *Respiratory Physiology***129**: 159-174.

Boucher RC. 2007. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annual Review of Medicine***58**: 157-170.

Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, Pfeiffer U, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galiotta LJ. 2008. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science***322**: 590-594.

Ch'en FF, Villafuerte FC, Swietach P, Cobden PM, Vaughan-Jones RD. 2008. S0859, an N-cyanosulphonamide inhibitor of sodium-bicarbonate cotransport in the heart. *British Journal of Pharmacology***153**: 972-982.

Corvol H, Blackman SM, Boëlle PY, Gallins PJ, Pace RG, Stonebraker JR, Accurso FJ, Clement A, Collaco JM, Dang H, Dang AT, Franca A, Gong J, Guillot L, Keenan K, Li W, Lin F, Patrone MV, Raraigh KS, Sun L, Zhou YH, O'Neal WK, Sontag MK, Levy H, Durie PR, Rommens JM, Drumm ML, Wright FA, Strug LJ, Cutting GR, Knowles MR. 2015. Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis. *Nature Communications***6**: 8382.

Coyle B, Coffey R, J. A. L. Armour JAL, Gausden E, Hochberg Z, Grossmann A, Britton K, Pembrey M, Reardon W, Trembath R. 1996. Pendred syndrome (goitre and sensorineural hearing loss) maps to chromosome 7 in the region containing the nonsyndromic deafness gene DFNB4. *Nature Genetics***12**(4): 421–423.

D'Adamo MC, Shang L, Imbrici P, Brown SD, Pessia M, Tucker SJ. 2011. Genetic inactivation of Kcnj16 identifies Kir5.1 as an important determinant of neuronal PCO₂/pH sensitivity. *Journal of Biological Chemistry***286**: 192-198.

Danahay H, Atherton H, Jones G, Bridges RJ, Poll CT. 2002. Interleukin-13 induces a hypersecretory ion transport phenotype in human bronchial epithelial cells. *American Journal of Physiology***282**: L226-L236.

Delpire E, Rauchman MI, Beier DR, Hebert SC, Gullans SR. 1994. Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral Na–K–2Cl cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells. *J Biol Chem***269**: 25677–25683.

Dolganov GM, Woodruff PG, Novikov AA, Zhang Y, Ferrando RE, Szubin R, Fahy JV. 2001. A novel method of gene transcript profiling in airway biopsy homogenates reveals increased expression of a Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter (NKCC1) in asthmatic subjects. *Genome Research***11**: 1473-1483.

Galietta LJ, Musante L, Romio L, Caruso U, Fantasia A, Gazzolo A, Romano L, Sacco O, Rossi GA, Varesio L, Zegarra-Moran O. 1998. An electrogenic amino acid transporter in the apical membrane of cultured human bronchial epithelial cells. *American Journal of Physiology***275**: L917-L923.

Galietta LJ, Pagesy P, Folli C, Caci E, Romio L, Costes B, Nicolis E, Cabrini G, Goossens M, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O. 2002. IL-4 is a potent modulator of ion transport in the human bronchial epithelium in vitro. *Journal of Immunology***168**: 839-845.

Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA, Hebert SC.

1994. Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium–(potassium)–chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem***269**: 17713–17722.

Garnett JP, Hickman E, Burrows R, Hegyi P, Tiszlavicz L, Cuthbert AW, Fong P, Gray MA. 2011. Novel role for pendrin in orchestrating bicarbonate secretion in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-expressing airway serous cells. *Journal of Biological Chemistry***286**: 41069-41082.

Garcia MA, Yang N, Quinton PM. 2009. Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent bicarbonate secretion. *Journal of Clinical Investigation***119**: 2613-2622.

Gustafsson JK, Ermund A, Ambort D, Johansson ME, Nilsson HE, Thorell K, Hebert H, Sjövall H, Hansson GC. 2012. Bicarbonate and functional CFTR channel are required for proper mucin secretion and link cystic fibrosis with its mucus phenotype. *Journal of Experimental Medicine***209**: 1263-1272.

Hatanaka T, Nakanishi T, Huang W, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V, Ganapathy ME. 2001. Na⁺ - and Cl⁻-coupled active transport of nitric oxide synthase inhibitors via amino acid transport system B^(0,+). *Journal Clinical Investigation***107**: 1035-1034.

Hoegger MJ, Fischer AJ, McMenimen JD, Ostedgaard LS, Tucker AJ, Awadalla MA, Moninger TO, Michalski AS, Hoffman EA, Zabner J, Stoltz DA, Welsh MJ. 2014. Impaired mucus detachment disrupts mucociliary transport in a piglet model of cystic fibrosis. *Science***345**: 818-822.

Huang F, Zhang H, Wu M, Yang H, Kudo M, Peters CJ, Woodruff PG, Solberg OD, Donne ML, Huang X, Sheppard D, Fahy JV, Wolters PJ, Hogan BL, Finkbeiner WE, Li M, Jan YN, Jan LY, Rock JR. 2012. Calcium-activated chloride channel TMEM16A modulates mucin secretion and airway smooth muscle contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A***109**: 16354-16359.

Igarashi P, Vanden Heuvel GB, Payne JA, Forbush B. 1995. Cloning, embryonic expression and alternative splicing of a murine kidney specific Na–K–Cl cotransporter. *Am J Physiol (Renal FluidElectrolyte Physiol)***269**: F405–F418.

Ishida A, Ohta N, Suzuki Y, Kakehata S, Okubo K, Ikeda H, Shiraishi H, Izuhara K. 2012. Expression on pendrin and periostin in allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis. *Allergol Int***61**(4): 589-595.

Jeffery PK, Li D. 1997. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *Eur Respir J***10**(7): 1655-1662.

Jung J, Nam JH, Park HW, Oh U, Yoon JH, Lee MG. 2013. Dynamic modulation of ANO1/TMEM16A HCO₃⁻ permeability by Ca²⁺/calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA***110**: 360–365.

Kim CH, Kim KE, Yoon JH, Song KS. 2009. Upregulation of MUC5AC gene expression by IL-4 through CREB in human airway epithelial cells. *Journal of Cell Biochemistry***108**: 974-981.

Knight DA, Holgate ST. 2003. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology***8**(4): 432-446.

Knowles MR, Boucher RC. 2002. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *Journal of Clinical Investigation***109**: 571-577.

Kopp P, Bizhanova A. 2011. Clinical and molecular characteristics of Pendred syndrome. *Ann Endocrinol***72**(2): 88-94.

Lachowicz-Scroggins ME, Boushey HA, Finkbeiner WE, Widdicombe JH. 2010. Interleukin-13-induced mucous metaplasia increases susceptibility of human airway epithelium to rhinovirus infection. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology***43**: 652-661.

LeSimple P, Goepp J, Palmer ML, Fahrenkrug SC, O'Grady SM, Ferraro P, Robert R, Hanrahan JW. 2013. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is expressed in mucin granules from Calu-3 and primary human airway epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology***49**: 511-516.

Liu J, Walker NM, Ootani A, Strubberg AM, Clarke LL. 2015. Defective goblet cell exocytosis contributes to murine cystic fibrosis-associated intestinal disease. *Journal of Clinical Investigation***125**: 1056-1068.

Markadieu N, Delpire E. 2014. Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters. *Pflügers Archiv***466**: 91-105.

Mason SJ, Paradiso AM and Boucher RC . 1991. Regulation of transepithelial ion transport and intracellular calcium by extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis air way epithelium. *Br J Pharmacol***103**: 1649–1656.

Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC. 1998. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell***95**: 1005-1015.

Nakagami Y, Favoreto S, Zhen G, Park SW, Nguyenvu L, Kuperman DA, Dolganov GM, Huang X, Boushey HA, Avila PC, Erle DJ. 2008. The epithelial anion transporter pendrin is induced by allergy and rhinovirus infection, regulates airway surface liquid, and increases airway reactivity and inflammation in an asthma model. *J Immunol***181**(3): 2203-2210.

Nakao I, Kanaj S, Ohta S, Matsushita H, Arima K, Yuyuama N, Yamaya M, Nakayama K, Kubo, Watanabe M, Sagara H, Sugiyama K, Tanaka H, Toda S, Hayashi H, Inoue H, Hoshino T, Shiraki A, Inoue M, Suzuki K, Aizawa H, Okinami S, Nagai H, Hasegawa M, Fukuda T, Green ED, Izuhara K. 2008. Identification of pendrin as a common mediator for mucus production in bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol***180**(9): 6262-6269.

Nofziger C, Dossena S, Suzuki S, Izuhara K, Paulmichl M. 2011. Pendrin function in airway epithelia. *Cell Physiol Biochem***28**: 571-578.

Ousingsawat J, Martins JR, Schreiber R, Rock JR, Harfe BD, Kunzelmann K. 2009. Loss of TMEM16A causes a defect in epithelial Ca²⁺-dependent chloride transport. *J Biol Chem***284**(42): 28698-703.

Pedemonte N, Caci E, Sondo E, Caputo A, Rhoden K, Pfeffer U, Di Candia M, Bandettini R, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galiotta LJ. 2007. Thiocyanate transport in resting and IL-4-stimulated human bronchial epithelial cells: role of pendrin and anion channels. *Journal of Immunology***178**: 5144-5153.

Pedemonte N and Galiotta LJ. 2014. Structure and function of TMEM16 proteins (Anoctamins). *Physiol Rev***94**: 419-459.

Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, Alaiwa MH, Ramachandran S, Moninger TO, Karp PH, Wohlford-Lenane CL, Haagsman HP, van Eijk M, Bánfi B, Horswill AR, Stoltz DA, McCray PB Jr, Welsh MJ, Zabner J. 2012. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature***487**: 109-113.

Proud D, Leigh R. 2011. Epithelial cells and airway diseases. *Immunol Rev***242**(1): 186-204.

Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. 2008. *Annual Review of Biochemistry***77**: 701-726.

Rock JR, O'Neal WK, Gabriel SE, Randell SH, Harfe BD, Boucher RC, Grubb BR. 2009. Transmembrane protein 16A (TMEM16A) is a Ca²⁺-regulated Cl⁻ secretory channel in mouse airways. *J Biol Chem***284**(22): 14875-80.

Schnetkamp PP. 2004. The SLC24 Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchanger family: vision and beyond. *Pfluegers Archiv***447**: 683-688.

Schroeder BC, Cheng T, Jan YN & Jan LY. 2008. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell***134**: 1019–1029.

Scudieri P, Caci E, Bruno S, Ferrera L, Schiavon M, Sondo E, Tomati V, Gianotti A, Zegarra-Moran O, Pedemonte N, Rea F, Ravazzolo R, Galiotta LJ. 2012. Association of TMEM16A chloride channel overexpression with airway goblet cell metaplasia. *Journal of Physiology***590**: 6141-6145.

Seshadari S, Lu X, Purkey MR, Homma T, Choi AW, Carter R, Suh L, Norton J, Harris KE, Conley DB, Kato A, Avila PC, Czarnocka B, Kopp PA, Peters AT, Grammer LC, Chandra RK, Tan BK, Liu Z, Kern RC, Schleimer RP. 2015. Increased expression of the epithelial anion transporter pendrin/SLC26A4 in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol***136**(6): 1548-1558.

Shamsuddin AK, Quinton PM. 2014. Native small airways secrete bicarbonate. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology***50**: 796-804.

Sheppard DN and Welsh MJ. 1999. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiological reviews***79.1**: S23-S45.

Smith JJ, Welsh MJ. 1993. Fluid and electrolyte transport by cultured human airway epithelia. *Journal of Clinical Investigation***91**: 1590-1597.

Sondo E, Tomati V, Caci E, Esposito AI, Pfeiffer U, Pedemonte N, Galiotta LJ. 2011. Rescue of the mutant CFTR chloride channel by pharmacological correctors and low temperature analyzed by gene expression profiling. *American Journal of Physiology***301**: C872-C885.

Tarran R, Loewen ME, Paradiso AM, Olsen JC, Gray MA, Argent BE, Boucher RC & Gabriel SE. 2002. Regulation of murine airway surface liquid volume by CFTR and Ca²⁺-activated Cl⁻ conductances. *J Gen Physiol***120**: 407–418.

Turner J, Roger J, Fitau J, Combe D, Giddings J, Heeke GV, Jones CE. 2011. Goblet cells are derived from a FOXJ1-expressing progenitor in a human airway epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology***44**: 276-284.

Wang J, Barbuskaite D, Tozzi M, Giannuzzo A, Sørensen CE, Novak I. 2015. Proton pump inhibitors inhibit pancreatic secretion: role of gastric and non-gastric H⁺/K⁺-ATPases. *PLoS One***10**: e0126432.

Wang CY, Jenkitkasemwong S, Duarte S, Sparkman BK, Shawki A, Mackenzie B, Knutson MD. 2012. ZIP8 is an iron and zinc transporter whose cell-surface expression is up-regulated by cellular iron loading. *Journal of Biological Chemistry***287**: 34032-34043.

Xu J-C, Lytle C, Zhu TT, Payne JA, Benz E, Forbush B. 1994. Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-2Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A***91**: 2201-2205.

Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, Park SP, Lee J, Lee B, Kim BM, Raouf R, Shin YK & Oh U. 2008. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature***455**: 1210-1215.