



UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÁ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOLOGIA

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE BIO-09

CICLO XXIII°

Tesi di Dottorato di Ricerca

***IL TRASPORTO DI CLORURO: COINVOLGIMENTO IN
ALCUNE PATOLOGIE UMANE***

Dottorando: Dott.ssa Marta Boccazzi
Matricola: R07676

Tutor: Prof. Giuliano Meyer
Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie

Coordinatore: Prof. Paolo Cavallari

Anno Accademico 2009-2010

Indice

Riassunto	1
Cap. 1 INTRODUZIONE GENERALE	6
1.1 IL TRASPORTO DI CLORURO	7
1.2 LA FAMIGLIA DELLE PROTEINE DI TRASPORTO CLC	9
1.3 LA FAMIGLIA DEI CO-TRASPORTATORI CATIONE-CLORURO	11
1.4 GLI SCAMBIATORI Cl^-/HCO_3^-	13
1.4.1 La famiglia SLC4	13
1.4.2 La famiglia SLC26A	15
1.5 IL CANALE CFTR	17
1.6 CANALI PER IL Cl^- ATTIVATI DA LIGANDI	18
1.7 I CANALI PER IL Cl^- ATTIVATI DAL CALCIO	18
1.8 I CANALI PER IL Cl^- INTRACELLULARI (CLIC)	19
1.9 I CANALI PER IL Cl^- ATTIVATI DA RIGONFIAMENTO CELLULARE	20
1.10 RUOLO FISIOPATOLOGICO DEL TRASPORTO DI CLORURO E SCOPO DEL LAVORO	21
<i>Parte I: Caratterizzazione molecolare e funzionale di ICln umana wild type e di una mutazione individuata in una paziente affetta da Sindrome del QT lungo</i>	22
Cap. 2 INTRODUZIONE PARTE I	23
2.1 REGOLAZIONE DEL VOLUME CELLULARE	24
2.1.1 Decremento regolatore del volume (RVD)	25
2.2 LA CORRENTE ICL,SWELL	26
2.2.1 Caratteristiche generali	26
2.2.2 La corrente ICL,swell nel cuore	27
2.2.3 Candidati molecolari per ICL,swell	28

2.3 LA PROTEINA CANALE ICln	31
2.3.1 Struttura e localizzazione	32
2.3.2 Funzione	36
2.4 LA SINDROME DEL QT LUNGO	38
2.4.1. Diagnosi	40
2.4.2. Classificazione	41
2.4.2.1 Sindrome del QT lungo di tipo 1 (LQTS1)	42
2.4.2.2 Sindrome del QT lungo di tipo 2 (LQTS2)	42
2.4.2.3 Sindrome del QT lungo di tipo 3 (LQTS3)	43
2.4.2.4 Sindrome del QT lungo di tipo 4 (LQTS4)	43
2.4.2.5 Sindrome del QT lungo di tipo 5 (LQTS5)	44
2.4.2.6 Sindrome del QT lungo di tipo 6 (LQTS6)	44
2.4.2.7 Sindrome del QT lungo di tipo 7 (LQTS7)	44
2.4.2.8 Sindrome del QT lungo di tipo 8 (LQTS8)	45
2.4.2.2 Sindrome del QT lungo di tipo 9 (LQTS9)	45
2.4.2.2 Sindrome del QT lungo di tipo 10 (LQTS10)	45
2.4.3 Terapie	46
2.5 SCOPO DEL LAVORO	46
Cap. 3 MATERIALI E METODI PARTE I	51
3.1 PLASMIDI	49
3.1.1 pET3-His (per overespressione delle proteine di interesse in E. coli)	49
3.1.2 pIRES2-EGFP (per overespressione delle proteine di interesse in cellule eucariotiche usate per il patch-clamp)	50
3.1.3 pFLAG-CMV-4 (per overespressione delle proteine di interesse in cellule eucariotiche usate per il Western-Blot)	51
3.2 MUTAGENESI SITO SPECIFICA	51
3.2.1 Reazione di PCR	54
3.2.2 Digestione con Dpn1	56

3.2.3 Trasformazione	56
3.2.4 Miniprep	56
3.2.5 Largeprep	58
3.2.6 Elettroforesi di DNA su gel di agarosio	58
3.3 INDUZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA IN E. coli	59
3.3.1 Preparazione dei batteri chemiocompetenti	59
3.3.2 Trasformazione	59
3.4 PURIFICAZIONE DELLE PROTEINE da E. coli	60
3.4.1 Purificazione in condizioni native	61
3.4.2 Purificazione in condizioni denaturanti	62
3.5 SDS-PAGE	63
3.6 WESTERN BLOT	64
3.6.1 Trasferimento	65
3.6.2 Blocco	65
3.6.3 Anticorpo primario	65
3.6.4. Anticorpo secondario	65
3.6.5 Sviluppo	66
3.7 COLTURE CELLULARI	66
3.8 TRASFEZIONE CON pIRES2-EGFP-hICln wt e M1 o pFLAG-CMV-4-hICln wt e M1 (metodo della co-precipitazione del calcio fosfato)	67
3.9 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE TOTALI	68
3.10 ESPERIMENTI DI RICOSTITUZIONE IN BILAYERS LIPIDICI MACROSCOPICI	68
3.11 ESPERIMENTI DI PATCH-CLAMP	71
3.11.1 Procedure sperimentali	71
3.11.2 Protocolli	73
3.11.3 Microscopia	73
3.12 ANALISI STATISTICA	74

Cap.4	RISULTATI PARTE I	75
4.1	INDUZIONE DELLA MUTAZIONE M1 NEL cDNA DI hICln NEI VETTORI D'ESPRESSIONE pET-3 His, p-FLAG-CMV-4 e p-IRES2-EGFP	76
4.2	MESSA A PUNTO DELLA PURIFICAZIONE DELLA PROTEINA hICln M1	79
4.3	RICOSTITUZIONE FUNZIONALE DI hICln wt e hICln M1 IN MEMBRANE LIPIDICHE ARTIFICIALI	84
4.4	INDAGINE DELLA ESPRESSIONE DELLA PROTEINA hICln M1 IN CELLULE HEK 293 PHOENIX TRAMITE WESTERN BLOT	87
4.5	CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DELLE PROTEINE hICln wt E hICln M1 TRAMITE ESPERIMENTI DI PATCH-CLAMP	87
Cap. 5	DISCUSSIONE PARTE I	92
5.1	INDIVIDUAZIONE DI UNA MUTAZIONE NEL GENE DI ICln IN UNA PAZIENTE AFFETTA DA SINDROME DEL QT LUNGO	93
5.2	MESSA A PUNTO DELLA PURIFICAZIONE DELLA PROTEINA hICln M1	94
5.3	CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DI hICln wt E hICln M1 ATTRAVERSO ESPERIMENTI DI RICOSTITUZIONE IN MEMBRANE LIPIDICHE ARTIFICIALI	96
5.4	INDAGINE DELL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA hICln M1 IN CELLULE HEK293 PHOENIX E CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE TRAMITE ESPERIMENTI DI PATCH-CLAMP	97
5.5	CONCLUSIONI	98
	<i>Parte II: Caratterizzazione funzionale della 5'flanking region del gene SLC26A4</i>	100
Cap.6	INTRODUZIONE II PARTE	101
6.1	LA SINDROME DI PENDRED	102
6.2.	IL TRASPORTATORE SLC26A4 (Pendrina)	104
6.2.1	Struttura della pendrina	105

6.2.2 Ruolo e funzione della Pendrina nella tiroide, nel rene e nell'orecchio interno	106
6.2.3 Mutazioni a carico della pendrina	113
6.3 REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL GENE SLC26A4	115
6.4 SCOPO DEL LAVORO	118
Cap. 7 MATERIALI E METODI PARTE II	120
7.1 VETTORI	121
7.1.1 pGL3-Basic	121
7.1.2 Il vettore pRL-Tk	121
7.2 COSTRUZIONE DEI MUTANTI	122
7.2.1 Miniprep e Largeprep	123
7.2.3. Sequenziamento	124
7.3 COLTURE CELLULARI	124
7.4 TRASFEZIONE CON IL METODO DEL PEI	124
7.5 ESPERIMENTO AL LUMINOMETRO	125
7.6 SALI	126
7.7 ANALISI STATISTICA	126
Cap.8 RISULTATI II PARTE	127
8.1 CLONAGGIO DELLA 5'FLANKING REGION DEL GENE SLC26A4	128
8.2 DETERMINAZIONE DEL PROMOTORE MINIMO DEL GENE SLC26A4	129
8.2.1 Determinazione del promotore minimo del gene SLC26A4 nelle HEK293 Phoenix	129
8.2.2 Determinazione del promotore minimo del gene SLC26A4 nelle PC-CL3	131
8.3 REGOLAZIONE DEL GENE SLC26A4: RISPOSTA ORMONALE	132
8.3.1 Risposta del gene SLC26A4 a Tireoglobulina, Tireotropina e sodio ioduro	132

8.3.2 Verifica della specificità della risposta alla TG	135
8.3.3 Caratterizzazione della stimolazione del promotore con la TG	136
Cap.9 DISCUSSIONE	141
9.1 CARATTERIZZAZIONE DEL PROMOTORE DEL GENE SLC26A4	143
9.2 REGOLAZIONE ORMONALE DEL GENE SLC26A4 IN CELLULE TIROIDEE	146
9.3 CONCLUSIONI	151
Bibliografia	153

Riassunto

Il Cloruro (Cl^-) è l'anione più abbondante del fluido extracellulare, dove la sua concentrazione è superiore a 100 mM. Le concentrazioni intracellulari di Cl^- possono invece variare tra i 5 e i 15 mM a seconda del tipo cellulare e sono finemente regolate attraverso l'azione di specifici canali e trasportatori di membrana che intervengono in molte attività della cellula (Jentsch, 1996). Ad oggi sono state ben caratterizzate 6 famiglie geniche (le proteine CLC, i trasportatori catione-cloruro, le due famiglie di scambiatori $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ SLC4 e SLC26, il canale CFTR e i recettori per il GABA e la glicina) che comprendo diversi canali ionici e trasportatori per il cloruro. Esistono inoltre altre 3 famiglie putative di geni codificanti per canali del cloruro non ancora ben caratterizzate come le precedenti (i canali per Cl^- intracellulari, i canali per il Cl^- attivati dal calcio, i canali per il Cl^- attivati da rigonfiamento cellulare). Tenuto conto dell'ampia gamma di funzioni che rivestono, non è sorprendente che le mutazioni a carico di tali proteine possano portare ad un ampio spettro di patologie che coinvolgono diversi organi ed apparati (Jentsch et al., 2005). In particolare, questo lavoro verte allo studio di due trasportatori per il cloruro, il putativo canale ionico attivato da rigonfiamento cellulare ICln e lo scambiatore cloruro-bicarbonato denominato Pendrina (SLC26A4).

Nella prima parte del mio dottorato mi sono occupata della caratterizzazione funzionale dell'isoforma umana della proteina ICln wild type (hICln wt) e di una sua forma mutata (hICln M1) recentemente individuata dai nostri collaboratori della clinica Mayo di Rochester (Prof. Ackerman) in una paziente affetta da sindrome del QT lungo. ICln è una proteina ubiquitaria e multifunzionale, altamente conservata nella scala evolutiva e il cui silenziamento genico comporta l'arresto dello sviluppo embrionale. L'ipotesi funzionale, proposta sin dal momento della sua clonazione nel 1992 (Paulmichl et al., 1992), è che ICln costituisca il canale che media la corrente $\text{ICl}_{\text{swell}}$, la corrente di Cl^- attivata da rigonfiamento cellulare durante il processo di decremento regolatore del volume (RVD). La mutazione oggetto di indagine è l'inserzione di una Timina in posizione 383 nella sequenza nucleotidica. Questa inserzione produce un frameshift, che si traduce nella sequenza aminoacidica in una sequenza scrambled di 12 aminoacidi a partire dall'aminoacido 128, e una terminazione precoce (A128FSX139). Tale mutazione è stata individuata in

eterozigosi in una paziente in cui la familiarità, i sintomi e il valore di QTc hanno evidenziato fosse affetta dalla Sindrome del QT lungo (LQTS), senza mostrare però mutazioni in alcuno dei geni classicamente coinvolti nella patologia. Dopo aver messo a punto la procedura di purificazione per affinità, complicata dal fatto che hICln M1 mostra spiccata tendenza alla formazione di corpi di inclusione in seguito ad espressione in sistemi procariotici, le proteine sono state ricostituite in membrane lipidiche artificiali di sfingomieline e le proprietà biofisiche della corrente indotta da hICln M1 sono state paragonate a quelle di hICln wt. Sono stati presi in esame tre differenti parametri: la percentuale di comparsa di corrente, la selettività ionica e i valori di potenziale d'inversione medi della corrente. Per nessuno dei parametri presi in esame sono state riscontrate differenze significative tra la proteina wt e la mutata, suggerendo quindi che le proprietà biofisiche delle proteine ricostituite in questo sistema artificiale non sono distinguibili. Per questa ragione si è passati alla caratterizzazione funzionale di hICln wt e M1 in un sistema che fosse più vicino alle condizioni native, ossia in seguito a espressione eterologa in cellule di mammifero. Si è misurata la corrente di Cl⁻ attivata da ipotonicità con la tecnica del patch clamp in configurazione whole cell, sia in cellule HEK293 Phoenix di controllo, sia in cellule over-esprimenti hICln wt o M1. La corrente registrata mostra in tutti e tre i casi le tipiche caratteristiche biofisiche dell'ICl_{swell}; tuttavia, nelle cellule trasfettate con hICln M1 si è osservata una diminuzione significativa della corrente registrata allo steady-state e un'attivazione nel tempo più lenta rispetto a quanto osservato overesprimendo hICln wt. Inoltre, overesprimendo hICln M1 non si ottiene nessuna attivazione della corrente ICl_{swell} rispetto a quanto osservato in condizioni di controllo, contrariamente a quanto osservato con hICln wt. Nell'insieme questi dati indicano che, in vivo, hICln M1 potrebbe essere meno conduttiva per lo ione Cl⁻. La corrente ICl_{swell} è ampiamente espressa in tutto il cuore e il contributo delle correnti di Cl⁻ nell'accorciamento della durata del potenziale d'azione cardiaco è riportato in letteratura (Baumgarten e Clemon, 2003). L'inibizione o la mancata attivazione di una corrente di Cl⁻ potrebbe essere uno dei meccanismi che contribuiscono all'insorgenza della Sindrome del QT lungo.

Nella seconda parte del dottorato mi sono occupata invece della caratterizzazione funzionale della 5'flanking region del gene SLC26A4 che codifica per una proteina transmembrana con funzione di trasporto denominata pendrina (PDS). Mutazioni a carico di questo gene causano la sindrome di Pendred (PS), una patologia autosomica recessiva che causa sordità neurosensoriale (SNHL) associata a gozzo.

La pendrina è espressa principalmente a livello dell'epitelio follicolare tiroideo, dell'orecchio interno e del rene. Studi di caratterizzazione funzionale condotti in sistemi di overespressione eterologa hanno rilevato che essa può mediare il trasporto di ioduro, cloruro e bicarbonato, mentre non è presente quello di solfato nonostante la proteina presenti tratti nella sequenza che sono tipici dei trasportatori per tale ione. Dati in letteratura riportano che la pendrina possa svolgere un ruolo importante nel favorire l'efflusso di ioduro dalle cellule dell'epitelio follicolare tiroideo verso il colloide (Kopp et al., 2008), nel mantenimento del pH e della composizione ionica dell'endolinfa nell'orecchio interno (Royaux et al., 2003) e nel contribuire alla secrezione di bicarbonato a livello del tratto distale del nefrone (Royaux et al., 2001), accogliendo specie ioniche diverse in modo tessuto specifico. Poiché tale proteina è espressa solo in specifici organi e tipi cellulari risulta ragionevole pensare ad una regolazione fine della sua trascrizione. Inoltre da indagare è anche la regolazione dell'espressione del gene per la pendrina in risposta alla stimolazione ormonale.

Un frammento di 2 Kb contenente la 5'flanking region del gene umano SLC26A4 ed una serie di sue delezioni successive sono stati precedentemente clonati nel vettore pGL3-basic (pGL3-PDS) a monte del gene reporter per la luciferasi. In questo modo misurando l'attività del gene reporter in cellule trasfettate con tali costrutti si ottiene una misura indiretta della capacità del promotore di dirigere la trascrizione del gene a valle.

Per comprendere i meccanismi molecolari alla base della trascrizione tessuto specifica del gene abbiamo condotto esperimenti in due diverse linee cellulari andando a ricercare sequenze utili per la trascrizione tessuto specifica. I nostri esperimenti hanno evidenziato la possibile presenza di "elementi in cis" che regolano negativamente l'espressione del gene differenti in rene rispetto alla tiroide.

Inoltre abbiamo dimostrato che una sequenza di soli 286 nucleotidi è sufficiente a guidare l'espressione basale del gene della pendrina in entrambi i modelli cellulari.

Oltre a ciò abbiamo utilizzato il modello cellulare tiroideo PC-CL3 per studiare la regolazione ormonale del gene PDS e dimostrato, in accordo con quanto riportato dalla letteratura, che la somministrazione di tireoglobulina (TG) (1mg/ml) al medium di coltura delle cellule PC-CL3 attiva in modo specifico la trascrizione del gene. Infine siamo stati in grado di delimitare la regione responsiva alla stimolazione con TG ad una sequenza di sole 205 paia di basi.

La caratterizzazione dettagliata dei meccanismi di regolazione del gene SLC26A4 potrebbe migliorare i sintomi dei pazienti affetti da PS permettendo d'intervenire sull'espressione della proteina nel caso di deficit dovuti ad sua regolazione anomala. Inoltre l'individuazione degli elementi necessari alla trascrizione del gene SLC26A4 potrebbe anche migliorare la diagnosi dei pazienti PS, grazie al sequenziamento delle regioni non codificanti critiche per l'espressione della proteina.

Cap.1

Introduzione generale

1.1 IL TRASPORTO DI CLORURO

Il Cloruro (Cl^-) è l'anione più abbondante del fluido extracellulare, dove la sua concentrazione è superiore a 100 mM. Le concentrazioni intracellulari di Cl^- possono invece variare tra i 5 e i 15 mM a seconda del tipo cellulare e sono finemente regolate attraverso l'azione di specifici canali e trasportatori di membrana che intervengono in molte attività della cellula: modulano l'eccitabilità elettrica nei neuroni e nelle cellule muscolari; sono importanti per regolare l'omeostasi osmotica e ionica; sono coinvolti in diversi trasporti transepiteliali e sono di fondamentale importanza nei processi che coinvolgono la formazione di vescicole endocitotiche e sinaptiche (Jentsch 1996). Tenuto conto di questa ampia gamma di funzioni, non è sorprendente che le mutazioni a carico di tali proteine possano portare ad un ampio spettro di patologie che coinvolgono diversi organi ed apparati ed includono tra le altre: la miotonia, la fibrosi cistica, la sindrome di Bartter, i calcoli renali, la sordità e l'osteopetrosi (Jentsch et al., 2005).

A causa delle difficoltà riscontrate nel loro studio (molti canali del Cl^- hanno piccole conduttanze di singolo canale; altri sembrano essere ubiquitari e il loro clonaggio con la tecnica dell' *expression cloning* è praticamente impossibile; alcuni trasportatori non sono elettrogenici e risultano più difficili da misurare) i trasportatori per il cloruro sono stati inizialmente considerati i "cugini poveri" dei trasportatori cationici (Miller 2006). Tuttavia recenti sviluppi, tra cui l'identificazione di nuove proteine di trasporto di anioni, la generazione di animali knockout, la delucidazione di strutture tridimensionali di omologhi batterici di trasportatori di mammiferi e analisi biofisiche dettagliate, hanno messo in evidenza la loro importante rilevanza fisiologica.

Ad oggi sono state ben caratterizzate 6 famiglie geniche (le proteine CLC, i trasportatori catione-cloruro, le due famiglie di scambiatori $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ SLC4 e SLC26, il canale CFTR e i recettori per il GABA e la glicina) che comprendo diversi canali ionici e trasportatori per il cloruro (tabella 1). Esistono inoltre altre 3 famiglie putative di geni codificanti per canali del cloruro non ancora ben caratterizzate come le precedenti (i canali per Cl^- intracellulari, i canali per il Cl^- attivati dal calcio, i canali per il Cl^- attivati da rigonfiamento cellulare).

Gene family	Architecture	Number of genes coding for subunits	Localization	Associated disease(s)	Structure of homologues
Cation-chloride cotransporters	Monomer	9	PLM	Yes	No
Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ exchangers, SLC4	Monomer	4	PLM	Yes	No
Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ exchangers, SLC26	Monomer	5	PLM	Yes	No
GABA/glycine receptors	Pseudosymmetric pentamers	>20	PLM	Yes	Torpedo ACh receptor
CFTTR	Monomer	1	PLM	Yes	Bacterial ABC transporters
CLC proteins	Homodimers (possibly heterodimers)	9	PLM/organelles	Yes	Bacterial CLC homologues

Tabella 1: le sei famiglie geniche di trasportatori per il cloruro meglio caratterizzate. PLM: plasma membrane.

1.2 LA FAMIGLIA DELLE PROTEINE DI TRASPORTO CLC

Le proteine CLC (Chloride Channels) costituiscono una larga e diffusa famiglia di proteine integrali di membrana, inizialmente identificata clonando il canale per il cloruro CLC-0 dall'organo elettrico della torpedine (Jentsch et al., 1990). Fino a qualche anno fa si pensava che tutti i membri che appartengono a questa famiglia fossero canali ionici, tuttavia recenti sviluppi hanno mostrato che due classi funzionalmente distinte ma strutturalmente simili appartengono a questa famiglia di proteine: canali ionici e scambiatori (Accardi e Miller, 2004; Picollo e Pusch, 2005; Scheel et al., 2005).

Tutti i CLC esaminati fino ad ora sono omodimeri e ciascun monomero mostra un proprio poro (Jentsch 2002). La struttura dei CLC è stata recentemente caratterizzata tramite cristallografia ai raggi X (Dutzler et al., 2002) ed è stato visto che ogni monomero è costituito da 18 α -eliche, 17 delle quali sono transmembrana e le porzioni N e C terminali sono localizzate nel compartimento intracellulare.

I canali per il cloruro che fanno parte di questa famiglia sono per lo più voltaggio dipendenti, mostrano una chiara selettività degli anioni rispetto ai cationi e sono permeabile sia agli alidi ($\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$) che agli anioni inorganici ($\text{SCN}^- = \text{ClO}_4^- > \text{NO}_3^- = \text{ClO}_3^-$). I trasportatori invece scambiano ioni Cl^- da un lato all'altro della membrana in cambio di H^+ (in rapporto 1:1) usando l'energia immagazzinata nel potenziale elettrochimico dei protoni per guidare contro gradiente il Cl^- . La selettività dei trasportatori è stata caratterizzata meno in dettaglio rispetto a quella dei canali, tuttavia è emerso un simile pattern di permeabilità ($\text{SCN}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{SO}_4^{2-}$) (Accardi et al., 2004) suggerendo che il meccanismo che sta alla base della selettività anionica per le due classi sia simile. La distinzione funzionale sembra essere inoltre ben correlata con una diversa localizzazione cellulare dei CLC: i canali ionici si trovano solitamente nelle membrane plasmatiche, mentre i trasportatori sono generalmente segregati in compartimenti intracellulari dove contribuiscono all'acidificazione (Piwon et al., 2000; Kornak et al., 2001; Iyer et al., 2002). Nei mammiferi si distinguono nove geni CLC divisi in tre gruppi in base all'omologia di sequenza (figura 1).

The CLC family

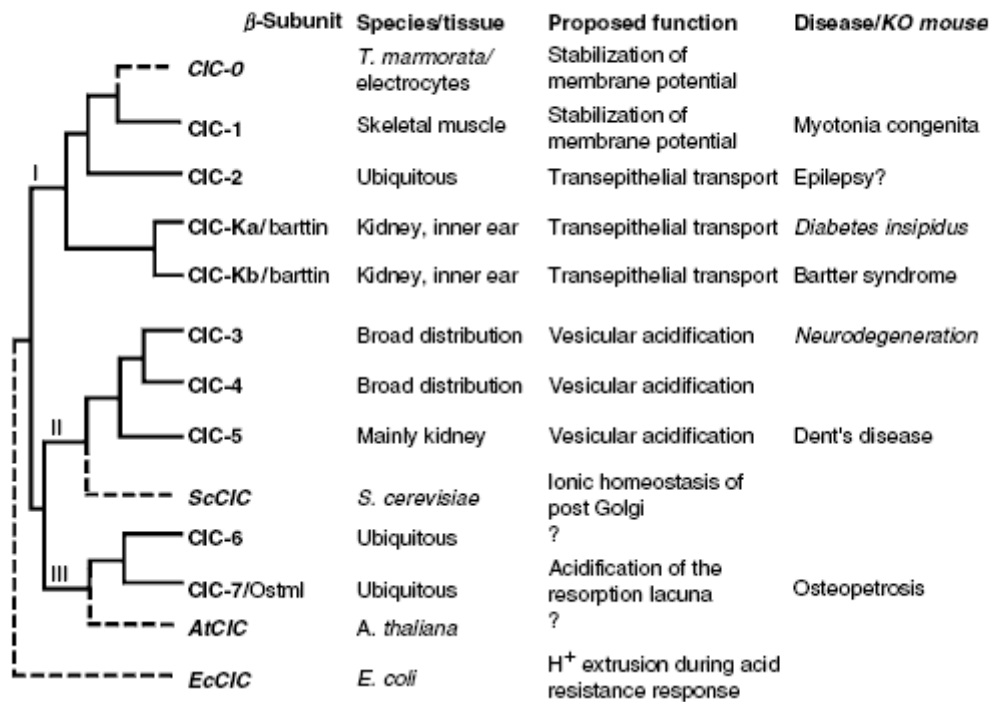


Figura 1: dendrogramma che rappresenta i tre sottogruppi in cui la famiglia dei CLC può essere suddivisa in base all'identità di sequenza.

La prima sottofamiglia comprende i canali CLC1, CLC2, CLCKa e CLCKb che mediano il trasporto transepiteliale di Cl⁻ o contribuiscono alla stabilizzazione del potenziale di riposo di membrana. CLC1 modula l'eccitabilità muscolare e la sua inattivazione provoca miotonia; CLC2 è espresso ubiquitariamente ed è attivato dal rigonfiamento cellulare o dall'iperpolarizzazione; se danneggiato determina la degenerazione dei testicoli e delle retine. CLCKa e il CLCKb, sono prevalentemente espressi nel rene e il loro mal funzionamento provoca la sindrome di Bartter (caratterizzata da sordità e perdita della funzionalità renale).

La seconda sottofamiglia comprende CLC3, CLC4 e CLC5, che sono localizzati principalmente a livello di vescicole intracellulari e partecipano all'acidificazione vescicolare. Contrariamente a quanto inizialmente pensato, è stato dimostrato che CLC4 e CLC5 non sono canali ionici, bensì antiporti elettrogenici Cl⁻/H⁺ (Picollo e Pusch, 2005; Scheel et al., 2005); è facile ipotizzare che anche CLC3 sia un antiporto, poiché mostra elevata omologia con CLC4 e CLC5; tuttavia, non esistono ancora evidenze sperimentali concrete a supporto di questa ipotesi. CLC3 è espresso in molti tessuti, soprattutto nel cervello, e, se inattivato, provoca la degenerazione

dell'ippocampo e della retina. Anche CLC4, è espresso principalmente nel cervello e nel muscolo scheletrico. Mutazioni a carico di CLC5 causano la malattia di Dent (caratterizzata da calcoli renali e rachitismo).

La terza sottofamiglia comprende CLC6 e CLC7, entrambi espressi ubiquitariamente. Sono localizzati anch'essi a livello di vescicole intracellulari. Tuttavia, a differenza dei membri della sottofamiglia di CLC3, non sono in grado di traslocare in membrana e quindi non è stato fino ad oggi possibile eseguire una caratterizzazione elettrofisiologica e stabilire se si tratti di canali o trasportatori.

1.3 LA FAMIGLIA DEI CO-TRASPORTATORI CATIONE-CLORURO

A differenza di ioni come Na^+ e K^+ , il gradiente elettrochimico del Cl^- è generalmente molto vicino all'equilibrio. Dato che non esistono evidenze di trasporti attivi di Cl^- nelle membrane cellulari dei mammiferi, diversi trasportatori utilizzano l'energia accumulata nei gradienti transmembrana di Na^+ e K^+ generati dalla Na^+/K^+ ATPasi per trasportare il Cl^- contro il suo gradiente elettrochimico. L'accoppiamento al gradiente di Na^+ nei cotrasportatori Na^+-Cl^- e $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ provoca un accumulo di Cl^- in cellula mentre il cotrasportatore K^+-Cl^- media solitamente l'efflusso di Cl^- dalla cellula. La caratterizzazione molecolare dei cotrasportatori cloruro-catione è iniziata con l'identificazione del cotrasportatore tiazide sensibile Na^+-Cl^- (NCC) nell'epitelio di vescica urinaria di platessa (Gamba et al., 1993) e del cotrasportatore $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ NKCC1 dalla ghiandola rettale di squalo (Xu et al., 1994). Da allora, sono stati identificati altri membri di questa famiglia genica, che rivestono importanti ruoli nel trasporto transepiteliale, nella regolazione del volume cellulare e nell'eccitabilità neuronale. Tutti i membri di questa famiglia sono strettamente legati dal punto di vista strutturale e costituiscono una famiglia genica di 7 proteine funzionalmente ben caratterizzate, più due membri orfani recentemente identificati la cui funzione non è ancora ben chiara. Questa famiglia di trasportatori ionici può essere suddivisa in due sottofamiglie a seconda della dipendenza o meno del trasporto dal sodio (figura 2).

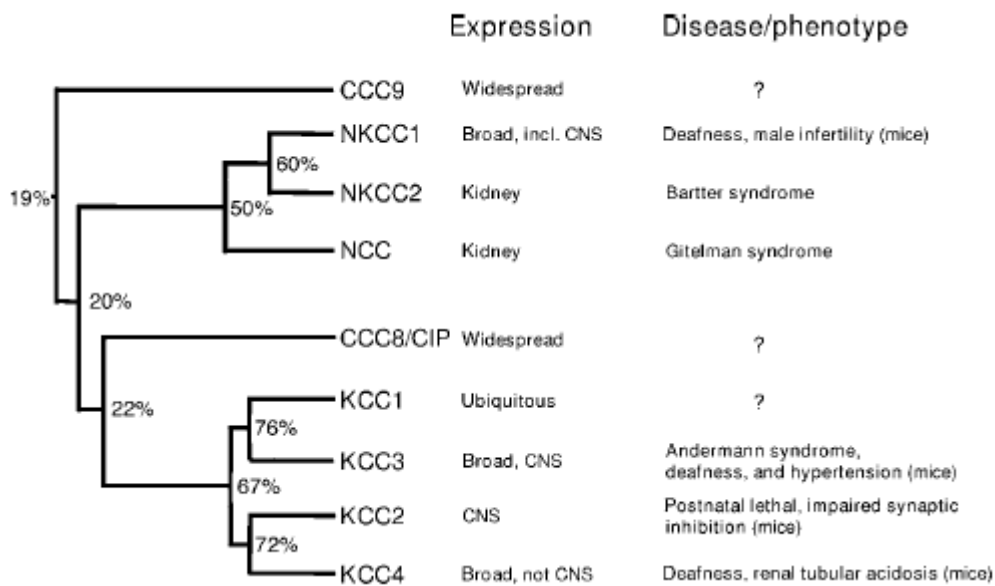


Figura 2: dendrogramma che rappresenta i due sottogruppi in cui la famiglia genica dei trasportatori catione-cloruro può essere suddivisa e i due membri orfani recentemente identificati.

La prima sottofamiglia include i due cotrasportatori $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC1 e NKCC2) e il cotrasportatore $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ (NCC).

NKCC1 è espresso sia nelle cellule epiteliali, dove è localizzato a livello della membrana basolaterale e fornisce Cl^- per la secrezione a livello apicale, sia a livello di cellule non epiteliali, dove viene attivato in condizioni ipertoniche e svolge un importante ruolo nella regolazione del volume cellulare (Lytle et al., 1997). Benché ad oggi nessuna patologia umana sia stata correlata a mutazioni a carico di NKCC1, in modelli murini con alterazioni a livello della proteina sono stati identificati diversi disturbi tra cui: sordità, problemi vestibolari, infertilità maschile dovuta a difetti della produzione di sperma, riduzione della secrezione salivare, difetti nella percezione sensoriale e deficit di crescita (Delpire et al., 1999; Flagella et al., 1999; Evans et al., 2000; Pace et al., 2000; Sung et al., 2000).

NKCC2 è localizzato principalmente a livello renale e mutazioni associate a perdita di funzionalità di tale proteina sono state identificate in pazienti affetti dalla sindrome di Bartter, che soffrono di ipotensione dovuta a una severa perdita di sali a livello renale (Simon et al., 1996a).

NCC è localizzato quasi esclusivamente a livello renale e intestinale (Bazzini, 2005); mutazioni associate a una perdita di funzionalità di questo cotrasportatore causano la

sindrome di Gitelman, caratterizzata da perdita di sali a livello renale e ipotensione (Simon et al., 1996).

La seconda sottofamiglia è costituita dai cotrasportatori K^+-Cl^- e comprende: KCC1, KCC2, KCC3, KCC4 e due membri orfani denominati CCC8 (o CIP) e CCC9 identificati solo negli ultimi anni (Carton et al., 2000; Gamba, 2005).

KCC1, KCC3 e KCC4 sono ampiamente espressi in tutto l'organismo e vengono attivati solo in seguito a stress ipotonico (Gamba, 2005a). Recentemente mutazioni associate a perdita di funzionalità a carico di KCC3 sono state associate all'insorgenza della sindrome di Andermann (ACCPN) (Howard et al., 2002). Questa rara sindrome, particolarmente comune in Canada, è caratterizzata da neuropatia perinatale, una variabile agenesia del corpo calloso e ritardo mentale.

KCC2 invece, è espresso solamente a livello dei neuroni ed è attivo già in condizioni isotoniche e il rigonfiamento cellulare stimola solo debolmente l'attività di trasporto mediata da tale proteina (Song et al., 2002).

1.4 GLI SCAMBIATORI Cl^-/HCO_3^-

Il metabolismo cellulare causa la produzione continua di acidi, un prodotto di scarto che deve essere rimosso affinché la respirazione ossidativa possa avvenire. Il corpo utilizza diversi meccanismi per eliminare gli equivalenti acidi: la CO_2 è eliminata dai polmoni, gli ioni H^+ sono secreti nelle urine con riassorbimento parallelo di HCO_3^- e diversi sistemi tampone presenti nel corpo neutralizzano la formazione di nuovi acidi. I trasportatori HCO_3^- sono essenziali per mantenere l'omeostasi del pH in quanto trasportano la base HCO_3^- attraverso le membrane biologiche. Una delle principali classi di trasportatori per l' HCO_3^- sono gli scambiatori Cl^-/HCO_3^- . Lo scambio Cl^-/HCO_3^- nelle cellule di mammifero è mediato dai membri di due famiglie di proteine di membrana: la famiglia SLC4 e la famiglia SLC26.

1.4.1 La famiglia SLC4

Questa famiglia include sia lo scambiatore sodio dipendente NDCBE1, sia gli scambiatori elettroneutri e sodio indipendenti AE1, AE2 e AE3.

AE1 è espresso principalmente a livello degli eritrociti (eAE1) e del rene (kAE1). L'isoforma umana di eAE è una glicoproteina costituita da 911 aminoacidi e ha un ruolo vitale nel ciclo del trasporto di HCO_3^- degli eritrociti. A livello dei capillari periferici la CO_2 diffonde all'interno degli eritrociti dove viene scissa in HCO_3^- e H^+ : l' HCO_3^- spinto dal gradiente di concentrazione favorevole, passa la membrana attraverso lo scambiatore AE1 e viene rilasciato nel plasma in cambio di Cl^- . La bassa concentrazione di CO_2 nei polmoni guida il processo inverso: l' HCO_3^- entra negli eritrociti in cambio di Cl^- e si forma CO_2 che viene esalata (Casey e Reithmeier, 1991; Sterling e Casey, 2002). A livello renale kAE1 è espresso sulla membrana basolaterale delle cellule intercalate di tipo alfa del dotto collettore ed estrude HCO_3^- in cambio di riassorbimento di Cl^- contribuendo così all'acidificazione dalle urine (Brosius et al, 1989).

AE2 è lo scambiatore più ampiamente espresso nell'organismo. Si trova sulla membrana basolaterale in diversi tipi cellulari e in un'ampia varietà di tessuti. È localizzato a livello delle cellule parietali dello stomaco, dove svolge un ruolo primario nella secrezione di HCl (Stuart-illey et al., 1994); si trova nel plesso coroideo delle cellule epiteliali del cervello (Alper et al., 1994) dove, in concerto con lo scambiatore Na^+/H^+ (NHE), facilita il riassorbimento di NaCl e regola la produzione di fluido cerebrospinale; è espresso a livello degli osteoclasti, dove svolge un ruolo importante nel rimodellamento delle ossa (Alper, 1991); infine, è presente sulla superficie degli enterociti del colon (Alper et al., 1999) e nel dotto collettore e nel tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle nel rene (Alper et al., 1997; Frische et al., 2004; Stuart-Tilley et al., 1998).

AE3 è espresso principalmente a livello dei tessuti nervosi. In particolare è localizzato nel cuore (Yannoukakos et al., 1994), dove è responsabile del 50% dell'estrusione di HCO_3^- ; nel cervello (Kudrycki et al., 1990), nella retina (Kobayashi et al., 1994) e nei muscoli lisci (Brosius et al., 1997).

NDCBE1 è localizzato principalmente a livello del cervello e dei testicoli e, a livelli di espressione minori, anche nei reni e nell'ovario. Anche questo è uno scambiatore elettroneutro ed è responsabile dello scambio reversibile di due HCO_3^- e un Na^+ extracellulari per un Cl^- intracellulare (Grichtchenko et al., 2001).

1.4.2 La famiglia SLC26

La famiglia SLC26 (Solute Linked Carrier 26) comprende, ad oggi, 11 geni umani (Dorwart et al. 2008); 10 di questi geni codificano per proteine che trasportano uno o più substrati tra i quali il cloruro, il bicarbonato, lo ioduro, l'ossalato, il formiato, il solfato, il gruppo OH⁻, il mannosio e il fruttosio (tabella 2). Sono proteine strutturalmente correlate ai trasportatori di solfato presenti in batteri, piante, funghi e animali non appartenenti ai mammiferi. Nell'ultimo decennio l'interesse per questa famiglia di SLC (una tra le 43 famiglie SLC classificate secondo l'Human Genome Organization) è cresciuto in maniera esponenziale in relazione all'importante ruolo sia fisiologico sia patologico (laddove presentino mutazioni) che le relative proteine svolgono. Tuttavia, molte delle loro caratteristiche funzionali sono sconosciute, sia per la relativamente recente identificazione, sia perché molti membri della famiglia sono stati individuati mediante analisi bioinformatica dei database esistenti (SLC26A6, A7, A8, A9, A10 e A11). Una caratteristica della famiglia è la tessuto specificità dei suoi membri: questo lascia supporre (a parità di funzioni di trasporto, come ad esempio lo scambio cloruro bicarbonato effettuato da vari componenti della famiglia) una interazione/regolazione cellulare con altre proteine di trasporto tessuto specifiche. A sostegno di questa ipotesi c'è da ricordare la presenza nella regione C terminale di molte di queste proteine, dei domini anti-sigma (STAS) e PDZ che promuovono l'interazione con altri trasportatori di membrana quali il CFTR e l'NHE3 (Ahn et al., 2001, Lohi et al., 2002, Lohi et al., 2002bis). Questo sottolinea il ruolo che la famiglia SLC26 può avere anche in patologie non direttamente associate ad essa. Ad esempio, si è visto che l'interazione tra il dominio R (Regulatory Domain) del CFTR ed il dominio STAS di SLC26A3 o di SLC26A6 attiva marcatamente lo scambio Cl⁻/HCO₃⁻ in entrambi i trasportatori con importanti implicazioni per la cura della fibrosi cistica (Ko, 2002).

Dal punto di vista strutturale questi trasportatori presentano un "core" idrofobico, costituito da 10-14 domini transmembrana, e le estremità N e C terminali intracitoplasmatiche; sono caratterizzati inoltre dalla presenza di sequenze altamente conservate, quali: una regione di 22 amminoacidi, che costituisce la sequenza consenso per il trasporto del solfato (prosite motif:

<http://expasy.org/prosite/PS01130>), e la tripletta NQE (Saier motif, Saier et al., 1999) nella regione C-terminale del “core” idrofobico (Mount et al., 2004).

Human gene	Aliases	Reported substrates	Tissue distribution	Disease association(s)	Human gene locus	Genbank Accession ID
SLC26A1	Sat-1	SO ₄ ²⁻ , oxalate	Liver, kidney		4p16.3	AF297659
SLC26A2	DTDST	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻	Widespread	Chondrodysplasias	5q31-34	NM_000112
SLC26A3	DRA, CLD	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ , OH ⁻ , oxalate	Intestine, sweat gland, pancreas, prostate	Congenital chloride-losing diarrhea	7q31	NM_000111
SLC26A4	Pendrin	Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ , I ⁻ , formate	Inner ear, kidney, thyroid	Pendred syndrome, deafness (DFNB4)	7q31	NM_000441
SLC26A5	Prestin	?	Inner ear	Deafness?	7q22	AY289133
SLC26A6	CFEX, PAT-1	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ , OH ⁻ , oxalate, formate	Widespread		3p21	AF416721(A6a) AF279265(A6b)
SLC26A7	None	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , oxalate	Kidney		8q22.2	AF331521
SLC26A8	Tat1	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , oxalate	Sperm, brain		6p21.3	AF314959
SLC26A9	None	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , oxalate	Lung		1q32	AF314958
(SLC26A10)	None	Pseudogene			12q13	NM_133489
SLC26A11	None	SO ₄ ²⁻	Widespread		17q25	AF345195

Tabella 2: i membri della famiglia dei trasportatori anionici SLC26. Gli 11 geni codificano per 10 proteine con funzione di trasporto mentre il gene SLC26A10 è uno pseudogene.

Quattro membri della famiglia (geni SLC26A2, A3, A4 e A5), per i quali sono state identificate numerose mutazioni che comportano stati patogeni, sono di notevole interesse clinico. Sebbene le sequenze dei quattro geni presentino tra loro alta omologia e codifichino per proteine strutturalmente correlate, mutazioni a carico di questi comportano distinti fenotipi clinici che vanno rispettivamente da anomalie dello sviluppo cartilagineo, alla diarrea cloro dipendente, alla sindrome di Pendred ed alla sordità non sindromica. La sindrome di Pendred e la proteina pendrina verranno trattate più in dettaglio nei paragrafi 6.1 e 6.2 dell'Introduzione della Parte II.

1.5 IL CANALE CFTR

Il CFTR appartiene alla superfamiglia di trasportatori ABC (ATP-binding cassette) e, analogamente a queste proteine di membrana, possiede due domini costituiti da sei eliche transmembrana, ognuno seguito da un dominio intracellulare che lega i nucleotidi (NBF1 e NBF2). Prove sperimentali suggeriscono che l'idrolisi di ATP nel primo sito di legame NBF1 è importante per l'apertura del canale, mentre il legame e l'idrolisi dell'ATP a livello di NBF2 determinano rispettivamente la stabilizzazione dello stato aperto e la chiusura del canale (Ambudkar et al., 1999). Il CFTR forma un canale anionico voltaggio-indipendente con sequenza di permeabilità: $\text{Br}^- \geq \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$, possiede una piccola conduttanza a singolo canale (6-10 pS) e media l'efflusso di Cl^- dalla cellula secondo il suo gradiente elettrochimico. Il CFTR è localizzato a livello della superficie apicale di molti epitelii secretori e svolge un ruolo fondamentale nell'omeostasi dei fluidi trans epiteliali in diversi sistemi d'organo come le vie aeree, l'intestino, il pancreas, i reni, le ghiandole salivari e il tratto riproduttore maschile.

Il gene CFTR è stato identificato nel 1989 come la base genetica della fibrosi cistica (Kerem et al., 1989), che è una malattia autosomica recessiva. Le caratteristiche cliniche della fibrosi cistica includono l'infezione polmonare cronica, con progressivo deterioramento della funzione polmonare, insufficienza del pancreas esocrino, infertilità maschile e complicazioni gastrointestinali. Sono state identificate più di 1500 mutazioni con perdita di funzione del CFTR che causano fibrosi cistica. Nella popolazione caucasica circa il 90% dei pazienti presentano la mutazione ΔF508 (delezione della fenilalanina in posizione 508) (Riordan, 2008). Nonostante non siano state identificate mutazioni con acquisto di funzione, un'attivazione sostenuta del CFTR in cellule epiteliali intestinali causata da enterotossine produce una diarrea secretoria. L'attività di CFTR nelle cellule epiteliali che tappezzano le cisti renali è responsabile di un progressivo accumulo di liquido e dell'ingrandimento delle cisti presenti nella malattia del rene policistico (PKD).

1.6 CANALI PER IL Cl⁻ ATTIVATI DA LIGANDI

Fanno parte di questa classe il recettore per il GABA_A e il recettore per la glicina. Il GABA (acido γ -aminobutirrico) e la glicina sono entrambi neurotrasmettitori inibitori in grado di attivare canali per il cloruro mediando la neurotrasmissione inibitoria. In seguito all'ingresso di cloruro, infatti, i neuroni iperpolarizzano ed il potenziale di membrana si allontana dal valore soglia necessario perché si origini il potenziale d'azione.

Il GABA è il principale neurotrasmettitore inibitorio del SNC. In generale, il GABA provoca una iperpolarizzazione della membrana, responsabile dell'effetto inibitorio. I recettori per il GABA_A sono costituiti da cinque subunità. Finora sono noti 20 tipi di subunità, la cui diversa combinazione conferisce differenti gradi di omologia ai diversi recettori. È presente un sito di fosforilazione che consente di modulare in senso positivo o negativo le correnti GABAergiche, a seconda delle subunità che costituiscono il recettore. Questi recettori sono il bersaglio di diverse sostanze neuroattive, che si legano a siti specifici aumentando la sensibilità al GABA. Le principali sostanze possono essere esogene, come le benzodiazepine, i barbiturici e l'alcool, o endogene, come i neurosteroidi.

La glicina è il principale neurotrasmettitore inibitorio del midollo allungato e del midollo spinale. Analogamente al GABA, provoca una iperpolarizzazione della membrana, responsabile dell'effetto inibitorio. Nel midollo spinale può essere liberata assieme al GABA, rispetto al quale mostra una risposta più rapida. I recettori della glicina hanno una struttura simile a quelli per il GABA_A essendo anch'essi costituiti da cinque subunità, tre di tipo α e due di tipo β , che costituiscono un canale permeabile al Cl⁻.

1.7 I CANALI PER IL Cl⁻ ATTIVATI DAL CALCIO

I CaCC sono ampiamente espressi in diversi tipi cellulari tra cui neuroni, varie cellule epiteliali, recettori olfattivi, fotorecettori, muscoli scheletrici, muscolo cardiaco, muscolatura liscia, cellule del Sertoli, neutrofili, linfociti, epatociti, cellule

beta del pancreas (Hartzell et al., 2005). Quando le concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} arrivano a 0,2-5 μM , i canali CaCC si attivano e si ha un'uscita di Cl^- con conseguente depolarizzazione della membrana cellulare. Questo efflusso di Cl^- ha un ruolo critico nelle secrezioni epiteliali (Wagner et al., 1991; Boucher, 1994; Grubb e Gabriel, 1997), nell'eccitabilità di membrana nel muscolo cardiaco e nei neuroni (Zygmunt, 1994; Kawano et al., 1995; Frings et al., 2000), nella trasduzione olfattiva (Frings et al., 2000), nella regolazione del tono vascolare (Large e Wang, 1996) e nella modulazione della risposta fotorecettoriale alla luce.

Nonostante i CaCC siano stati caratterizzati funzionalmente quasi tre decenni fa, la loro identità molecolare non è ancora stata ben chiarita. Vi sono diversi potenziali candidati che includono la famiglia proteica CLCA (Cunningham et al., 1995; Jentsch et al., 2002; Eggermont, 2004), il membro della famiglia dei CLC CLC-3 (Huang et al., 2001; Robinson et al., 2004) e le bestrofine (BEST1-BEST4) (Sun et al., 2002; Hartzell et al., 2005bis). Mutazioni di BEST1, espressa dalle cellule epiteliali del pigmento retineo, causano la malattia di Best, nota anche come distrofia maculare vitelliforme, che è una forma ereditaria di degenerazione maculare caratterizzata da perdita della visione centrale (Marmorstein et al., 2000).

1.8 I CANALI PER Cl^- INTRACELLULARI (CLIC)

I canali per Cl^- intracellulari (CLIC) sono stati isolati per la prima volta nel rene bovino (p64). Sono altamente conservati nei vertebrati, che solitamente possiedono sei distinti geni omologhi. Il primo omologo umano è stato chiamato NCC27 (poi rinominato CLIC1) ed è stato individuato nella membrana nucleare, in quella plasmatica, nel citoplasma e nel nucleoplasma. Quindi, queste proteine esistono sia come forma globulare solubile nel citosol, sia come canali ionici in membrana (Venezuela et al., 1997); la loro funzione molecolare, cellulare e fisiologica è ancora poco chiara (Litter et al., 2010).

1.9 I CANALI PER IL Cl^- ATTIVATI DA RIGONFIAMENTO CELLULARE

Le cellule sottoposte ad un aumento dell'osmolarità intracellulare o ad una diminuzione dell'osmolarità extracellulare si rigonfiano, a causa di un acquisto d'acqua. In queste condizioni vengono messi in atto una serie di meccanismi che vanno sotto il nome di "Regulatory Volume Decrease" (RVD), volti a diminuire l'osmolarità intracellulare; avverrà così, per osmosi, una fuoriuscita di acqua dalla cellula, in modo da controbilanciare l'acquisto iniziale e far recuperare alla cellula stessa il suo volume originale. Questo decremento del volume cellulare può essere compiuto in teoria attraverso il legame o la polimerizzazione di sostanze osmoticamente attive; in realtà, quello che si osserva più spesso è l'estrusione di tali sostanze (Lang F. et al., 1998 bis).

La maggior parte delle cellule di mammifero risponde all'aumento di volume attivando sistemi di trasporto principalmente per K^+ e Cl^- , ma anche per Na^+ , H^+ e HCO_3^- , oltre a rilasciare numerosi piccoli osmoliti organici. In molte cellule il decremento regolatorio del volume coinvolge un canale anionico, indicato con l'acronimo di RVDC (Regulatory Volume Decrease Channel), che permette il passaggio non solo di Cl^- , ma anche di HCO_3^- , anioni organici ed osmoliti organici neutri. Questo canale consente il passaggio di una corrente denominata $\text{I}_{\text{Cl,swell}}$. Nello scorso decennio sono stati proposti numerosi candidati molecolari che potrebbero mediare la corrente $\text{I}_{\text{Cl,swell}}$, tuttavia l'identificazione del canale responsabile di questa corrente è risultata difficoltosa, in quanto non sono noti bloccanti specifici e la maggior parte delle cellule esprime questo canale endogenamente. Non è chiaro inoltre se $\text{I}_{\text{Cl,swell}}$ sia mediata da un solo tipo di canale. Per una trattazione dettagliata dei diversi candidati molecolari e delle caratteristiche della corrente $\text{I}_{\text{Cl,swell}}$ si rimanda al paragrafo 2.2 dell'Introduzione della Parte I.

1.10 RUOLO FISIOPATOLOGICO DEL TRASPORTO DI CLORURO E SCOPO DEL LAVORO

Come precedentemente accennato, i canali e i trasportatori del cloruro intervengono in molte attività fisiologiche delle cellule eccitabili e non eccitabili (Jentsch 1996). Inoltre, mutazioni a carico di tali proteine conducono ad un ampio spettro di patologie che coinvolgono diversi organi ed apparati ed includono tra le altre: la miotonia, la fibrosi cistica, la sindrome di Bartter, i calcoli renali, la sordità e l'osteopetrosi (Jentsch et al., 2005). Infatti, una delle motivazioni che ha portato ai recenti sviluppi nello studio dei trasporti anionici è stata proprio la scoperta del loro coinvolgimento in numerose malattie genetiche. Visto il crescente interesse della comunità scientifica per il trasporto di cloruro e per il coinvolgimento di tale fenomeno in patologie umane, nei nostri laboratori ci interessiamo alla caratterizzazione di proteine coinvolte nel trasporto anionico. In particolare, questo lavoro verte allo studio di due trasportatori per il cloruro, il putativo canale ionico attivato dal rigonfiamento cellulare ICln e lo scambiatore cloruro-bicarbonato denominato Pendrina (SLC26A4).

Parte I

*Caratterizzazione molecolare e funzionale di
ICln umana wild type e di una mutazione
individuata in una paziente affetta da
Sindrome del QT lungo*

Cap.2

Introduzione Parte I

2.1 REGOLAZIONE DEL VOLUME CELLULARE

La regolazione del volume cellulare è un importante meccanismo fisiologico che permette alla cellula di ripristinare il proprio volume nel caso si verifichi uno squilibrio osmotico tra comparto intracellulare ed extracellulare, che può realizzarsi sia in condizioni fisiologiche, sia patologiche. Le membrane cellulari sono molto permeabili all'acqua che si muove, attraverso queste ultime, sia secondo gradiente di pressione osmotica, sia idrostatica. Qualsiasi squilibrio osmotico tra comparto extracellulare e intracellulare causa movimento di acqua e quindi variazione del volume cellulare, eventi che influenzano i trasporti ionici e possono determinare alterazioni morfologiche, metaboliche e morte cellulare per lisi osmotica (Lang, et al, 1998).

Normalmente la maggior parte delle cellule di mammifero sono a contatto con un fluido extracellulare isoosmotico; nel caso in cui la cellula fosse esposta ad una soluzione extracellulare ipertonica, o se si verificasse una riduzione dell'osmolarità intracellulare rispetto a quella extracellulare, la cellula si raggrinzirebbe a causa della perdita d'acqua, che uscirebbe secondo il suo gradiente di potenziale chimico. Quando si verifica questa situazione, vengono messi in atto una serie di meccanismi di trasporto attraverso la membrana cellulare, atti essenzialmente a favorire un ingresso di NaCl, che daranno origine all'incremento regolatore del volume cellulare (RVI); si determinerà così un aumento dell'osmolarità intracellulare, il quale a sua volta determinerà un ingresso di acqua in cellula, che ne ripristinerà il volume originale (figura 3) (Okada 2001).

Se, invece, la cellula venisse esposta a soluzione extracellulare ipotonica o vi fosse un aumento della concentrazione intracellulare di osmoliti, la cellula richiamerebbe acqua dall'ambiente extracellulare e si rigonfierebbe. In questo caso verranno messi in atto i meccanismi del decremento regolatore del volume cellulare (RVD), che permetteranno una diminuzione dell'osmolarità intracellulare; in questo modo, per osmosi, vi sarà una fuoriuscita d'acqua dalla cellula in grado di controbilanciare l'acquisto iniziale e far recuperare alla cellula stessa il volume originale (figura 3) (Okada 2001).

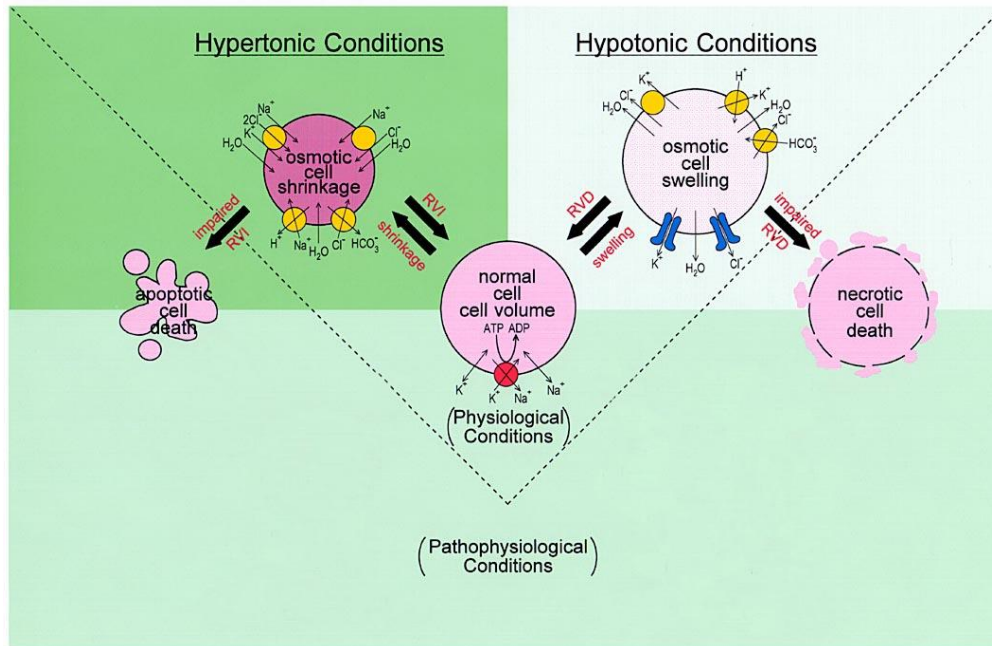


Figura 3: meccanismi di trasporto coinvolti nella regolazione del volume cellulare.

2.1.1 Decremento regolatore del volume (RVD)

Come precedentemente accennato, i meccanismi di trasporto implicati nell'RVD si attivano dopo rigonfiamento cellulare e provocano l'estrusione di sostanze osmoticamente attive e, per osmosi, una fuoriuscita d'acqua dalla cellula che determina il ripristinarsi del volume cellulare iniziale. I meccanismi di trasporto coinvolti nell'RVD (figura 3) sono principalmente finalizzati all'estrusione di KCl; in particolare, si possono attivare conduttanze per il K^+ e per il Cl^- (Lang et al., 1998bis). Questo è il trasporto che si attiva più frequentemente durante il rigonfiamento cellulare di cellule di mammifero, ed è stato osservato in svariati citotipi quali: linfociti, piastrine, cellule endoteliali, fibroblasti, astrociti, cellule MDCK, cellule dell'epitelio del corpo ciliare, cellule del cristallino e dell'intestino, cellule della pelle e della vescica urinaria di rana, del tubulo prossimale, del fegato e della trachea (Lang et al., 1998). È stato dimostrato da vari studi che il canale anionico attivato dal rigonfiamento cellulare è aslettivo e permette il passaggio non solo di Cl^- , ma anche di HCO_3^- , anioni inorganici e osmoliti organici neutri (Lang et al., 1998). Oltre ai canali ionici, nell'RVD possono intervenire un simporto KCl (descritto ad esempio negli eritrociti di uccello, pecora e uomo), o gli scambiatori K^+/H^+ e Cl^-/HCO_3^- , che vengono attivati parallelamente. Gli ioni H^+ e HCO_3^- , entrati

in cellula, formano CO₂ che, diffondendo all'esterno, non risulta osmoticamente attiva (Lang et al., 1998).

È possibile, inoltre, che per contrastare l'elevata osmolarità intracellulare vi sia rilascio di sorbitolo, inositolo, aminoacidi non essenziali quali betaina, taurina, attraverso lo stesso canale anionico aspecifico citato in precedenza e non attraverso carriers molecolari (Lang et al., 1998). Questo canale che media l'efflusso di cloruro e osmoliti ed è attivato dal rigonfiamento cellulare, è denominato, a seconda degli autori, swelling activated chloride channel (ICl,swell channel), volume dependent chloride channel (ICl,vol channel), volume sensitive organic osmolyte and anion channel (VSOAC) o volume sensitive outwardly rectifying channel (VSOR). Quali siano la struttura e l'identità molecolare di questo canale anionico è ancora oggi oggetto di studio.

2.2 LA CORRENTE ICl,swell

2.2.1 Caratteristiche generali

L'esposizione della cellula ad un ambiente ipotonico porta all'attivazione di una corrente anionica denominata ICl,swell o ICl,vol. Le sue caratteristiche elettrofisiologiche sono state studiate mediante patch-clamp in configurazione whole cell o voltage clamp a due elettrodi. Essa è caratterizzata da una moderata rettificazione uscente, la cui entità è comunque variabile in relazione al tipo cellulare indagato (Okada, 1997); presenta inoltre una lenta inattivazione tempo dipendente a voltaggi più positivi di +40 mV; anche l'entità dell'inattivazione è variabile a seconda del tipo cellulare, e può inoltre essere modulata dal pH e dalla presenza di cationi bivalenti nel mezzo extracellulare: ad esempio, a pH=6.5 la corrente si inattiva più rapidamente e a potenziali meno depolarizzati; a pH=8.5 la cinetica di inattivazione diviene più lenta (Ackerman et al., 1994). E' stato proposto che, a livello di singolo canale, questa inattivazione sia dovuta ad un progressivo decremento nel numero di canali attivi (Okada, 1997). Altre caratteristiche tipiche di ICl,swell sono: veloce cinetica di attivazione (<1 ms), indipendenza dal voltaggio, elevata selettività per gli anioni sui cationi (tipicamente sono riportati rapporti di

permeabilità $P_{\text{cationi}}/P_{\text{Cl}^-} < 0.02-0.05$ (Strange et al., 1996); per gli oociti di *Xenopus* è riportato un valore di $P_{\text{Cl}^-}/P_{\text{Na}^+} > 3$ (Ackerman et al., 1994 bis), per altri tipi cellulari sono stati proposti valori di $P_{\text{Na}^+}/P_{\text{Cl}^-}$ tra 0.2 e 0.5. Tale corrente presenta inoltre dipendenza dall'ATP citosolico, tale per cui la deplezione di ATP intracellulare con inibitori metabolici la abolisce quasi completamente in un'ampia varietà di cellule, o ne induce il "rundown". La sequenza di selettività anionica del canale è: $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- = \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^- > \text{metilsulfonato} > \text{HCO}_3^- > \text{acetato} > \text{gluconato} > \text{glutammato}$ riportata per svariati citotipi (oociti di *Xenopus*, cellule 407 di intestino umano e altre cellule di mammifero, epatociti di seppia) (Wright e Diamond, 1977). Come già precedentemente accennato, numerose evidenze sperimentali indicano che il canale anionico attivato da rigonfiamento cellulare possa consentire l'efflusso anche di osmoliti, anioni organici, ATP. Esistono prove sostanziali che questo canale medi il trasporto di aminoacidi, quali taurina, glutammato, glutammina e glicina; ad esempio, per cellule C6 di glioma e per epatociti di seppia è riportato un valore di $P_{\text{taurina}}/P_{\text{Cl}^-} \sim 0.2$ (Jackson e Strange, 1996).

2.2.2 La corrente $I_{\text{Cl,swell}}$ nel cuore

La corrente $I_{\text{Cl,swell}}$ viene attivata in seguito a stretch di tipo meccanico o a rigonfiamento cellulare ed è ampiamente espressa in tutto il cuore, tuttavia la sua distribuzione varia a seconda del tipo cellulare, della regione cardiaca e della specie considerata. E' stata riscontrata una sua attivazione nei miociti atriali di gran parte delle specie esaminate, comprese cellule canine, di coniglio, di cavia e umane; la corrente è presente anche nei miociti ventricolari di cavia, canini e umani (Hiraoka et al., 1998).

L'attivazione di questa corrente contribuisce a una leggera depolarizzazione del potenziale di riposo e ad un accorciamento della durata del potenziale d'azione (Vandenberg et al., 1997; Baumgarten e Clempner, 2003); sembrerebbe quindi implicata nell'insorgenza di aritmie, specialmente in seguito ad eventi di ischemia e riperfusione.

Sia durante l'ischemia sia dopo la riperfusione, le cellule del miocardio vanno incontro a rigonfiamento cellulare. Il grado di rigonfiamento delle cellule durante ischemia e riperfusione non è stato correlato direttamente con l'attivazione della

corrente mediante misure elettrofisiologiche, tuttavia l'aumento della superficie della sezione trasversale dei miociti cardiaci di coniglio di oltre il 110% rispetto al controllo, ottenuto tramite inflazione, ha portato all'attivazione della corrente (Hagiwara et al., 1992). Dal momento che simili livelli di rigonfiamento cellulare si possono sviluppare durante l'ischemia e la ri-perfusione, è probabile che la corrente venga attivata durante tali eventi.

Meno chiaro è il ruolo di $I_{Cl,swell}$ in condizioni fisiologiche. Dato che la corrente è risultata essere attivata prevalentemente nelle cellule atriali e nelle cellule del nodo seno-atriale (S-A), potrebbe svolgere un ruolo significativo nell'attività elettrica del tessuto atriale e nella funzione di pacemaker; inoltre, essendo attivata anche dallo stiramento cellulare, potrebbe servire come importante mediatore della mecano-trasduzione, in accordo con la funzione svolta in vari altri tessuti (Hiraoka et al., 1998).

2.2.3 Candidati molecolari per $I_{Cl,swell}$

Sebbene ad oggi non si conosca l'identità del canale responsabile dell'attivazione della corrente attivata dal rigonfiamento cellulare, negli ultimi anni sono stati proposti i seguenti candidati molecolari:

- **CLC2**: appartiene alla famiglia dei CLC, canali del Cl^- voltaggio dipendenti: isolato da cuore e cervello di ratto è espresso in diverse linee cellulari (pancreas, polmone, fegato). L'espressione in oociti di *Xenopus* induce correnti di Cl^- che si attivano lentamente dopo forte iperpolarizzazione a voltaggi non fisiologici, e mostrano una relazione corrente-voltaggio lineare; la sequenza di selettività è: $Cl^- \geq Br^- > I^-$ (Thiemann et al., 1992). In seguito, è stato dimostrato che il canale poteva essere attivato anche dall'ipotonicità extracellulare, e che nella regione ammino-terminale si trovava un dominio necessario per l'attivazione del canale (Grunder et al., 1992). Tuttavia, diverse caratteristiche (la sequenza di selettività anionica, le modalità e la cinetica d'attivazione della corrente, la rettificazione, l'insensibilità al DIDS, l'attivazione da parte di pH extracellulare acido) hanno portato ad escludere che sia effettivamente questo il canale responsabile di $I_{Cl,swell}$ (Okada, 1997).

- **CLC3**: appartiene alla famiglia dei CLC, è stato clonato inizialmente da cervello di ratto (Kawasaki et al., 1994); l'espressione funzionale di un clone

cardiaco in fibroblasti NIH/3T3 dà luogo ad una conduttanza al Cl^- basalmente attiva, che è fortemente modulata dal volume cellulare e mostra parecchie caratteristiche simili a $\text{ICl}_{\text{swell}}$, tra cui la rettificazione uscente, l'inattivazione a potenziali positivi, la sequenza di selettività $\text{I}^- > \text{Cl}^-$, l'inibizione da parte di NPPB e ATP extracellulare (Duan et al., 1997). Tuttavia, tentativi di riprodurre questi risultati in oociti di *Xenopus* e in altre cellule di mammifero non hanno avuto successo (Friedrich et al., 1999). Il quadro è ulteriormente complicato dall'identificazione di due isoforme per CLC3, una variante lunga ed una corta; recentemente, è stato dimostrato, in sistemi d'overespressione, che nessuna delle due isoforme ha influenza significativa sulla regolazione del volume e su $\text{ICl}_{\text{swell}}$. Inoltre, sembra che la proteina abbia una distribuzione relativamente ristretta, essendo espressa principalmente nel rene e nel cervello. Questo pattern d'espressione è incompatibile con un ruolo nell'RVD, che è una funzione ubiquitaria (Weylandt et al., 2001). La produzione del topo knock-out per CLC 3 e l'osservazione che epatociti e cellule degli acini pancreatici ottenuti da tali topi presentano una corrente di swelling con le caratteristiche canoniche, sembrava aver portato finalmente ad escludere il CLC 3 dalla rosa dei canali candidati per $\text{ICl}_{\text{swell}}$ (Sobrawa et al., 2001); tuttavia, Yamamoto-Mizuma et al. (2004) hanno dimostrato che, sebbene le correnti di swelling misurate in cellule atriali di topi ko CLC 3 e topi di controllo siano fenotipicamente indistinguibili, presentano diversa sensibilità ad alcuni bloccanti extracellulari e fattori intracellulari quali Mg^{++} e ATP. L'esclusione di CLC 3 sembra quindi essere prematura, e le ultime osservazioni indicherebbero che questa proteina potrebbe essere, se non il poro di permeazione, un regolatore di un canale eteromultimerico; non è inverosimile inoltre che possano esistere diverse sottopopolazioni distinte di canali attivati dallo swelling (Greenwood, 2004).

- **CFTR**: è ormai associato che le caratteristiche della corrente di questo canale sono ben diverse da $\text{ICl}_{\text{swell}}$: la sua attivazione richiede sia una fosforilazione dipendente da cAMP, sia idrolisi di ATP; la sequenza di selettività anionica è: $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^-$; la relazione corrente-voltaggio è lineare; la corrente non mostra cinetiche di inattivazione ed attivazione; è insensibile al DIDS; infine, la corrente di Cl^- attivata dal rigonfiamento è stata osservata anche in cellule che non esprimono il CFTR (Okada et al., 1997).

- **Glicoproteina P:** è il prodotto del gene MDR1, che conferisce resistenza crociata ai chemioterapici a linee cellulari e tumori umani. La glicoproteina P appartiene alla superfamiglia dei trasportatori ABC (ATC binding cassette); questa è un trasportatore attivo, dipendente dall'ATP, che pompa farmaci idrofobici al di fuori della cellula: il suo normale ruolo fisiologico è sconosciuto. E' stato riportato che la sua overespressione genera canali selettivi al Cl⁻, regolati dal volume e dipendenti dall'ATP (Valverde et al., 1992). Tuttavia, parecchi laboratori non hanno confermato questi risultati; inoltre, inibitori (quali il verapamil), oligonucleotidi antisenso e anticorpi monoclonali per la glicoproteina P non hanno effetto su ICl_{swell} (Okada et al., 1997). Più recentemente, è stato tuttavia proposto per questa molecola un ruolo come regolatore di ICl_{swell}; eventi di fosforilazione da parte della PKC modulerebbero il passaggio tra diversi stati di attività della glicoproteina P, che potrebbe agire sia come pompa che come regolatore di canali ionici (Idriss et al., 2000).

- **Phospholemman:** è una piccola proteina con un unico dominio transmembrana, osservata per la prima volta nel sarcolemma cardiaco: l'espressione eterologa in oociti di *Xenopus* dà origine ad una corrente selettiva al cloruro attivata da iperpolarizzazione. Questa corrente ha una lenta cinetica d'attivazione, non mostra cinetiche di inattivazione e incrementa a pH extracellulare acido (Moorman et al., 1992). Esperimenti di ricostituzione della proteina in bilayers lipidici hanno confermato che è più probabile che si comporti da canale ionico, piuttosto che da regolatore di canali. Nonostante la corrente mostri caratteristiche diverse da ICl_{swell}, l'osservata selettività per la taurina (Moorman et al., 1995) rende possibile l'ipotesi di un coinvolgimento di questa proteina nella regolazione del volume cellulare; tuttavia la sequenza di selettività anionica e l'elevata conduttanza di singolo canale (700 pS) indicano che difficilmente phospholemman possa essere la base molecolare per ICl_{swell}.

- **VDAC:** è una proteina chiamata anche "porina eucariotica", contenuta in migliaia di copie nella membrana esterna dei mitocondri; anch'essa sarebbe in grado di comportarsi da canale anionico voltaggio dipendente (Mannella et al., 1992) e presenterebbe una struttura a β -barrel (Mannella et al., 1997). Si ritiene che VDAC sia presente anche in altre frazioni di membrana, quali: reticolo endoplasmico e

plasmalemma di oociti di *Xenopus* (Steinacker et al., 2000; Schwarzer et al., 2000), linfociti umani e astrociti (Dermietzel et al., 1994). Poiché anticorpi anti-VDAC sono in grado di abolire i flussi ionici attivati dallo stress ipotonico, è stato ipotizzato un ruolo di questa molecola nella regolazione del volume cellulare (Dermietzel et al., 1994), anche se le caratteristiche biofisiche della corrente non corrispondono a quelle di $I_{Cl,swell}$.

- **ICln**: è una proteina di 235 amminoacidi, con peso molecolare di circa 26 kDa, clonata con la tecnica dell'expression cloning da una linea cellulare epiteliale canina (MDCK) (Paulmichl e al., 1992). L'overespressione in oociti di *Xenopus* determina, in condizioni isotoniche, la comparsa di una corrente a rettificazione uscente che presenta veloce attivazione (<1 ms) e lenta inattivazione a potenziali positivi ($\tau_{off} = 243 \pm 15$ ms a $+60$ mV). Questa corrente possiede un potenziale d'inversione di circa -30 mV (vicino al potenziale di inversione dello ione cloruro in queste cellule) ed è inibita dai bloccanti dei canali del cloruro DIDS ($IC_{50}=20$ μ M) e NPPB ($IC_{50}=1,5$ μ M), rispettivamente in maniera parzialmente e totalmente reversibile. La corrente è, inoltre, sensibile al pH extracellulare, non dipende dal calcio intracellulare o extracellulare, altamente selettiva per gli anioni rispetto ai cationi, e possiede una sequenza di permeabilità anionica: $SCN^- >> I^- > Br^- > Cl^- > acetato > HSO_4^-$ (identica a quella riportata per $I_{Cl,swell}$). L'aggiunta di nucleotidi alla soluzione extracellulare induce un blocco dose dipendente e reversibile della corrente (Paulmichl et al., 1992; Gschwentner et al., 1994). È evidente l'analogia tra le caratteristiche della corrente derivante dall'espressione eterologa di ICln e $I_{Cl,swell}$.

2.3 LA PROTEINA CANALE ICln

La proteina ICln è ubiquitariamente espressa e il suo ruolo nella sopravvivenza della cellula è di primaria importanza: il knock-out di tale proteina è letale e lo sviluppo dell'organismo si ferma infatti allo stadio embrionale, come è stato dimostrato in topo (Pu et al., 2000) e nematode (Fürst et al., 2002). Nel genoma umano il gene che codifica per ICln, chiamato CLNS1A (Chloride channel Nucleotide Sensitive 1 A), è

stato scoperto con tecniche di ibridazione in situ, e si trova sul cromosoma 11 (Nagl et al., 1996). Questo gene è lungo circa 18.3 kb ed è costituito da sei esoni e cinque introni. E' stato anche individuato uno pseudogene non codificante, detto CLNS1B, che si trova invece sul cromosoma 6. La più corta sequenza promotrice individuata è lunga 89 nucleotidi (da -163 a -74), è priva del TATA-box (elemento promotore che specifica il punto particolare di inizio della trascrizione) e possiede almeno tre differenti siti d'inizio (Scandella et al. 2000).

2.3.1. Struttura e localizzazione

Come già accennato, il cDNA dell'isoforma canina di ICln codifica per una proteina di 235 aminoacidi, prevalentemente acidi (pI=3.8) e con un peso molecolare predetto sulla base della sequenza primaria di 26.5 kDa. Tuttavia, effettuando un'elettroforesi su gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti (in presenza cioè di SDS) la proteina migra ad un'altezza di circa 36 kDa; una simile discrepanza non è riconducibile a modificazioni post-traduzionali, dal momento che ICln espressa in batteri e quella espressa in un sistema eucariotico (reticolociti di coniglio) migrano alla stessa altezza (Buyse et al., 1996), ma potrebbe essere dovuta alla predominanza di aminoacidi acidi che la costituiscono, che interferirebbero con l'azione dell' SDS sulla proteina stessa.

ICln presenta un'alta similarità tra i suoi ortologhi, tanto che l'espressione delle proteine provenienti da diverse specie in oociti di *Xenopus laevis* genera correnti molto simili (Gschwentner et al., 1999). A livello subcellulare ICln è distribuita per circa il 90% nel citosol, mentre per il restante 10% è localizzata nella membrana plasmatica. E' stato provato che in alcuni tipi cellulari uno stress ipotonico può indurre la traslocazione reversibile di ICln dal citoplasma alla membrana; in particolare, nei fibroblasti NIH3T3, dove la riduzione dell'osmolarità extracellulare induce la traslocazione di ICln dal citosol alla frazione microsomiale (Ritter et al., 2003), così come in cellule cardiache di embrione di razza (*Raja eglanteria*) (Musch et al., 1997), in miociti cardiaci di ratto (Musch et al., 1998) e in cellule mesoteliali umane (Meyer. et al., 2004).

La struttura primaria di ICln presenta tre regioni interessanti, denominate Acidic Domains (AD) poichè composte prevalentemente da amminoacidi acidi (figura 4):

queste potrebbero svolgere un ruolo importante nelle interazioni con altre proteine (Emma et al., 1998). Ad esempio, il dominio AD2 contiene un sito di fosforilazione (S142) e sembra essere coinvolto nel legame con la proteina LSm4 (Fürst et al., 2005), implicata nel processamento dell'RNA, mentre AD3 sembrerebbe legare PRMT5 (Emma et al., 1998 bis).

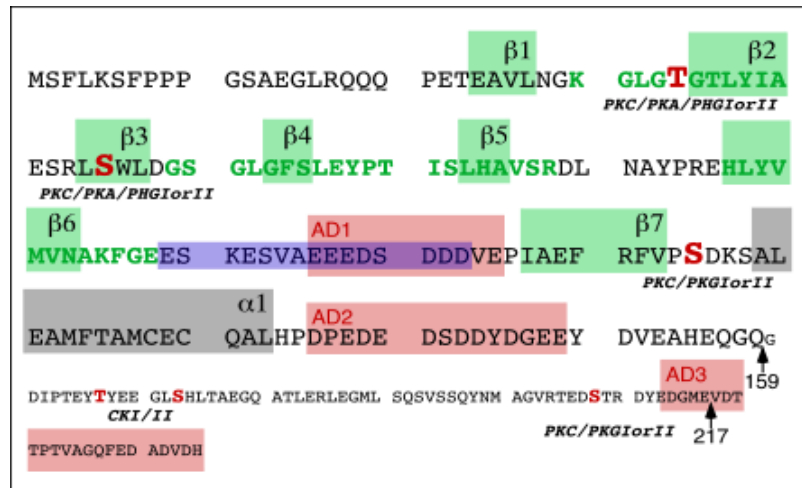


Figura 4: sequenza aminoacidica della proteina ICLn (isoforma canina). I quadrati verdi indicano i filamenti β del PH-domain, mentre le lettere verdi quelli del modello in membrana. In viola è evidenziato il loop $\beta 6$ - $\beta 7$, in grigio l' α -elica e in rosa i domini acidi.

Sulla base della sequenza aminoacidica, per la proteina ICLn inserita in membrana, è stata proposta nel 1992 (Paulmichl et al., 1992) una struttura terziaria costituita da un foglietto- β composto da quattro putativi filamenti β antiparalleli. Secondo questa ipotesi due molecole di ICLn potrebbero formare un omodimero apponendo i rispettivi foglietti β uno contro l'altro. In questo modo si verrebbe a formare un canale che attraversa il bilayer lipidico. Questo modello prevede che sia l'estremità C-terminale che quella N-terminale si affaccino sul lato citoplasmatico.

A supporto di questa ipotesi, le predizioni bioinformatiche della struttura secondaria indicano che il foglietto β è il "folding" più probabile della regione interessata nella formazione del poro (figura 5).

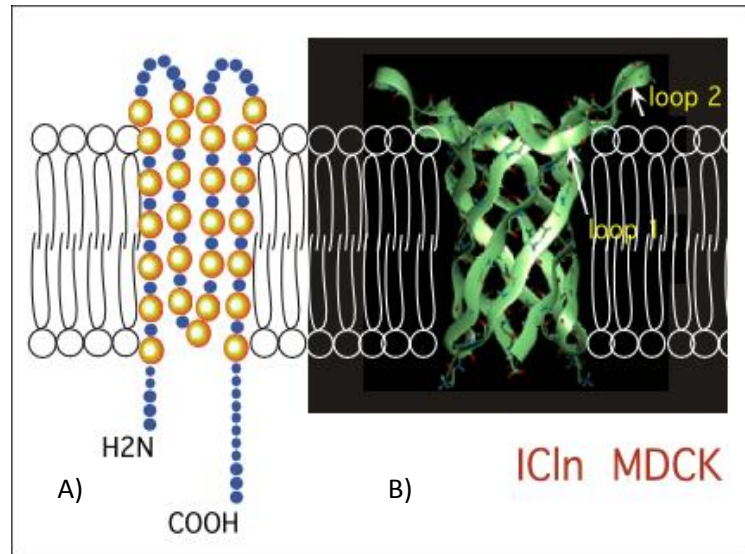


Figura 5: modello strutturale della proteina canale ICln (isoforma canina) inserita nel bilayer lipidico. A) Modello bidimensionale di un monomero di ICln in cui è messa in evidenza la localizzazione citoplasmatica delle estremità C- e N-terminale. B) Modello tridimensionale dell'omodimero in membrana in cui sono posti in evidenza i loops extracellulari.

Tenendo conto della sua localizzazione prevalentemente citoplasmatica, si è indagato quale possibile organizzazione spaziale potesse assumere ICln quando non si trova inserita in membrana. Una conformazione compatibile con i risultati degli stessi strumenti informatici di predizione della struttura secondaria è il cosiddetto dominio PH (Pleckstrin Homology), confermata con esperimenti di NMR. Il dominio PH di ICln condivide la medesima struttura dei domini PH canonici.

Generalmente un dominio PH è formato da sette filamenti β , organizzati in due foglietti affacciati, l'uno contro l'altro a formare uno stretto barile, seguiti da un' α -elica che si accosta all'estremità superiore del barile, in posizione trasversale rispetto ad esso.

La parte inferiore è delimitata dai loop $\beta 1/\beta 2$, $\beta 3/\beta 4$ e $\beta 6/\beta 7$ denominati "variable loops", rispettivamente VL2, VL1 e VL3 (Ferguson et al., 1994). L'alta variabilità di questi loop, sia per lunghezza che per composizione aminoacidica, insieme con la loro accessibilità spaziale è coerente con l'ipotesi che essi costituiscano il sito di legame per eventuali ligandi (figura 6).

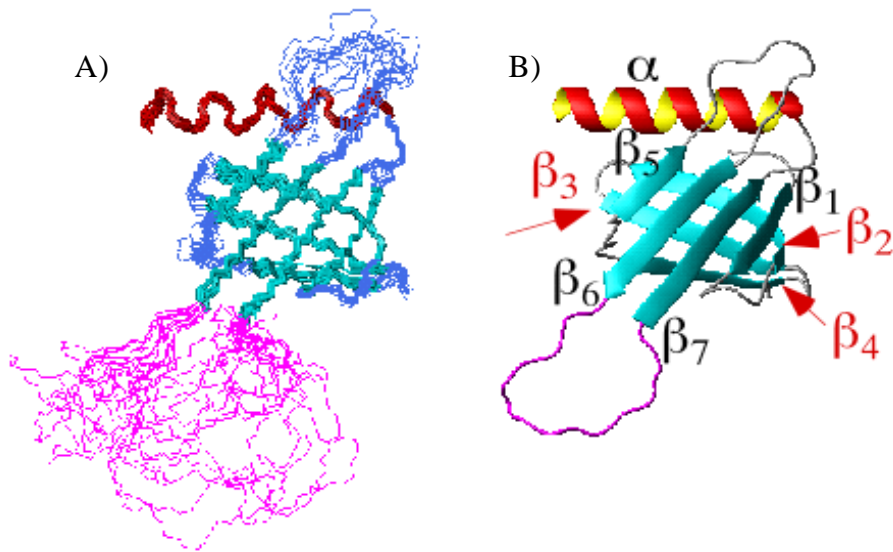


Figura 6: dominio PH di IChn. A) veduta laterale della sovrapposizione delle dieci migliori strutture ottenute per NMR; B) modello strutturale del dominio PH di IChn.

È molto interessante notare che in IChn il loop che connette il filamento β_6 e β_7 è lungo circa 20 aminoacidi in più dei 4-5 solitamente presenti nei canonici “PH domains”. Questo segmento di IChn, inoltre, corrisponde alla regione con alta mobilità la cui struttura non ha potuto essere determinata con precisione mediante NMR.

L'avvitamento dell' α -elica fa sì invece che i residui aminoacidici presenti in questo tratto, si trovino all'esterno e perpendicolari all'asse dell'elica stessa, e quindi esposti. In particolare, tra gli aminoacidi che costituiscono l' α -elica, in posizione 128 e 130 si trovano due cisteine (C128 e C130) che potrebbero promuovere il fenomeno di dimerizzazione attraverso la formazione di ponti disolfuro. Si pensa infatti che, come molte altre proteine, IChn sia funzionale solo quando due monomeri si associano a formare un omodimero.

I ponti disolfuro si formano tramite l'ossidazione dei gruppi tiolici (-SH) tra due residui di cisteina, e pur non essendo forze stabilizzatrici essenziali, possono essere decisivi nel consentire o impedire un particolare ripiegamento. Essi sono rari nelle proteine intracellulari poiché il citosol è un ambiente riducente. Sono invece presenti molti ponti disolfuro nelle proteine che vengono secrete dalle cellule negli ambienti extracellulari, in genere più ossidanti.

2.3.2 Funzione

La prima funzione che è stata proposta e meglio studiata per la proteina ICln riguarda il suo ruolo nella regolazione del volume cellulare e nella comparsa dell'ICl_{swell}. Come già detto, l'iniezione dell'mRNA codificante per ICln in oociti di *Xenopus* dà luogo ad una corrente selettiva per il Cl⁻ basamente attiva (Paulmichl et al., 1992; Gschwentner et al., 1994). Si può notare come le caratteristiche della corrente derivante dall'espressione eterologa di ICln ricalchino quelle descritte per la corrente ICl_{swell}, sostenendo l'ipotesi che essa possa costituire il canale responsabile di tale corrente o almeno parte di esso. A conferma di ciò, l'overespressione di diverse isoforme (uomo, nematode) di ICln in cellule di mammifero risulta in un significativo incremento della velocità di attivazione o dell'entità di ICl_{swell} (Hubert et al., 2000; Fürst et al., 2002). Inoltre, l'attivazione della corrente di Cl⁻ endogena indotta dallo swelling in fibroblasti NIH/3T3 viene completamente inibita in seguito all'introduzione in cellula di oligonucleotidi antisenso complementari ai primi trenta nucleotidi della regione codificante per ICln (Gschwentner et al., 1995); anche l'utilizzo di coloranti fluorescenti sensibili ai flussi transmembrana di cloruro conferma questo risultato (Wöll et al., 1996).

Accanto a questa primaria funzione nell'ambito della regolazione del volume, con il proseguire degli studi sulla proteina ICln sono stati scoperti molteplici altri processi in cui essa gioca un ruolo importante, interagendo con diverse altre proteine citosoliche. Per questa complessa rete di interazioni in cui ICln interviene essa è stata definita "connector-hub", a sottolineare che questa non solo interagisce con diverse molecole all'interno di uno stesso meccanismo funzionale, ma che connette anche sistemi funzionali diversi in molteplici compartimenti all'interno della cellula (Fürst et al., 2006). L'insieme di tutte le proteine che interagiscono con ICln costituiscono il suo *interactoma*.

Per capire le molteplici funzioni svolte da questa proteina è dunque di primaria importanza comprendere quali siano le proteine con cui essa interagisce direttamente. Alcune di esse sono connesse con l'organizzazione del citoscheletro:

- l'actina (p42) (Krapivinsky et al., 1994);
- la proteina 4.1R degli eritrociti (Tang e Tang, 1998): questa non è una proteina del citoscheletro, ma ne regola l'attività. A seguito di esperimenti di doppio

ibrido, la parte C terminale di ICln umana (aa 103-237) risulta in grado di legare l'isoforma eritroide della proteina P4.1 (4.1R), anche detta Banda 4.1, sugli amminoacidi 162-280, corrispondenti a parte del dominio FERM. Di recente è stato inoltre riportato che ICln è capace anche di legare altri membri della famiglia delle 4.1: la 4.1B e presumibilmente anche la 4.1G e la 4.1N (Calinisan et al., 2006);

- la proteina p17, identificata come l'isoforma non muscolare della catena leggera della miosina (Emma et al., 1998);

- recentemente è stato anche dimostrato un coinvolgimento delle integrine nella regolazione dell'osmosi e dei movimenti degli ioni attraverso le membrane cellulari; tali proteine, in particolare, controllano il flusso del calcio, del potassio e del cloruro sia direttamente (Davis et al., 2002; Haussinger et al., 2003) sia indirettamente (McPhee et al., 1998; Ritter et al., 2003; Shakibaei e Mobasheri, 2003; vom Dahl et al., 2003; Larkin et al., 2004). Le integrine sono molecole eterodimeriche composte da subunità α e β che mediano l'adesione cellula-cellula e cellula-matrice e coordinano i segnali bidirezionali che attraversano la membrana plasmatica. L'integrina α IIb β 3, specifica per le piastrine, è la più studiata ed è stata utilizzata come substrato per la ricerca di eventuali ligandi. Mediante esperimenti di PCR, Western Blot e di coimmunoprecipitazione è stata verificata la presenza di ICln nelle piastrine umane e la sua capacità di interagire con la catena α IIb. Dal momento che l'inibizione della ICln,swell attraverso l'Acyclovir induce l'inibizione delle integrine e dell'aggregazione piastrinica, è plausibile che ICln svolga un ruolo rilevante negli eventi di attivazione delle piastrine (Larkin et al., 2004);

- altre proteine per cui è stata dimostrata un'interazione con ICln sono le Smith antigen (Sm) (Pu et al., 1999; Friesen et al., 2001; Meister et al., 2001; Schmarda et al., 2001; Friesen et al., 2002; Azzouz et al., 2005), le like-Sm (Schmarda et al., 2001; Azzouz et al., 2005; Fürst et al., 2005) e la proteina Janus kinase binding protein, JBP1, (Pu et al., 1999; Meister et al., 2001), che lega le proteine Sm nei loro domini ricchi di arginina e glicina (RG domains): tutte queste proteine sono coinvolte nel processamento dell'RNA. L'interazione tra ICln e i fattori di splicing è stata descritta in maggior dettaglio (Fürst et al., 2002), ma il ruolo fisiologico di ICln in queste interazioni non è stato ancora ben caratterizzato.

Recentemente è stata identificata in eterozigosi una mutazione nel gene che codifica per ICln in una paziente giunta all'osservazione dei nostri collaboratori della clinica Mayo di Rochester (Prof. Ackerman, The Departments of Medicine, Pediatrics, and Molecular Pharmacology & Experimental Therapeutics). Si tratta di una donna di 51 anni che, mentre camminava, ha avuto un attacco cardiaco che le ha causato improvvisa perdita di conoscenza. Portata direttamente in ospedale, è stata rianimata e le è stato impiantato un defibrillatore ICD, e ha recuperato completamente. L'elettrocardiogramma della paziente misurava un QTc di 560 ms. Il padre e la zia della signora sono morti improvvisamente all'età rispettivamente di 60 e 57 anni. La familiarità, i sintomi e il valore di QTc della donna hanno portato a pensare che fosse affetta dalla sindrome del QT lungo (LQTS).

La LQTS è una malattia genetica responsabile di sincopi e morte cardiaca improvvisa, in assenza di anomalie strutturali del cuore. Essa è caratterizzata da un prolungamento dell'intervallo QT sull'ECG e dal rischio di aritmie ventricolari scatenate da situazioni di stress fisico o psicologico (Paragrafo 2.4).

Nella paziente non sono state trovate altre mutazioni di ICln e nemmeno mutazioni relative ai geni generalmente coinvolti nella LQTS, soltanto il comune polimorfismo in SCN5A (NaV1.5) H558R. Attraverso questa collaborazione internazionale, intendiamo indagare se ci siano collegamenti fra la mutazione di ICln e la malattia.

La mutazione nella sequenza di ICln umana oggetto di indagine è l'inserzione di una Timina in posizione 383 nella sequenza nucleotidica. Questa inserzione produce un frameshift che si traduce con una terminazione precoce nella sequenza aminoacidica (A128FSX139).

2.4 LA SINDROME DEL QT LUNGO

La sindrome del QT lungo (LQTS) è una malattia genetica che ha un'incidenza di 1:5000 tra le malattie geneticamente determinate (Kass e Moss, 2003). È stata descritta per la prima volta alla fine degli anni cinquanta, ma solo nel decennio che va dal 1991 al 2001 sono stati determinati i geni le cui mutazioni sono responsabili di tale sindrome. È caratterizzata da un'anormale e prolungata ripolarizzazione

ventricolare che determina episodi sincopali, ma può anche causare morte improvvisa in età infantile o giovanile. Durante i primi studi di questa malattia, fu formulata un'ipotesi che sosteneva come causa delle aritmie un'anormale innervazione del cuore da parte del sistema nervoso autonomo (Sympatic Imbalance Hypothesis, Schwartz et al. 1991). Analisi e studi genetici confutarono la teoria e dimostrarono che la predisposizione allo sviluppo delle aritmie ventricolari è la conseguenza di determinate alterazioni genetiche che portano a mutazioni nei canali ionici del cuore (Priori et al. 2000). Ciò considerato, la LQTS viene annoverata tra le canalopatie.

Ad oggi sono state descritte più di 500 mutazioni che causano la LQTS, a carico di 10 geni che codificano principalmente per canali cardiaci del potassio e del sodio o per loro proteine accessorie (tabella 3). Nella maggior parte dei casi si tratta di soggetti portatori di un solo allele disfunzionale (eterozigoti); nel raro caso di soggetti omozigoti, la disfunzionalità del canale si esprime nelle forme più gravi della patologia. Nonostante i passi avanti fatti in questo campo, una diagnosi genetica non può essere stabilita nel 25-30% dei pazienti (Tester et al., 2005; Napolitano et al., 2005) e la penetranza, ossia la percentuale di pazienti che hanno la mutazione e manifestano il fenotipo, varia dal 25% al 90% (Priori et al., 1999). Meno frequentemente ci possono essere variazioni nell'espressione della malattia, con diversi fenotipi risultanti dalla stessa mutazione. Tuttavia gli studi di genetica molecolare sviluppati nel corso degli ultimi 11 anni hanno evidenziato importanti correlazioni genotipo-fenotipo, che hanno contribuito a guidare l'approccio al trattamento. Inoltre, studiando i frequenti polimorfismi non sinonimi riscontrati nei pazienti, sono state effettuate interessanti osservazioni sulla suscettibilità individuale a sviluppare aritmia, un aspetto di notevole interesse per il settore della farmacogenomica (Medeiros-Domingo et al., 2007).

Type	Locus	Gene	Protein	Current	Effect	Frequency, %
Romano-Ward (autosomal dominant)						
LQTS1	11p15.5	<i>KCNQ1/KVLQT1</i>	Principal, I_{Ks} α -subunit	K	↓	30-35
LQTS2	7q35-36	<i>KCNH2/HERG</i>	Principal, I_{Kr} α -subunit	K	↓	25-30
LQTS3	3p21-p24	<i>SCN5A</i>	Principal, I_{Na} α -subunit	INa	↑	5-10
LQTS4	4q25-q27	<i>ANKB</i>	Accessory, ankyrin- β	Na/Ca	↑	<1
LQTS5	21q22.1	<i>KCNE1/minK</i>	Accessory, I_{Ks} β -subunit	K	↓	<1
LQTS6	21q22.1	<i>KCNE2/MIRP1</i>	Accessory, I_{Kr} β -subunit	K	↓	<1
LQTS7 ^a	17q23	<i>KCNJ2</i>	Principal, K_{ATP} α -subunit	K	↓	<1
LQTS8 ^b	12p13.3	<i>CACNA1</i>	Principal, $C_{av}1.2$ α -subunit	Ca type L	↑	<1
LQTS9	3p25	<i>CAV3</i>	Accessory, caveolin 3	Na	↑	<1
LQTS10	11q23	<i>SCN4B</i>	Accessory, I_{Na} β 4-subunit	Na	↑	<1
Jervell-Lange-Nielsen (autosomal recessive)						
JLN1	11p15.5	<i>KCNQ1/KVLQT1</i>	Principal, I_{Ks} α -subunit	K	↓	>90.5
JLN	21q22.1	<i>KCNE1/minK</i>	Accessory, I_{Ks} β -subunit	K	↓	<0.5

^aAndersen-Tawil Syndrome

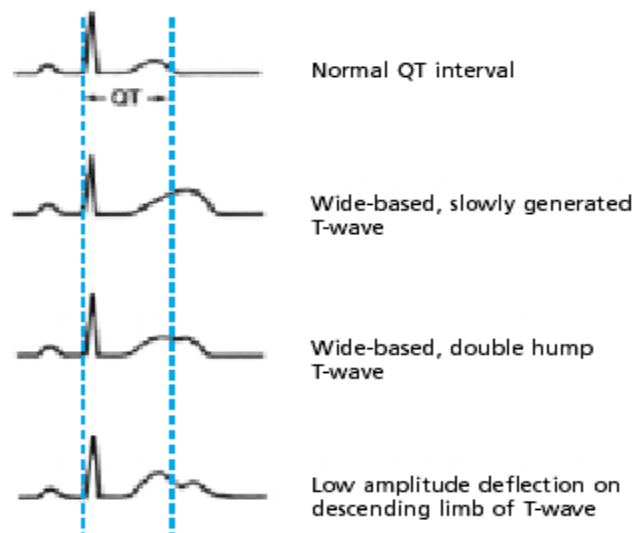
^bTimothy syndrome

Tabella 3: tabella riassuntiva dei geni coinvolti nell'insorgenza della malattia e del tipo di sindrome ad essi correlata (Maideros-Domingo et al., 2007).

2.4.1 Diagnosi

Il primo screening diagnostico, per determinare la malattia, avviene esaminando l'ECGrafico di un intervallo QTc. La LQTS è caratterizzata da un allungamento a livello del tratto QT, considerando come valori limite normali del QTc una durata inferiore a 440 msec nei soggetti di sesso maschile ed a 460 msec nei soggetti di sesso femminile.

A tutt'oggi sono stati descritti diversi tipi ECGrafici di sindrome del QT lungo (figura 7):



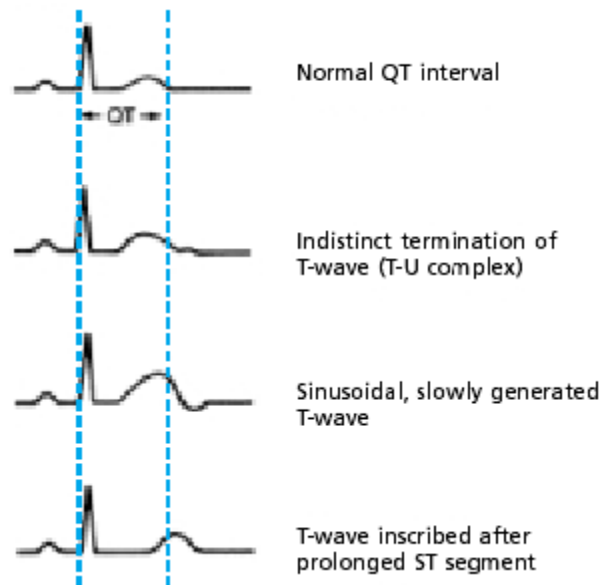


Figura 7: diversi tipi di ECG che descrivono la sindrome del QT lungo.

Il risultato dell'ECG non è sufficiente a diagnosticare la malattia, poichè sono stati riscontrati dei casi di LQTS che presentavano ECG normali (International Registry of LQTS). Quindi è impossibile escludere la diagnosi di LQTS semplicemente sulle basi di un normale QTc. In presenza di condizioni cliniche sospette come: ricorrenti episodi sincopali inspiegabili, accompagnati da cianosi e convulsioni, o la presenza in famiglia di un parente affetto dalla malattia, non si può escludere a priori la presenza della sindrome, anche se viene evidenziato un ECG nella norma. Nel caso di morte improvvisa non è possibile dedurre da un'autopsia se il paziente sia stato o meno affetto dalla sindrome, in quanto il cuore non presenta malformazioni.

2.4.2 Classificazione

La classificazione per la sindrome del QT lungo usata nel passato era basata sul carattere recessivo o dominante presentato dalla malattia, che dava luogo rispettivamente alla sindrome di Jarvell-Lange-Nielsen (JLN, con sordità) e alla sindrome di Romano-Ward (Rw, senza sordità). La classificazione utilizzata oggi enfatizza invece le scoperte genetiche degli ultimi decenni (come illustrato nella tabella 3): tre geni principali associati con la malattia sono stati descritti tra il 1995 e il 1996, che codificano per la subunità che forma il poro dei canali del potassio Iks e Ikr e per quella del canale del sodio Nav1.5. Le mutazioni a carico di tali geni accomunano circa il 65% dei casi e generano i tre sottotipi principali di LQTS: il

LQTS1 (a carico del canale del potassio I_{ks}), LQTS2 (che colpisce il canale del potassio I_{kr}) e il LQTS3 (che colpisce il canale del sodio). Negli ultimi anni sono stati scoperti altri 7 geni (tabella 3) che, se mutati, possono contribuire all'insorgenza della patologia, tuttavia solo il 5% dei casi rientra in queste categorie (Medeiros-Domingo et. al., 2007).

A seconda del gene implicato, la patologia prende un nome diverso e presenta caratteristiche distintive.

2.4.2.1 Sindrome del QT lungo di tipo 1 (LQTS1)

Pazienti con LQTS1 presentano solitamente episodi di aritmie ventricolari durante l'esercizio fisico (in particolar modo durante il nuoto) o in seguito a uno stimolo di tipo simpatico (Schwartz et al., 2001). L'onda T (fase dell'ECG che corrisponde alla ripolarizzazione dei ventricoli, vedere figura 9b) in questi pazienti ha spesso un'ampia base e una durata molto prolungata (figura 8). Questo sottotipo è il più frequente e ha una penetranza del 62 % (Zareba et al., 2006). Il gene affetto, detto K_vLQT1 o KCNQ1, è localizzato sul cromosoma 11 e codifica per la subunità alfa del canale del potassio I_{ks}. A causa di una riduzione della corrente uscente di potassio durante la fase 3 (fase di ripolarizzazione del potenziale d'azione cardiaco, vedere figura 9a) il potenziale d'azione risulta prolungato.

2.4.2.2 Sindrome del QT lungo di tipo 2 (LQTS2)

Pazienti con LQTS2 tendono a presentare aritmia ventricolare in risposta a stress di tipo emotivo (49%) o stimoli uditivi improvvisi (es. il suono della sveglia), e meno frequentemente durante il sonno (22%) o l'esercizio (29%) (Schwartz et al., 2001). Inoltre, le donne nel periodo post-parto sono particolarmente suscettibili (Khositseth et al., 2004). Si stima una penetranza del 79%; infatti, fino al 20% dei casi può avere un ECG asintomatico. L'onda T (figura 9b) nel LQTS2 è solitamente caratterizzata da un'ampiezza ridotta (in termini di altezza) e da un doppio picco separato da un solco (figura 8) (Zareba et al., 2006). Il gene affetto è KCNH2 o HERG, localizzato sul cromosoma 7, che codifica per la subunità alfa del canale per il potassio I_{kr} e comprende il 25-30% dei casi totali. Disfunzioni di questo canale diminuiscono la

corrente uscente di potassio durante la fase 3 del potenziale d'azione, prolungando la sua durata.

2.4.2.3 Sindrome del QT lungo di tipo 3 (LQTS3)

Pazienti con LQTS3 possiedono un elevato rischio di aritmie o bradicardia durante il sonno (Beaufort-Krol et al., 2005). L'ECG mostra solitamente un'onda T ritardata e appuntita e permette di riscontrare chiaramente un tratto ST (che insieme all'onda T corrisponde alla ripolarizzazione delle cellule miocardiche, figura 9b) prolungato (figura 8) (Zareba et al., 2006). Questi pazienti hanno solitamente meno sintomi rispetto a quelli con LQTS1 o LQTS2, ma gli eventi (aritmie o bradicardie) sono maggiormente letali. Il gene mutato è SCN5A, che codifica per la subunità alfa del canale del sodio Nav1.5, localizzato sul cromosoma 3 (3p21-24). La mutazione del gene SCN5A ha una penetranza vicina al 90% ed è causa di malattia nel 5-10% dei casi. L'inattivazione difettosa del canale permette un ingresso sostenuto di Na⁺ durante la fase 2 (plateau, figura 9a) del potenziale d'azione, prolungando la sua durata.




Type	Current	Functional Effect	Frequency Among LQTS	ECG ^{12,13}	Triggers Lethal Cardiac Event ¹⁰	Penetrance*
LQTS1	K	↓	30%-35%		Exercise (68%) Emotional Stress (14%) Sleep, Repose (9%) Others (19%)	62%
LQTS2	K	↓	25%-30%		Exercise (29%) Emotional Stress (49%) Sleep, Repose (22%)	75%
LQTS3	Na	↑	5%-10%		Exercise (4%) Emotional Stress (12%) Sleep, Repose (64%) Others (20%)	90%

Figura 8: correlazione genotipo-fenotipo dei tre tipi più comuni di LQTS.

2.4.2.4 Sindrome del QT lungo di tipo 4 (LQTS4)

Il tipo 4 è una varietà molto rara di sindrome del QT lungo, e comprende solamente circa l'1% dei casi. E' una forma atipica che produce un ampio specchio di aritmie (Mohler et al., 2004), inoltre il valore di QTc può essere nei limiti normali in molti pazienti. Il gene affetto è ANKB, localizzato sul cromosoma 4, che codifica per l'anchirina-β, una proteina strutturale che connette la pompa Na⁺/K⁺ ATPasi, lo

scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e il recettore per gli inositoli trifosfati dei cardiomiociti con le proteine del citoscheletro. Mutazioni che causano una perdita di funzione dell'anchirina- β portano ad un aumento della concentrazione del calcio intracellulare e ad un'alterazione dell'espressione della pompa Na^+/K^+ ATPasi e dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. L'elevata concentrazione di calcio dà origine a post-potenziamenti precoci (early after-depolarizations: EADs) o tardivi (delayed after-depolarizations: DADs). Così, le aritmie ventricolari osservate in pazienti con mutazioni genetiche a carico dell'anchirina- β sono dovute a depolarizzazioni spontanee, di solito in risposta a stimolazione catecolaminergica.

2.4.2.5 Sindrome del QT lungo di tipo 5 (LQTS5)

La LQTS5 deriva da cambiamenti nella sequenza del gene *KCNE1*, localizzato sul cromosoma 21 (Splawski et al., 1997). Questo gene codifica per la subunità beta del canale del potassio *I_{ks}*, anche conosciuta come subunità *minK*. Meno dell'1% dei casi di LQTS fa parte della sindrome di tipo 5.

2.4.2.6 Sindrome del QT lungo di tipo 6 (LQTS6)

Il gene affetto nella sindrome di tipo 6 è il *KCNE2*, localizzato sul cromosoma 21 (Abbott et al., 1999). Questo gene codifica per la subunità beta del canale del potassio *I_{kr}*, anche conosciuta come subunità *MiRP1*. Meno dell'1% dei casi di LQTS fa parte della sindrome di tipo 6.

2.4.2.7 Sindrome del QT lungo di tipo 7 (LQTS7)

Conosciuta anche come sindrome di Andersen-Tawil, questa condizione è un'alterazione autosomica dominante caratterizzata da paralisi provvisorie, anomalie nello sviluppo scheletrico, aritmie ventricolari con frequenti extrasistole e una suscettibilità particolare a sviluppare fibrillazioni ventricolari, specialmente nelle donne (Zhang et al., 2005). Nel 70% dei casi viene riscontrata una mutazione a carico del gene *KCNJ2* localizzato sul cromosoma 17, che codifica per il canale di potassio rettificante *Kir 2.1*. Questo canale partecipa alla fase 4 (di riposo, figura 9a) del potenziale d'azione.

2.4.2.8 Sindrome del QT lungo di tipo 8 (LQTS8)

La sindrome del QT lungo di tipo 8 deriva da mutazioni a carico del gene CACNA1 localizzato sul cromosoma 12, che codifica per il canale del calcio di tipo L $Ca_v1.2$. Questa patologia è anche definita come sindrome di Timothy (Splawski et al., 2004), una condizione caratterizzata da malformazioni cardiache, deficienze immunitarie intermittenti, ipoglicemia, alterazioni cognitive comprendenti l'autismo, fusione interdigitale e QT prolungato che sfocia in aritmia e morte improvvisa (Splawski et al., 2005). Meno dello 0,8 % dei casi di LQTS fa parte del tipo 8.

2.4.2.9 Sindrome del QT lungo di tipo 9 (LQTS9)

Questa varietà della sindrome del QT lungo deriva da una mutazione nel gene CAV3, localizzato sul cromosoma 3 (3p25), che codifica per la caveolina 3, il sottotipo specifico del muscolo scheletrico e cardiaco. Alcuni canali ionici co-localizzano nelle caveole, compresa un'isoforma cardiaca del canale del sodio $Na_v1.5$. Sono state recentemente descritte diverse mutazioni a carico di questa proteina che in vitro alterano le sue caratteristiche biofisiche generando un fenotipo simile a quello osservato nel LQTS3 (Vatta et al., 2006). Meno dell'1% dei casi di LQTS possono essere attribuiti a questa causa.

2.4.2.10 Sindrome del QT lungo di tipo 10 (LQTS10)

Il tipo 10 è stato descritto in un caso molto grave con un parametro $QT_c > 600ms$ e bradicardia fetale. Risulta dalla mutazione del gene SCN4B, localizzato sul cromosoma 11, che codifica per la sub unità $\beta-4$ del canale del sodio (Medeiros et al., 2006). L'incidenza della mutazione a carico di questo gene non è stata misurata, ma si stima essere responsabile di meno dell'1% dei casi di LQTS.

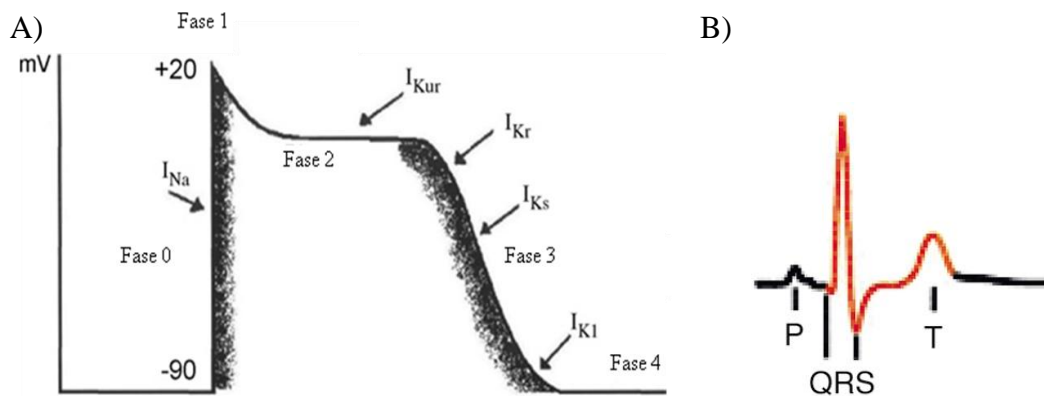


Figura 9: A) Potenziale d'azione cardiaco. Sono indicate le varie fasi: fase 0: depolarizzazione rapida; fase 1: ripolarizzazione parziale (incisura); fase 2: plateau; fase 3: ripolarizzazione; fase 4: fase di riposo; le frecce indicano le diverse correnti che intervengono nelle varie fasi. B) ECG. Le lettere indicano le varie fasi: onda P: depolarizzazione atri; complesso QRS: depolarizzazione ventricoli; onda T: ripolarizzazione ventricoli (da Duan 2009).

2.4.3 Terapie

La terapia standard per controllare e prevenire i fenomeni di sincope e morte improvvisa, si basa sull'assunzione di β -bloccanti. Vengono prescritti diversi tipi di β -bloccanti in base alle caratteristiche cliniche del paziente. Nel caso in cui il paziente non tollerasse i β -bloccanti si interviene attraverso processi più invasivi. In pazienti con un blocco atrioventricolare viene inserito un pacemaker. Dati statistici provenienti dall'International Registry of LQTS, dimostrano che in un periodo di due anni, il numero di casi di persone alle quali è stato inserito un pacemaker che presentano fenomeni di sincope è diminuito in maniera significativa. Un'alternativa al pacemaker è LCSD (left cardiac sympathetic denervation). Questa procedura prevede la rimozione dei primi quattro gangli toracici. LCSD previene le aritmie letali dell'LQTS. Nel caso in cui il paziente presentasse ancora fenomeni di sincope, si procede all'impianto di un defibrillatore ICD (Moss et al., 2000).

2.5 SCOPO DEL LAVORO

Come precedentemente accennato, dai nostri collaboratori della clinica Mayo di Rochester (Prof. Ackerman), è stata recentemente identificata una mutazione in eterozigosi nel gene che codifica per ICln. La mutazione oggetto di indagine è

l'inserzione di una Timina in posizione 383 nella sequenza nucleotidica. Questa inserzione produce un frameshift, che si traduce, nella sequenza aminoacidica, in una sequenza scrambled di 12 aminoacidi a partire dall'aminoacido 128, e una terminazione precoce per la comparsa di un codone di stop a livello del codone 140 (A128FSX139). Tale mutazione è stata individuata in una paziente cui la familiarità, i sintomi e il valore di QTc dell'elettrocardiogramma hanno evidenziato fosse affetta dalla Sindrome del QT lungo (LQTS). E' importante sottolineare che nella paziente in esame non sono state trovate altre mutazioni considerate patogeniche dei geni generalmente coinvolti nella LQTS, eccezion fatta per il comune polimorfismo in SCN5A (NaV1.5) H558R.

Al fine di chiarire l'ipotetico ruolo funzionale di ICln nella Sindrome del QT lungo, lo scopo del mio lavoro è stato la caratterizzazione funzionale dell'isoforma umana della proteina ICln wild type (hICln wt) e A128FSX139 (che abbiamo definito, per semplicità, hICln M1).

A questo proposito, hICln M1 è stata espressa in E. coli e purificata, per effettuare la ricostituzione funzionale in membrane lipidiche artificiali (tecnica del black lipid bilayer). Inoltre, sono stati eseguiti esperimenti di patch clamp in configurazione whole cell in cellule di mammifero dove è stata precedentemente overespressa la proteina hICln M1. In entrambi i casi l'attività e le caratteristiche elettrofisiologiche presentate da hICln M1 sono state confrontate con quelle della proteina wild-type.

Cap.3

Materiali e metodi Parte I

3.1 PLASMIDI

3.1.1 pET3-His (per overespressione delle proteine di interesse in E. coli)

L' "Open Reading Frame" (ORF) codificante per l'isoforma umana di ICl_n (hICl_n) è stato subclonato nel vettore pET3-His (figura 10), gentilmente fornito dal Professor T. Hai della Ohio State University, utilizzando i siti di restrizione per Xho I e Bam HI posti rispettivamente a monte e a valle della regione codificante. L'ORF di hICl_n viene a trovarsi così "in frame" con una sequenza codificante per sei istidine, posta a monte dell'ATG di inizio. La trascrizione dell'inserto è sotto controllo del promotore riconosciuto dalla T7-RNA polimerasi. Tale costrutto contiene una sequenza che conferisce resistenza all'ampicillina e può essere incorporato in E. coli BL21(DE3) e overespresso: i batteri originano quindi una proteina ricombinante dove all'estremità N-terminale di hICl_n è fusa la coda di 6 istidine detta His-tag. Tramite questa è possibile purificare la proteina per cromatografia di affinità, utilizzando colonnine contenenti resina Ni-NTA (Quiagen).

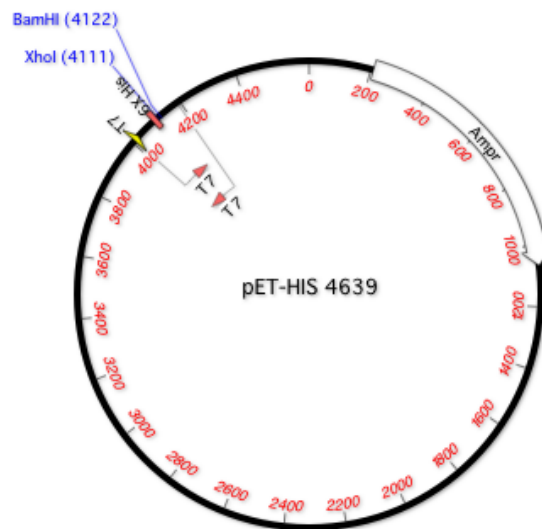


Figura 10: vettore pET3-His; esso contiene: un sito di clonaggio multiplo con siti di restrizione unici per diversi enzimi, che permette di inserire il frammento di interesse in frame con una sequenza codificante per 6 istidine; un gene marker, che conferisce la resistenza all'ampicillina; un promotore (riconosciuto dalla T7 RNA polimerasi) e un terminatore della trascrizione; un'origine di replicazione per la propagazione in E. coli.

3.1.2 pIRES2-EGFP (per overespressione delle proteine di interesse in cellule eucariotiche usate per il patch-clamp)

Per overesprimere le proteine in cellule eucariotiche (sulle quali sono stati effettuati gli esperimenti di patch-clamp) è stato usato il vettore d'espressione pIRES2-EGFP (Clontech, figura 11); tale vettore è stato utilizzato per la trasfezione delle cellule HEK293 Phoenix col metodo del calcio fosfato (paragrafo 3.8). Questo è un plasmide bicistronico codificante per la proteina EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) e la proteina oggetto di studio. Il pIRES2-EGFP contiene l'*internal ribosomal entry site* (IRES) dell' *encephalomyocarditis virus* (ECMV), posto tra l'MCS (Multiple Cloning Site, che consente l'inserimento di un ORF d'interesse) e la sequenza codificante per la EGFP. Ciò consente la traduzione del cDNA di interesse (contenuto nel MCS) e della EGFP da un singolo mRNA bicistronico come due proteine distinte, evitando cioè la formazione di una proteina di fusione (Morgan et al., 1992). L'overespressione è promossa da un promotore clonato dal citomegalovirus (P_{CMV}). L'EGFP è una variante della wild-type GFP, che è stata ottimizzata per una maggiore espressione nelle cellule di mammifero (eccitazione massima $\lambda = 488$ nm; emissione massima $\lambda = 507$ nm): la sequenza codificante contiene più di 190 mutazioni silenti che permettono la formazione di codoni espressi preferenzialmente nell'uomo. Il vettore contiene anche: una cassetta che codifica per il gene che conferisce la resistenza alla neomicina del Tn5 (Neo^r) e rende possibile ottenere delle trasfezioni stabili; una cassetta che codifica per il gene che conferisce a *E. coli* la resistenza alla kanamicina (Kan^r).

Descrizione tratta da: https://www.clontech.com/images/pt/dis_vectors/PT3267-5.pdf.

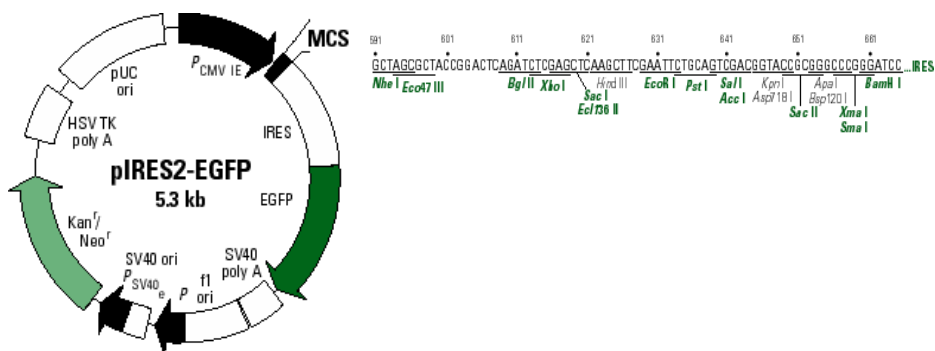


Figura 11: vettore pIRES2-EGFP; esso contiene: un promotore del citomegalovirus (P_{CMV}) un sito interno di entrata dei ribosomi (IRES) del virus ECMV tra MSC (sito di clonaggio multiplo) e l'inizio della regione codificante per la proteina verde fluorescente EGFP. Ciò permette sia alla proteina di interesse, sia a EGFP, di essere tradotte separatamente da un singolo mRNA bicistronico. Inoltre contiene un gene marker che conferisce la resistenza alla kanamicina e alla neomicina (kan/neo) e sequenze per segnali di poliadenilazione.

3.1.3 pFLAG-CMV-4 (per overespressione delle proteine di interesse in cellule eucariotiche usate per il Western blot)

Il vettore d'espressione pFLAG-CMV-4 (figura 12) contiene: un promotore (CMV) clonato da Cytomegalovirus, che permette l'overespressione delle proteine, clonate nel multiple cloning site (MCS), come proteine di fusione con una corta sequenza FLAG Nterminale, corrispondente ad 8 amminoacidi idrofilici (DYKDDDDK). Il FLAG viene poi usato come epitopo di riconoscimento della proteina di fusione da parte di un anticorpo commerciale specifico (anti-FLAG).

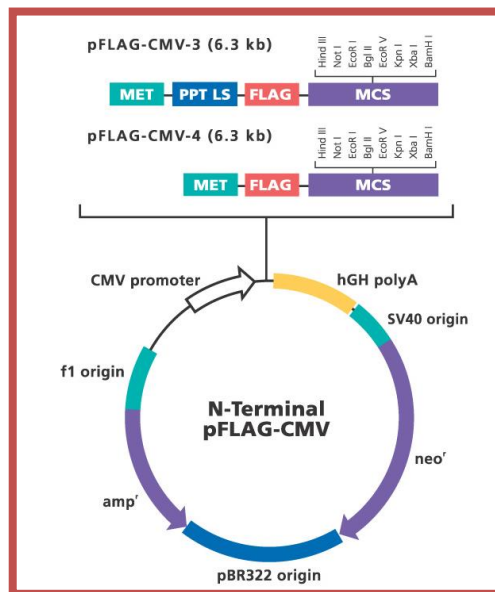


Figura 12: pFLAG-CMV-4; esso contiene: il promotore del citomegalovirus (CMV promoter), un sito di clonaggio multiplo che permette di inserire il cDNA di interesse in frame con una sequenza codificante per il peptide FLAG, due sequenze marker che conferiscono resistenza all'ampicillina e alla neomicina.

3.2 MUTAGENESI SITO SPECIFICA

La mutagenesi sito-specifica permette di introdurre qualsiasi modifica nucleotidica in qualsiasi posizione desiderata nel DNA clonato. I sistemi più semplici ed efficaci

utilizzano gli oligonucleotidi sintetici come primers in una reazione di estensione enzimatica in vitro. Gli oligonucleotidi vengono disegnati in modo che siano complementari al DNA stampo parentale eccetto che per i nucleotidi che definiscono la mutazione, solitamente posti al centro del primer stesso.

Le mutazioni che vogliamo ottenere nella sequenza di hICln umana sono:

- hICln M1: inserzione di una Timina in posizione 383 nella sequenza nucleotidica. Questa inserzione produce un frameshift che si traduce con una terminazione precoce nella sequenza aminoacidica (A128FSX139); questa mutazione verrà inserita in tutti e tre i vettori utilizzati: pET3-His, pFLAG-CMV-4 e pIRES2-EGFP (figura 13);
- hICln M1rc: mutazione conservativa dei codoni rari che codificano per le Arginine (R131, R138) nella sequenza aminoacidica scrambled di hICln M1 (figura 13);
- hICln M1rc GGG: sostituzione di tre aminoacidi ingombranti (R131, M132, P133) con tre Glicine nella sequenza aminoacidica scrambled di hICln M1 (figura 13);
- hICln wt 127, hICln wt 139: due forme tronche della proteina hICln wt (figura 13);
- hICln M1rc 133, hICln M1rc 136: due forme tronche della proteina hICln M1 (figura 13).

Queste ultime sei mutazioni verranno effettuate solamente nel vettore pET3-His.

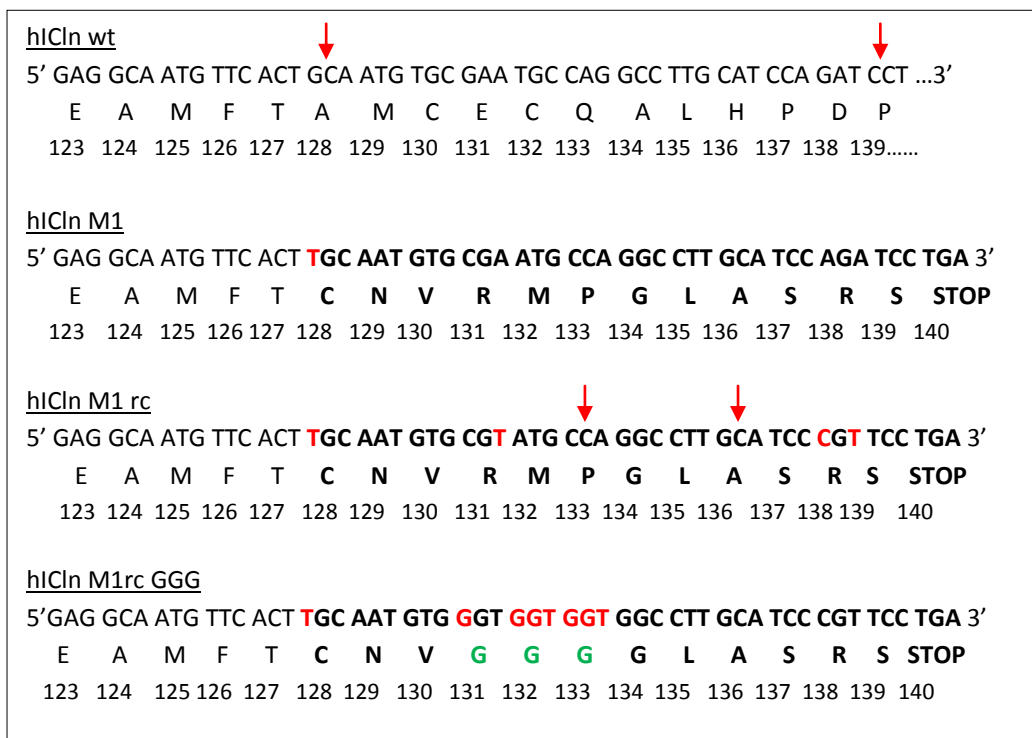


Figura 13: sequenze nucleotidiche e aminoacidiche di hICln wt e delle tre mutazioni hICln M1, hICln M1rc e hICln M1rc GGG. In grassetto sono indicati gli aminoacidi dello scrambled e la sequenza nucleotidica corrispondente; in rosso i nucleotidi mutati e l'inserzione della timina, in verde le tre glicine. Le frecce rosse indicano dove si hanno le due troncazioni in corrispondenza della sequenza di hICln wt (hICln wt 127, hICln wt 139) e in corrispondenza della sequenza hIClnM1 RC (hICln M1rc 133, hICln M1rc136).

I primers da noi utilizzati sono:

hICln M1

fwd: 5' G GAG GCA ATG TTC ACT **TGC** AAT GTG CGA ATG CC 3'

rev: 5' GG CAT TCG CAC ATT GCA AGT GAA CAT TGC CTC C 3'

(utilizzati su templatato hICln wt pET3-His, hICln wt p-FLAG e hICln wt pIRES2-EGFP; in rosso è evidenziata l'inserzione della Timina).

hICln M1rc

fwd: 5' GC AAT GTG **CGT** ATG CCA GGC CTT GCA TCC **CGT** TCC TGA GGA TGA GG 3'

rev: 5'CC TCA TCC TCA GGA **ACG** GGA TGC AAG GCC TGG CAT **ACG** CAC ATT GC 3'

(utilizzati su templatato hICln wt pET3-His; in rosso sono evidenziati i codoni codificanti per le Arginine, in grassetto i nucleotidi mutati all'interno di tali codoni).

hICln M1rc GGG

fwd: 5' C ACT TGC AAT GTG **GGT GGT GGT** GGC CTT GCA TCC 3'

rev: 5' GGA TGC AAG GCC **ACC ACC ACC** CAC ATT GCA AGT G 3'

(utilizzati su templatato hICln M1rc pET3-His; in rosso sono evidenziate le mutazioni inserite).

hICln wt 127

fwd: 5' G GAG GCA ATG TTC ACT **TGA** AAT GTG CGA ATG CCA GG 3'

rev: 5' CC TGG CAT TCG CAC ATT **TCA** AGT GAA CAT TGC CTCC 3'

(utilizzati su templatato hICln wt pET3-His; in rosso è evidenziato il codone di STOP).

hICln wt 139

fwd: 5' G CAT CCA GAT CCT **TAG** GAT GAG GAT TCA G 3'

rev: 5' C TGA ATC CTC ATC **CTA** AGG ATC TGG ATG C 3'

(utilizzati su templatato hICln wt pET3-His; in rosso è evidenziato il codone di STOP).

hICln M1rc 133

fwd: 5' GC AAT GTG CGT ATG CCA **TGA** CTT GCA TCC CGT TCC 3'

rev: 5' GGA ACG GGA TGC AAG **TCA** TGG CAT ACG CAC ATT GC 3'

(utilizzati su templatato hICln M1rc pET3-His; in rosso è evidenziato il codone di STOP).

hICln M1rc 136

fwd: 5' G CCA GGC CTT GCA **TAA** CGT TCC TGA GGA TGA GG 3'

rev: 5' CC TCA TCC TCA GGA ACG **TTA** TGC AAG GCC TGG C 3'

(utilizzati su templatato hICln M1rc pET3-His; in rosso è evidenziato il codone di STOP).

3.2.1 Reazione di PCR

Viene utilizzato il kit QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, secondo le istruzioni del fornitore che verranno qui descritte in breve.

Il primo passaggio consiste in una reazione di PCR. La miscela per PCR è così composta:

1	H ₂ O	40.5	µl
2	Buffer	5.0	µl
3	Primer fwd (10 µM)	1.5	µl
4	Primer rev (10 µM)	1.5	µl
5	dNTPs	1.0	µl

Si aggiungono poi 1 µl di Pfu Turbo DNA Polimerasi, 20 µl di olio minerale per PCR e 0.5 µl di DNA templatato (hICln wt pET3-His, hICln M1rc pET3-His, hICln wt pFLAG e hICln wt pIRES2-EGFP 100 µg/µl). La miscela viene preparata su ghiaccio e successivamente spinnata.

La reazione di PCR prevede i seguenti steps:

1) Step di denaturazione iniziale (1 ciclo):

DENATURAZIONE

95°C

3 minuti

2) Step di amplificazione (12 cicli):

DENATURAZIONE	ANNEALING	ELONGATION
---------------	-----------	------------

95°C	55°C	68°C
------	------	------

30 secondi	1 minuto	10 minuti
------------	----------	-----------

La temperatura di annealing viene calcolata in base alla temperatura di melting dei primers e deve essere inferiore a questa di almeno 5 °C. Durante la fase di elongation la temperatura viene impostata in base alla DNA-polimerasi utilizzata (la pFu-turbo richiede 68 °C) e il tempo è calcolato, approssimando per eccesso, in base alla lunghezza del plasmide e dell'inserto (1 minuto di tempo per ogni Kbase) che nel nostro caso sono lunghi rispettivamente 4636 e 675 nucleotidi (5,311 Kbase).

3.2.2 Digestione con Dpn1

Terminata la PCR si aggiunge al DNA amplificato 1 μ l di enzima di restrizione Dpn1. Questo enzima va a tagliare e degradare il DNA metilato; per questo degraderà il DNA plasmidico parentale wild type che è stato utilizzato come stampo della reazione di PCR. Tale DNA è metilato, in quanto viene propagato in *E. coli*; al contrario, il DNA mutagenizzato risultato dalla reazione di PCR, non è metilato, in quanto è frutto di una reazione di sintesi in vitro, e non verrà degradato. Si incuba il tutto a 37 °C per un'ora.

3.2.3 Trasformazione

Un'aliquota di batteri competenti XL-1-Blue (50 μ l) viene lasciata scongelare lentamente in ghiaccio (10 minuti circa). Vengono quindi aggiunti 50-100 ng di vettore per aliquota, si mescola delicatamente e si lascia in ghiaccio per altri 30 minuti. I batteri vengono quindi sottoposti a shock termico a 42 °C per 45 secondi, e riposti in ghiaccio per 2 minuti. Ad essi vengono poi aggiunti 250 μ l di terreno liquido LB (Luria Broth, Sigma, 20 g/l) contenente glucosio 20 mM preriscaldato a 37 °C, si mescola delicatamente e si lasciano in incubazione per 1 ora a 37 °C in agitazione, per consentire ai batteri di esprimere il gene per la resistenza all'antibiotico (Ampicillina o Kanamicina).

Successivamente i batteri vengono piastrati su piastre LB Agar preriscaldate, contenenti Ampicillina 100-200 μ g/ml o Kanamicina 30 μ g/ml, e lasciati a incubare a 37 °C per tutta la notte.

3.2.4 Miniprep

Si preparano 3 ml di terreno LB con antibiotico in provette "alu cap" o in Falcon da 15 ml per ogni miniprep da preparare, vi si aggiunge una colonia batterica per provetta, utilizzando un puntale sterile per prelevarla dalla piastra, e si mette a incubare a 37 °C per 12-17 ore. Si trasferisce poi 1.5 ml di coltura in eppendorf da 1.5 ml e si centrifuga utilizzando una centrifuga Mini Spin ($r = 4$ cm) a 4000 rpm per 10 minuti. Si elimina il surnatante, si risospende completamente il pellet batterico in 100 μ l di Soluzione I (soluzione di risospensione, contiene RNAsi e viene tenuta in ghiaccio) e si lascia a temperatura ambiente per 5 minuti. A questo punto si

aggiungono 200 µl di Soluzione II, si agita capovolgendo delicatamente la provetta e si lascia in ghiaccio per 5 minuti. La soluzione II serve per lisare i batteri; contiene infatti NaOH che causa una lisi alcalina della parete cellulare. Contiene inoltre SDS, che denatura le macromolecole (DNA genomico e plasmidico, proteine) presenti in soluzione, inducendone la flocculazione o precipitazione. Si aggiungono poi 150 µl di Soluzione III, si agita come prima e si lascia in ghiaccio per 5 minuti. La Soluzione III è una soluzione acida che serve per neutralizzare il pH alcalino della Soluzione II. Tale soluzione indurrà una rinaturazione delle macromolecole, che sarà solo parziale per DNA genomico e proteine, e totale per il DNA plasmidico, che tornerà in soluzione. Al termine, si centrifuga a 13000 rpm per 15 minuti e si trasferisce il surnatante, contenente il DNA plasmidico, in una nuova eppendorf con 1 ml circa di etanolo (EtOH), la si agita su vortex e la si lascia a -80 °C per 15 minuti. Si precipita il DNA plasmidico centrifugando a 12000 rpm per 5 minuti; al termine si aspira il surnatante, si lava il pellet con 500 µl di EtOH al 70% freddo e si centrifuga a 12000 rpm per 2 minuti. Infine, si elimina il sovrantante, si asciuga il pellet sotto vuoto per 10 minuti circa e si risospende in 10 µl di TE (Tris-EDTA) o di acqua milliQ.

Soluzioni:

<u>Soluzione I</u>	<u>Soluzione II</u>	<u>Soluzione III</u>
50 mM glucosio	0.2 N NaOH	3 M KOAc
25 mM Tris pH 8	0.1% SDS	1.5% acido acetico glaciale
10 mM EDTA		pH 4.8
100 µg/ml RNAsi A		

Tutte le soluzioni sono sterilizzate per filtrazione.

Il DNA plasmidico ottenuto dalle miniprep viene controllato tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio dopo digestione (si veda oltre) e sequenziato per conferma dell'avvenuta mutagenesi (servizio Microsynth CH); il DNA plasmidico della miniprep viene poi sottoposto ad amplificazione su larga scala (largeprep).

3.2.5 Largeprep

Sono stati sempre utilizzati Kit per largeprep Nucleobond AX-500.

Si parte dal pellet ottenuto da una coltura batterica di 400 ml risospeso in 12 ml di buffer S1 (Nucleobond) contenente RNAasi. Vengono quindi aggiunti 12 ml di buffer S2 (Nucleobond), si mescola delicatamente capovolgendo la provetta e si incuba a temperatura ambiente per 5 minuti. Si aggiunge il buffer S3 (Nucleobond), si agita delicatamente fino a far diventare omogenea la sospensione e la si incuba in ghiaccio per 5 minuti. Si versa quindi il contenuto del contenitore in un filtro posto all'interno di un imbuto. Ciò che non è trattenuto dal filtro viene raccolto in una colonna (Nucleobond AX-500), precedentemente pre-equilibrata con 6 ml di buffer N2 (Nucleobond). Si lascia eluire, dopodichè si eseguono 2 lavaggi con 16 ml di buffer N3 (Nucleobond). A questo punto il DNA plasmidico legato alla colonna viene eluito con 15 ml di buffer N5 (Nucleobond). Il plasmide purificato viene precipitato con 11 ml di isopropanolo a temperatura ambiente e centrifugato a 15000 g a 4 °C per 30 minuti. Al termine della centrifugata si elimina il sovrnatante e si lava il pellet con 5 ml di etanolo al 70%. Si esegue una seconda centrifugata a 15000 g per 10 minuti a 4 °C. Si elimina il sovrnatante e si lascia evaporare tutto l'etanolo. Il pellet di DNA viene risospeso in 100-200 µl di acqua milliq e dosato allo spettrofotometro ($\lambda = 260 \text{ nm}$).

L'intero inserto di ogni plasmide viene poi sequenziato per verificare l'assenza di mutazioni indesiderate (servizio Microsynth CH).

3.2.6 Elettroforesi di DNA su gel di agarosio

Per un gel di agarosio all'1%, 0,4 g di agarosio vengono sciolti in 40 ml di buffer TAE 0.5X (Fermentas) portato ad ebollizione. Si lascia raffreddare fino a 50 °C circa, si aggiungono 40 µl di etidio bromuro 500 µg/ml (Sigma) e si versa nell'apposito vassoio.

Il campione viene preparato aggiungendo Loading Dye 6X (Fermentas) in quantità tale da ottenere una concentrazione finale 1X. La corsa viene condotta a voltaggio costante di 100 V, utilizzando come tampone di corsa TAE 0.5X. Come marker è stato generalmente utilizzato il Mass Ruler DNA Ladder mix (Fermentas).

3.3 INDUZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA IN E. coli

3.3.1 Preparazione dei batteri chemiocompetenti

I batteri del ceppo BL21 (DE3), utilizzato per l'espressione della proteina, vengono lasciati crescere "overnight" a 37 °C in 3 ml di terreno liquido LB (Luria Broth, Sigma, 20 g/l) privo di antibiotici. La mattina successiva 3 ml della coltura vengono diluiti in 200 ml di LB e incubati a 37 °C fino al raggiungimento di una densità ottica a $\lambda = 600$ nm (O.D.₆₀₀) pari a 0.7. I batteri a questo punto vengono trasferiti in 4 provette sterili da centrifuga, lasciati in ghiaccio 30 minuti e poi centrifugati utilizzando una centrifuga Heraeus Multifuge 3SR (r= 8,5 cm) a 3000 rpm per 15 minuti a 4 °C. Il sovrantante viene eliminato, mentre ogni pellet viene risospeso delicatamente in 2 ml di buffer RF1; gli 8 ml totali vengono lasciati in ghiaccio per 15-30 minuti. Al termine, i batteri sono nuovamente raccolti centrifugando a 3000 rpm per 10 minuti a 4 °C e risospesi in 2 ml di buffer RF2. Vengono quindi aliquotate frazioni da 100 μ l in eppendorf sterili, immediatamente congelate in azoto liquido e tenute a -80 °C fino al momento della trasformazione.

Soluzioni:

<u>RF1</u>	<u>RF2</u>
100 mM RbCl	10 mM RbCl
30 mM acetato di potassio (KOAc)	10 mM MOPS
10 mM CaCl ₂	75 mM CaCl ₂
15% (w/v) glicerolo	15% (v/v) glicerolo
50 mM Cloruro di Manganese	
pH 5.8 con acido acetico	pH 6.8 con NaOH

Tutte le soluzioni sono sterilizzate per filtrazione.

3.3.2 Trasformazione

Una o più aliquote di batteri competenti vengono lasciate scongelare lentamente in ghiaccio (10 minuti circa). Vengono quindi aggiunti 50-100 ng di vettore (plasmide pET-His contenente l'ORF della proteina d'interesse) per aliquota, si mescola delicatamente e si lascia in ghiaccio per altri 10 minuti. I batteri vengono quindi

sottoposti a shock termico a 42 °C per 45 secondi, e riposti in ghiaccio per 2 minuti. Vengono poi aggiunti ad ogni aliquota 250 µl di LB contenente glucosio 20 mM preriscaldato a 37 °C, il contenuto della eppendorf viene mescolato delicatamente e posto in incubazione per 30 minuti a 37 °C in assenza di agitazione, per consentire ai batteri di esprimere il gene per la resistenza agli antibiotici. Successivamente i batteri vengono piastrati su piastre LB agar preriscaldate, contenenti ampicillina 100 µg/ml, e lasciati a incubare a 37 °C per tutta la notte.

La mattina dopo una ventina di colonie vengono prelevate dalla piastra con un'ansa sterile e aggiunte in una beuta con 100 ml di LB sterile preriscaldato, contenente Ampicillina 100-200 µg/ml. La coltura è lasciata ad incubare in agitazione a 37 °C, fino al raggiungimento di una $O.D._{600} = 0.8$. Viene quindi indotta la sintesi della proteina aggiungendo IPTG (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) ad una concentrazione finale di 2 mM. I batteri vengono lasciati a incubare per altre 4 ore. L'IPTG agisce come derepressore dell'operone lac contenuto nel DNA genomico dei batteri, al cui interno è presente il gene per la T7 RNA polimerasi. I batteri diverranno così in grado di produrre la proteina, codificata dal plasmide pET3-His, la cui trascrizione è controllata dal promotore T7 (figura 10).

Infine, i batteri vengono divisi in due Falcon da 50 ml e raccolti centrifugando a 1600 g per 15 minuti; i pellet sono congelati a -80 °C fino al momento dell'estrazione della proteina.

3.4 PURIFICAZIONE DELLE PROTEINE da E. coli

Le proteine ricombinanti overesprese in E. coli vengono purificate tramite cromatografia per affinità utilizzando colonnine (spin-column Ni-NTA, Qiagen, Hilden, Germania) la cui resina, contenente ioni Nickel, presenta alta affinità per i 6 residui di Istidine che costituiscono l'His tag. Questo metodo permette la purificazione da un lisato batterico sia in condizioni native che in condizioni denaturanti (figura 14).

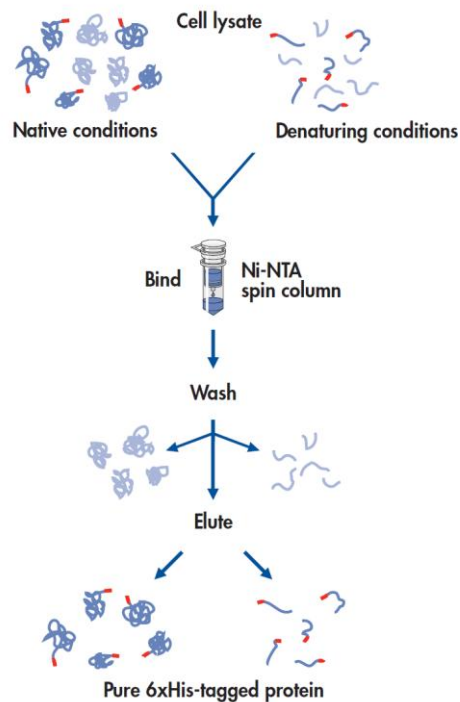


Figura 14: tecnica di purificazione per cromatografia di affinità delle proteine overespresso in *E. coli* mediante il vettore *pET3-His*.

3.4.1 Purificazione in condizioni native

Il pellet congelato ottenuto da 50 ml di coltura batterica viene risospeso su ghiaccio in 2 ml di buffer di lisi N, aliquotato in due eppendorf e sottoposto a tre cicli di congelamento in azoto liquido e scongelamento in bagnetto a una temperatura di 30-37 °C, al fine di determinare la lisi cellulare. Le due eppendorf sono centrifugate utilizzando una centrifuga Mini Spin ($r = 4$ cm) a 13000 rpm a 4 °C per 10 minuti, per eliminare i frammenti di parete e membrana. 750 μ l del sovrantante sono caricati su una colonnina (spin-column Ni-NTA, Qiagen) preequilibrata con 750 μ l di buffer di lisi N. Le colonnine vengono centrifugate a 2000 rpm per 2 minuti, l'eluato è eliminato e si procede con 2 centrifugate di lavaggio, ognuna effettuata con 750 μ l di buffer di lavaggio N a 2000 rpm per 2 minuti.

L'eluizione della proteina avviene in 300 μ l di buffer di eluizione N, contenente alta concentrazione di imidazolo, che compete con le istidine dell'His-tag per il legame con gli ioni Ni^{2+} presenti nella colonnina. L'eluato è aliquotato e conservato a -80 °C fino al momento dell'uso. La concentrazione finale delle proteine nel buffer di eluizione viene determinata con il metodo di Bradford.

Soluzioni:

<u>Buffer di lisi N</u>	<u>Buffer di lavaggio N</u>	<u>Buffer di eluizione N</u>
50 mM K ₂ HPO ₄	50 mM K ₂ HPO ₄	50 mM K ₂ HPO ₄
-----	10 mM imidazolo-HCl	200 mM imidazolo-HCl
pH 8.0 con KOH 1N	pH 8.0 con KOH 1N	pH 8.0 con KOH 1N

3.4.2 Purificazione in condizioni denaturanti

Elevati livelli di espressione di proteine ricombinanti in una varietà di sistemi di espressione può condurre alla formazione di aggregati insolubili; in E. coli, questi sono noti come corpi di inclusione o “inclusion bodies”. La purificazione in condizioni denaturanti prevede l’utilizzo di soluzioni ad alta concentrazione di urea (8 M) e a pH decrescente.

Il pellet congelato ottenuto da 50 ml di coltura batterica viene fatto scongelare in ghiaccio e risospeso (sempre su ghiaccio) in 2 ml di buffer di lisi D. Il lisato così ottenuto viene quindi incubato in agitazione per 1 ora a temperatura ambiente.

Al termine dell’incubazione, il lisato viene aliquotato in due eppendorf che vengono centrifugate a 10000 g a temperatura ambiente per 20 minuti. 600 µl del sovrantante sono caricati su una colonnina (spin-column Ni-NTA, Qiagen) preequilibrata con 600 µl di buffer di lisi D. Le colonnine vengono centrifugate a 700 g per 3 minuti, l’eluato è eliminato e si procede con 2 centrifugate di lavaggio, ognuna effettuata con 600 µl di buffer di lavaggio D a 700 g per 3 minuti.

L’eluizione della proteina avviene in 200 µl di buffer di eluizione D, che grazie al suo pH acido (4.5) fa sì che la proteina si stacchi dalla resina. L’eluato è aliquotato e conservato a -80 °C fino al momento dell’uso. La concentrazione finale delle proteine nel buffer di eluizione viene determinata con il metodo di Bradford.

Soluzioni:

<u>Buffer di lisi D (pH 8)</u>	<u>Buffer di lavaggio D</u>	<u>Buffer di eluizione D</u>
8 M Urea	8 M Urea	8 M Urea
0,01 M NaH ₂ PO ₄	0,01 M NaH ₂ PO ₄	0,01 M NaH ₂ PO ₄
pH 8.0	pH 6.3	pH 4.5

3.5 SDS-PAGE

L'SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*), consiste in un'elettroforesi di estratti proteici su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato, ossia in condizioni denaturanti. Brevemente, le miscele per lo "stacking" e il "running" gel (si veda oltre per la composizione) vengono preparate senza APS (ammonio persolfato) per evitare l'innesco della reazione di polimerizzazione. Viene quindi aggiunto l'APS alla miscela per il "running" gel, che viene mescolata e versata tra i vetri. Il fronte viene isolato dall'ossigeno atmosferico aggiungendo acqua. Il gel è lasciato polimerizzare (30 minuti circa), successivamente l'acqua viene eliminata ed è aggiunto l'APS allo "stacking" gel, che viene quindi versato tra i vetri sopra il "running" gel. Vengono inseriti i pettini per la formazione dei pozzetti e il gel viene lasciato polimerizzare.

I campioni proteici sono addizionati di Sample Buffer 4X in modo da raggiungere una concentrazione finale 1X e vengono denaturati bollendoli a bagnomaria per 5 minuti, centrifugati per pochi secondi ad alta velocità e caricati nei pozzetti del gel. La corsa elettroforetica è condotta a voltaggio costante di 120-150 V in buffer di corsa ELPHO. Al termine, il gel viene colorato per 2 ore, in blanda agitazione, con una soluzione di acido acetico al 7% contenente Blue di Coomassie R-250 (Sigma) allo 0.1% (w/v). La decolorazione è effettuata in acido acetico al 10%.

Soluzioni:

	240 mM Tris-HCl pH 6.8
<u>Sample buffer 4X:</u>	SDS 4% (w/v)
	Blu di bromofenolo 0.008% (w/v)

0.2 M β -mercaptoetanolo

Buffer di corsa ELPHO:

25 mM Tris-base

200 mM glicina

3.5 mM SDS

pH 8.3

	<u>Stacking gel 4%</u>	<u>Running gel 12.5%</u>
Miscela acrilamide (30%)/ Bisacrilammide (0.8%)	1.25 ml	8.3 ml
Acqua bidistillata	6 ml	6.3 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	2.5 ml	-
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	-	5 ml
10% SDS	100 μ l	200 μ l
10% APS	100 μ l	200 μ l
Temed	3.5 μ l	7 μ l
Volume finale	10 ml	20 ml

3.6 WESTERN BLOT

Il Western blot viene eseguito sulle proteine totali estratte dalle cellule HEK293 Phoenix (vedi paragrafo 3.9) e sulle proteine overesprese in E.coli e quindi purificate in condizioni native (paragrafi 3.3.2 e 3.4.1). In quest'ultimo caso sono stati caricati su gel sia la frazione di pellet, sia il surnatante ottenuti in seguito alla centrifugazione del lisato batterico, sia l'eluato ottenuto dal passaggio finale della purificazione. Dopo brevi prove di messa a punto abbiamo stabilito di caricare 0,5 μ g di proteina purificata e dei volumi di pellet e surnatante tali da contenere quantità comparabili di proteina.

3.6.1 Trasferimento

Al termine della corsa su gel le proteine devono essere trasferite su una membrana PVDF per mezzo di un elettroblotter. La membrana, pretrattata con metanolo, viene preequilibrata nel Buffer di trasferimento insieme alla carta da filtro e al gel. In seguito si monta l'apparato: la membrana viene posta tra i due elettrodi in platino, rivolta verso l'anodo, a contatto con il gel ed il tutto viene posizionato tra due fogli di carta da filtro (Biorad 162-0177).

Il trasferimento avviene ad un voltaggio costante di 80V per 2 ore a 4°C.

Al termine il gel viene colorato con Blue di Comassie R-205 (Sigma) 0,4% in acido acetico al 7% (Baby Lact) mentre la membrana viene lavata due volte con TBS-T a temperatura ambiente, in agitazione rotante.

3.6.2 Blocco

Alla fine del trasferimento, la membrana viene incubata con una soluzione di TBS-T addizionato a polvere di latte al 5%, in agitazione orbitante per un'ora, a temperatura ambiente.

3.6.3 Anticorpo primario

Successivamente la membrana viene sottoposta a due lavaggi da 10 minuti con TBS-T, per poi essere incubata over-night a 4°C con l'anticorpo primario opportunamente diluito (vedi tabella).

Anticorpi primari :

anti-His	1:1000 in BSA 3%	Abcam (ab18184)
anti-FLAG	1:1000 in polvere di latte al 5%	Sigma Aldrich (F3165)
anti-Na-K atpasi	1:5000 in polvere di latte al 5%	Upstate (50-369)

3.6.4 Anticorpo secondario

Il mattino seguente si effettuano quattro lavaggi da 10 minuti con TBS-T a temperatura ambiente, in agitazione orbitante. In seguito la membrana viene incubato per un'ora sempre in agitazione, con una soluzione 1:5000 dell'anticorpo secondario (anti-mouse Pierce) sciolto in TBS-T addizionato di polvere di latte al 5%. Al termine si effettuano altri quattro lavaggi da 10 minuti ognuno in TBS-T.

3.6.5 Sviluppo

Il segnale è stato visualizzato mediante il kit “SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate” della Pierce, seguendo le istruzioni del produttore. Il substrato presente nel reagente (Luminol), se ossidato dalla perossidasi del rafano coniugata all’anticorpo secondario (o primario nel caso dell’anti-His), in presenza di H_2O_2 ed in condizioni alcaline, passa in uno stato eccitato. Il decadimento dallo stato eccitato allo stato fondamentale avviene per emissione di luce (chemioluminescenza) e tale segnale è stato acquisito con il sistema Biospectrum AC imaging system (UVP).

A sviluppo avvenuto, la membrana PVDF può essere colorata tramite una breve incubazione in Rosso di Ponceau 0,1% (Sigma) in acido acetico al 5%.

Soluzioni:

<u>TBS-T</u>	<u>Buffer di trasferimento</u>
Tris HCl 15 mM pH=8.8	Metanolo 20%
NaCl 150 mM	Tris base 48mM
Tween 20 0.1%	Glicina 39mM

3.7 COLTURE CELLULARI

Come modello cellulare sono state utilizzate HEK293 Phoenix, cellule embrionali umane di derivazione renale con caratteristiche di crescita a monostrato aderente. Queste cellule sono state coltivate in piastre Petri da 10 cm, in un incubatore alla temperatura ottimale di crescita di 37 °C e al 5% di CO₂ in terreno MEM (Minimal Essential Medium, Sigma M5650) addizionato di Siero Bovino Fetale (Fetal Bovin Serum F- 2442, Cambrex Bio Science), 2 mM L-glutammina, 100 µg/ml penicillina, 100 U/ml streptomycina (Penicillin Streptomycin solution P0781, Sigma) e 1 mM acido piruvico (sodium salt, Sigma). Le cellule vengono splittate ogni 2-3 giorni con tripsina-EDTA 0.05% previo lavaggio con PBS (Phosphate Buffered Saline, si veda oltre per la composizione). Per gli esperimenti che prevedevano la trasfezione, le

cellule sono state seminate in multi-wells da 6 pozzetti (con pozzetti del diametro di 3,5 cm) e trasfettate una volta raggiunta una confluenza del 50-80%.

3.8 TRASFEZIONE CON pIRES2-EGFP-hICln wt e M1 o pFLAG-CMV-4-hICln wt e M1 (metodo della co-precipitazione del calcio fosfato)

Per trasfettare transientemente le cellule HEK293 Phoenix è stato usato il metodo della co-precipitazione del fosfato di calcio. Le cellule sono state seminate in multi-wells da 6 pozzetti e lasciate crescere almeno 12 ore fino al raggiungimento di una confluenza del 50-80% e quindi, a seconda dell'esperimento da eseguire in seguito, trasfettate con:

- vettore pIRES-EGFP o pFLAG-CMV-4 vuoto
- vettore pIRES-EGFP o pFLAG-CMV-4 hICln wt
- vettore pIRES-EGFP o pFLAG-CMV-4 hICln M1

3 µg DNA sono stati disciolti in acqua sterile e mescolati con 7.5 µl di una soluzione di CaCl₂ 2.5 M in modo da arrivare ad un volume finale di 75 µl. Dopo aver miscelato accuratamente venivano aggiunti 75 µl di HBS 2X. La soluzione veniva lasciata in incubazione 20 minuti a temperatura ambiente e successivamente distribuita goccia a goccia sulle cellule, mescolando delicatamente. Nel caso delle cellule trasfettate con il plasmide pIRES2-EGFP, destinate agli esperimenti di patch clamp, le piastre sono state messe in incubatore per 8 ore, successivamente lavate due volte con PBS (Phosphate Buffered Saline), trattate con tripsina e seminate su vetrini da microscopia del diametro di 1 cm.

Dopo almeno 24 ore dalla trasfezione, le singole cellule che esprimono il segnale per la EGFP sono state selezionate per gli esperimenti di patch clamp mediante microscopia a fluorescenza.

Soluzioni:

<u>HBS 2x (pH 7.5)</u>	<u>PBS (pH 7.4)</u>
NaCl 140 mM	NaCl 136,89 mM
Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM	Na ₂ HPO ₄ 3,21 mM
HEPES 50 mM	KCl 2,69 mM
	KH ₂ PO ₄ 1,47 mM

3.9 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE TOTALI

Per l'estrazione delle proteine totali destinate agli esperimenti di Western Blot, è stato utilizzato il seguente procedimento: dopo aver eliminato il terreno da ogni multi-well, le cellule (HEK293 Phoenix transfettate con i vettori pFLAG-CMV-4 vuoto o codificante per hICln wt o M1) venivano lavate una volta con PBS. Rimosso quest'ultimo, venivano aggiunti 200 µl di passive lysis buffer (Promega), a cui era stato addizionato un inibitore delle proteasi (Complete EDTA-free, Boehringer); le cellule venivano successivamente raccolte tramite scraping. L'omogenato ottenuto è stato quindi centrifugato a 1000 g allo scopo di eliminare il particolato costituito da cellule non lisate e detriti cellulari. La concentrazione finale delle proteine è stata determinata con il metodo di Bradford. Successivamente i campioni sono stati addizionati di Sample Buffer 4X in modo da raggiungere una concentrazione finale 1X e denaturati bollendoli per 5 minuti, centrifugati per pochi secondi ad alta velocità e caricati nei pozzetti del gel.

3.10 ESPERIMENTI DI RICOSTITUZIONE IN BILAYERS LIPIDICI MACROSCOPICI

La procedura usata è stata descritta in dettaglio da Benz e collaboratori (Benz et al., 1992).

I lipidi utilizzati per la costruzione delle membrane artificiali (sfingomieline; Sigma, S7004) sono stati acquistati sotto forma di polvere liofilizzata e successivamente

sciolti in cloroformio (concentrazione finale del 2%, w/v). Il cloroformio è poi fatto evaporare con un Rotavapor e i lipidi disciolti in n-decano, in modo da ottenere una concentrazione finale del 2%.

Per la ricostituzione in bilayers lipidici di area macroscopica è stata utilizzata una camera in teflon divisa in due compartimenti (figura 15), definiti cis e trans, contenenti ognuno 5 ml di soluzione. Sulla parete divisoria è presente un foro delle dimensioni di 1 mm² circa. Dopo opportuna sterilizzazione della cameretta, si procede alla costruzione di un anello lipidico (Diph-PC, 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocoline) (Avanti Polar; P/N 850356C) attorno al foro per conferire stabilità alla membrana; dopo essiccazione dell'anello di lipidi in forno a 100 °C per 15 minuti, sul poro vengono depositi dal lato trans, servendosi di una spatolina in teflon, 4 µl di fosfolipidi (sfingomieline, si veda sopra).

Al fine di formare un bilayer stabile ed eliminare l'eventuale eccesso di lipidi, vengono costruite in successione tre membrane di controllo, monitorate per 5 minuti ad un potenziale di -50 mV. In seguito, si aggiunge nel compartimento cis un'opportuna quantità di proteina, in modo tale da avere una concentrazione finale di 500 ng/ml. Se la proteina si inserisce nella membrana, si può registrarne l'attività elettrica grazie al set-up sperimentale riportato schematicamente in figura 15: due elettrodi di riferimento Ag/AgCl (Metrohm, Svizzera) in KCl saturo sono connessi alle soluzioni in contatto con il bilayer mediante una coppia di ponti agar 4% in KCl 3 M; gli elettrodi sono inoltre connessi in serie con una batteria (cis) e con un convertitore corrente/voltaggio (trans), costruito utilizzando un amplificatore operativo Burr Brown.

Generalmente il fattore di amplificazione è 10¹¹ V/A e il segnale è filtrato a 3.3 o 33 Hz; il segnale è poi inviato a un registratore a carta ed analizzato. Se la proteina non si inserisce in membrana, quest'ultima viene distrutta dopo 45 minuti. Tutti gli esperimenti sono stati condotti alla temperatura di 28°C, mantenuta attraverso la termostatazione della cameretta.

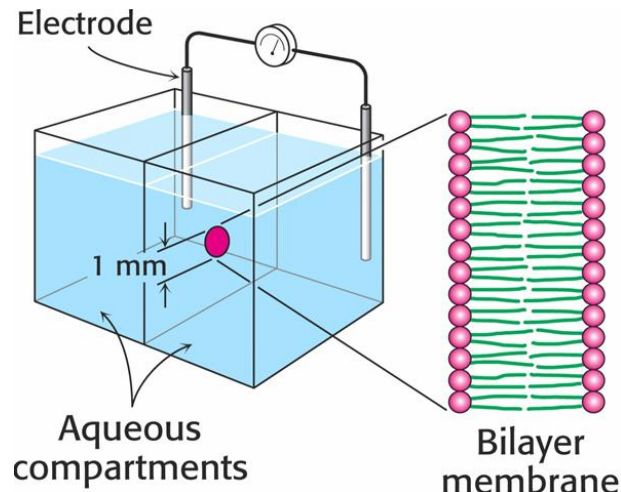


Figura. 15: schema della cameretta in teflon utilizzata per gli esperimenti di ricostituzione in membrane lipidiche macroscopiche, e del set-up sperimentale che permette la registrazione dell'attività elettrica.

La corrente indotta in seguito all'inserimento in membrana di ICln viene registrata a diversi voltaggi (+50, +25, 0, -25 o -50 mV) in modo da poter ottenere una relazione corrente/voltaggio e calcolare poi il punto di inversione.

Per determinare la selettività delle proteine ricostituite, a cavallo della membrana si induce un gradiente di concentrazione ionica, ponendo nei compartimenti cis e trans soluzioni contenenti diverse concentrazioni di KCl. Poiché la costruzione del bilayer richiede tempo, si può avere una parziale riduzione di questo gradiente; quindi, alla fine di ogni esperimento, si recuperano entrambe le soluzioni e si misura il gradiente di Cl^- ($\Delta\text{PD}_{\text{Cl}^-}$) mediante una coppia di elettrodi selettivi al cloruro. Il valore del $\Delta\text{PD}_{\text{Cl}^-}$ di ogni singolo esperimento è poi utilizzato per calcolare la permeabilità relativa del K^+ rispetto a Cl^- ($P_{\text{K}}/P_{\text{Cl}}$) mediante l'equazione di Goldman-Hodgkin-Katz. I rispettivi potenziali di inversione sono calcolati per interpolazione grafica.

Soluzioni:

	<u>CIS</u>	<u>TRANS</u>
KCl	10 mM	150 mM
HEPES	5 mM	5 mM

Queste soluzioni sono state preparate a pH 8.0.

3.11 ESPERIMENTI DI PATCH-CLAMP

3.11.1 Procedure sperimentali

Per misurare la corrente di Cl^- indotta da rigonfiamento nelle cellule HEK293 Phoenix, è stato scelto il metodo del voltage clamp in configurazione whole-cell (figura 16). Tutte le misure sono state eseguite a temperatura ambiente, almeno 15 ore dopo l'ultimo passaggio di tripsinizzazione delle cellule. La soluzione di perfusione del bagno (extracellulare) e di riempimento della pipetta (intracellulare), descritte in seguito, sono state opportunamente scelte per permettere la misura di correnti del Cl^- . La realizzazione del sigillo in configurazione cell-attached ed il passaggio in whole-cell avvengono in soluzione extracellulare ipertonica; a questo punto, si controlla la stabilità del sigillo e l'assenza di correnti di leakage con i protocolli "rampa" ed "IV" descritti in seguito. Le condizioni ipotoniche sono stabilite almeno 2 min dopo il passaggio in configurazione whole-cell mediante una veloce sostituzione della soluzione extracellulare. Tale sostituzione si realizza sfruttando un sistema di perfusione con una velocità di flusso di 5 ml/min; il volume del bagno è di 300 μ l. Tale bagno era messo a terra con l'ausilio di un elettrodo Ag/AgCl. L'attivazione della corrente nel tempo è monitorata mediante il protocollo "sweeps a + 40 mV" descritto in seguito. L'entità della corrente, in condizioni di massima attivazione, è misurata di nuovo mediante i protocolli "rampa" ed "IV". Le pipette da patch-clamp sono ottenute da capillari in vetro borosilicato (diametro esterno = 1.65 ± 0.05 mm, diametro interno = 1.15 ± 0.05 mm, Garner Glass Company, Claremont), mediante un puller orizzontale (P-87, Sutter Instruments CO, USA). Le pipette, se necessario, subiscono un trattamento definito "fire polishing", che garantiva la levigatura e la pulizia della punta. La resistenza degli elettrodi, misurata nelle soluzioni indicate di seguito, è compresa tra i 3 e i 6 M Ω . Per l'acquisizione dei dati, si usa un amplificatore del tipo EPC10-USB (HEKA, Germania), collegato ad una scheda analogico digitale interna del tipo ITC-16 e controllato da un computer Mac mini (Apple), su cui è installato il programma Patchmaster (HEKA, Germania). Tutte le misure sono state acquisite con una frequenza di campionamento di 50 kHz e filtrate a 2,9 kHz con un filtro Bessel a 4 poli. I valori di densità di corrente (pA/pF) nelle relazioni corrente-tempo o corrente voltaggio sono stati determinati dalla

corrente media (pA) misurata nei 40 ms dell'intervallo tra 10 e 50 ms dopo l'inizio dell'impulso, normalizzata per la capacità della membrana di ogni singola cellula (pF). Non è mai stata effettuata la sottrazione della corrente di leakage alle correnti misurate.

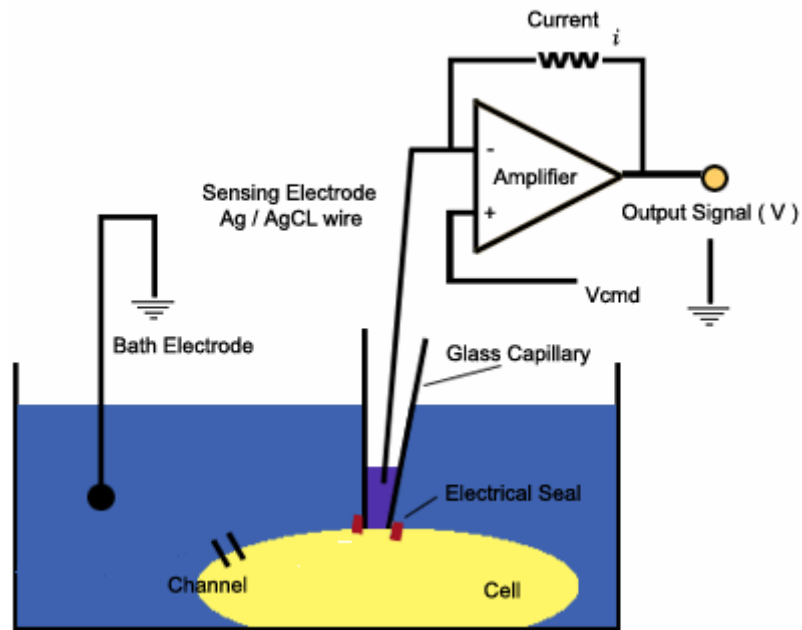


Figura 16: schema di un classico set up da Patch Clamp.

Soluzioni:

Soluzione standard di riempimento della pipetta (intracellulare)

CsCl 125 mM

MgCl₂ 5 mM

Raffinosio 50 mM

EGTA 11 mM

MgATP 2 mM

HEPES 10 mM

pH 7.2 aggiustato con CsOH o HCl

Osmolarità teorica 336 mOsm

Osmolarità reale circa 330 mOsm

Soluzione ipertonica per la perfusione del bagno (extracellulare)

NaCl 125 mM
MgCl₂ 2.5 mM
CaCl₂ 2.5 mM
HEPES 10 mM
Mannitolo 100 mM
pH 7.4 aggiustato con NaOH o HCl
Osmolarità teorica 375 mOsm
Osmolarità reale circa 360 mOsm

Soluzione ipotonica per la perfusione del bagno (extracellulare)

NaCl 125 mM
MgCl₂ 2.5 mM
CaCl₂ 2.5 mM
HEPES 10 mM
pH 7.4 aggiustato con NaOH o HCl
Osmolarità teorica 275 mOsm
Osmolarità reale circa 260 mOsm

3.11.2 Protocolli

IV: da un potenziale di holding di 0 mV si impartiscono impulsi di potenziale della durata di 500 ms da -120 a +100 mV, in incrementi di 20 mV.

Rampa: da un potenziale di holding di 0 mV si impone una variazione di potenziale continua da -120 a +100 mV della durata di 500 ms.

Sweeps a + 40 mV: da un potenziale di holding di 0 mV si impartisce ogni 20 sec un impulso di potenziale di +40 mV della durata di 400 ms. La corrente si considera giunta a stabilità (massima attivazione o *steady state*) se il valore della corrente media si mantiene costante per almeno 1 min.

3.11.3 Microscopia

Tutte le cellule usate per gli esperimenti di elettrofisiologia sono state osservate con un microscopio a contrasto di fase (Microscope inverted Axiovert 200A, Zeiss). Le cellule trasfettate sono state osservate col medesimo microscopio equipaggiato con

una lampada Xenon (XBO75W) e filtri della serie n° 9 (ZEISS). Le caratteristiche dei filtri sono le seguenti:

Eccitazione: BP 450-490 nm

Beam splitter: 510 nm

Emissione: LP 520 nm

3.12 ANALISI STATISTICA

Per l'analisi dei dati analisi, sono stati sfruttati i programmi Pulse Fit (HEKA, Germania) ed Excel (Microsoft) o PRISM (GraphPad, USA).

Tutti i valori sono espressi come media +/- errore standard; per l'analisi statistica sono stati applicati i test del t di Student, del χ^2 o il test F. Le differenze tra i dati sono assunte come statisticamente significative quando $p \leq 0,05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Cap.4
Risultati Parte I

4.1 INDUZIONE DELLA MUTAZIONE M1 NEL cDNA DI hICln NEI VETTORI D'ESPRESSIONE PET-3 HIS, P-FLAG-CMV-4 E P-IRES2-EGFP

Come già accennato nell'introduzione, dai nostri collaboratori della Mayo Clinic di Rochester (Prof. Ackerman), è stata recentemente identificata una mutazione in eterozigosi (che abbiamo definito per semplicità M1) nel gene che codifica per ICln. La mutazione oggetto di indagine è l'inserzione di una Timina in posizione 383 nella sequenza nucleotidica che produce un frameshift, che si traduce in una sequenza scrambled di 12 aminoacidi a partire dall'aminoacido 128, e in una terminazione precoce (A128FSX139, figura 17).

5'	ACT	TGC	AAT	GTG	CGA	ATG	CCA	GGC	CTT	GCA	TCC	AGA	TCC	TGA	GGA	TGA	3'
Nt	T	C	N	V	R	M	P	G	L	A	S	R	S	STOP	G	STOP	Ct
	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	

Figura 17: sequenza aminoacidica e nucleotidica della proteina hICln M1. In grassetto sono riportate: la sequenza aminoacidica scrambled e la corrispondente sequenza nucleotidica; in rosso è indicata l'inserzione della Timina nella sequenza nucleotidica.

Tale mutazione è stata individuata in una paziente in cui la familiarità, i sintomi e il valore di QTc dell'elettrocardiogramma hanno evidenziato fosse affetta dalla Sindrome del QT lungo. La paziente non presentava altre mutazioni né nel gene che codifica per ICln né in altri geni comunemente coinvolti nella patologia eccezion fatta per il comune polimorfismo in SCN5A (NaV1.5) H558R; inoltre lo screening di altri 800 alleli in una popolazione di riferimento non ha mai evidenziato questa mutazione in soggetti sani. Al fine di chiarire l'ipotetico ruolo funzionale di ICln nella Sindrome del QT lungo, si è proceduto alla caratterizzazione funzionale dell'isoforma umana della proteina ICln wild type (hICln wt) e della mutazione M1, sia tramite esperimenti di ricostituzione funzionale in membrane lipidiche artificiali (tecnica del black lipid bilayer), sia con esperimenti di patch clamp in configurazione whole cell in cellule di mammifero, dove la proteina è stata precedentemente overespressa.

In primo luogo, il cDNA codificante per l'isoforma umana della proteina wt è clonato all'interno dei vettori di espressione pET3-His, p-FLAG-CMV-4 e p-IRES2-

EGFP è stato sottoposto a mutagenesi sito specifica (figura 18), al fine di produrre la proteina mutata di nostro interesse da utilizzare poi rispettivamente per:

- overespressione delle proteine di interesse in *E. coli*;
- overespressione delle proteine di interesse in cellule eucariotiche usate per il Western blot;
- overespressione delle proteine di interesse in cellule eucariotiche usate per il patch clamp.

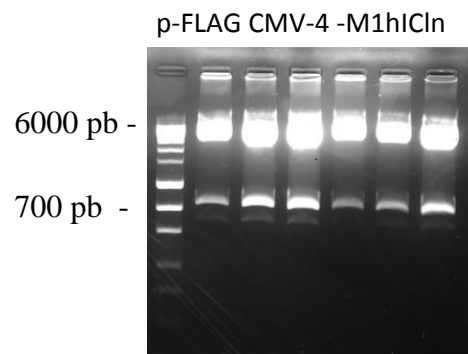


Figura 18: elettroforesi su gel di agarosio delle estrazioni plasmidiche su piccola scala ottenute in seguito a mutagenesi sito-specifica di hICln nel vettore p-FLAG-; le preparazioni plasmidiche sono state sottoposte a digestione con gli enzimi di restrizione HindIII e BamHI; la banda a 700 pb corrisponde all'inserto codificante per hICln, quella a 6000 pb corrisponde al plasmide. Dopo sequenziamento, è stato opportunamente selezionato un clone contenente la mutazione desiderata.

Dalla lettura dell'elettroferogramma ottenuto dal sequenziamento dei vettori p-ET3-His, p-FLAG-CMV-4 e p-IRES2-EGFP mutagenizzati abbiamo ottenuto una sequenza che è stata inserita nel programma Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) per ottenere l'allineamento con le sequenze nucleotidiche riportate nel data-base; il migliore allineamento corrisponde alla sequenza codificante per ICln umana. Per semplicità in figura 19 è stata riportata la sola sequenza corrispondente alla mutagenesi nel p-FLAG-CMV-4 dove si può notare che la mutazione desiderata si è inserita (in rosso sono evidenziati il codone di inizio e di stop, la timina inserita è evidenziata in fucsia, in verde una mutazione conservativa).

[ref|NM_001293.2|](#) Homo sapiens chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A (CLNS1A),

GENE ID: 1207 CLNS1A | chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A [Homo sapiens] (Over 10 PubMed links)

```

Query 1  ATGAGCTTCCTCAAAGTTTCCCGCCGCTGGGCCAGCGGAGGGGCTCCTGCGGCAGCAG 60
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 93  ATGAGCTTCCTCAAAGTTTCCCGCCGCTGGGCCAGCGGAGGGGCTCCTGCGGCAGCAG 152

Query 61  CCAGACACTGAGGCTGTGCTGAACGGGAAGGGCCTCGGCACTGGTACCCTTTACATCGCT 120
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 153  CCAGACACTGAGGCTGTGCTGAACGGGAAGGGCCTCGGCACTGGTACCCTTTACATCGCT 212

Query 121  GAGAGCCGCTGTCTTGGTTAGATGGCTCTGGATTAGGATTCTCACTGGAATACCCACC 180
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 213  GAGAGCCGCTGTCTTGGTTAGATGGCTCTGGATTAGGATTCTCACTGGAATACCCACC 272

Query 181  ATTAGTTTACATGCATTATCCAGGGACCGAAGTGACTGTCTAGGAGAGCATTTGTATGTT 240
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 273  ATTAGTTTACATGCATTATCCAGGGACCGAAGTGACTGTCTAGGAGAGCATTTGTATGTT 332

Query 241  ATGGTGAATGCCAAATTTGAAGAAGAATCAAAGAACCTGTTGCTGATGAAGAAGAGGAA 300
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 333  ATGGTGAATGCCAAATTTGAAGAAGAATCAAAGAACCTGTTGCTGATGAAGAAGAGGAA 392

Query 301  GACAGTGATGATGATGTTGAACCTATTACTGAATTTAGATTTGTGCCAGTGATAAATCA 360
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 393  GACAGTGATGATGATGTTGAACCTATTACTGAATTTAGATTTGTGCCAGTGATAAATCA 452

Query 361  GCGTTGGAGGCAATGTTCACTGCAATGTGCGAATGCCAGGCCTTGCATCCAGATCC TGA 420
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 453  GCGTTGGAGGCAATGTTCACT-GCAATGTGCGAATGCCAGGCCTTGCATCCAGATCC TGA 511

Query 421  GGATGAGGATTCAGATGACTACGATGGAGAAGAATATGATGTGGAAGCACATGAACAAGG 480
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 512  GGATGAGGATTCAGATGACTACGATGGAGAAGAATATGATGTGGAAGCACATGAACAAGG 571

Query 481  ACAGGGGGACATCCCTACATTTTACACCTATGAAGAAGGATTATCCCATCTAACAGCAGA 540
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 572  ACAGGGGGACATCCCTACATTTTACACCTATGAAGAAGGATTATCCCATCTAACAGCAGA 631

Query 541  AGGCCAAGCCACACTGGAGAGATTAGAAGGAATGCTTTCTCAGTCTGTGAGCAGCCAGTA 600
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 632  AGGCCAAGCCACACTGGAGAGATTAGAAGGAATGCTTTCTCAGTCTGTGAGCAGCCAGTA 691

Query 601  TAATATGGCTGGGGTCAGGACAGAAGATTCAATAAGAGATTATGAAGATGGGATGGAGGT 660
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 692  TAATATGGCTGGGGTCAGGACAGAAGATTCAATAAGAGATTATGAAGATGGGATGGAGGT 751

Query 661  GGATACCACACCAACAGTTGCTGGACAGTTTGAGGATGCAGATGT-GATCACTGA 714
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 752  GGATACCACACCAACAGTTGCTGGACAGTTTGAGGATGCAGATGTTGATCACTGA 806

```

Figura 19: sequenza nucleotidica ottenuta allineando il risultato del sequenziamento del vettore pFLAG-CMV-4 hICln wt mutagenizzato (query) con le sequenze contenute nel data base Blast (sbjct). Il miglior allineamento si ha con la sequenza codificante per ICln umana. In rosso sono evidenziati il codone di inizio e di stop, la timina inserita è evidenziata in fucsia, in verde una mutazione conservativa.

4.2 MESSA A PUNTO DELLA PURIFICAZIONE DELLA PROTEINA hICln M1

Il vettore pET3-His viene utilizzato per l'overespressione della proteina in E.coli BL21 (D3): i batteri generano così una proteina ricombinante, dove all'estremità N-terminale di hICln è fusa la coda di 6 istidine, detta His-tag, che permette di purificare la proteina per cromatografia di affinità, utilizzando colonnine contenenti resina Ni-NTA (Quiagen).

Tuttavia, in seguito all'overespressione di hICln M1 in batteri E. coli, a differenza di quanto osservato per hICln wt, non è stato possibile ottenere proteina purificata in condizioni native (altezza predetta per la banda circa 15KDa), come si può notare nel gel di poliacrilammide risultante (figura 20), nel quale sono stati caricati: il surnatante derivato dalla centrifugazione del lisato batterico (S), l'eluato che deriva dal passaggio del surnatante attraverso la colonnina (flowthrough, F) e l'eluizione finale della proteina con il buffer contenente l'imidazolo (E1, E2) (paragrafo 3.4.1 di Materiali e metodi della Parte I).

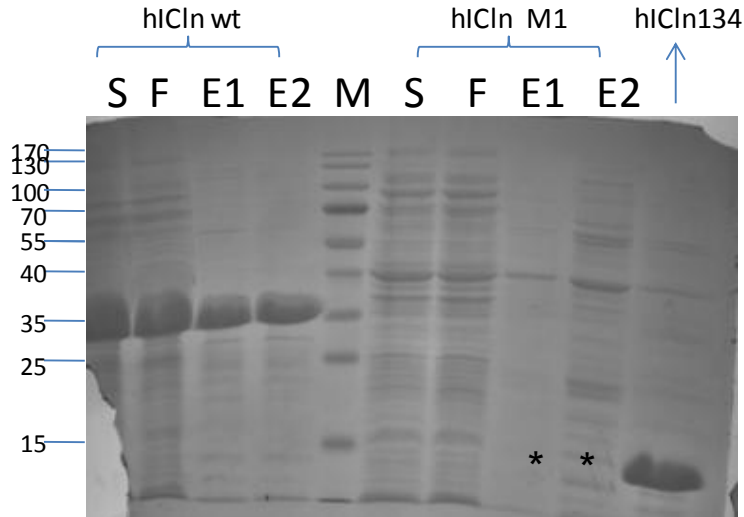


Figura 20: gel di poliacrilammide che mostra il risultato dalla purificazione di hICln wt (a sinistra) e ICln M1 (a destra). Come si può notare non è stato possibile purificare la proteina mutata tramite cromatografia per affinità in condizioni native. La proteina hICln 134 è stata caricata poiché banda più o meno alla stessa altezza predetta per hICln M1 (S: surnatante; F: flow through; E1,E2: eluati; M: marker).* gli asterischi indicano l'altezza attesa per la banda relativa a hICln M1 se la purificazione fosse avvenuta con successo.

La prima ipotesi da noi formulata è stata che in queste condizioni non fosse possibile purificare la proteina in quanto i batteri non erano in grado di produrla; infatti,

osservando la sequenza codificante per la porzione aminoacidica scrambled, abbiamo notato al suo interno la presenza di 2 codoni rari (poco frequenti nei geni di *E. coli* che possiede quindi meno tRNA che riconoscono quel codone). Siamo quindi andati a mutare tali codoni all'interno del cDNA codificante per hICln M1 convertendoli in codoni comuni e abbiamo chiamato questa mutazione hICln M1rc (figura 21).

hICln M1	ACT	TGC	AAT	GTG	CGA	ATG	CCA	GGC	CTT	GCA	TCC	AGA	TCC	TGA	GGA	TGA
	T	C	N	V	R	M	P	G	L	A	S	R	S	STOP	G	STOP
	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142
hICln M1 RC	ACT	TGC	AAT	GTG	CGT	ATG	CCA	GGC	CTT	GCA	TCC	CGT	TCC	TGA	GGA	TGA
	T	C	N	V	R	M	P	G	L	A	S	R	S	STOP	G	STOP
	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142

Figura 21: sequenze aminoacidiche e nucleotidiche di hICln M1 (in alto) e di hICln M1rc (in basso). In grassetto la sequenza aminoacidica scrambled, in rosso l'inserzione della Timina, in azzurro i codoni rari e in verde i nucleotidi mutati.

Tuttavia, anche in questo caso, in seguito all'overespressione e alla purificazione in condizioni native non abbiamo riscontrato la presenza della proteina nel gel di poliacrilammide risultante (figura 22).

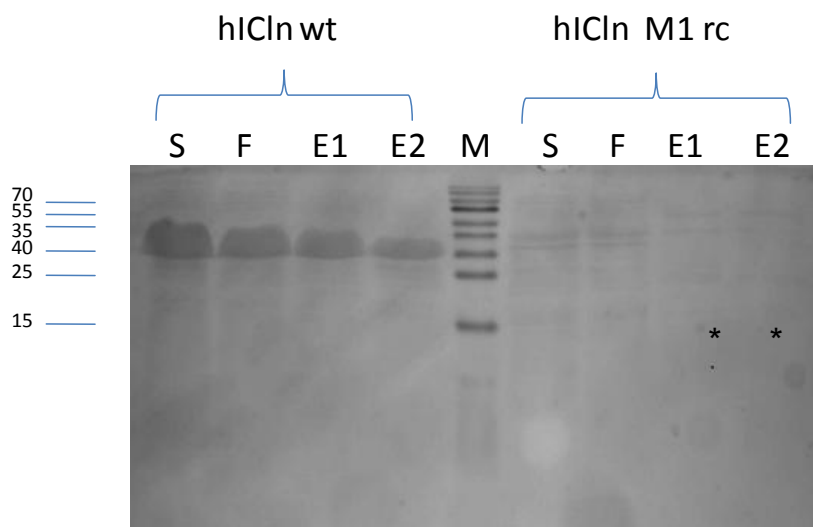


Figura 22: Gel di poliacrilammide che mostra il risultato della purificazione di hICln wt (a sinistra) e ICln M1rc (a destra). Anche in questo caso non è stato possibile purificare la proteina mutata tramite cromatografia per affinità in condizioni native (S: surnatante; F: flow through; E1, E2: eluati; M: marker). * gli asterischi indicano l'altezza attesa per la banda relativa a hICln M1rc se la purificazione fosse avvenuta con successo.

Ci siamo quindi chiesti se invece non fosse possibile purificare hICln M1 per la formazione di aggregati insolubili (inclusion bodies) all'interno dei batteri. Per

verificare la nostra ipotesi abbiamo eseguito un Western blot in condizioni denaturanti, utilizzando un anticorpo primario anti his-tag. Abbiamo caricato su gel sia la frazione di pellet, sia il surnatante ottenuti in seguito alla centrifugazione del lisato batterico, sia l'eluato ottenuto dal passaggio finale della purificazione. Quello che si è visto è che nel caso della proteina mutata, in accordo con la nostra ipotesi, compariva una banda solo in corrispondenza della frazione del pellet (figura 23).

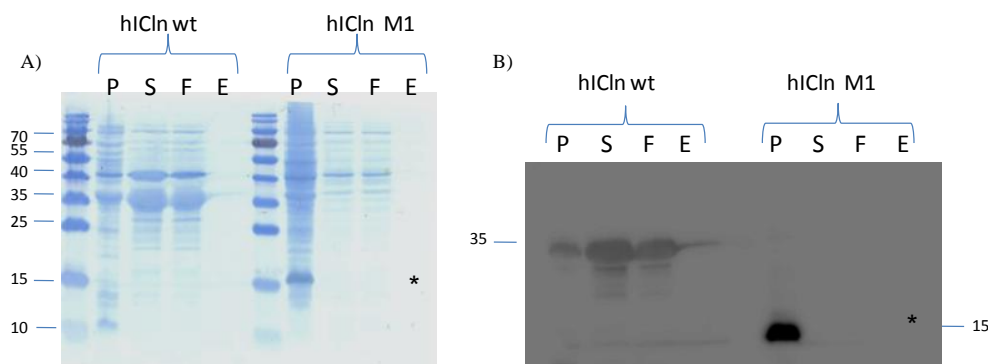


Figura 23: A) Colorazione con Blue di Coomassie del gel relativo alla corsa elettroforetica SDS-PAGE della purificazione in condizioni native delle proteine hICln wt e hICln M1 (P: pellet; S: surnatante; F: flow through; E: eluato). B) Western blot eseguito sugli stessi campioni di A, utilizzando come anticorpo primario l'anti his-tag (P: pellet; S: surnatante; F: flow through; E: eluato). Nel caso di hICln M1 sia in A che in B il segnale è riscontrabile solo in corrispondenza della corsia in cui è stato caricato il pellet (P). * gli asterischi indicano l'altezza attesa per la banda relativa a hICln M1 se la purificazione fosse avvenuta con successo.

Per indagare le ragioni di questo fenomeno, abbiamo effettuato ulteriori mutazioni sito-specifiche al fine di ottenere 2 forme tronche della proteina hICln wt: hICln wt 139 e hICln wt 127; e tre forme mutate della proteina hICln M1rc: hICln M1rc 136, hICln M1rc133 e hICln M1rc GGG in cui gli aminoacidi ingombranti Arginina, Metionina e Prolina nella sequenza scrambled sono stati mutati in Glicine (figura 24).

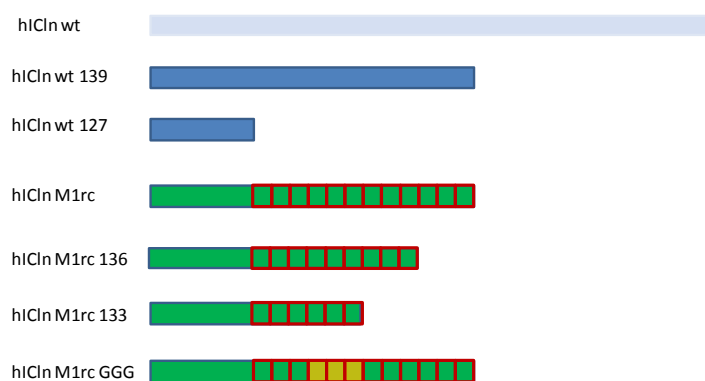


Figura 24: schema delle mutazioni prodotte a partire da hICln wt (in azzurro) e hICln M1 (in verde). I quadrati rossi rappresentano gli aminoacidi scrambled, quelli gialli gli aminoacidi Arginina, Metionina e Prolina nella sequenza scrambled che sono stati mutati in Glicine.

Tramite Western blot su lisato batterico si è visto che, ad eccezion fatta per la proteina hICln wt 139, tutte le altre erano presenti solamente nella frazione insolubile (figura 25).

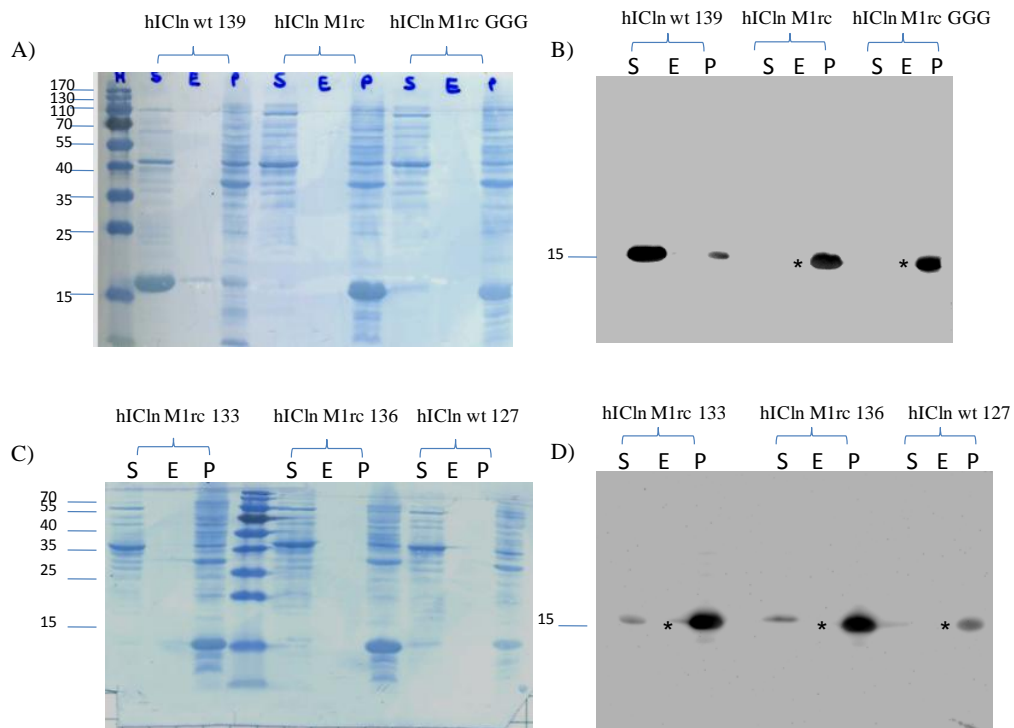


Figura 25: A) e C) Colorazione con Blue di Coomassie del gel relativo alla corsa elettroforetica SDS-PAGE della purificazione in condizioni native delle proteine hICln wt 139, hICln M1rc e hICln M1rc GGG (A) e hICln M1rc 133, hICln M1rc 136 e hICln wt 127 (C) (S: surnatante; E: eluato; P: pellet); B) e D) Western blot eseguito sugli stessi campioni di A) e D), utilizzando come anticorpo primario l'anti his-tag (S: surnatante; E: eluato; P: pellet). Ad eccezion fatta che per la proteina hICln wt 139, per tutte le altre proteine mutate il segnale è riscontrabile solo in corrispondenza della corsia in cui è stato caricato il pellet (P). * gli asterischi indicano l'altezza attesa per la banda relativa a hICln M1rc 133, hICln M1rc 136, hICln wt 127, hICln M1rc e hICln M1rc GGG se la purificazione fosse avvenuta con successo.

Per ovviare a questo problema si è dovuto procedere alla purificazione in condizioni denaturanti utilizzando soluzioni in cui è presente Urea 8M.

In queste condizioni la proteina hICln M1 è stata recuperata nella frazione solubile, ed è pertanto risultata purificabile come si può vedere dalla corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide (figura 26).

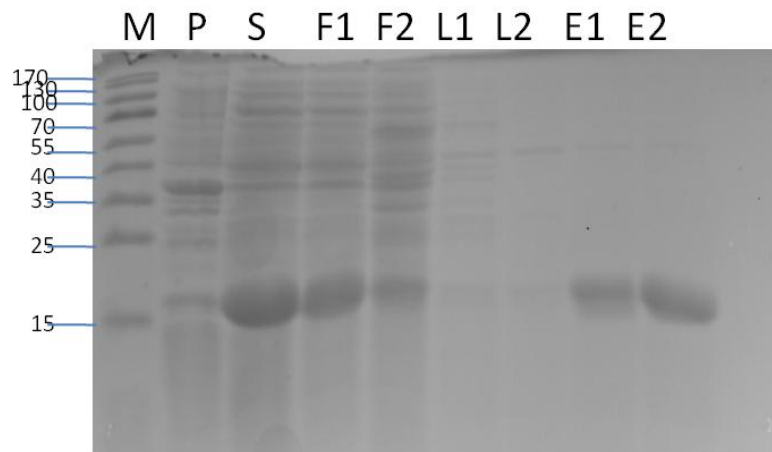


Figura 26: Gel di poliacrilammide che mostra il risultato dalla purificazione di hICln M1 in condizioni denaturanti (Urea 8M). In queste condizioni è stato possibile recuperare la proteina dal pellet e purificarla nella frazione solubile, come è possibile notare dal segnale presente in corrispondenza della corsia in cui sono caricati gli eluati (M: marker; P: pellet; S: surnatante; F1, F2: flow through; L1, L2: lavaggi; E1, E2: eluati).

Abbiamo poi verificato l'attendibilità di questo risultato anche tramite Western Blot utilizzando un anticorpo anti his-tag (figura 27).

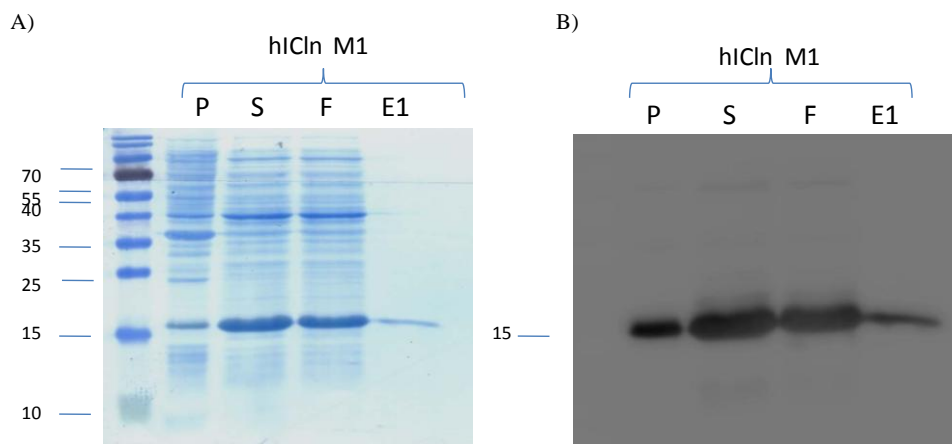


Figura 27: A) Colorazione con Blue di Coomassie del gel relativo alla corsa elettroforetica SDS-PAGE della proteina hICln M1 purificata in condizioni denaturanti (Urea 8M) (P: pellet; S: surnatante; F: flow through; E: eluato). B) Western blot eseguito sugli stessi campioni di A, utilizzando come anticorpo primario l'anti his-tag (P: pellet; S: surnatante; F: flow through; E: eluato). In queste condizioni è stato possibile rilevare il segnale anche in corrispondenza della corsia in cui è stato caricato l'eluato (E1).

4.3 RICOSTITUZIONE FUNZIONALE DI hICln wt E hICln M1 IN MEMBRANE LIPIDICHE ARTIFICIALI

Dopo aver messo a punto la procedura di purificazione, abbiamo eseguito esperimenti di ricostituzione funzionale della proteina in membrane artificiali (Black Lipid Bilayer). E' stata utilizzata una cameretta in teflon divisa da un setto trasversale in due compartimenti, denominati cis e trans; sulla parete di tale setto è presente un foro del diametro di 1 mm, sul quale viene costruito un bilayer con la composizione lipidica prescelta. La proteina viene aggiunta in quantità nota (0.5 µg/ml) nel compartimento cis; in tutti gli esperimenti sono mantenute le medesime condizioni sperimentali: una soluzione di KCl 10 mM viene inizialmente posta in entrambi i compartimenti e in seguito all'attivazione della proteina e alla comparsa di corrente la soluzione del compartimento trans viene sostituita con una a concentrazione 150 mM per creare un gradiente che permetta poi di determinare la selettività della proteina (vedere paragrafo 3.10 dei Materiali e metodi della Parta I); temperatura e pH vengono mantenute costanti (pH 8.0 e T=28 °C) durante tutta la durata dell'esperimento. Sia la proteina wt che la proteina mutata sono state ricostituite in membrane lipidiche artificiali di sfingomieline; negli esperimenti di controllo, al compartimento cis anziché il buffer contenente la proteina purificata, è stata aggiunta la medesima quantità (in termini di µl) del solo buffer contenente urea nel quale viene eluita la proteina (buffer di eluizione D, paragrafo 3.4.2 dei Materiali e metodi della Parte I).

Innanzitutto, andando ad osservare i valori di frequenza di comparsa di corrente, è possibile notare come non vi siano differenze statisticamente significative hICln wt e M1, mentre per entrambe si ha una differenza statisticamente significativa rispetto al controllo: per la proteina wt è stata osservata una comparsa di corrente ionica nell'8,73% dei casi, per la proteina mutata nell'8,3 % dei casi e per il controllo solamente nell'1,6% (figura 28).

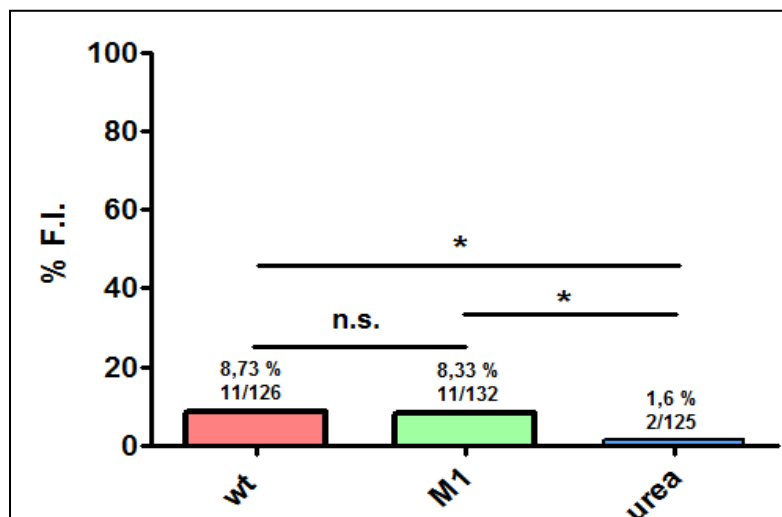


Figura 28: grafico relativo alle percentuali di comparsa di corrente riferite alla ricostituzione funzionale delle proteine hICln wt e hICln M1 e per gli esperimenti di controllo, in cui è stato utilizzato il solo buffer di eluizione contenente urea (Test del χ^2 , * = $p < 0,05$).

Inoltre, non si riscontrano differenze statisticamente significative tra hICln wt e hICln M1 nemmeno per quanto riguarda la selettività ionica (pK^+/pCl^-): per entrambe le proteine nel 100% dei casi si hanno correnti K^+ selettive (figura 29).

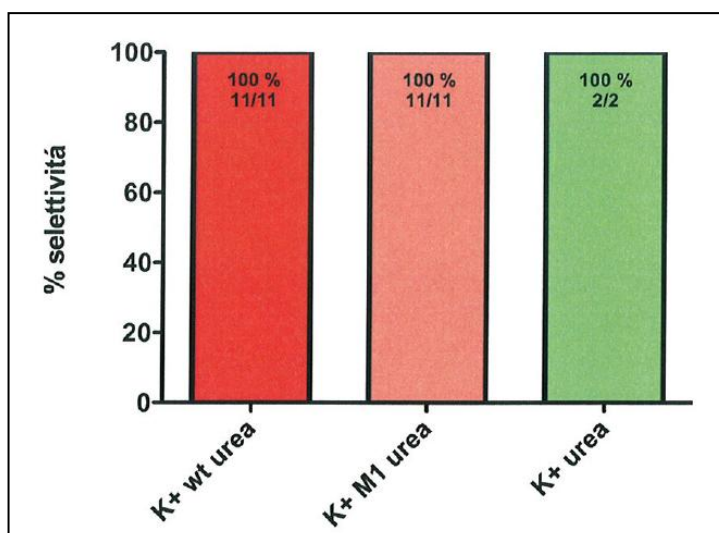


Figura 27: grafico relativo alle percentuali di selettività delle proteine hICln wt e hICln M1. Per per entrambe le proteine nel 100% dei casi si hanno correnti selettive per lo ione K^+ .

Infine, anche per quanto riguarda i valori di potenziale d'inversione medio, non si sono rilevate differenze statisticamente significative tra hICln wt e hICln M1 (T test, tabella 4).

Erev MEDI		
	hICln wt	hICln M1
K⁺	30,47±3,67 mV	38,65±1,18 mV

Tabella 4: valori di potenziali d'inversione (*E rev*) medi determinati per hICln wt e hICln M1.

4.4 INDAGINE DELL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA hICln M1 IN CELLULE HEK293 PHOENIX TRAMITE WESTERN BLOT

In vista degli esperimenti di caratterizzazione funzionale con il patch clamp, abbiamo voluto controllare che la proteina hICln M1 fosse correttamente espressa anche all'interno delle cellule eucariotiche. Le cellule HEK293 Phoenix sono state trasfettate transientemente con i vettori pFLAG hICln wt e pFLAG hICln M1 o con il vettore vuoto (metodo della co-precipitazione del fosfato di calcio, paragrafo 3.8 dei materiali e metodi della Parte I), sono state quindi lisate e l'omogenato totale è stato caricato su gel. Per entrambe le proteine si è riscontrata la presenza di una banda all'altezza attesa (figura 30), mentre non è presente alcun segnale nell'omogenato totale delle cellule trasfettate con il solo vettore vuoto (controllo negativo). Entrambe le proteine risultano quindi espresse in cellula a livelli paragonabili. Come controllo interno all'esperimento, per verificare la bontà delle preparazioni proteiche e la loro confrontabilità, abbiamo utilizzato anche un anticorpo che riconoscesse la Na⁺/K⁺ ATPasi.

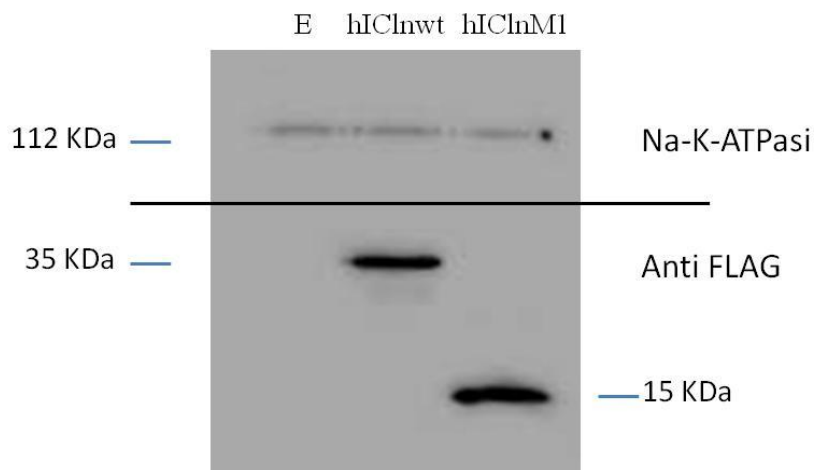


Figura 28: Western blot eseguito su omogenato totale di cellule HEK 293 Phoenix trasfettate con i vettori pFLAG hICln wt e pFLAG hICln M1 o con il vettore vuoto (E). Per entrambe le proteine si è riscontrata la presenza di una banda all'altezza attesa, mentre non è presente alcun segnale nell'omogenato totale delle cellule trasfettate con il solo vettore vuoto (E). Per verificare la bontà delle preparazioni proteiche e la loro confrontabilità, abbiamo utilizzato anche un anticorpo che riconoscesse la Na⁺/K⁺ ATPasi.

4.5. CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DELLE PROTEINE hICln wt E hICln M1 TRAMITE ESPERIMENTI DI PATCH-CLAMP

Al fine di chiarire l'ipotetico ruolo funzionale di ICln nella Sindrome del QT lungo, sono stati allestiti esperimenti di patch-clamp, in configurazione whole-cell, che hanno consentito un'analisi elettrofisiologica delle correnti di Cl⁻ indotte dallo swelling in cellule HEK293 Phoenix trasfettate con i vettori pIRES2-EGFP hICln wt, pIRES2-EGFP hICln M1 o pIRES2-EGFP, utilizzato come controllo negativo. In una prima serie sperimentale sono state confrontate tra loro correnti di Cl⁻ indotte dallo swelling in cellule HEK293 Phoenix trasfettate con i vettori pIRES2-EGFP hICln wt e pIRES2-EGFP (controllo). Il protocollo sperimentale prevedeva il passaggio da una condizione ipertonica (la soluzione extracellulare presentava un'osmolarità reale misurata di 360 mOsm circa) ad una ipotonica (260 mOsm circa). L'attivazione temporale della corrente veniva continuamente monitorata impartendo impulsi di +40 mV ogni 20 sec, in modo da determinare la relazione corrente/tempo (figura 31, pannello B); ogni 10 minuti inoltre si impartivano impulsi in un intervallo di potenziali compresi tra -120 mV e +100 mV, in modo da

determinare la relazione corrente/voltaggio (I/V) (figura 29, pannello A). La corrente registrata mostra le tipiche caratteristiche biofisiche dell'IClswell, rettificazione uscente e inattivazione lenta tempo dipendente a potenziali positivi; il potenziale di inversione è molto vicino allo zero, come previsto per una corrente di Cl⁻ nelle nostre condizioni sperimentali. L'analisi statistica delle relazioni densità di corrente/voltaggio, effettuata mediante il test F, mostra un significativo aumento della corrente registrata allo steady-state in soluzione ipotonica (condizione di massima attivazione della corrente; F test, $p < 0,0001$) nelle cellule overesprimenti hICln wt rispetto al controllo. Anche l'analisi del grafico dell'andamento temporale della densità di corrente (figura 31, pannello B) indica una maggiore attivazione della corrente in condizioni di overespressione di hICln wt rispetto alle condizioni di controllo (F test, $p < 0,0001$).

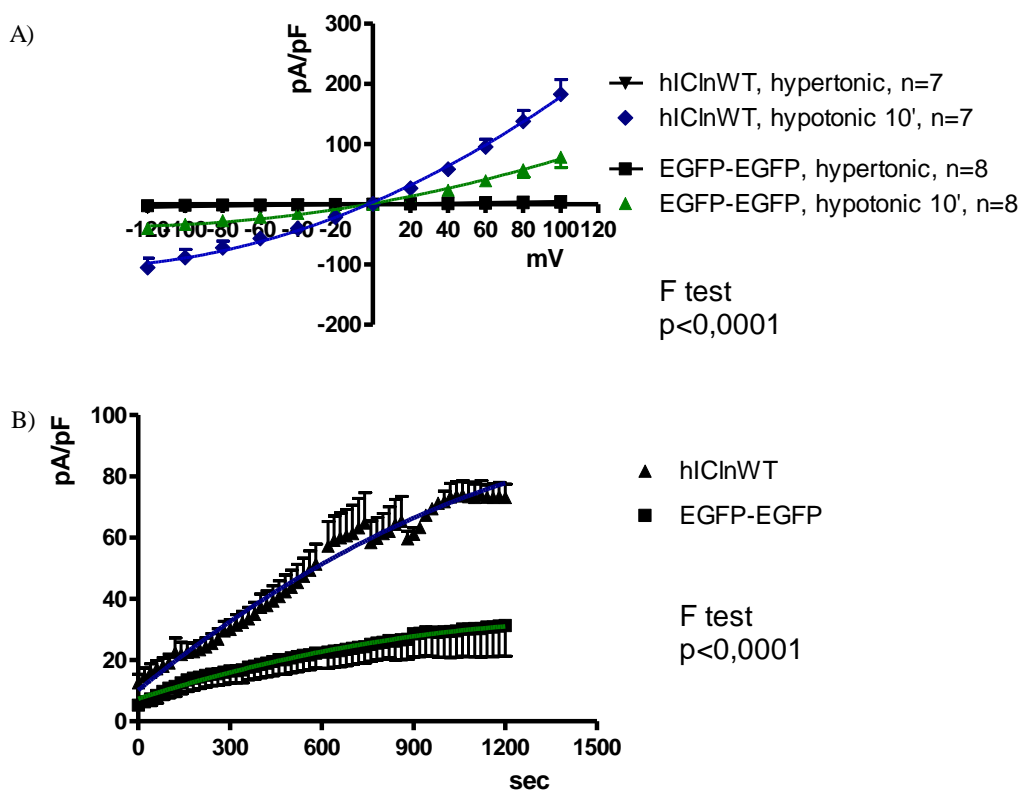


Figura 31: La realizzazione del sigillo è avvenuta in ambiente ipertonico (360 mOsm circa) e la corrente misurata mediante la tecnica del patch clamp in modalità voltage-clamp, in configurazione whole-cell. Dopo aver verificato la stabilità del sigillo e l'assenza di grosse correnti di leakage, la soluzione extracellulare ipertonica è stata sostituita rapidamente con una ipotonica (260 mOsm circa) per attivare l'IClswell. A) Relazione I/V determinata in cellule HEK293 Phoenix overesprimenti la sola EGFP (controllo) o EGFP + hICln wt, in condizioni ipertoniche e ipotoniche, determinata impartendo ogni 10 minuti impulsi della durata di 500 ms da un voltaggio di -120 mV fino a 100 mV con incrementi di 20 mV, a partire da un potenziale di holding di 0 mV. B) Cinetica di attivazione dell'IClswell. Per

monitorare l'attivazione la corrente fino allo steady-state, le cellule sono state sottoposte ad impulsi della durata di 400 ms impartiti ogni 20 s da un potenziale di holding di 0 mV a +40 mV.

Utilizzando lo stesso protocollo sono state quindi confrontate tra loro correnti di Cl^- indotte dallo swelling in cellule HEK293 Phoenix trasfettate con i vettori pIRES2-EGFP hICln wt o pIRES2-EGFP hICln M1. La corrente misurata nelle cellule trasfettate con hICln M1 mostra le tipiche caratteristiche biofisiche dell'IClswell; tuttavia, l'analisi statistica delle relazioni densità di corrente/voltaggio, mostra una diminuzione significativa della corrente registrata allo steady-state in soluzione ipotonica nelle cellule overesprimenti hICln M1 rispetto a hICln wt (Test F, $p < 0,0001$) (figura 32, pannello A). Anche l'analisi del grafico dell'andamento temporale della densità di corrente (figura 32, pannello B) indica una minore attivazione della corrente in condizioni di overespressione di hICln M1 rispetto a hICln wt (F test, $p < 0,0001$).

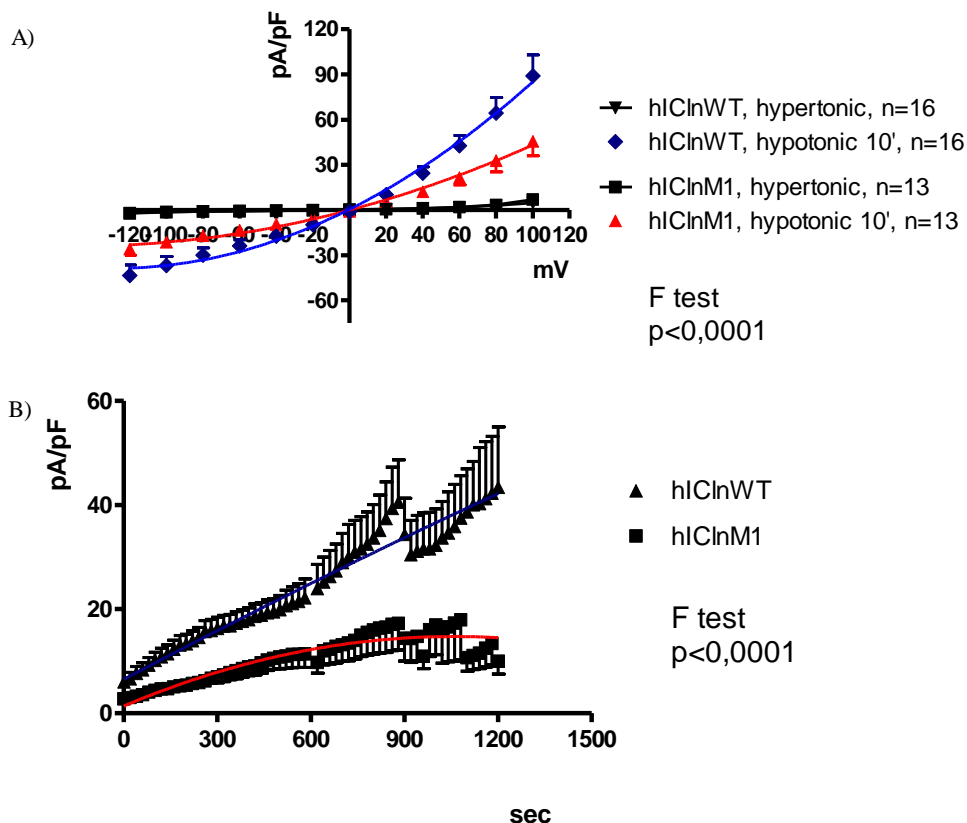


Figura 30: La realizzazione del sigillo è avvenuta in ambiente ipertonico (360 mOsm circa) e la corrente misurata mediante la tecnica del patch clamp in modalità voltage-clamp, in configurazione whole-cell. Dopo aver verificato la stabilità del sigillo e l'assenza di grosse correnti di leakage, la soluzione extracellulare ipertonica è stata sostituita rapidamente con una ipotonica (260 mOsm circa) per attivare l'IClswell. A) Relazione I/V determinata in cellule HEK293 Phoenix overesprimenti la proteina hICln wt o hICln M1, in condizioni

ipertoniche e ipotoniche, determinata impartendo ogni 10 minuti impulsi della durata di 500 ms da un voltaggio di -120 mV fino a 100 mV con incrementi di 20 mV, a partire da un potenziale di holding di 0 mV. b) Cinetica di attivazione dell'IClswell. Per monitorare l'attivazione la corrente fino allo steady-state, le cellule sono state sottoposte ad impulsi della durata di 400 ms impartiti ogni 20 s da un potenziale di holding di 0 mV a +40 mV.

Infine, sono state confrontate tra loro correnti di Cl⁻ indotte dallo swelling in cellule HEK293 Phoenix trasfettate con il vettore pIRES2-EGFP hICln M1 o con il vettore vuoto pIRES2-EGFP usato come controllo. In questo caso l'analisi statistica delle relazioni densità di corrente/voltaggio, mostra una leggera ma significativa diminuzione della corrente registrata allo steady-state in soluzione ipotonica nelle cellule overesprimenti hICln M1 rispetto al controllo (Test F, p< 0,005) (figura 33, pannello A). Anche l'analisi del grafico dell'andamento temporale della densità di corrente (figura 33, pannello B) indica una minore attivazione della corrente in condizioni di overespressione di hICln M1 rispetto al controllo (F test, p<0,0001).

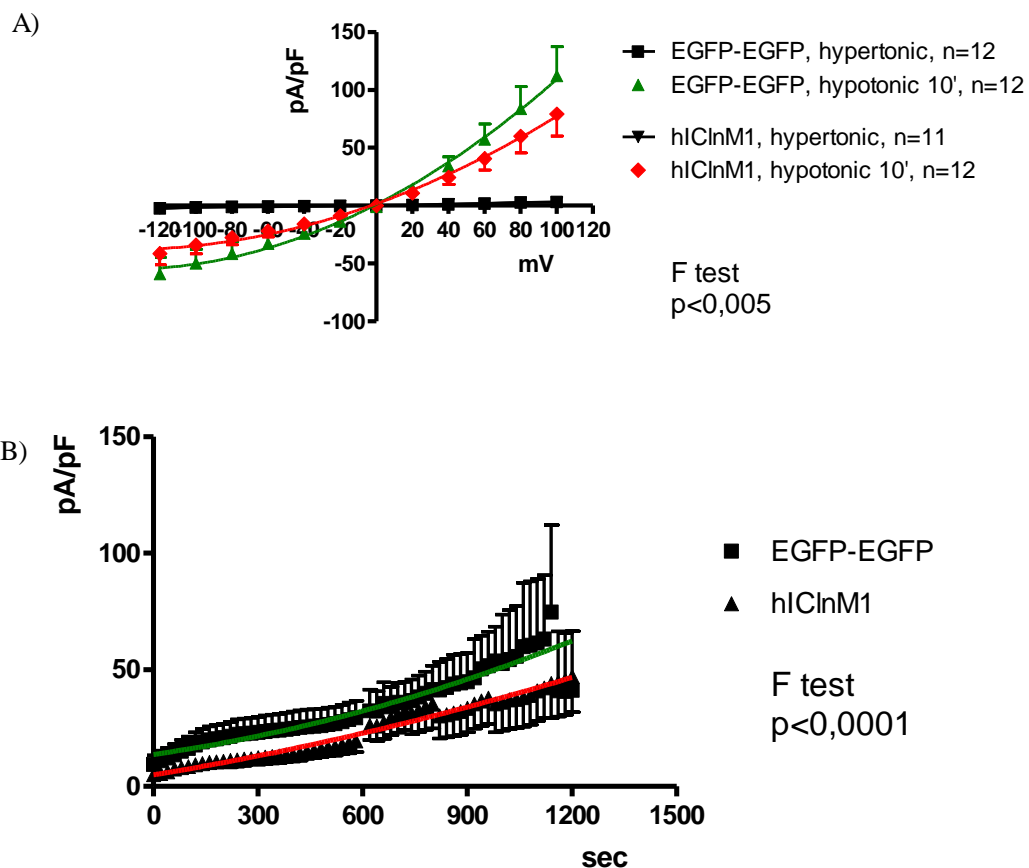


Figura 33: La realizzazione del sigillo è avvenuta in ambiente ipertonico (360 mOsm circa) e la corrente misurata mediante la tecnica del patch clamp in modalità voltage-clamp, in configurazione whole-cell. Dopo aver verificato la stabilità del sigillo e l'assenza di grosse correnti di leakage, la soluzione extracellulare ipertonica è stata sostituita rapidamente con

una ipotonica (260 mOsm circa) per attivare l'IClswell. A) Relazione I/V determinata in cellule HEK293 Phoenix overesprimenti la sola EGFP (controllo) o EGFP + hICln M1, in condizioni ipertoniche e ipotoniche, determinata impartendo ogni 10 minuti impulsi della durata di 500 ms da un voltaggio di -120 mV fino a 100 mV con incrementi di 20 mV, a partire da un potenziale di holding di 0 mV. B) Cinetica di attivazione dell'IClswell. Per monitorare l'attivazione la corrente fino allo steady-state, le cellule sono state sottoposte ad impulsi della durata di 400 ms impartiti ogni 20 s da un potenziale di holding di 0 mV a +40 mV.

Cap.5

Discussione Parte I

5.1 INDIVIDUAZIONE DI UNA MUTAZIONE NEL GENE DI ICln IN UNA PAZIENTE AFFETTA DA SINDROME DEL QT LUNGO

Se una cellula viene esposta a soluzione extracellulare ipotonica, o se si verifica un aumento della concentrazione intracellulare di osmoliti, la cellula richiama acqua dall'ambiente extracellulare e si rigonfia. Per ripristinare le condizioni iniziali vengono messi in atto meccanismi di trasporto che, estrudendo osmoliti dalla cellula, determinano un efflusso di acqua che riporterà la cellula al proprio volume originale. È noto dalla letteratura che durante questo fenomeno omeostatico, detto decremento regolatore del volume cellulare (RVD) si attiva una corrente anionica denominata ICl_{swell}, ma ancora oggi non è chiaro il meccanismo con il quale questa corrente sia attivata dal rigonfiamento cellulare (Lang et al., 1998).

La struttura molecolare responsabile della formazione del canale di ICl_{swell} non è ancora definita: è comunque certo che la proteina ICln, clonata da una linea epiteliale renale canina (Paulmichl et al., 1992), svolga un ruolo di fondamentale importanza in quest'ambito. Accanto all'ipotesi che ICln costituisca il canale per ICl_{swell} o parte di esso, non è da escludere il fatto che la proteina ICln possa essere un regolatore citoplasmatico di ICl_{swell}.

Recentemente è stata identificata in eterozigosi una mutazione nel gene che codifica per ICln in una paziente giunta all'osservazione dei nostri collaboratori della clinica Mayo di Rochester (Prof. Ackerman, The Departments of Medicine, Pediatrics, and Molecular Pharmacology & Experimental Therapeutics). Si tratta di una donna di 51 anni che, mentre camminava, ha avuto un attacco cardiaco che le ha causato improvvisa perdita di conoscenza. Portata direttamente in ospedale, è stata rianimata, le è stato impiantato un defibrillatore ICD, e ha recuperato completamente. L'elettrocardiogramma della paziente misurava un QTc di 560 ms. Il padre e la zia della signora sono morti improvvisamente all'età rispettivamente di 60 e 57 anni. La familiarità, i sintomi e il valore di QTc della donna hanno portato a pensare che fosse affetta dalla sindrome del QT lungo (LQTS). Tuttavia, nel genoma della paziente non sono state trovate mutazioni relative ai geni generalmente coinvolti nella LQTS, ma è stato identificato soltanto il comune polimorfismo H558R in SCN5A (NaV1.5); è stata però identificata una mutazione nel gene che codifica per la proteina ICln. La

mutazione nella sequenza di ICln umana oggetto di indagine è l'inserzione di una Timina in posizione 383 nella sequenza nucleotidica. Questa inserzione produce un frameshift che si traduce con una terminazione precoce nella sequenza aminoacidica (A128FSX139); la proteina mutata è dunque una forma tronca composta da 139 aminoacidi, con una sequenza aminoacidica scrambled di 12 aminoacidi a partire dall'aminoacido 128, ed è stata definita per semplicità hICln M1. Nella paziente non sono state inoltre trovate altre mutazioni nel gene codificante per ICln.

La sindrome del QT lungo (LQTS) è una malattia genetica che ha un'incidenza di 1:5000 tra le malattie geneticamente determinate (Kass e Moss, 2003). E' caratterizzata da un'anormale e prolungata ripolarizzazione ventricolare che determina episodi sincopali, ma può anche causare morte improvvisa in età infantile o giovanile. Analisi e studi genetici hanno dimostrato che la predisposizione allo sviluppo delle aritmie ventricolari è la conseguenza di determinate alterazioni genetiche che portano a mutazioni nei canali ionici del cuore (Priori et al. 2000). Ciò considerato, la LQTS viene annoverata tra le canalopatie. Ad oggi sono state descritte più di 500 mutazioni che causano la LQTS, a carico di 10 geni che codificano principalmente per canali cardiaci del potassio e del sodio o per loro proteine accessorie.

5.2 . MESSA A PUNTO DELLA PURIFICAZIONE DELLA PROTEINA hICln M1

In primo luogo, il cDNA codificante per l'isoforma umana della proteina ICln wild type, clonato all'interno del vettore di espressione per procarioti pET3-His, è stato sottoposto a mutagenesi sito specifica, al fine di produrre la proteina mutata di nostro interesse. In seguito all'overespressione in batteri E. coli del ceppo BL-21 (D3), non è stato però possibile purificare la proteina mutata (cromatografia per affinità) in condizioni native, a differenza della proteina wt. Per indagare le ragioni di questo fenomeno, abbiamo effettuato ulteriori mutazioni sito-specifiche al fine di ottenere due forme tronche della proteina hICln wt (hICln wt 139 e hICln wt 127) e quattro forme mutate della proteina hICln M1 (hICln M1rc, hICln M1rc GGG, hICln M1rc

136, hICln M1rc 133). In hICln M1rc abbiamo mutato i codoni rari codificanti per le Arginine presenti nella sequenza scrambled; in hICln M1rc GGG gli aminoacidi ingombranti Arginina, Metionina e Prolina nella sequenza scrambled sono stati mutati in Glicine (Figura 24). Tramite Western Blot su lisato batterico si è visto che, ad eccezione fatta per la proteina hICln wt 139, tutte le altre erano presenti solamente nella frazione del pellet e risultavano pertanto non purificabili in condizioni native (Figura 25). Da questo lavoro si deduce che la mancata purificazione di hICln M1 non è dovuta a una mancata produzione della proteina (ascrivibile, ad esempio, alla presenza di codoni rari codificanti per alcuni aminoacidi della sequenza aminoacidica scrambled); infatti, anche hICln M1rc non può essere recuperata nella frazione solubile. Abbiamo di seguito realizzato che hICln M1 non è recuperabile nella frazione solubile non perché non venga prodotta, ma perché rimane confinata nella frazione insolubile (pellet), a causa della formazione di inclusion bodies. Ci siamo interrogati poi sulle possibili cause che potessero portare alla formazione degli inclusion bodies. La formazione di inclusion bodies non è dovuta a problemi di folding ascrivibili alla presenza di aminoacidi ingombranti nella sequenza scrambled, in quanto anche hICln M1rc GGG rimane esclusa dalla frazione solubile. Eliminando in parte o tutta la sequenza scrambled (hICln wt 127) si ottengono comunque aggregati insolubili; se però produciamo una proteina con lo stesso numero di aminoacidi di hICln M1 ma con sequenza wild type (hICln wt 139) possiamo finalmente recuperare la proteina nella frazione solubile. Abbiamo quindi concluso che forme tronche di ICln a partire dall'aminoacido 127 conducono alla formazione di corpi di inclusione, fenomeno possibilmente legato a problemi di folding; è da osservare tuttavia che gli aminoacidi presenti nella sequenza scrambled contribuiscono alla formazione dei corpi di inclusione, in quanto una proteina wild type della stessa lunghezza di hICln M1 (hICln wt 139) non porta alla formazione di tali aggregati. Corpi d'inclusione insolubili e inattivi si formano frequentemente in seguito alla produzione di proteine umane ricombinanti in microrganismi trasformati. Solitamente sono dovuti a specifiche interazioni intermolecolari tra un tipo solo di molecola e l'aggregazione è reversibile. È stato suggerito che i corpi d'inclusione siano strutture dinamiche formate da un equilibrio instabile tra la forma aggregata e quella insolubile delle proteine in *E. coli*. In generale i corpi d'inclusione vengono

solubilizzati grazie all'utilizzo di alte concentrazioni di agenti denaturanti come l'urea o la guanidina idrocloruro (Singh e Panda, 2005). Nel nostro caso si è dovuto procedere alla purificazione in condizioni denaturanti utilizzando Urea 8M, un agente caotropico in grado di rompere i ponti idrogeno intra e inter -molecolari. In queste condizioni tutte le proteine mutate sono state recuperate nella frazione solubile, e sono pertanto risultate purificabili come è stato dimostrato attraverso esperimenti di Western blot.

5.3 CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DI hICln wt e hICln M1 ATTRAVERSO ESPERIMENTI DI RICOSTITUZIONE IN MEMBRANE LIPIDICHE ARTIFICIALI

Dopo aver messo a punto la procedura di purificazione di hICln wt e M1, le proteine sono state ricostituite in membrane lipidiche artificiali di sfingomieline e le proprietà biofisiche della corrente indotta da hICln M1 sono state paragonate a quelle di hICln wt. Sono stati presi in esame tre differenti parametri: la percentuale di comparsa di corrente, la selettività della proteina, e i valori di potenziale d'inversione medi.

La percentuale di comparsa di corrente è stata calcolata in base alle volte in cui è stato possibile registrare un'attività elettrica in seguito all'aggiunta della proteina nella cameretta (vedere paragrafo 3.10 dei Materiali metodi della Parte I) rispetto al numero totale di esperimenti. Se dopo 45 min dall'aggiunta della proteina non si manifestava alcuna attività elettrica (segno di mancata attivazione della proteina) le membrane venivano distrutte. La percentuale di comparsa di corrente della proteina wt e della M1 non sono statisticamente differenti, ad indicare che la mutazione non andrebbe ad inficiare la capacità della proteina di traslocare indipendentemente in membrana (fenomeno che avviene senza l'ausilio di sistemi vescicolari) (Fürst et al., 2000) e di condurre corrente.

Per quanto riguarda la selettività della proteina misurata negli esperimenti di ricostituzione funzionale, entrambe le proteine sono risultate essere selettive per il solo ione K^+ . Questo fatto sembra essere in totale disaccordo con le proprietà biofisiche che la proteina possiede in vivo, dove si ipotizza attivi una corrente

selettiva per lo ione Cl⁻. Tuttavia, come già precedentemente dimostrato nel nostro laboratorio (Garavaglia et al., 2004), lo spessore della membrana influenza la selettività della corrente mediata dalla proteina canale ICln; è stata osservata una tendenza della corrente ad assumere un fenotipo potassio selettivo al diminuire della lunghezza della catena acilica dei lipidi costituenti la membrana (fosfatidilcolina). Anche nel caso di membrane formate da una miscela di sfingomieline si ipotizza che la selettività per lo ione potassio sia dovuta all'inserimento della proteina nella porzione di membrana costituita da sfingomielina con catene aciliche corte (a 18 atomi di C). Anche per i valori di potenziale di inversione medi non è stata riscontrata alcuna differenza tra la proteina wt e la mutata suggerendo quindi che le due proteine ricostituite in questo sistema non presentano alcuna differenza per quanto riguarda le proprietà biofisiche prese in esame.

5.4 INDAGINE DELL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA hICln M1 IN CELLULE HEK293 PHOENIX E CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE TRAMITE ESPERIMENTI DI PATCH-CLAMP

Si è deciso di approfondire la caratterizzazione funzionale di hICln M1 passando da un sistema artificiale che, se pur semplice e controllabile, è piuttosto lontano dalle condizioni fisiologiche che si determinano *in vivo*, a un sistema di overespressione in cellule umane. Innanzitutto è stata verificata l'espressione della proteina M1 in cellule eucariotiche tramite esperimenti di Western blot in cellule HEK293 Phoenix trasfettate transientemente con i vettori pFLAG hICln wt e pFLAG hICln M1. Entrambe le proteine sono risultate essere espresse in cellula a livelli paragonabili tra loro. In seguito, si è passati alla caratterizzazione funzionale di ICln wt e M1 con la tecnica del patch clamp in configurazione whole cell. A tale scopo, cellule umane di derivazione renale sono state sottoposte a trasfezione transiente; in seguito, si è misurata la corrente di cloruro attivata da ipotonicità, sia in cellule di controllo, sia in cellule esprimenti hICln wt o M1. La corrente registrata mostra in tutti e tre i casi le tipiche caratteristiche biofisiche dell'ICl_{swell} (rettificazione uscente, inattivazione lenta tempo dipendente a potenziali positivi, potenziale di inversione molto vicino

allo zero, come previsto per una corrente di Cl^- nelle nostre condizioni sperimentali). In caso di overespressione di hICln wt, la corrente si attiva più velocemente nel tempo, ed è significativamente maggiore in condizioni di massima attivazione (steady state), della corrente registrata in condizioni di controllo, in accordo con quanto osservato in letteratura (Krapivinsky et al., 1994) (figura 31). La condizione di controllo è rappresentata da cellule transfettate con il vettore pIRES2-EGFP-EGFP, in cui è possibile misurare la corrente $ICl,swell$ endogena. E' interessante notare che, benché anche la corrente misurata nelle cellule transfettate con hICln M1 mostri le tipiche caratteristiche biofisiche dell' $ICl,swell$, l'analisi statistica delle relazioni densità di corrente/voltaggio e dell'andamento temporale della densità di corrente, mostrino rispettivamente una diminuzione significativa della corrente registrata allo steady-state e una attivazione nel tempo più lenta rispetto a quanto osservato overesprimendo hICln wt (figura 30). In accordo con queste osservazioni, overesprimendo hICln M1 non si ottiene nessun effetto attivatorio sulla corrente rispetto a quanto osservato in condizioni di controllo (figura 32); al contrario, in cellule transfettate con hICln M1 la corrente è significativamente minore di quella registrata in cellule transfettate con il vettore di controllo, ossia della corrente endogenamente presente in questa linea cellulare; questo fenomeno indica che hICln M1 potrebbe essere capace di determinare un significativo – seppur modesto – fenomeno di dominanza negativa, andando ad inficiare l'attività di ICln endogena. Il fenomeno con cui hICln M1 possa fungere da dominante negativo è ancora completamente da delucidare, ma potrebbe essere legato ad un ipotetica capacità della proteina mutata di dimerizzare con la proteina wt endogena.

5.5 CONCLUSIONI

Nell'insieme questi dati indicano che, in vivo, hICln wt e M1 potrebbero avere proprietà elettrofisiologiche differenti; in particolare, hICln M1 potrebbe essere meno conduttiva per lo ione Cl^- . La corrente $ICl,swell$ viene attivata in seguito a stretch di tipo meccanico o a rigonfiamento cellulare ed è ampiamente espressa in tutto il cuore: è stata riscontrata una sua attivazione nei miociti atriali di gran parte

delle specie esaminate, comprese cellule canine, di coniglio, di cavia e umane; la corrente è presente anche nei miociti ventricolari di cavia, canini e umani (Hiraoka et al., 1998). L'attivazione di questa corrente contribuisce a una leggera depolarizzazione del potenziale di riposo e ad un accorciamento della durata del potenziale d'azione (Vandenberg et al., 1997; Baumgarten e Clemon, 2003). L'inibizione o la mancata attivazione di una corrente di Cl^- potrebbe pertanto essere uno dei meccanismi che contribuiscono all'insorgenza della Sindrome del QT lungo.

Parte II

*Caratterizzazione funzionale della 5'flanking
region del gene SLC26A4*

Cap.6

Introduzione Parte II

6.1 LA SINDROME DI PENDRED

L'associazione tra sordità familiare e gozzo non endemico fu descritta per la prima volta nel 1896 da Vaughan Pendred. La sindrome di Pendred (PS) (OMIM 274.600) è un disturbo a trasmissione autosomica recessiva definito da compromissione uditiva neurosensoriale e un difetto parziale nell'organizzazione dello ioduro che può sfociare nella comparsa del gozzo nel 50% dei pazienti. Questa patologia rappresenta il 5- 10% di tutti i casi di sordità ereditaria. La maggior parte dei pazienti presenta profonda sordità prelinguale; altri sviluppano una compromissione progressiva dell'udito più tardi, durante l'infanzia. Studi radiologici dell'orecchio interno mostrano in tutti i pazienti un allargamento dell'acquedotto vestibolare (EVA) (figura 34) che può essere rilevato tempestivamente; la tomografia computerizzata dell'osso temporale o la risonanza magnetica sono quindi utili per la caratterizzazione del fenotipo.

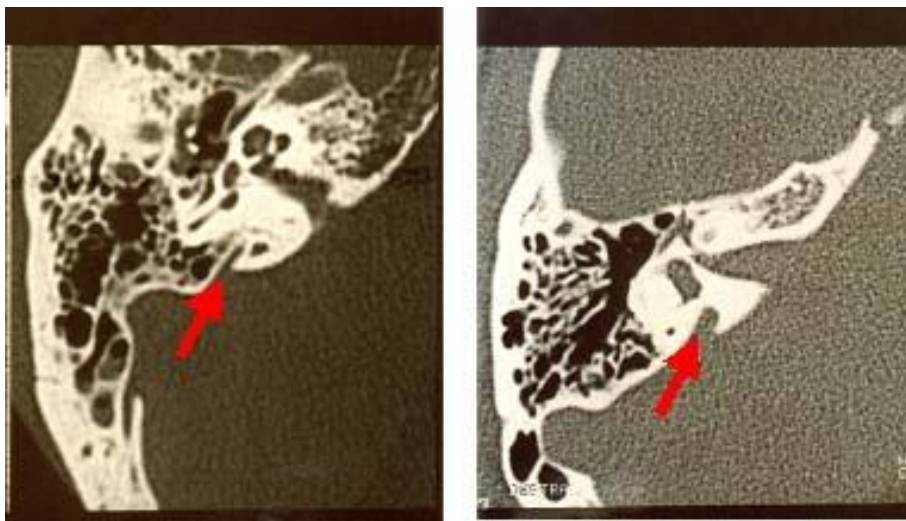


Figura 34: immagine ottenuta mediante tomografia assiale computerizzata ad alta risoluzione delle ossa temporali di un soggetto sano (a sinistra) e di un paziente affetto da sindrome di Pendred (a destra). Le frecce indicano l'acquedotto vestibolare, che risulta allargato nel paziente.

Una parte dei pazienti con sindrome di Pendred presenta anche una malformazione detta coclea del Mondini (figura 35), in cui i giri cocleari sono sostituiti da una cavità singola o da una coclea rudimentale.

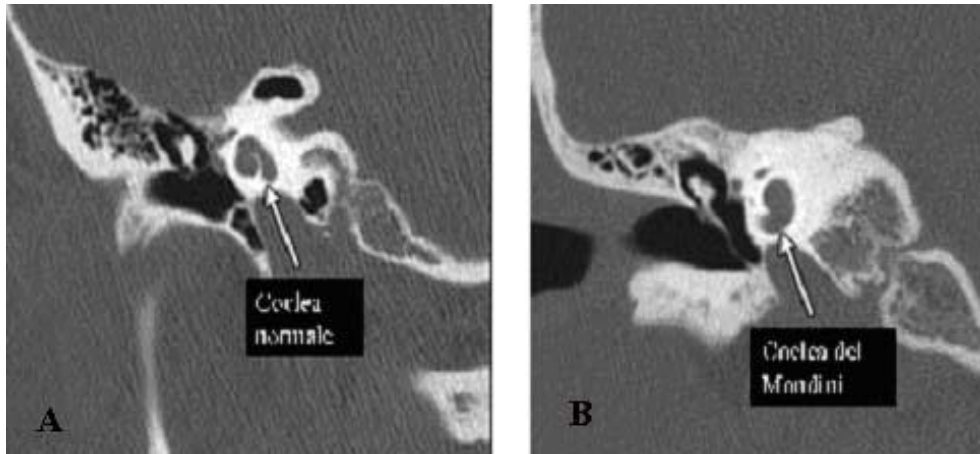


Figura 35: sezione coronale di orecchio interno di individuo sano (A) e di paziente affetto da Sindrome di Pendred (B); è ben evidente la malformazione del Mondini, dove la coclea manca del suo giro apicale.

Tuttavia, entrambi i difetti (EVA e coclea del Mondini) si possono trovare anche in altre malattie e non sono quindi specifici per tale sindrome.

Il gozzo è legato ad un difetto nella organizzazione dello ioduro, rilevabile con il test della dismissione del perclorato, che risulta positivo in tutti i pazienti affetti da sindrome di Pendred (Reardon et al., 1997). Tale test sfrutta una caratteristica esclusiva delle cellule tiroidee, che è quella di poter accumulare ioduro e di utilizzarlo per la sintesi degli ormoni tiroidei. Lo ioduro presente nel circolo ematico a concentrazioni estremamente basse (10^{-7} , 10^{-8} M) raggiunge all'interno dei follicoli tiroidei concentrazioni centinaia di volte maggiori (Wolff 1983). Tali concentrazioni sembrano essere indispensabili per la corretta sintesi degli ormoni tiroidei, come dimostrato dalla presenza di ipotiroidismo e gozzo nei soggetti incapaci di concentrare lo ioduro. Il test con perclorato viene eseguito somministrando una dose tracciante di ioduro marcato (^{131}I , ^{123}I); ad un'ora di distanza dall'assunzione del tracciante viene eseguita una prima scintigrafia alla tiroide e quindi viene somministrato un grammo di perclorato di potassio. Due ore dopo l'assunzione del perclorato, viene acquisita un'immagine scintigrafica e misurata la riduzione della captazione dello ioduro. In una ghiandola normale il processo di organificazione dello ioduro è estremamente veloce e pertanto la riduzione della captazione dopo somministrazione del perclorato di potassio non supera il 10%. Nei soggetti affetti da sindrome di Pendred la dismissione dello ioduro è invece generalmente compresa tra il 15 e l'80%. La positività al test del perclorato non è però caratteristica della sola

sindrome di Pendred, essendo osservabile anche nella tiroidite cronica di Hashimoto, nella tireotossicosi trattata con iodio e in diverse condizioni autosomiche recessive note come Deficit Totali di Organificazione dello Iodio (Total Iodide Organification Deficiency o TIOD).

Dal punto di vista clinico i pazienti affetti da sindrome di Pendred sono generalmente eutiroidei, con normali livelli di T3 e T4 e con livelli di tireotropina (TSH) che si collocano ai limiti superiori dei normali valori di riferimento; in alcuni casi si è potuta rilevare l'insorgenza di ipotiroidismo.

Il gozzo di solito si sviluppa durante l'infanzia, ma ci sono sostanziali variazioni intrafamiliari e regionali, e l'assunzione nutrizionale di ioduro sembra influenzare in modo significativo il fenotipo tiroideo. In condizioni di alta assunzione di ioduro, l'allargamento della tiroide può essere molto lieve o assente, e quindi questi pazienti spesso sono semplicemente classificati sulla base della presenza di EVA (familiare).

La sindrome di Pendred (definita come presenza di EVA con test per il perclorato positivo, con o senza gozzo evidente) sono causate da mutazioni bialleliche (in omozigosi o in eterozigosi composta) nel gene SLC26A4, che codifica per la proteina pendrina (PDS) (Everett 1997; Kopp et al., 2008). Inoltre, mutazioni bialleliche, o anche monoalleliche, nel gene SLC26A4 sono responsabili anche di una forma di sordità non sindromica, definita DFNB4, caratterizzata da EVA senza interessamento tiroideo (Albert 2006).

6.2. IL TRASPORTATORE SLC26A4 (Pendrina)

Il gene SLC26A4, clonato per la prima volta nel 1997 (Everett, 1997), è situato a livello del cromosoma 7 (7q22.31), e codifica per una proteina transmembrana altamente idrofobica costituita da 780 amminoacidi, avente peso molecolare di 86 KDa. L'mRNA prodotto ha una lunghezza di circa 5 kb, con una Open Reading Frame di 2343 paia di basi organizzate in 21 esoni (figura 36).

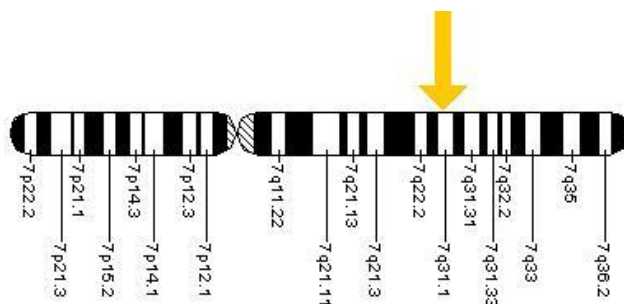


Figura 36: localizzazione cromosomica del gene umano SLC26A4.

6.2.1. Struttura della pendrina

Le informazioni strutturali per quanto riguarda la topologia in membrana della pendrina sono alquanto limitate e controverse. Utilizzando il programma PHDhtm Everett e collaboratori suggeriscono un modello con 11 segmenti trans-membrana (TM-11) e con il terminale carbossilico extracellulare; Royaux e collaboratori suggeriscono invece un modello da 12 segmenti trans-membrana (TM 12) e con il C-terminale citoplasmatico. Un modello analogo viene proposto sull'homepage di Pendred/BOR ([Http://www.healthcare.uiowa.edu/labs/pendredandbor/domains.htm](http://www.healthcare.uiowa.edu/labs/pendredandbor/domains.htm)), derivato utilizzando il programma MEMSAT (Zhai e Saier 2001). Questo programma, però, prevede un ulteriore segmento (TM 13) localizzato nello STAS-domain (Sulfate Transporter and Anti Sigma factor antagonist) del gene SLC26A4 (Aravind e Koonin 2000), che è stato trascurato.

Lo STAS domain possiede una sequenza molto simile alle proteine ASA (Anti Sigma factor Antagonist) dei batteri. Questa sequenza si pensa sia coinvolta nel legame e/o nell'idrolisi dei nucleotidi tri-fosfato. Aravind e collaboratori (Aravind e Koonin 2000) ipotizzano che il dominio STAS nei membri della famiglia SLC26 potrebbe regolare il trasporto di anioni rilevando le concentrazioni intracellulari di GTP e/o ATP. Inoltre, è stato ipotizzato che il dominio STAS sia coinvolto nell'interazione tra i membri della famiglia SLC26 con il CFTR (Kopp et al. 2002); tuttavia la funzione esatta di questo dominio è ancora poco chiara. Il nostro gruppo (Dossena et al., 2009) ha recentemente proposto un'altra struttura putativa, utilizzando la previsione MEMSAT come punto di partenza e raffinando il modello in accordo con Sweet e Eisenberg (1983), e Shafrir e Guy (2004). In questo nostro modello, la pendrina potrebbe possedere da 13 a 15 segmenti transmembrana (figura 37).

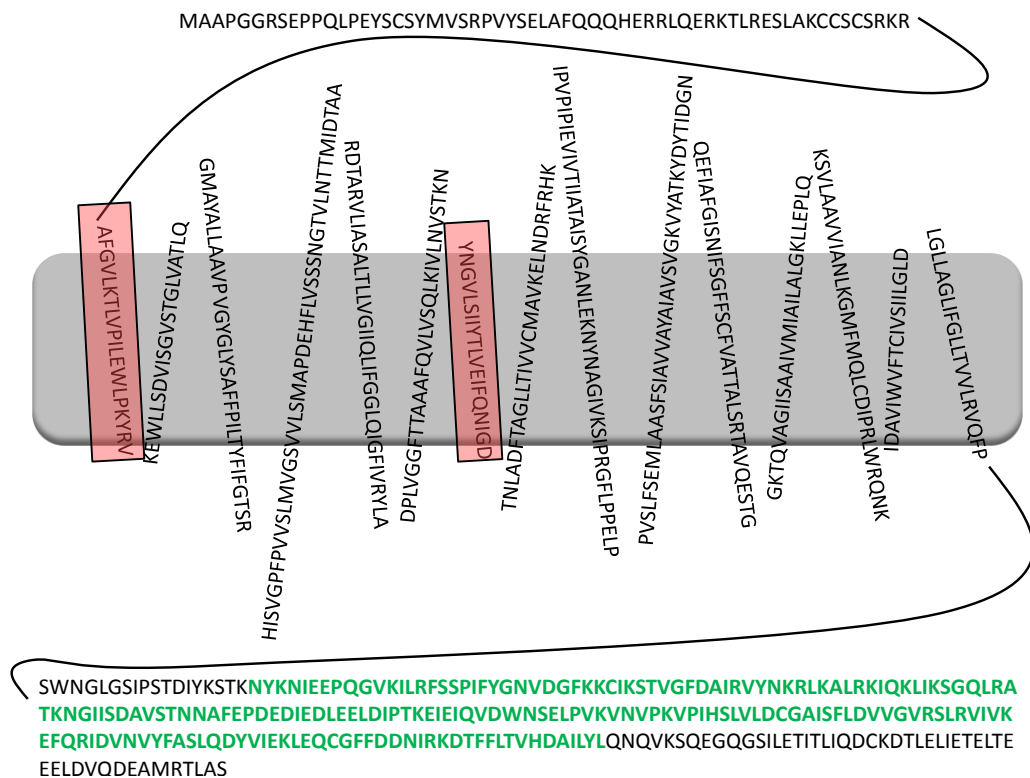


Figura 37: putativo modello a 15 segmenti trans-membrana proposto dal nostro gruppo. In questo modello il C- terminale è posto nel lato citoplasmatico mentre l’N-terminale nel lato extracellulare. Il rettangolo grigio rappresenta la membrana attraversata dai 15 segmenti trans membrana; i due segmenti anfipatici sono indicati dai rettangoli rosa e gli aminoacidi dello STAS-domain sono in verde.

I segmenti anfipatici (indicati dai rettangoli rosa in figura 37) sono i più ambigui in termini di localizzazione, in quanto potrebbero essere sia transmembrana, sia citosolici o extracellulari. Tuttavia, a differenza di quelli localizzati negli ambienti intra o extracitoplasmatici, l’omologia di sequenza di questi segmenti tra le diverse specie è molto alta, e si può quindi ipotizzare che siano effettivamente localizzati nella porzione trans-membranaria (Dossena et al., 2009). Resta tuttavia necessario che questo modello trovi conferme sperimentali.

6.2.2 Ruolo e funzione della Pendrina nella tiroide, nel rene e nell’orecchio interno

La pendrina sembrerebbe svolgere funzioni di trasporto estremamente importanti soprattutto in tre distretti: la tiroide, il rene e l’orecchio interno.

Studi di immunolocalizzazione hanno evidenziato l’espressione della pendrina a livello della membrana apicale dell’epitelio follicolare tiroideo, dove

presumibilmente svolge una funzione nel trasporto dello ioduro (Royaux et al., 2000). Per la corretta produzione degli ormoni tiroidei T3 e T4 è di fondamentale importanza che lo ioduro venga trasportato a livello del lume del follicolo tiroideo e la pendrina sembrerebbe essere coinvolta in questo processo (Royaux et al., 2000). Lo ioduro viene infatti concentrato nel citosol delle cellule del follicolo tiroideo per mezzo del co-transportatore di Na^+/I^- NIS espresso a livello della membrana basolaterale. Sulla membrana apicale la pendrina si comporterebbe da scambiatore ioduro-cloruro consentendo, probabilmente in associazione a canali per lo ioduro, la secrezione di questo ione a livello follicolare (Royaux et al., 2000; Kopp et al., 2008) (figura 38).

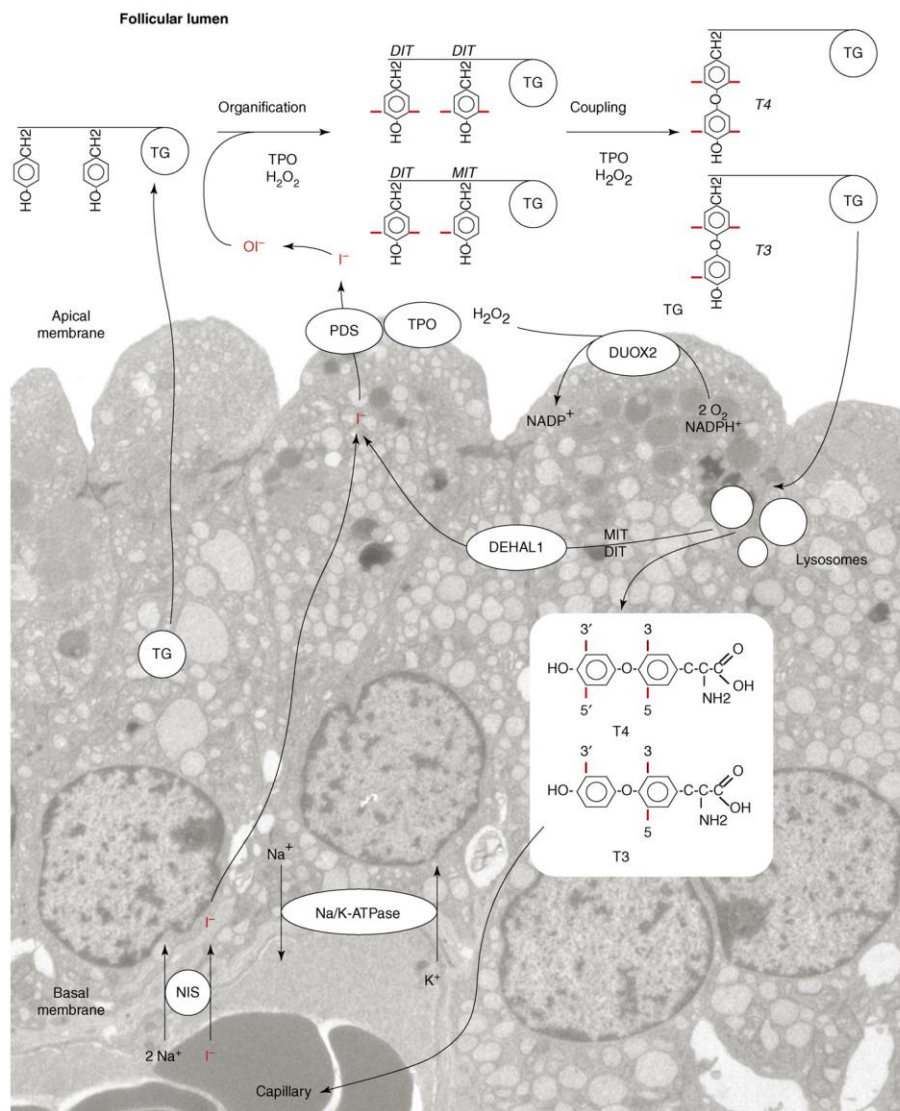


Figura 38: modello cellulare del meccanismo di trasporto di ioni nelle cellule follicolari della ghiandola tiroide. Il simporto Na^+/I^- (NIS) è situato sulla membrana basolaterale delle

cellule follicolari mentre sul lato apicale è presente la pendrina che è responsabile del trasporto di ioduro nel lume del follicolo.

Un'alterazione della funzione della proteina a questo livello potrebbe indurre un difetto di organicazione dello ioduro, come è stato evidenziato nei pazienti affetti da sindrome di Pendred (Fugazzola et al., 2001).

Studi di immunolocalizzazione hanno posto in evidenza che questa proteina è espressa sulla membrana apicale delle cellule dei dotti collettori corticali (CCD) nel rene di topo, ratto e uomo (Royaux et al., 2001). Per quanto concerne il rene, la pendrina sembrerebbe essere coinvolta nella regolazione dell'equilibrio acido-base dell'organismo (Royaux et al., 2001). Il dotto corticale collettore è caratterizzato dalla presenza di un epitelio eterogeneo, costituito da due tipi cellulari: le cellule principali e le cellule intercalate. A livello delle cellule intercalate avvengono fenomeni di assorbimento e di secrezione di bicarbonato, che hanno l'importante funzione di regolare l'equilibrio acido-base dell'organismo. L'assorbimento del bicarbonato avviene a livello di un sottotipo di cellule intercalate, le A o α , che presentano a livello della membrana apicale l' H^+ -ATPasi. Nelle cellule α l'assorbimento di bicarbonato è mediato dallo scambiatore $AE1\ Cl^-/HCO_3^-$, situato a livello della membrana basolaterale, funzionante in azione coordinata con l' H^+ -ATPasi della membrana apicale. La secrezione di bicarbonato è invece mediata da due popolazioni di cellule: le cellule intercalate di tipo B o β , e le cellule non-A e non-B (Amlal et al., 2010). Le cellule di tipo B presentano l' H^+ -ATPasi a livello della membrana basolaterale e l'attività dello scambiatore Cl^-/HCO_3^- è limitata alla membrana apicale; nelle cellule non-A e non-B invece l'attività di tale scambiatore è stata rilevata sia sulla membrana apicale che su quella basolaterale.

Per quanto concerne la secrezione di bicarbonato, non si hanno dati certi in merito all'identità del trasportatore, tuttavia studi di immunolocalizzazione, condotti su cellule di ratto, topo e uomo, hanno evidenziato che, a livello della membrana apicale delle cellule B e delle cellule non-A e non-B è localizzata la pendrina che interverrebbe, in associazione con l' H^+ -ATPasi della membrana basolaterale, nella secrezione del bicarbonato (Royaux et al., 2001) (figura 39).

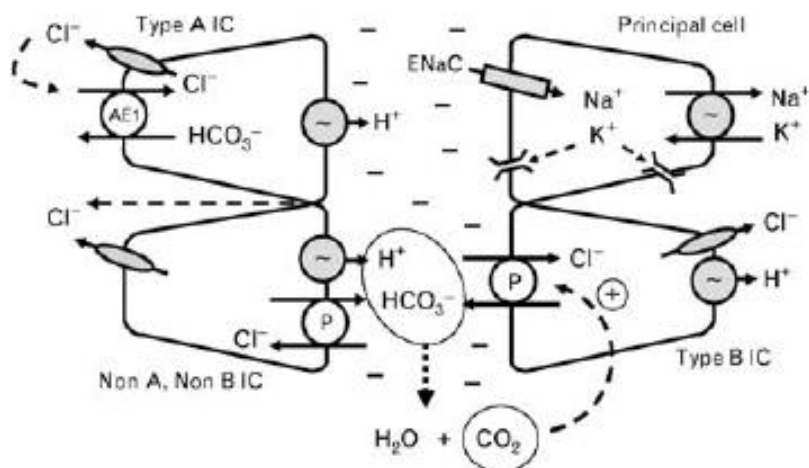


Figura 39: a livello renale la pendrina (P) sembrerebbe essere espressa sulla membrana apicale delle cellule intercalate di tipo B e non-A e non B e interverrebbe, in associazione con l' H^+ -ATPasi della membrana basolaterale (cellule B), nella secrezione del bicarbonato.

Recenti studi condotti su topi knock out per il gene della pendrina (Amlal et al., 2010) hanno evidenziato una diminuzione netta della secrezione di bicarbonato a livello apicale sia nelle cellule di tipo B che nelle cellule di tipo non-A e non-B, mentre a livello basolaterale delle cellule A e delle cellule non-A non-B non vi è una differenza significativa dell'attività di scambio Cl^-/HCO_3^- rispetto al topo wild-type. A livello renale la pendrina è implicata anche nel riassorbimento del cloruro. I livelli di espressione della pendrina sono infatti up-regolati in risposta al trattamento con un analogo dell'aldosterone (DOCP) e in seguito a dieta cloruro-restrittiva (Verlander et al., 2003; Wall et al., 2004). L'aldosterone aumenta il volume vascolare e la pressione sanguigna stimolando il riassorbimento renale di sodio e cloruro. Durante una dieta con bassi livelli di sodio e cloruro, che causa un aumento dei livelli di aldosterone, i topi KO per la pendrina hanno livelli di pressione sanguigna più bassa e presentano un alcalosi metabolica più severa rispetto ai topi wild-type, probabilmente a causa della diminuita capacità dei topi KO di assorbire cloruro e secernere bicarbonato (Verlander et al., 2006).

La pendrina sembrerebbe anche mediare l'espressione e la funzionalità del canale del sodio epiteliale ENaC, benchè localizzato sulla membrana apicale delle cellule principali del dotto collettore (Kim et al., 2007). In particolare, durante una dieta priva di NaCl, la funzione e i livelli di ENaC sono significativamente ridotti nei topi KO per la pendrina (Kim et al., 2007).

Nonostante queste evidenze sperimentali, in pazienti affetti da Sindrome di Pendred non sono stati descritti fino ad oggi disturbi dell'equilibrio acido-base clinicamente evidenti in condizioni basali; ciò potrebbe essere correlato alla presenza, a livello renale, di altri sistemi in grado di effettuare la secrezione di bicarbonato, supplendo in questo modo alla mancata funzionalità della pendrina.

Sempre mediante l'ausilio di studi di immunolocalizzazione nel topo, è stata rilevata la presenza della pendrina nell'orecchio interno. In questo distretto la pendrina è espressa sulla membrana apicale delle cellule della prominente spirale e del solco esterno nella coclea (figura 40) e sulla membrana apicale delle cellule epiteliali del sacco e del dotto endolinfatico (Royaux et al., 2003); è inoltre espressa nelle cellule transizionali nel sacco e nell'utricolo. In condizioni normali la pendrina contribuisce al mantenimento della composizione ionica e del pH dell'endolinfa. In accordo con questa ipotesi, è stato dimostrato che la pendrina, nel sacco e nel dotto endolinfatici, è coespressa con l' H^+ -ATPasi a livello della membrana apicale delle cellule dell'orecchio interno dove, mediando il riassorbimento del bicarbonato, contribuirebbe al mantenimento del pH endolinfatico acido tipico di questo distretto (pH 6.6-7) (Dou et al., 2004).

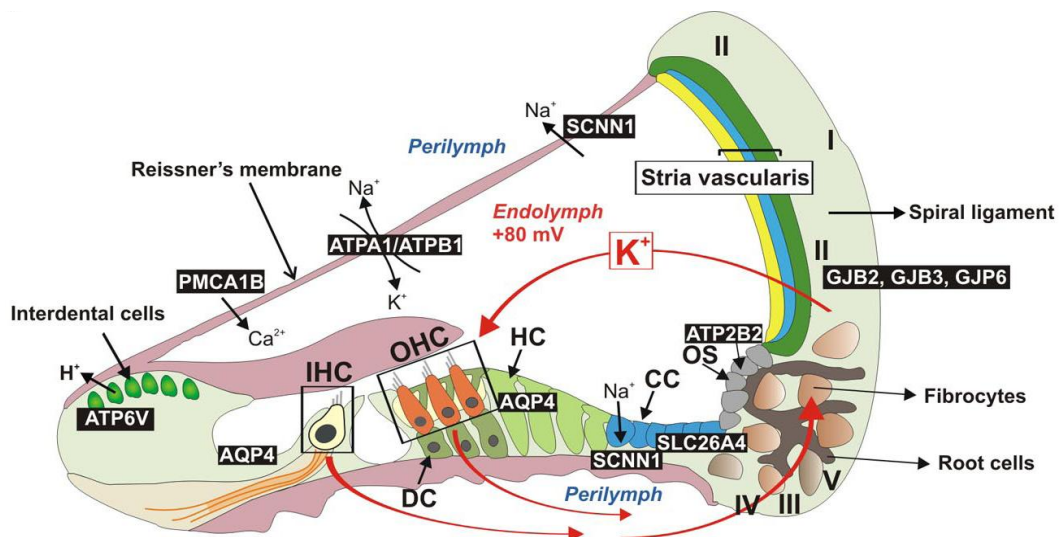


Figura 40: sezione trasversale del dotto cocleare. I nomi dei geni relativi ai trasportatori e ai canali ionici espressi sono riportati in corrispondenza della loro localizzazione. IHC: cellule del solco interno; DC: cellule di Deiters; CC: cellule di Claudius; HC: cellule di Hensen; OS: cellule del solco esterno; I-V: tipi specializzati di fibrociti.

Non così negli altri distretti dell'orecchio interno (coclea, sacco e dotto endolinfatici), dove il ruolo della pendrina è invece quello di favorire la secrezione di bicarbonato nell'endolinfa, per il mantenimento di un pH superiore alla neutralità.

Mutazioni della pendrina con perdita di funzionalità del trasportatore provocherebbero pertanto alterazioni del pH endolinfatico e, di conseguenza, sordità.

La creazione del topo KO ha fornito uno strumento utile a chiarire il ruolo della pendrina nell'orecchio interno e i meccanismi che causano sordità nei pazienti affetti da sindrome di Pendred. Il topo KO è completamente sordo e presenta un fenotipo vestibolare con testa inclinata (*head tilting*), andatura instabile, e una “*reaching response*” circolare e anormale (Everett et al., 2001). Anatomicamente, l'orecchio interno di questi animali si sviluppa in maniera normale fino al 15esimo giorno embrionale, dopo il quale si hanno una serie di anomalie, tra cui la dilatazione del dotto e del sacco endolinfatico, la degenerazione delle cellule sensoriali e la malformazione degli otoconi e della membrana otoconiale (Everett et al., 2001). A tal proposito è stato recentemente identificato e caratterizzato da alcuni nostri collaboratori (Dror et al., 2010) un nuovo topo mutante chiamato *loop* (*Slc26a4^{loop}*) che porta in omozigosi una mutazione missenso nel gene *Slc26a4* (S408F). Questo topo presenta sordità profonda e comportamenti vestibolari anormali (da qui il nome *loop*) simili al topo KO. Inoltre, questa mutazione causa difetti nella formazione degli otoconi in maniera diversa tra sacculo e utricolo: dei minerali di calcite di grosse dimensioni sono sempre riscontrabili nell'utricolo del topo mutato, mentre un cambiamento graduale nella composizione dei minerali è osservabile nel sacculo, con la formazione di sassolini di calcio ossalato nel topo adulto. Questo è probabilmente dovuto al fatto che, nonostante nelle due zone si abbiano livelli d'espressione della pendrina simili tra loro, l'abolizione della sua attività e quindi della secrezione di bicarbonato nell'endolinfa, porta ad un acidificazione differente a livello dei due compartimenti (Dror et al., 2010). Infatti, l'endolinfa nell'utricolo è connessa al canale semicircolare e alla crista ampullare e può quindi circolare più frequentemente rispetto al sacculo, dove queste connessioni non sono presenti.

Studi sul topo KO (Nakaya et al., 2007) hanno mostrato che l'acidificazione dell'endolinfa vestibolare porta a sua volta all'inattivazione di due canali di calcio apicali (TRPV5 e TRPV6) presenti sulle “*dark cells*” vestibolari pigmentate presenti

nell'utricolo e quindi ad un aumento della concentrazione di calcio nell'endolinfa. L'accumulo di calcio potrebbe essere la causa della degenerazione cellulare delle "hair cells" che si osserva tra il settimo e quindicesimo giorno dopo la nascita del topo KO (Wangemann et al., 2004; Wangemann et al., 2007). Ulteriori studi condotti su topi KO per Slc26a4 hanno evidenziato che il potenziale endococleare in questi animali è assente, a causa di una mancata espressione del canale del potassio KCNJ10 (Wangemann et al., 2004; Wangemann et al., 2007).

Infine, la scala media del topo Slc26a4^{-/-} è allargata e lo sviluppo della coclea è ritardato (Wangemann et al., 2009).

L'espressione della pendrina, seppure a livelli minori rispetto ai tessuti sopra citati, è stata accertata anche in altre sedi quali la placenta, il testicolo (nelle cellule del Sertoli) e l'endometrio umano (Suzuki et al., 2002). Anche la ghiandola mammaria del topo esprime la pendrina, come è stato dimostrato da esperimenti di Western blot; probabilmente in questa sede la pendrina media l'accumulo di ioduro a livello del latte materno (Rillema et al., 2003; Everett et al., 1997) (figura 41).

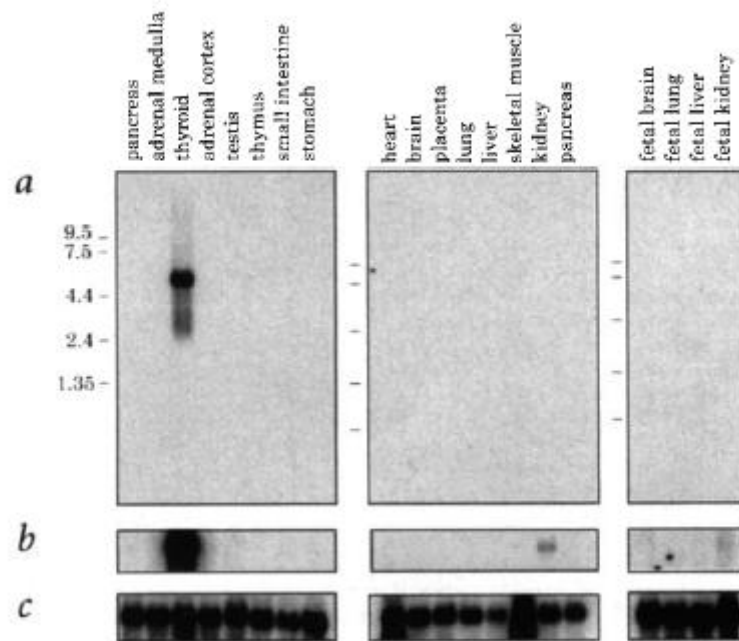


Figura 41: northern blot relativo al pannello d'espressione della pendrina. a) dopo esposizione per 7 ore è possibile rilevare un forte segnale solamente a livello della tiroide; b) dopo esposizione per 100 ore compare un segnale anche in corrispondenza del rene adulto e fetale e del cervello fetale; c) controllo con β -actina.

Da questi lavori sembrerebbe quindi emergere che la pendrina sia in grado di accogliere specie ioniche diverse, in modo tessuto specifico, con un possibile

intervento di fattori ambientali, ormoni e altre proteine nel mediare la sua regolazione nonché la sua funzione.

6.2.3 Mutazioni a carico della pendrina

Più di 140 diverse mutazioni a carico del gene SLC26A4 sono state rilevate in soggetti affetti da sindrome di Pendred (PS) (<http://www.healthcare.uiowa.edu/labs/pendredandbor/slcMutations.htm>). Tali mutazioni sono state riscontrate all'interno della sequenza codificante, in siti donatori/accettori di splicing, nell'esone 1 non codificante (5' Untranslated Region) e precisamente nella sequenza riconosciuta dal fattore trascrizionale FOXI1 (Yang et al., 2007); è stato riportato che il 62 % circa di tutte le mutazioni identificate sono sostituzioni aminoacidiche missenso.

In accordo tra loro, le diverse tecniche utilizzate per i saggi funzionali (che vanno da studi di flusso con isotopi radioattivi a test che utilizzano indicatori fluorescenti intracellulari per misurare variazioni di alogenuri e/o protoni) evidenziano come l'intera proteina, e non solo i presunti elementi transmembrana, sia fondamentale per il corretto funzionamento del trasportatore (Dossena et al., 2009). Come mostrato in figura 42, mutazioni patologiche sono state rilevate lungo tutti i 780 residui che costituiscono la proteina e tutte le mutazioni che conducono a un'isoforma tronca sono funzionalmente inattive (Dossena et al., 2009).

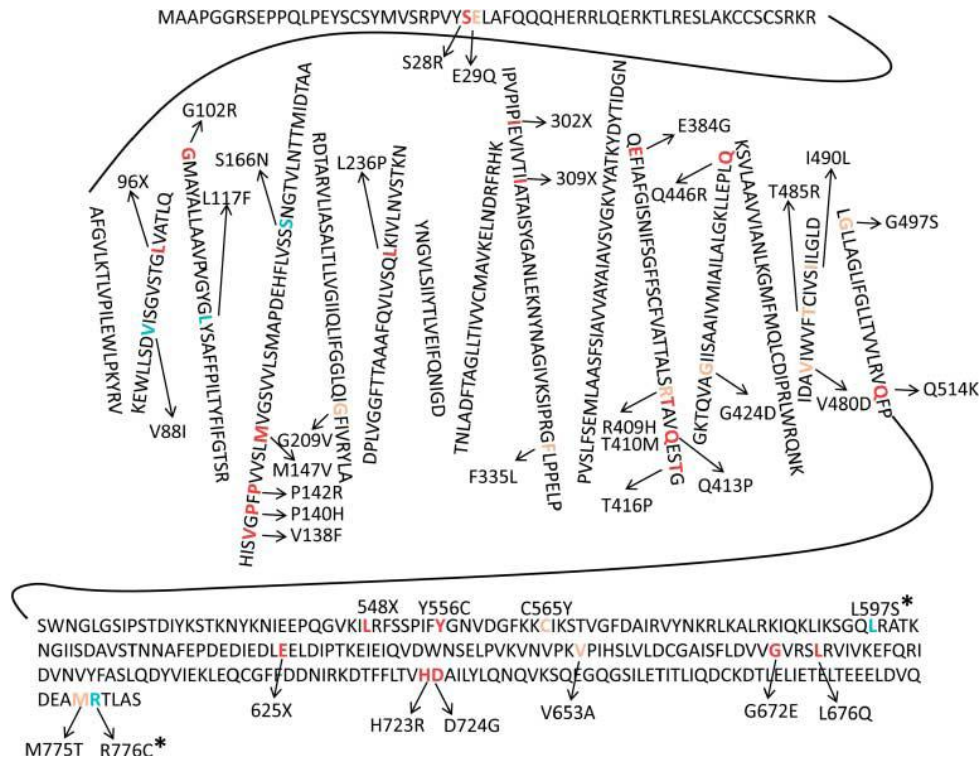


Figura 42: mutazioni nella sequenza aminoacidica della pendrina che sono state caratterizzate funzionalmente. In azzurro sono indicate le mutazioni senza impatto funzionale, in rosa quelle che portano a una ridotta funzionalità e in rosso quelle che rendono la proteina non funzionale. L'estensione X indica le mutazioni che danno luogo a una forma trunca della proteina; *varianti alleliche descritte come polimorfismi ma la cui funzionalità è ambigua (Choi et al., 2008).

Tuttavia, è difficile al momento collegare in modo inequivocabile la gravità della perdita dell'udito (moderata, grave, e profonda) a specifiche mutazioni di SLC26A4. Mutazioni senza attività di trasporto (P140H, Q413P, Q514K e D724G) o con attività ridotta (E29Q, V88I/R409H, G424D e T485R) sono state ugualmente identificate in pazienti con PS e EVA non sindromica che soffrono di sordità da moderata a profonda (Taylor et al., 2002; Pera et al., 2008); pazienti che non mostrano mutazioni a carico di SLC26A4 possono essere affetti da EVA e da una sordità severa; infine, pazienti con mutazioni mono-alleliche possono soffrire di sordità severa o profonda (Pera et al., 2008).

La spiegazione più semplice della difficoltà di correlare una specifica mutazione di SLC26A4 con sintomi clinici è che fattori genetici, epigenetici e/o ambientali potrebbero modificare il fenotipo della malattia osservato (Pera et al., 2008). Pryor e collaboratori (Pryor et al., 2005) hanno trovato che generalmente i casi di EVA non sindromica sono associati con una singola mutazione di SLC26A4, mentre la PS è

una malattia geneticamente omogenea causata da mutazioni bi-alleleliche di SLC26A4. La teoria dell'associazione tra EVA non sindromica e mutazioni monoalleleliche di SLC26A4 è stata in seguito smentita (Albert, EJHG 2006, Pera et al. EJHG 2008). Va inoltre sottolineato che i pazienti considerati avere una mutazione monoallelica potrebbero avere una mutazione non rilevata in una regione regolatrice o in un introne (Gillam et al., 2005, Pryor et al., 2005).

I due criteri utilizzati comunemente per l'assunzione di patogenicità per mutazioni del gene SLC26A4 sono:

- i) bassa incidenza della mutazione nella popolazione di controllo;
- ii) la sostituzione di aminoacidi conservati.

Tuttavia è stato recentemente dimostrato dal nostro gruppo (Pera et al., 2008) che questi criteri non sono parametri sufficienti per predire la funzionalità di SLC26A4; tuttavia, è stato dimostrato che alcuni parametri biochimici possono essere impiegati per spiegare alcuni deficit funzionali. Una riduzione della funzionalità del trasportatore è stata trovata quando un aminoacido munito di una carica fissa (come l'acido aspartico (D-), l'acido glutammico (E-), la lisina (K+) l' arginina (R), o l'istidina (H+) viene sostituito. Inoltre, la perdita o l'aggiunta di una prolina (P) che agisce come un distruttore delle strutture secondarie regolari quali α eliche o foglietti β , è dannoso per la funzione di trasporto.

Nonostante più di 140 mutazioni nell'ORF della pendrina siano state descritte e correlate con lo sviluppo della sindrome di Pendred, un sottogruppo di pazienti (20% circa) mostra tutti i sintomi senza mutazioni nella proteina di per sé. In questi pazienti, la mancanza della funzione della pendrina può essere dovuta: i) a mutazioni nella sequenza promotrice e/o al malfunzionamento di elementi regolatori, con la conseguente perdita di espressione di una proteina altrimenti funzionale; ii) oppure allo sviluppo di una malattia autoimmune.

6.3. REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL GENE SLC26A4

Recentemente è stata riportata da Adler e collaboratori un'analisi dettagliata delle regioni regolatrici del promotore del gene umano della pendrina (Adler et al., 2008).

Tale gruppo ha dimostrato che l'interazione tra elementi PREs (positive regulatory elements) e NREs (negative regulatory elements) può determinare in maniera specifica l'espressione della pendrina in cellule epiteliali renali, di tiroide, e d'orecchio interno. Inoltre, sebbene la pendrina sia espressa in questi tre organi, la sua regolazione trascrizionale è diversa e coinvolge differenti regioni del DNA all'interno della 5'flanking region. In particolare in questo lavoro è stato isolato un frammento di DNA corrispondente alla 5' flanking region del gene umano della pendrina che si estende per oltre 4,2 kb a partire dalla posizione - 40 rispetto sito d'inizio della traduzione (la A dell'ATG, per convenzione, è in posizione +1).

Analisi in silico di questo frammento (Farre et al., 2003; Schug e Overton, 1997) hanno rivelato un'abbondanza di elementi SP1 in questa regione ricca di GC e l'assenza di un motivo TATA box. Inoltre, sempre in questa regione, sono stati trovati putativi siti di legame per diversi fattori nucleari di epatociti (HNF) e per fattori GATA, (che sono noti conferire un'espressione rene-specifica a diversi geni) (Bai et al., 2002, Taniyama et al., 2001); nonché siti di legame per fattori di trascrizione della tiroide TTF-1, TTF-2 e Pax8 (tutti in grado di conferire un'espressione tiroide-specifica).

Già studi precedenti avevano dimostrato nella 5'flanking region del gene di ratto, la presenza di un sito di legame per il fattore di trascrizione tessuto specifico TTF-1 (Dentice M. et al.2005). Mutazioni mono-alleleliche del gene umano TTF-1 portano a difficoltà respiratorie, lievi disfunzione della tiroide e coreoatetosi (Krude H. et al., 2002). Pax8 è un altro potenziale regolatore dell'espressione della pendrina. Questo fattore di trascrizione è stato originariamente identificato nel rene e nella tiroide, dove agisce, sinergicamente con TTF-1, sul promotore della tireoglobulina. E' stato dimostrato che Pax8 è un regolatore positivo dell'espressione della pendrina umana (Presta et al., 2005), e che le mutazioni mono-alleleliche del gene umano di Pax8 risultano in ipotiroidismo congenito e in una ipoplasia della tiroide (Macchia et al., 1998). Pax8 è anche espresso in precursori di cellule dell'orecchio, dove la sua trascrizione è attivata da FOXI1 (Hans et al. 2004), un fattore di trascrizione che viene espresso anche nel rene e nell'orecchio interno. I topi KO per FOXI1 sono sordi e presentano segni di un'alterata omeostasi endolinfatica. Il compartimento endolinfatico dell'orecchio interno di questi animali è allargato, un fenotipo molto

simile a quello visto nel topo knock-out per la pendrina. È interessante notare che topi FOXI1-/- non esprimono la pendrina nell'epitelio endolinfatico dell'orecchio interno, il che suggerisce che FOXI1 regoli l'espressione della proteina a monte (Hulander et al., 2003). È stato anche dimostrato, che i topi FOXI1-/- non hanno cellule intercalate nel tubulo renale distale, e sono quindi soggetti ad acidosi in questo tratto del nefrone (Al-Awqati et al., 2004; Blomqvist et al., 2004). Questi risultati dimostrano inoltre che sia le mutazioni che portano alla perdita di funzionalità che quelle che portano alla mancata trascrizione della pendrina possono causare sintomi caratteristici della PS.

Negli esperimenti di Adler e collaboratori (Adler et al., 2008), la regione di 4.2 kb corrispondente alla 5' flanking region e i prodotti di delezioni consecutive al 5' sono stati clonati in un vettore e fusi con il gene reporter della luciferasi. In seguito sono stati trasfettati transientemente nelle linee cellulari HEK293 (rene), LA2 (tiroide), e VOT36 (orecchio interno) dove era stata in precedenza riscontrata la presenza dell'mRNA della pendrina. Questi esperimenti hanno mostrato una variazione dell'attività del gene reporter che differiva a seconda della linea cellulare testata. In particolare hanno suggerito che un elemento regolatore negativo controlli l'attività del promotore della pendrina in tutti e tre i tipi cellulari; un elemento regolatore positivo (tra i nucleotidi -1433 e -1044) controllerebbe l'attività del promotore nelle cellule renali, mentre uno posto tra i nucleotidi -2060 e -1726 sembrerebbe controllarne l'attività nelle cellule di tiroide e orecchio interno. Un'analisi più dettagliata di queste due ultime regioni ha rivelato una sequenza di 91 bp, una sequenza di 114 bp, e una regione di 108 bp, che sembrano essere responsabili in maniera specifica rispettivamente della modulazione della trascrizione in rene, tiroide, e orecchio interno. In particolare, con esperimenti di mutazione della regione di 114 bp Adler e collaboratori (Adler et al., 2008) hanno dimostrato la presenza di siti di legame per TTF-1 e TTF-2, essenziali per l'attività del promotore in cellule LA2. Nelle regioni di 108 e 91 bp sono stati trovati putativi siti di legame per diversi fattori di trascrizione rene-specifici (tra cui HNF3 e di Wilms tumor 1), ma non si conoscono fattori di trascrizione specifici per l'orecchio interno.

Tuttavia, anche fattori sistemici sono in grado di modificare l'espressione di SLC26A4. È stato dimostrato, ad esempio, che il desossicorticosterone pivalato

(DOCP), un analogo dell'aldosterone, è in grado di stimolare l'espressione della pendrina (Verlander et al., 2003), ad indicare il suo coinvolgimento nella regolazione dell'equilibrio acido-base e salino; un aumento dell'espressione della pendrina si può osservare anche in caso di alcalosi metabolica (Frische et al., 2003), sottolineando il ruolo di SLC26A4 nella secrezione di bicarbonato nel rene (Wagner et al., 2002). Sempre Adler e colleghi hanno osservato che vi è una diminuzione o un aumento dell'attività del promotore in caso, rispettivamente, di pH acido (7,0 -7,1) o di pH alcalino (7,6 -7,7) in HEK293 e VOT36, ma non nelle cellule tiroidee (LA2) transfettate. Inoltre l'aldosterone provoca una ridotta attività del promotore in HEK293 ma non ha effetto nelle LA2 e nelle VOT36.

E' riportato anche che la tiroglobulina (TG) sia in grado di stimolare l'espressione di SLC26A4 (Royaux et al., 2000; Suzuki et al., 2006). L'espressione di TG, a sua volta, è stimolata dal regolatore trascrizionale TTF-2, che può essere attivato da TSH (Ortiz et al., 1997).

6.4 SCOPO DEL LAVORO

La pendrina è espressa principalmente a livello dell'epitelio follicolare tiroideo, dell'orecchio interno e del rene. Studi di caratterizzazione funzionale condotti in sistemi di overespressione eterologa hanno rilevato che essa può mediare il trasporto di alogenuri, favorendo lo scambio Cl^-/Cl^- e Cl^-/I^- ; inoltre essa è in grado di mediare lo scambio $\text{Cl}^-/\text{formiato}$, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e Cl^-/OH^- . Dati in letteratura riportano che la pendrina possa svolgere un ruolo importante nel favorire l'efflusso di ioduro dalle cellule dell'epitelio follicolare tiroideo verso il colloide (Kopp et al., 2008), nel mantenimento del pH e della composizione ionica dell'endolinfa nell'orecchio interno (Royaux et al., 2003) e nel contribuire alla secrezione di bicarbonato a livello del tratto distale del nefrone (Royaux et al., 2001), accogliendo specie ioniche diverse in modo tessuto specifico. Poichè tale proteina è espressa solo in specifici organi e tipi cellulari risulta ragionevole pensare ad una regolazione fine della sua trascrizione.

Inoltre, nonostante più di 140 mutazioni nell'ORF (Open Reading Frame) della pendrina siano state descritte e correlate con lo sviluppo della sindrome di Pendred, il 20% dei pazienti affetti dalla malattia non presenta mutazioni nella proteina di per sé. Questi pazienti potrebbero tuttavia presentare mutazioni nella sequenza promotrice e/o in quella di elementi regolatori, con la conseguente perdita di espressione di una proteina altrimenti funzionale.

Lo scopo del lavoro è stato quindi la caratterizzazione funzionale della 5' flanking region del gene SLC26A4 ed in particolare:

- i) l'identificazione del promotore minimo (la sequenza nucleotidica minima che è necessaria per la trascrizione della proteina) del gene SLC26A4 e degli eventuali elementi di regolazione tessuto specifici;
- ii) la determinazione degli elementi responsivi alla stimolazione ormonale.

La caratterizzazione dettagliata dei meccanismi di regolazione del gene SLC26A4 potrebbe migliorare i sintomi dei pazienti affetti da PS permettendo d'intervenire sull'espressione della proteina nel caso di deficit dovuti ad sua regolazione anomala. Inoltre l'individuazione degli elementi necessari alla trascrizione del gene SLC26A4 potrebbe anche migliorare la diagnosi dei pazienti PS, grazie al sequenziamento delle regioni non codificanti critiche per l'espressione della proteina.

Cap.7

Materiali e metodi Parte II

7.1 VETTORI

7.1.1 pGL3-Basic

Il vettore pGL3-Basic (figura 43) è privo sia di un promotore eucariotico sia di elementi di regolazione positiva. Il frammento di DNA clonato al suo interno e contenete la sequenza con ipotetica funzione promotrice, può essere inserito a monte del gene reporter per la “Firefly” luciferasi (luc^+). In questo modo trasfettando transientemente le cellule con tale costrutto e misurando poi l’attività del gene reporter della luciferasi si ottiene una misura indiretta della capacità del promotore di dirigere la trascrizione del gene a valle.

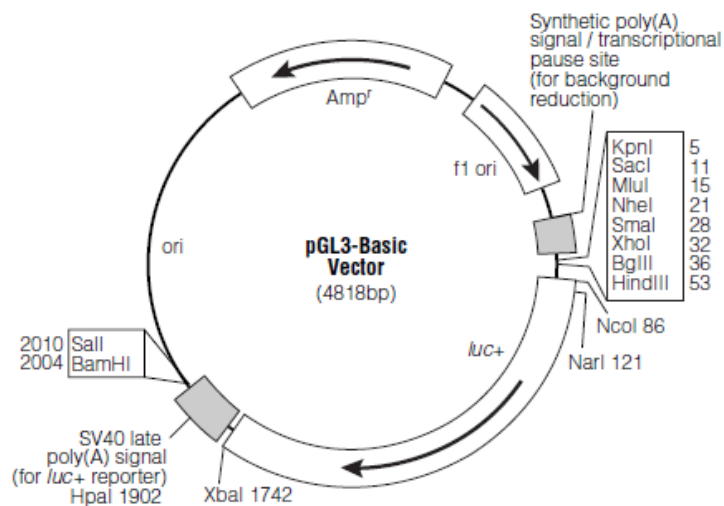


Figura 43: rappresentazione grafica del vettore pGL3-basic, utilizzato nel saggio funzionale al luminometro.

7.1.2 Il vettore pRL-Tk

Il vettore pRL-TK (figura 44) contiene il cDNA codificante la Renilla luciferasi (Rluc) sotto il controllo del promotore del virus dell’ herpes simplex della tirosina kinasi (HSV-TK). Il vettore pRL-TK viene utilizzato, nei nostri esperimenti, come normalizzatore interno in combinazione con un secondo vettore contenente la sequenza con ipotetica attività promotrice che controlla il gene reporter della Firefly luciferasi (nel nostro caso il pGL3-basic o pGL3-costrutto) .

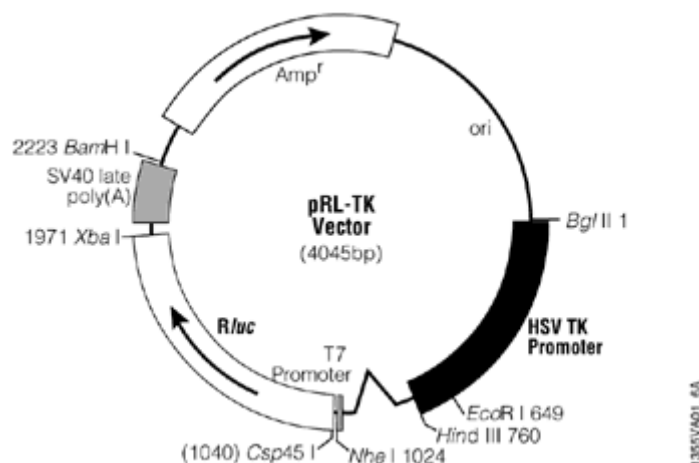


Figura 44: rappresentazione grafica del vettore pRL-TK, utilizzato nel saggio funzionale al luminometro, il gene della Renilla è posto sotto il controllo del promotore virale per la tirosin kinasi.

7.2 COSTRUZIONE DEI MUTANTI

Per creare i diversi costrutti deleti a partire dal vettore pGL3-PDS (figura 45) la strategia utilizzata è stata la seguente: è stata inserita tramite mutagenesi sito specifica una sequenza riconosciuta dall'enzima di restrizione Kpn1 poco dopo la regione che intendevamo tagliare. In seguito, sfruttando la presenza di un secondo sito per Kpn1 nel vettore esattamente a monte della sequenza clonata il frammento che si intendeva eliminare è stato exciso e successivamente il vettore è stato richiuso con una reazione di ligazione.

Le reazioni sono state condotte utilizzando il “QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit” (Stratagene) e seguendo il protocollo fornito dal produttore. I primers utilizzati sono i seguenti:

1-452 fw: 5'- TAGTGTTTTACACGGGGTACCCCCAGATCTTGAAAGG-3'

1-452 rw: 5'- CCTTTCAAGATCTGGGGGTACCCCCGGTGAAAACACTA -3'

1-1165 fw: 5'- GGAGCCTCTTCGGGGTACCCCTGTATTTAC-3'

1-1165 rw: 5'- GAAGTAAATACGGGGTACCCCGAAGAGGC-3'

1-1608 fw: 5'- GTTCCTCTTCTCGGGGTACCCCCTCCCCATGTGG-3'

1-1608 rw: 5'- CCACATGGGGAGGGGTACCCCGAAGAGGAAC-3'

1-1734 fw: 5'- ACCTCGCAACCCTGGGGTACCCCTGAGATTAGTAA-3'

1-1734 rw: 5'- TTACTAATCTCAGGGGTACCCAGGGTTGCGAGGT -3'

Il mutante 452-960 è stato invece costruito tagliando il plasmide pGL3-PDS con l'enzima BglII (che ha appunto due siti in tale vettore in posizione 452 e 960 della sequenza da 1894 bp), purificando da gel il plasmide aperto e richiudendolo con la T4 ligasi.

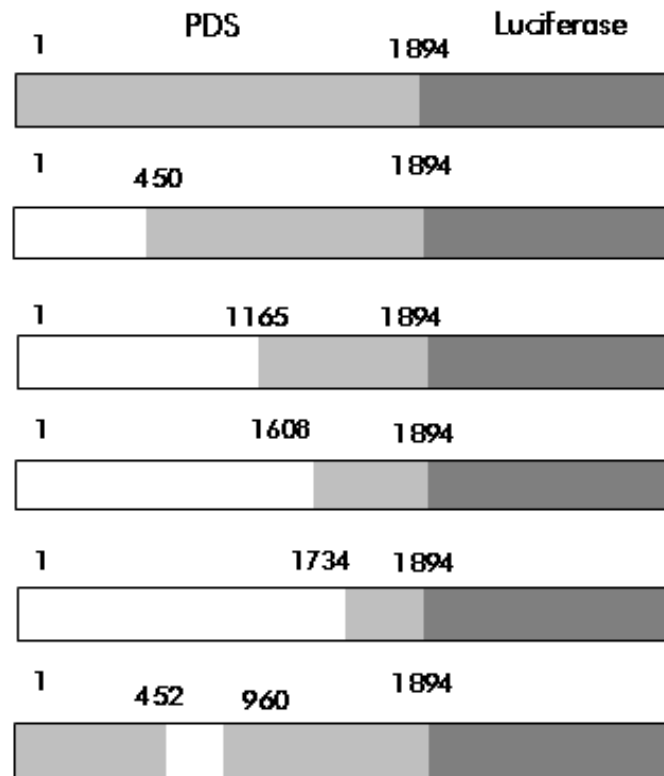


Figura 45: rappresentazione grafica dei diversi costrutti utilizzati per gli studi del promotore. In grigio chiaro la sequenza del gene della pendrina che abbiamo testato; in grigio scuro il gene della luciferasi firefly nel vettore pGL3; la regione in bianco rappresenta la porzione deleta della sequenza del promotore.

7.2.1 Miniprep e Largeprep

Le miniprep venivano eseguite con il kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) (vedere paragrafo 3.2.4 di Materiali e metodi Parte I).

Le largeprep venivano eseguite con il kit Nucleobond AX-100 (Machery & Nagel) (vedere paragrafo 3.2.5 di Materiali e metodi Parte I).

7.2.3. Sequenziamento

Le sequenze sono state verificate mediante sequenziamento (servizio Microsynth, CH).

7.3 COLTURE CELLULARI

Abbiamo utilizzato due diverse linee cellulari; le HEK293 Phoenix (embrionali renali umane), e le PC-CL3 (epiteliali follicolari da tiroide di ratto). Le cellule sono state coltivate in incubatore alla temperatura ottimale di 37°C e al 5% di CO₂ con i seguenti terreni:

HEK293 Phoenix: vedi paragrafo 3.7 di Materiali e metodi Parte I.

PC-CL3: terreno Ham F12 Coon's modified supplementato di 5% di siero fetale bovino, 280 µM penicillina, 144 mM streptomina e una miscela di sei ormoni contenete insulina (1ug/ml), idrocortisone (3.62ug/ml), transferrina (5ug/ml), L-Glicil-istidil-L-lisina acetato (20ng/ml), somatostatina (10ng/ml) e TSH (1mU/ml).

Per la propagazione della coltura cellulare le cellule sono state seminate in capsule Petri del diametro di 10 cm e tripsinizzate con 1 ml di tripsin-EDTA solution 0.05% (Sigma).

7.4 TRASFEZIONE CON IL METODO DEL PEI

Le cellule sono state piastrate in multiwell da 96 pozzetti alla densità di 2×10^4 cellule (Nunc), e trasfettate 24 ore dopo con il plasmide pGL3-PDS o derivati (150 ng) e con il plasmide pRL-TK (75 ng) utilizzando la polietil-ammina (PEI). Per ogni costrutto sono state preparate due mix con i seguenti reagenti:

Reagenti	Eppendorf a (volume finale 50 μ l)	Eppendorf b (volume finale 50 μ l)
PEI		12 μ l
NaCl 150 mM	47 μ l	38 μ l
pGL3-vector (75 ng/ μ l)	2 μ l	
pRL-TK (75 ng/ μ l)	1 μ l	

Il contenuto delle due eppendorf viene miscelato e incubato per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione vengono aggiunti 10 μ l della miscela di trasfezione ad ogni pozzetto (con n=8 per ogni costrutto reporter testato) del multi-well da 96. Il medium viene cambiato 24 ore dopo con terreno fresco e trascorso un periodo di circa 48 ore le cellule sono state utilizzate per il saggio funzionale.

7.5 ESPERIMENTO AL LUMINOMETRO

Per misurare l'attività del gene reporter in cellule trasfettate è stato utilizzato il "Dual-Luciferase [®] Reporter (DLR) Assay System" (Promega) seguendo le istruzioni del produttore.

Le cellule vengono co-trasfettate con i due vettori contenuti ognuno un gene reporter, la "Firefly" luciferasi, sotto il controllo della sequenza con ipotetica funzione promotrice (vettore pGL3), e la "Renilla" luciferasi, sotto il controllo del promotore virale TK (timidino kinasi, pTK-basic). Quarantotto ore dopo la trasfezione il lisato cellulare viene preparato aggiungendo 20 μ l di "Passive Lysis Buffer" ad ogni pozzetto del multi-well da 96. Si aggiungono quindi 100 μ l di "Luciferase Assay Reagent II" (LAR II) al lisato cellulare. Dopo aver registrato la luminescenza, vengono aggiunti 100 μ l del reagente "Stop & Glo" per spegnere la reazione della luciferasi firefly e per attivare simultaneamente la Renilla luciferasi. L'attività delle due luciferasi viene misurata usando un luminometro a due iniettori (Victor X3, Perkin Elmer) nella modalità "DLR". L'attività della luciferasi Firefly viene normalizzata per quella della luciferasi Renilla per compensare eventuali differenze nell'efficienza di trasfezione tra i diversi pozzetti.

7.6 SALI

Tutti i sali e le altre sostanze chimiche usate erano al grado di purezza pro analysis

7.7 ANALISI STATISTICA

Per l'analisi dei dati, sono stati sfruttati i programmi Excel (Microsoft) o PRISM (GraphPad, USA). Tutti i risultati sono stati espressi come media \pm errore standard, per l'analisi statistica, è stato applicato il test T di Student per dati non appaiati o il test dell'ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test). Le differenze tra i dati sono assunte come statisticamente significative quando $p \leq 0,05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Cap.8

Risultati Parte II

8.1 CLONAGGIO DELLA 5' FLANKING REGION DEL GENE SLC26A4

Il gene SLC26A4, che codifica per la proteina pendrina (PDS) è espresso solamente in specifici organi e tipi cellulari, suggerendo una sua fine regolazione a livello trascrizionale. Sottoponendo la 5' flanking region del gene SLC26A4 ad un'analisi bioinformatica utilizzando il programma MathInspector (Genomatix) sono stati messi in evidenza diversi siti di binding per fattori trascrizionali tessuto specifici, quali Pax-8, espresso in rene, tiroide ed orecchio interno e TTF-1, che regola la trascrizione di geni espressi selettivamente in tiroide, polmone e cervello. Inoltre è stata evidenziata la presenza di una CpG island, una regione frequentemente presente nei promotori di geni sottoposti ad una regolazione tessuto specifica (figura 46).

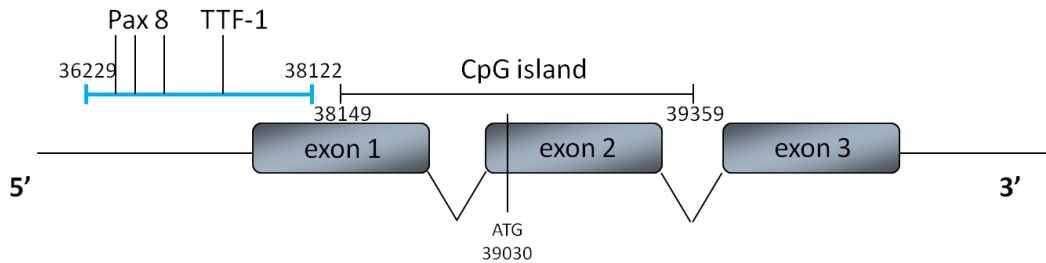


Figura 46: rappresentazione grafica della regione a monte del gene SLC26A4. Sono stati evidenziati siti di binding per Pax8, TTF-1 e una CpG Island. I rettangoli grigi rappresentano i primi tre esoni, in azzurro è evidenziata la putativa sequenza promotrice che è stata clonata nel vettore pGL3-basic.

In base all'analisi bioinformatica condotta un frammento di 2 Kb contenente la 5' flanking region del gene umano SLC26A4 ed una serie di sue delezioni successive sono stati clonati nel vettore pGL3-basic a monte del gene reporter per la luciferasi (figura 47).

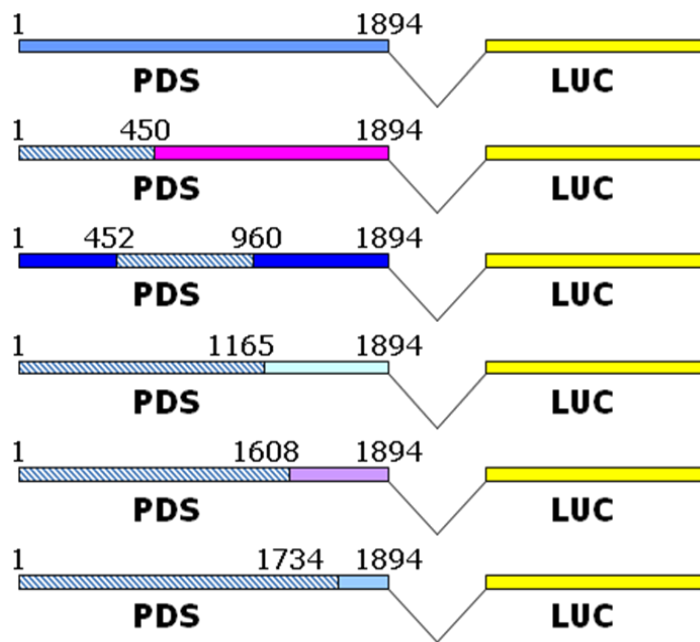


Figura 47: diversi costrutti ottenuti mediante mutagenesi del vettore pGL3-PDS. I rettangoli grigi a righe rappresentano le porzioni delete, i rettangoli colorati le sequenze rimanenti ed il rettangolo giallo il gene della Firefly luciferasi.

8.2 DERMINAZIONE DEL PROMOTORE MINIMO DEL GENE SLC26A4

8.2.1 Determinazione del promotore minimo del gene SLC26A4 nelle HEK293 Phoenix

Abbiamo deciso di determinare il promotore minimo del gene SLC26A4, ovvero la sequenza minima necessaria alla trascrizione del gene, in cellule HEK293 Phoenix. Abbiamo scelto di utilizzare tale modello cellulare perché facile da mantenere in coltura e trasfettare. Inoltre è riportato in letteratura (Dossena et al. 2006; Adler et al 2008) che tali cellule esprimono il trascritto per la pendrina; questo indica che il modello cellulare scelto contiene i mediatori trascrizionali necessari alla lettura delle informazioni contenute nel promotore. Per ciascuno dei costrutti precedentemente descritti è stata misurata al luminometro l'attività del gene reporter della Firefly luciferasi (figura 48).

HEK 293 PHOENIX

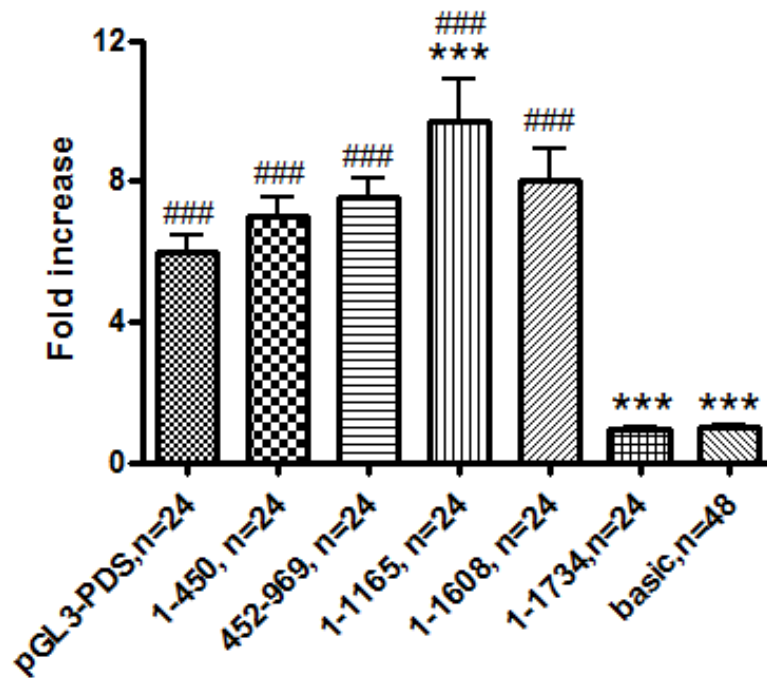


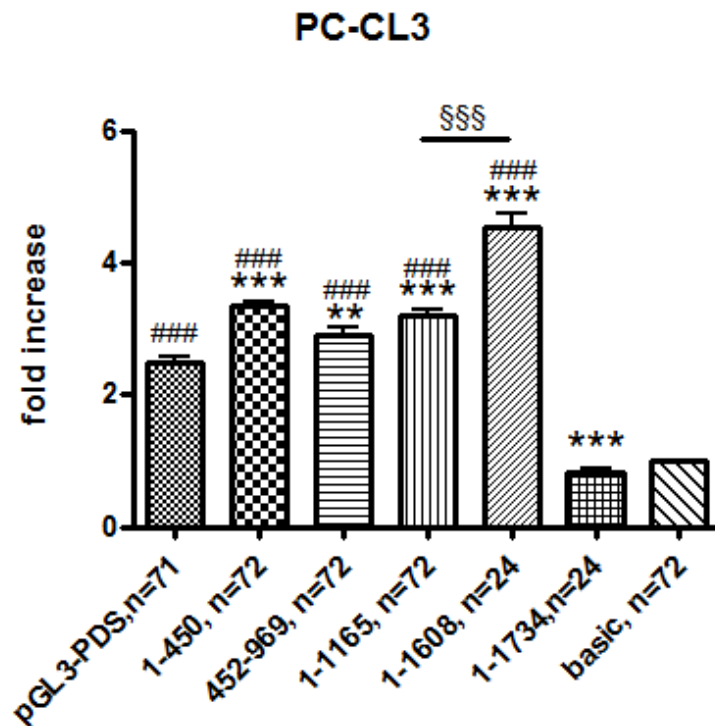
Figura 48: attività del promotore della pendrina (pGL3-PDS) e dei diversi mutanti deleti misurata nelle cellule HEK 293 Phoenix (attività luciferasi Firefly/attività luciferasi Renilla per ciascun costrutto normalizzata per il vettore vuoto, pGL3 basic, posto uguale a 1). La riduzione successiva della 5'flanking region porta ad un aumento statisticamente significativo della attività del promotore che risulta massima per il costrutto 1-1165; quando però la sequenza viene ulteriormente ridotta (costrutto 1-1734) l'attività cade drasticamente e si ottengono letture al luminometro comparabili con quelle ottenute per il vettore vuoto (basic). (Iway ANOVA, Tukeys Multiple Comparison Test, *** = $p < 0,001$ = differenza statisticamente significativa rispetto al costrutto pGL3-PDS; ### = $p < 0,001$ = differenza statisticamente significativa rispetto al costrutto pGL3 basic).

Come si può osservare dalla figura 48 la riduzione successiva della 5' flanking region del gene SLC26A4 porta ad un aumento statisticamente significativo della attività del promotore: si passa dalle $6,00 \pm 0,45$ volte rispetto al vettore vuoto del pGL3-PDS alle $8,03 \pm 0,89$ volte rispetto al vettore vuoto del costrutto 1-1608 (dove i numeri si riferiscono ai nucleotidi deleti).

Quando però abbiamo ulteriormente ridotto la sequenza del promotore (nel costrutto 1-1734, che contiene i soli nucleotidi della 5' UnTranslated Region) la sua attività cade drasticamente e si ottengono letture al luminometro comparabili con quelle ottenute con il vettore vuoto.

8.2.2 Determinazione del promotore minimo del gene SLC26A4 nelle PC-CL3

Abbiamo condotto lo stesso esperimento, utilizzando i medesimi costrutti, anche in cellule di derivazione tiroidea, in particolare abbiamo scelto come modello cellulare le PC-CL3, derivanti da follicolo tiroideo di ratto. Tali cellule esprimono i marcatori tipici delle cellule tiroidee (NIS, TG, TPO) e sono in grado di crescere solo in mezzo di coltura contenente una miscela di ormoni tiroidei (paragrafo 7.3 in Materiali e metodi Parte II). Anche in tale linea cellulare è stato identificato, come nelle HEK293 Phoenix, il trascritto per la pendrina (Muscella et al., 2008). Come osservato per le cellule renali, la riduzione successiva della 5' flanking region del gene PDS porta ad un aumento statisticamente significativo della attività del promotore (figura 49): si passa dalle $2,48 \pm 0,09$ volte rispetto al vettore vuoto del pGL3-PDS alle $3,19 \pm 0,08$ volte rispetto al vettore vuoto del costrutto 1-1165 (dove i numeri si riferiscono ai nucleotidi deleti). Nel modello tiroideo però la delezione successiva di ulteriori 443 nucleotidi (costrutto 1-1608) porta ad un incremento ancora maggiore della attività del promotore ($4,53 \pm 0,21$ volte). Quando la sequenza del promotore viene ulteriormente ridotta (nel costrutto 1-1734, che contiene i soli nucleotidi della 5' UnTranslated Region) l'attività cade drasticamente e si ottengono letture al luminometro comparabili con quelle ottenute per il vettore vuoto.



*Figura 49: attività del promotore della pendrina (pGL3-PDS) e dei diversi mutanti deleti misurata nelle cellule PC-CL3 (attività luciferasi Firefly/attività luciferasi Renilla di ciascun costrutto normalizzata per il vettore vuoto, pGL3 basic, posto uguale a 1). La riduzione successiva della 5' flanking region porta ad un aumento statisticamente significativo della attività del promotore; in questo caso la delezione successiva di ulteriori 443 nucleotidi (costrutto 1-1608) porta ad un incremento ancora maggiore della attività del promotore. Quando però la sequenza viene ulteriormente ridotta (costrutto 1-1734) l'attività cade drasticamente e si ottengono letture al luminometro comparabili con quelle ottenute per il vettore vuoto (basic). (1way ANOVA, Tukeys Multiple Comparison Test, *** = $p < 0,001$ = differenza statisticamente significativa rispetto al costrutto pGL3-PDS; ### = $p < 0,001$ = differenza statisticamente significativa rispetto al costrutto pGL3 basic; §§§ = $p < 0,001$).*

8.3 REGOLAZIONE DEL GENE SLC26A4: RISPOSTA ORMONALE

8.3.1 Risposta del gene SLC26A4 a Tireoglobulina, Tireotropina e sodio ioduro

Abbiamo utilizzato il modello cellulare tiroideo PC-CL3 anche per studiare la regolazione della trascrizione del gene PDS in risposta alla stimolazione ormonale; in particolare abbiamo verificato se l'attività del promotore della pendrina fosse influenzata dalla somministrazione di tireoglobulina (TG) (1 mg/ml) al mezzo di coltura. Infatti in letteratura è riportato che il messaggero della pendrina in cellule di tiroide di ratto aumenta se tale molecola viene addizionato al mezzo di crescita (Royaux et al., 2000). In figura 50 sono riportate le misure ottenute al luminometro trasferendo le cellule con il costrutto pGL3-PDS in presenza (1mg/ml) ed in assenza di tireoglobulina. Abbiamo inoltre verificato se l'aggiunta della TG provocasse variazioni anche nelle letture del solo vettore vuoto (pGL3-basic).

TG stimulation (1mg/ml)

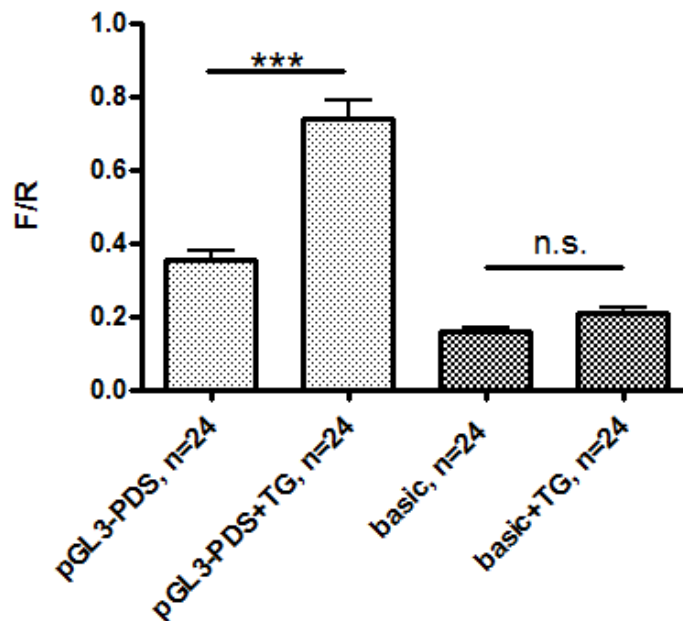


Figura 50: attività del costrutto pGL3-PDS e del vettore vuoto (attività luciferasi Firefly/attività luciferasi Renilla) misurata nelle cellule PC-CL3 trattate (+TG) o non trattate con tireoglobulina (1mg/ml). L'attività del costrutto pGL3-PDS misurata in cellule trattate è significativamente più alta di quella misurata in cellule non trattate; non vi sono invece differenze significative nelle letture del vettore vuoto. (1way ANOVA, Tukeys Multiple Comparison Test, *** = $p < 0,001$, n.s. = non significativo).

L'attività del costrutto pGL3-PDS misurata in cellule stimulate con tireoglobulina ($0,74 \pm 0,05$) è significativamente più alta di quella misurata in cellule non trattate ($0,35 \pm 0,02$), mentre non si rileva alcun effetto della tireoglobulina sul vettore vuoto ($0,16 \pm 0,01$ per il vettore vuoto non trattato e $0,21 \pm 0,01$ per il vettore vuoto +TG). I risultati ottenuti ci portano a concludere che all'interno della sequenza di 1894 paia di basi analizzata vi siano uno o più "elementi in cis" responsivi alla tireoglobulina. Recentemente in letteratura (Suzuki et al., 2006) è stata riportata anche un' azione dell'ormone tireostimolante tireotropina (TSH) in cellule FTLR-5 stimulate contemporaneamente con TG sull'espressione del messaggero della pendrina, . Abbiamo quindi valutato se il medesimo effetto fosse evidenziabile anche sull'attività del promotore (figura 51). In accordo con quanto riportato in letteratura abbiamo osservato che in seguito alla co-stimolazione di TG e TSH si ha un modesto aumento, statisticamente significativo, dell'attività del promotore (si passa da una attività $3,13 \pm 0,11$ volte maggiore rispetto al vuoto delle cellule trattate solo con TG

ad un'attività $3.57 \pm 0,14$ volte maggiore rispetto al vuoto delle cellule co-stimate con TG e TSH).

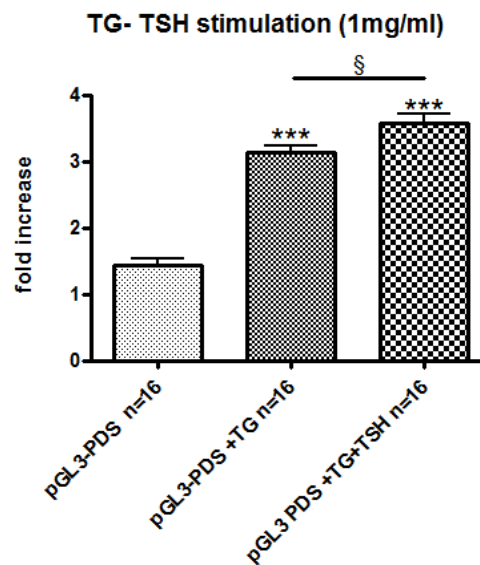


Figura 51: attività del costrutto pGL3-PDS misurata nelle cellule PC-CL3 non trattate, trattate con la tireoglobulina (+TG) o in seguito a co-stimolazione con l'ormone tireotropina (+TG +TSH) (attività luciferasi Firefly/attività luciferasi Renilla di ciascun costrutto normalizzata per il vettore vuoto posto uguale a 1). L'attività del costrutto pGL3-PDS in seguito a co-stimolazione è significativamente più alta di quella misurata in cellule trattate solamente con TG (1way ANOVA, Tukeys Multiple Comparison Test, *** = $p < 0,001$ = differenza statisticamente significativa rispetto al costrutto pGL3-PDS, § = $p < 0,05$).

Suzuki e collaboratori hanno anche osservato un aumento nei livelli d'espressione della pendrina in seguito alla co-stimolazione con TG e sodio ioduro (NaI, 5mM). Nei nostri esperimenti andando a stimolare le cellule solamente con NaI non si hanno differenze nell'attività del promotore rispetto alle cellule non trattate (si ha un'attività di $2,02 \pm 0,13$ volte maggiore rispetto al vuoto per le cellule non trattate e di $2,21 \pm 0,13$ volte maggiore rispetto al vuoto per le cellule trattate con NaI), mentre, come atteso, si ha un aumento statisticamente significativo se le cellule vengono stimulate contemporaneamente con TG e NaI ($3,112 \pm 0,14$ volte rispetto al vuoto; figura 52a). Tuttavia la co-stimolazione NaI-TG non induce un aumento dell'attività del promotore rispetto alla sola stimolazione con la sola TG (rispettivamente si ha un'attività di $3,112 \pm 0,14$ e di $3,55 \pm 0,10$ volte rispetto al vettore vuoto) (figura 52b).

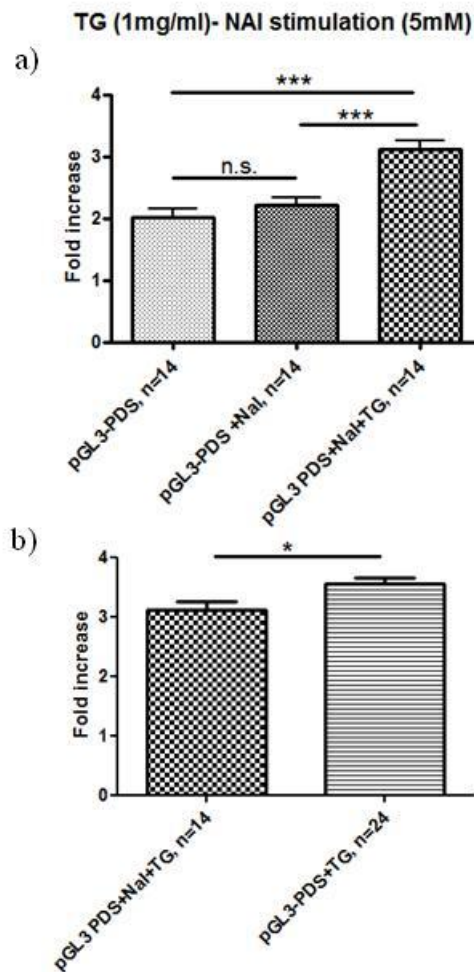


Figura 52: attività del costrutto pGL3-PDS in seguito alla co-stimolazione delle cellule con TG e NaI (attività luciferasi Firefly/attività luciferasi Renilla di ogni costrutto normalizzata per il vettore vuoto posto ugualmente a 1). a) andando a stimolare le cellule solamente con NaI non si hanno differenze dell'attività del promotore rispetto alle cellule non trattate mentre si ha un aumento statisticamente significativo se le cellule vengono co-stimate con la TG. Tuttavia la co-stimolazione NaI-TG non induce un aumento dell'attività del promotore rispetto alla sola stimolazione con TG. (1way ANOVA, Tukeys Multiple Comparison Test, *** = $p < 0,001$, * = $p < 0,05$).

8.3.2 Verifica della specificità della risposta alla TG

Per verificare che la stimolazione osservata in seguito al trattamento delle cellule con la TG fosse specifica e non dovuto ad una azione secondaria dei suoi due derivati iodurati 3,5,3'-triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4), siamo andati a misurare l'attività del costrutto pGL3-PDS anche in seguito alla stimolazione con T_3 (20 $\mu\text{g/ml}$) e T_4 (50 ng/ml) (Figura 53 a e b).

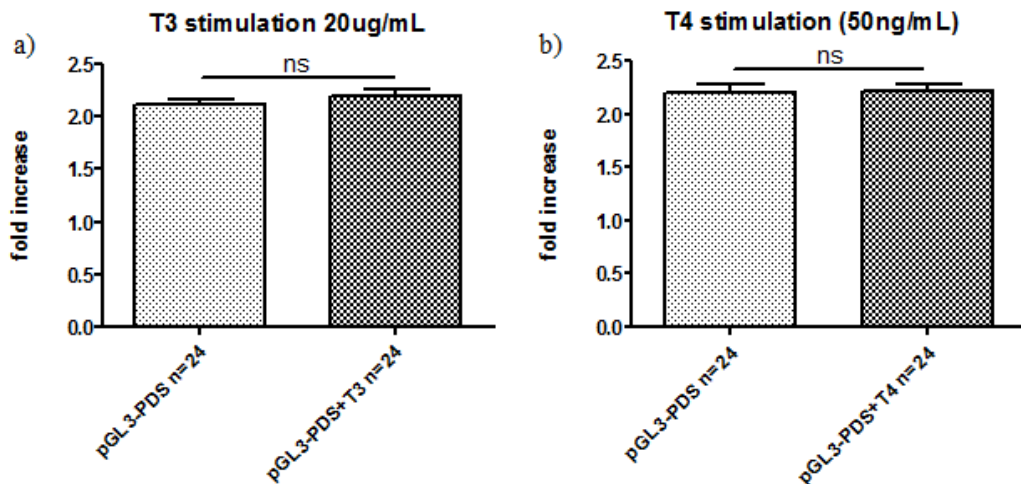


Figura 53: attività del costrutto pGL3-PDS in seguito alla stimolazione delle cellule con T3 (a) o T4 (b) (attività luciferasi Firefly/attività luciferasi Renilla di ciascun costrutto normalizzata per il vettore vuoto posto uguale a 1). In nessuno dei costrutti testati la stimolazione con i due ormoni provoca un aumento dell'attività del promotore, ad indicare che la risposta per la TG è specifica. (1way ANOVA, Tukeys Multiple Comparison Test; ns= non significativo).

In nessuno dei costrutti testati la stimolazione con i due ormoni provoca un aumento dell'attività del promotore, ad indicare che la risposta per la TG è specifica (per la stimolazione con T3 si ha un valore di $2,11 \pm 0,06$ volte rispetto al vuoto per il non trattato e di $2,2 \pm 0,07$ volte rispetto al vuoto per il trattato; per la stimolazione con T4 si ha un valore di $2,2 \pm 0,08$ volte rispetto al vuoto per il non trattato e di $2,2 \pm 0,06$ volte rispetto al vuoto per il trattato).

8.3.3 Caratterizzazione della stimolazione del promotore con la TG

Dopo aver determinato che la tireoglobulina stimola in modo specifico l'attività del promotore della pendrina abbiamo deciso di caratterizzare in maggiore dettaglio tale risposta.

Abbiamo innanzitutto eseguito esperimenti dose/risposta andando a trattare le cellule PC-CL3 trasfettate con il costrutto pGL3-PDS con concentrazioni crescenti di TG da 0,5 a 2,5 mg/ml (figura 54).

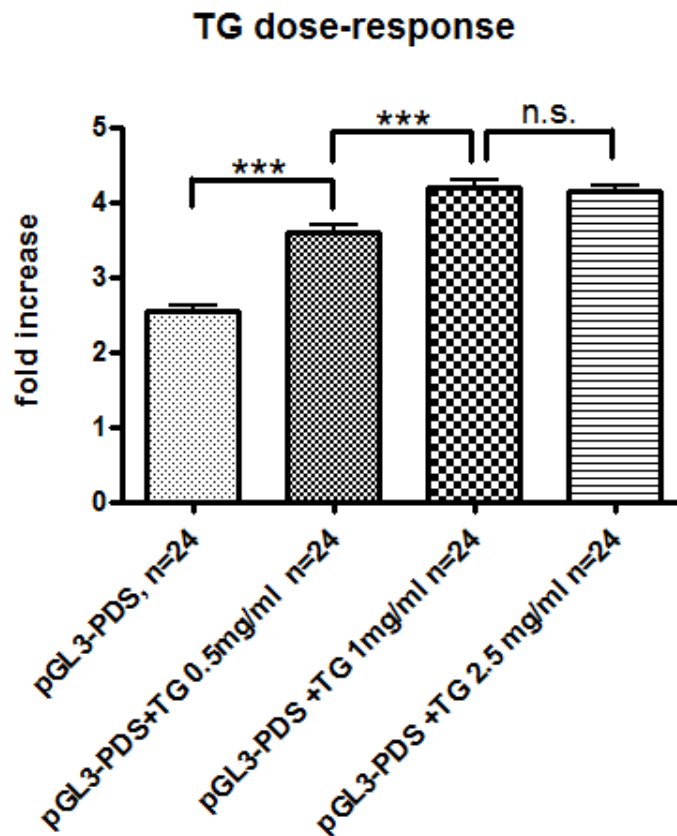


Figura 54: attività del costrutto pGL3-PDS trattato con concentrazioni crescenti di tireoglobulina (attività luciferasi Firefly/attività luciferasi Renilla normalizzata per il vettore vuoto, posto uguale a 1). La risposta massima la si ottiene già alla concentrazione di 1mg/ml. (1way ANOVA, Tukeys Multiple Comparison Test, *** = $p < 0,001$, n.s.= non significativo).

Come già riportato in letteratura la massima risposta alla TG si ottiene già alla concentrazione di 1mg/ml, infatti la stimolazione con una concentrazione maggiore (TG 2,5 mg/ml) non porta ad una aumento significativo della attività del promotore della pendrina (rispetto al vettore vuoto si hanno i valori di: $2,53 \pm 0,08$ per il non trattato; $3,59 \pm 0,09$ per 0,5 mg/ml; $4,18 \pm 0,01$ per 1mg/ml e $4,14 \pm 0,07$ per 2,5 mg/ml). Per caratterizzare la risposta alla tireoglobulina nel tempo abbiamo quindi eseguito anche esperimenti di “time course”. Le cellule sono state trasfettate con il costrutto pGL3-PDS e ventiquattro ore dalla dopo la trasfezione la tireoglobulina è stata addizionata al mezzo di coltura; a partire da tale momento (tempo 0) l’attività del promotore è stata quindi misurata ad intervalli di dodici ore fino ad un tempo massimo di quarantotto ore. L’attività massima del promotore si registra già dodici ore dopo il trattamento con tireoglobulina ($2,52 \pm 0,30$ volte rispetto al vuoto per le

cellule non trattate e $3,95 \pm 0,43$ volte rispetto al vuoto per le cellule trattate), in accordo con quanto riportato in letteratura (figura 55).

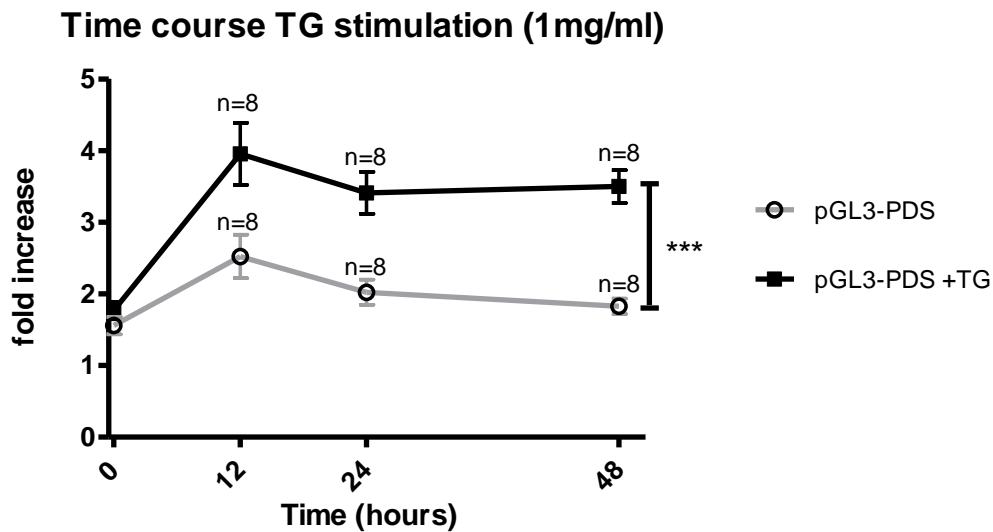


Figura 55: esperimenti di time-course in cellule PC-CL3 trasfettate con il costrutto pGL3-PDS e trattate con tireoglobulina 1mg/ml. L'attività massima (attività luciferasi Firefly/attività luciferasi Renilla normalizzata per il vettore vuoto, posto uguale a 1) la si registra dodici ore dopo il trattamento con TG (2way ANOVA, *** = $p < 0,001$).

Il passo successivo è stato quello di identificare, all'interno della sequenza di 1894 bp da noi clonata, quali fossero gli "elementi in cis" responsivi alla tireoglobulina. Abbiamo verificato se nei vari mutanti deleti a nostra disposizione l'attività del gene reporter subisse variazioni in seguito alla stimolazione (figura 56) con TG.

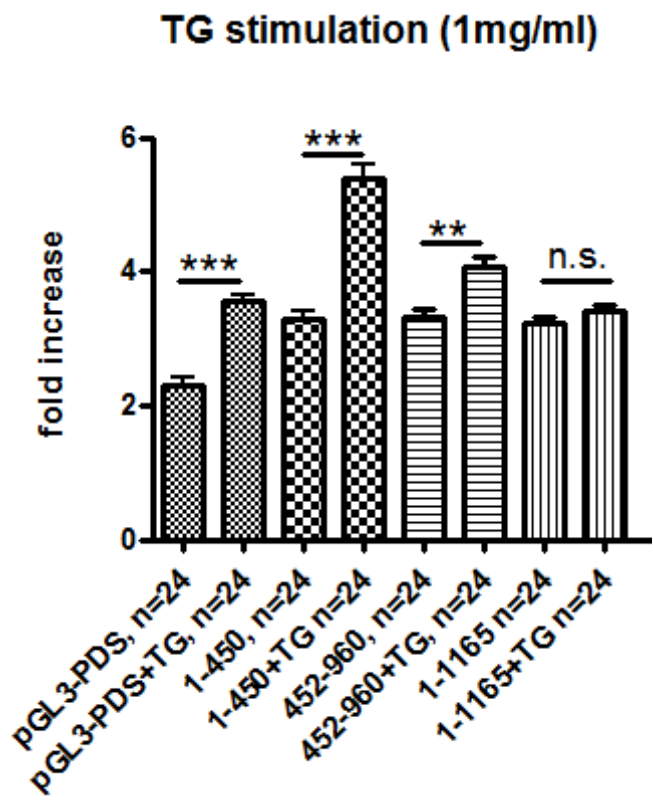


Figura 56: attività del promotore della pendrina (pGL3-PDS) e dei diversi mutanti deleti (attività luciferasi Firefly/attività luciferasi Renilla normalizzate per il vettore vuoto posto uguale a 1) misurata nelle cellule PC-CL3 trattate o non trattate con tireoglobulina 1mg/ml. L'attività del gene reporter in tutti i costrutti provati è significativamente maggiore in cellule trattate con tireoglobulina di quella misurata in cellule non trattate tranne che per il costrutto 1-1165. (1way ANOVA, Tukeys Multiple Comparison Test, *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, n.s. = non significativo).

L'attività del gene reporter misurata per i costrutti pGL3-PDS, 1-450, 452-960 è significativamente maggiore in cellule trattate con tireoglobulina di quella misurata in cellule non trattate ($2,29 \pm 0,12$ e $3,55 \pm 0,10$ per il costrutto pGL3-PDS; $3,29 \pm 0,13$ e $5,38 \pm 0,23$ per il costrutto 1-450; $3,32 \pm 0,13$ e $4,08 \pm 0,14$ per il costrutto 452-960). Solo la delezione della sequenza compresa tra i nucleotidi 960-1165 porta alla perdita della stimolazione da parte della tireoglobulina ($3,23 \pm 0,09$ e $3,42 \pm 0,09$ volte rispetto al vettore vuoto rispettivamente per le cellule non tratte o trattate con TG). E' quindi ipotizzabile che all'interno di tale regione si trovi la sequenza di binding per i fattori trascrizionali che mediano la risposta alla tireoglobulina. E' inoltre interessante notare che la delezione della regione compresa tra i nucleotidi 452-960 porta ad una diminuzione, statisticamente misurabile, della stimolazione da parte

della TG. Non è quindi da escludere, che, anche all'interno di tale sequenza, vi siano elementi in cis responsivi alla TG.

Cap.9

Discussione Parte II

L'identificazione della precisa regione genomica contenente il gene SLC26A4, le cui mutazioni sono responsabili della sindrome di Pendred, ed il conseguente clonaggio del gene, sono stati effettuati solo parecchi anni dopo la prima descrizione della patologia (Everett et al., 1997).

La scoperta del gene-malattia, responsabile della sindrome di Pendred, ha immediatamente dato avvio ad una serie di studi volti ad investigare la struttura, la funzione e l'espressione del prodotto proteico del gene della pendrina (PDS). Il gene SLC26A4 dà luogo ad un trascritto di 2343 paia di basi distribuite in 21 esoni e codifica una proteina transmembrana altamente idrofobica di 780 aminoacidi, la pendrina.

L'espressione del gene è stata individuata dapprima nell'orecchio interno, nella tiroide e nel rene (Everett et al., 1997). Successivamente, sebbene a livelli molto bassi rispetto alla tiroide, l' mRNA della pendrina (mediante Real Time PCR), è stato evidenziato in altre sedi quali il sincizio trofoblasto villosa derivato da colture primarie placentari di cellule di citotrofoblasto villosa (Bidart et al., 2000), nelle cellule del Sertoli (Lacroix et al., 2001) e nell'endometrio umano (Suzuki et al., 2002).

Tra le funzioni attribuite alla pendrina figura il trasporto di ioduro, cloruro e bicarbonato, mentre non è presente quello di solfato nonostante la proteina presenti tratti nella sequenza tipici dei trasportatori per tale ione.

Dai dati riportati in letteratura sembra verosimile che la pendrina accolga specie ioniche diverse in modo tessuto-specifico e questo comporta che fattori ambientali (e.g. ormoni ed altre proteine) contribuiscano alla sua funzione/regolazione.

Dati i differenti livelli di espressione della proteina nei vari tessuti è ragionevole pensare ad una regolazione fine della sua espressione con un controllo specifico a livello trascrizionale. Inoltre da indagare è anche la regolazione dell'espressione del gene per la pendrina in risposta alla stimolazione ormonale.

Date le premesse lo scopo del mio lavoro è stato quello di caratterizzare la sequenza del promotore della pendrina, di riconoscere all'interno di tale sequenza gli elementi che determinano l'espressione tessuto specifica del gene ed eventuali elementi responsivi alla stimolazione ormonale.

9.1 CARATTERIZZAZIONE DEL PROMOTORE DEL GENE SLC26A4

Un frammento di 1894 nucleotidi contenente la 5' flanking region del gene umano SLC26A4 ed una serie di sue delezioni successive sono stati precedentemente clonati nel vettore pGL3-basic a monte del gene reporter per la luciferasi (figure 46 e 47 dei Risultati della Parte II). Abbiamo deciso di misurare la capacità della "5' flanking region" del gene PDS di promuovere la trascrizione del gene reporter in due diverse linee cellulari, una di derivazione renale, le HEK293 Phoenix, e una di derivazione tiroidea, le PC-CL3. In entrambi i modelli cellulari utilizzati l'espressione della pendrina è già stata precedentemente saggiata sia a livello di trascritto, tramite RT-PCR, che a livello di proteina tramite Western blot (Dossena et al. 2006; Adler et al 2008; Muscella et al., 2008). Abbiamo scelto di condurre gli esperimenti in due linee cellulari di differente origine per identificare se particolari sequenze nucleotidiche contenessero elementi responsivi diversi a seconda del contesto cellulare. Questo porterebbe all'identificazione di sequenze responsabili dell'espressione tessuto specifica della pendrina.

Come atteso la sequenza di 1894 bp (paia di basi) da noi clonata è in grado di promuovere la trascrizione del gene reporter nei due modelli cellulari scelti. Quindi utilizzando i vari costrutti deleti a nostra disposizione siamo andati alla ricerca del promotore minimo del gene SLC26A4, ovvero della sequenza minima necessaria per la sua trascrizione, prima in cellule HEK293 Phoenix e poi in cellule PC-CL3.

Come riportato nella sezione dei risultati, delezioni successive in 5' della sequenza di 1894 bp clonata portano ad un aumento nella capacità del promotore di dirigere la trascrizione del gene reporter (figura 48). In particolare si ha un aumento statisticamente significativo dell'attività trascrizionale se la regione compresa tra i nucleotidi 1-1165 viene deleta. Tale aumento nella attività del promotore non è un artefatto dovuto alla presenza di un maggior numero di molecole di DNA del costrutto più corto (1-1165) rispetto al costrutto pGL3-PDS; infatti, i risultati non cambiano trasfettando con un numero uguale di molecole di plasmide anziché con la stessa quantità di DNA (dati non mostrati). Tale risultato è spiegabile ipotizzando invece la presenza di segnali riconosciuti da proteine che agiscono come regolatore negativo all'interno della sequenza deleta.. Adler e collaboratori (Adler et al., 2008)

hanno individuato recentemente la presenza di elementi di regolazione negativa tra i nucleotidi 1-741 sia per cellule renali (HEK 293) che tiroidee (LA 2) che di orecchio interno (VOT36). I nostri dati portano invece ad identificare l'elemento di regolazione negativa, specifico per le sole cellule renali, tra i nucleotidi 960-1165 della sequenza da noi clonata. La disomogeneità evidenziata tra quanto riportato da Adler e quanto osservato da noi sperimentalmente potrebbe risiedere nell'approccio metodologico utilizzato. Infatti tagliando grossolanamente porzioni della sequenza promotrice è possibile eliminare contemporaneamente molteplici segnali regolatori (sia positivi che negativi). Ci proponiamo quindi, attraverso la costruzione di nuovi mutanti deleti e l'impiego di saggi di binding al DNA (EMSA, footprinting), di caratterizzare in maggiore dettaglio la sequenza responsabile della regolazione negativa nel nostro modello renale.

Riducendo ulteriormente la 5' flanking region del promotore della pendrina a soli 160 nucleotidi (costrutto 1-1734), abbiamo osservato che la capacità di tale sequenza di promuovere la trascrizione del gene reporter cala bruscamente, tanto da non essere diversa da quella misurata per il vettore vuoto. Tale risultato è in accordo con gli esperimenti di "Primer Extension" precedentemente condotti (dati non mostrati) che mappano nelle cellule HEK293 Phoenix l'inizio della trascrizione in posizione 1745. Possiamo quindi concludere che nella 5'UTR del gene della pendrina non vi siano segnali utili alla formazione del complesso d'inizio necessario alla trascrizione basale del gene. Non possiamo tuttavia escludere che vi siano comunque all'interno di tale sequenza dei segnali deputati ad un controllo fine dell'espressione del gene. A questo proposito recentemente Yang e collaboratori (Yang et al., 2007) hanno identificato nella 5'UTR del gene una sequenza di binding per il fattore trascrizionale Foxi1, che è stato dimostrato essere un elemento chiave per l'espressione della pendrina.

Inoltre l'approccio che abbiamo utilizzato ci ha permesso di individuare il promotore minimo del gene SLC26A4 in una sequenza di soli 286 nucleotidi; tale regione è in grado da sola di promuovere la trascrizione basale del gene nel modello cellulare renale.

Abbiamo poi condotto lo stesso protocollo sperimentale anche in una linea cellulare tiroidea, le PC-CL3. Tali cellule derivano dal follicolo di ratto, esprimono i marcatori

tipici delle cellule tiroidee (NIS, TG, TPO) e sono in grado di crescere solo in mezzo di coltura contenente una miscela di ormoni tiroidei. Dai risultati ottenuti (paragrafo 8.2.2 dei Risultati della Parte II) è possibile osservare che il costrutto di 1894 nucleotidi risulta meno efficiente nel promuovere la trascrizione del gene reporter nel contesto tiroideo rispetto al modello renale. Questo potrebbe essere dovuto ad una minor efficienza in queste cellule del “sistema della luciferasi” in quanto anche l’attività del costrutto pGL3-TK, utilizzato come controllo positivo, è minore nelle PC-CL3 rispetto a quella misurata in cellule HEK 293 Phoenix (dati non mostrati). Inoltre tale differenza potrebbe risiedere anche nell’utilizzo di una sequenza isolata da DNA umano in un “background” murino. In aggiunta è riportato in letteratura che nella tiroide di topo, diversamente da quanto mostrato per l’uomo, i livelli d’espressione della pendrina sono cinquanta volte inferiori rispetto a quelli registrati in rene (Wangermann et al., 2009).

Anche in questo caso delezioni successive in 5’ della sequenza di 1894 bp portano ad un aumento nella capacità del promotore di dirigere la trascrizione del gene reporter (figura 49). Diversamente però da quanto si osserva nelle HEK293Phoenix l’attività del costrutto 1-450 misurata nelle PC-CL3 risulta significativamente maggiore di quella del costrutto pGL3-PDS. Inoltre anche la capacità di dirigere la trascrizione del gene reporter del costrutto 1-1608, nelle PC-CL3, è significativamente maggiore di quella misurata per il costrutto 1-1165. Questo ci porta a ipotizzare che nelle regioni comprese tra i nucleotidi 1-450 e 1608-1165 siano contenuti ulteriori “elementi in cis” riconosciuti da proteine che agiscono da repressore nelle sole cellule tiroidee. Inoltre, anche nel modello tiroideo, l’attività del costrutto 1-1734, recante solo 160 nucleotidi della 5’UTR del gene PDS è significativamente minore rispetto a quella misurata con il costrutto pGL3-PDS e le letture sono comparabili con quelle ottenute con il vettore vuoto. Tuttavia non siamo stati in grado di individuare nessun elemento di regolazione positiva nella sequenza da noi clonata, a differenza di quanto precedentemente riportato da Adler e collaboratori (Adler et al., 2008) in un modello di cellule tiroideo differente dal nostro (cellule LA2, derivate da carcinoma follicolare). Anche in questo caso la costruzione di nuovi mutanti deleti ed esperimenti di EMSA e “footprinting” del DNA permetteranno di caratterizzare in

modo dettagliato eventuali elementi (cis e trans) di regolazione sia positiva che negativa del gene nel contesto tiroideo.

I promotori tessuto-specifici possono essere utilizzati per diverse applicazioni, tra cui l'espressione genica programmata in tessuti, organi e tipi cellulari di interesse o per la terapia genica (Kuzmin et al., 2010). La terapia genica potrebbe risultare particolarmente efficace nel trattamento di tumori della tiroide per la possibilità di introdurre selettivamente nelle sole cellule tumorali “geni killer” utilizzando promotori tessuto specifici come quello della tireoglobulina o calcitonina, riducendo così la tossicità per le cellule sane. Anche il promotore della pendrina potrebbe essere utilizzato in un approccio di questo tipo, dopo un'attenta determinazione di quegli elementi che rendono tessuto specifica la trascrizione del suo gene. Inoltre determinare quali sequenze aumentino la sua efficienza di trascrizione consentirebbe di incrementare l'espressione della pendrina nelle cellule tumorali di tiroide che mostrano difetti nel processo di organificazione dello ioduro. Difetti in tale meccanismo riducono l'efficacia del trattamento con iodio radioattivo utilizzato nei carcinomi metastatici della tiroide. La somministrazione di attivatori trascrizionali potrebbe essere utilizzata per migliorare l'efficienza di tale trattamento nei pazienti affetti da tumore alla tiroide.

Inoltre identificando regioni critiche per la trascrizione del gene si potrebbe migliorare la diagnosi della Sindrome di Pendred, infatti, nonostante più di 140 mutazioni nell'ORF (Open Reading Frame) della pendrina siano state descritte e correlate con lo sviluppo della malattia, il 20% dei pazienti non presenta mutazioni nella proteina di per sé. Questi pazienti potrebbero tuttavia presentare mutazioni nella sequenza promotrice e/o in quella di elementi regolatori, con la conseguente perdita di espressione di una proteina altrimenti funzionale.

9.2 REGOLAZIONE ORMONALE DEL GENE SLC26A4 IN CELLULE TIROIDEE

La biosintesi degli ormoni tiroidei dipende dall'espressione e dalla funzione di diversi geni specifici per la tiroide quali il gene della tireoglobulina (TG), della

tiroperossidasi (TPO), del recettore per la tireotropina (TSHR), del simporto NIS ed infine della pendrina stessa (Suzuki et al., 2006). Quando la TG viene aggiunta al mezzo di coltura delle cellule FRTL-5, a concentrazioni che vanno da 0,1 a 10 mg/ml finali, il livello del messaggero dei geni TPO, NIS; TSHR e della TG stessa diminuisce significativamente (Suzuki 1999); al contrario l'espressione della pendrina aumenta. Anche nei nostri esperimenti (figura 50), la somministrazione di TG al mezzo di coltura di cellule tiroidee (PC-CL3) induce un aumento significativo della attività trascrizionale della 5' flanking region del promotore della pendrina. In esperimenti dose/risposta abbiamo determinato che la massima stimolazione si misura in seguito alla somministrazione di tireoglobulina 1 mg/ml. Tale concentrazione massima è in accordo con quanto già riportato per il trascritto della pendrina (Roiaux et al., 2000), inoltre è in un "range" fisiologico, infatti la quantità di TG misurata in biopsie di tiroide umana è estremamente variabile e compresa tra 0,1-250 mg/ml. Inoltre, l'attività massima del promotore si registra già dodici ore dopo il trattamento e si mantiene costante nel tempo. Tale comportamento differisce da quanto riportato da Suzuki e collaboratori che vedono tramite esperimenti di Northern Blot, un aumento solo transiente del trascritto, massimo alle sei ore post stimolazione, ma che poi diminuisce già alle dodici ore. Tuttavia, i segnali necessari a tale tipo di controllo potrebbero non essere presenti nella sequenza di 2 Kb da noi utilizzata in questi esperimenti. L'attivazione trascrizionale mediata dalla tireoglobulina sembra inoltre essere specifica, infatti il trattamento delle cellule con i suoi due derivati iodurati T3 e T4 non si traduce nel medesimo effetto.

In cellule FRTL-5 sia il TSH che lo ioduro da soli non sono in grado di aumentare i livelli d'espressione della pendrina (mRNA), tuttavia la stimolazione contemporanea con TG e TSH o TG e sodio ioduro (NaI) è in grado in entrambi i casi di aumentarne i livelli d'espressione (Suzuki et al., 2006). Nei nostri esperimenti abbiamo osservato un blando effetto additivo della stimolazione con TSH e TG, sull'attività del promotore della pendrina, in accordo con quanto riportato in letteratura; al contrario il sodio ioduro non sembra avere un effetto additivo alla TG nella stimolazione dell'attività del promotore. Questo dato sembra essere in disaccordo con quanto riportato in letteratura, tuttavia anche in questo caso va considerato che nel nostro

modello sperimentale siamo in grado di analizzare una regione limitata di DNA che potrebbe non contenere la sequenza che media la co-stimolazione.

Il modello proposto da Suzuki e collaboratori, in accordo con le osservazioni da noi riportate, potrebbe almeno in parte spiegare come la tireoglobulina ed il TSH regolino la trascrizione dei geni “tiroide specifici” nel follicolo tiroideo.

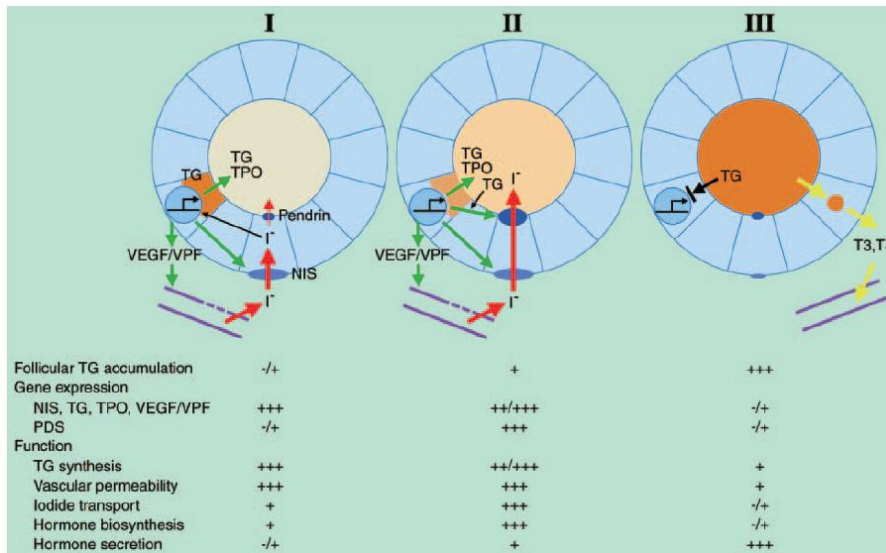


Figura 57: ciclo fisiologico dell'attività del follicolo tiroideo regolato dalla tireoglobulina. Sono rappresentati tre follicoli con differenti livelli di accumulo di TG (I,II,III) e i corrispondenti livelli d'espressione di alcuni geni.

In un follicolo dove l'accumulo di TG è minimo l'espressione dei geni NIS, TG, TPO e VEGF/VPF è massima (fase I figura 57). Lo ioduro è trasportato nel tireocita attraverso NIS ma il suo efflusso nel follicolo è limitato poiché i livelli d'espressione della pendrina sono bassi. La TG inizia ad accumularsi all'interno del follicolo e la iodinazione avviene in modo graduale. Quando già una bassa concentrazione di TG inizia ad accumularsi nel follicolo l'espressione della pendrina viene indotta e l'efflusso di ioduro raggiunge i suoi livelli massimi (fase II figura 57) e il suo accumulo contribuisce all'induzione ulteriore dell'espressione della pendrina. Quando livelli sufficienti di TG sono accumulati all'interno del follicolo (fase III figura 57) l'espressione dei geni necessari al trasporto di ioduro e alla biosintesi di TG è soppressa.

La tireoglobulina sembrerebbe agire inoltre a livello trascrizionale, infatti esperimenti al luminometro mostrano come l'attività del promotore dei geni TPO, NIS, TSHR e della TG diminuisce in seguito alla stimolazione con l'ormone

(Nakazato et al., 2000). In accordo con questa ipotesi anche nei nostri esperimenti in cellule trattate con tireoglobulina si ha un aumento dell'attività del gene reporter della luciferasi. Sembra poco verosimile che una macromolecola dal peso molecolare di 600 KDa possa modulare e regolare la trascrizione genica, tuttavia esperimenti di "binding" al DNA del gene TTF-1 condotti da Nakazato e collaboratori mostrano come l'interazione di questo ormone con il suo recettore determini una diminuzione del legame dell'attivatore NF-1 alla sequenza promotrice di tale gene (Nakazato et al., 2000). Un meccanismo simile (ovvero un'azione indiretta dell'ormone che alteri il legame al promotore della pendrina di un attivatore o repressore trascrizionale) potrebbe spiegare anche l'aumento nell'attività del gene reporter della luciferasi osservata nei nostri esperimenti.

Per identificare all'interno della sequenza clonata quali siano gli "elementi in cis" responsivi alla tireoglobulina, e risalire da questi al fattore/i trascrizionale/i coinvolto/i nel mediare tale risposta, abbiamo utilizzato i vari costrutti deleti a nostra disposizione e determinato sperimentalmente se la rimozione di particolari regioni della sequenza promotrice determinasse una diminuzione (parziale o totale) della regolazione esercitata dalla TG. Dalle letture ottenute al luminometro possiamo ipotizzare che la regione compresa tra i nucleotidi 960-1165 contenga "elementi in cis" responsivi alla TG. E' inoltre interessante notare che anche la delezione della regione compresa tra i nucleotidi 452-960 porta ad una diminuzione, statisticamente misurabile, della stimolazione da parte della TG. Non è quindi da escludere che, anche all'interno di tale sequenza, vi siano elementi in cis responsivi alla TG, che agiscano sinergicamente ai fattori che legano la regione 960-1165. Per poter identificare quali fossero gli attivatori o repressori che mediano la risposta alla TG nella regione di 205 nucleotidi da noi identificata abbiamo condotto un'analisi bioinformatica utilizzando il software MatInspector, della Genomatix. Nella regione compresa tra i nucleotidi 960-1165 sono stati identificati numerosi siti di binding per fattori trascrizionali sia tessuto specifici che basali (tabella 5).

Detailed Family Information	Start position	End position	Anchor position
LEF1/TCF	949	965	957
Grainyhead-like transcription factors	968	980	974
MYT1 C2HC zinc finger protein	968	980	974
Cellular and viral myb-like transcriptional regulators	969	981	975
Fork head domain factors	970	986	978
MAF and AP1 related factors	970	990	980
AP1, Activating protein 1	976	986	981
AP1, Activating protein 1	976	986	981
MAF and AP1 related factors	972	992	982
Paralog hox genes 1-8 from the four hox clusters A, B, C, D	975	993	984
HOX - MEIS1 heterodimers	978	992	985
SOX/SRY-sex/testis determining and related HMG box factors	978	994	986
SOX/SRY-sex/testis determining and related HMG box factors	980	996	988
Signal transducer and activator of transcription	985	1003	994
Signal transducer and activator of transcription	986	1004	995
MAF and AP1 related factors	1001	1021	1011
SWI/SNF related nucleophosphoproteins with a RING finger DNA binding motif	1015	1025	1020
Signal transducer and activator of transcription	1015	1033	1024
Signal transducer and activator of transcription	1017	1035	1026
Octamer binding protein	1023	1039	1031
SOX/SRY-sex/testis determining and related HMG box factors	1024	1040	1032
AARE binding factors	1030	1038	1034
cAMP-responsive element binding proteins	1024	1044	1034
Octamer binding protein	1028	1044	1036
Ras-responsive element binding protein	1037	1051	1044
Neuron-specific-olfactory factor	1036	1058	1047
Interferon regulatory factors	1056	1076	1066
Nuclear factor of activated T-cells	1058	1076	1067
Two-handed zinc finger homeodomain transcription factors	1063	1075	1069
POZ domain zinc finger expressed in B-Cells	1065	1081	1073
Signal transducer and activator of transcription	1064	1082	1073
Signal transducer and activator of transcription	1066	1084	1075
Heat shock factors	1072	1096	1084
HOX - MEIS1 heterodimers	1079	1093	1086
Octamer binding protein	1081	1097	1089
Octamer binding protein	1095	1111	1103
Octamer binding protein	1096	1112	1104
Octamer binding protein	1101	1117	1109
Myoblast determining factors	1106	1122	1114
Bicoid-like homeodomain transcription factors	1111	1127	1119
cAMP-responsive element binding proteins	1113	1133	1123
PAR/bZIP family	1115	1131	1123
cAMP-responsive element binding proteins	1114	1134	1124
PAR/bZIP family	1116	1132	1124
Human and murine ETS1 factors	1116	1136	1126
cAMP-responsive element binding proteins	1125	1145	1135
PBX1 - MEIS1 complexes	1127	1143	1135
Nuclear receptor subfamily 2 factors	1128	1152	1140
Zinc finger with interaction domain factors	1148	1160	1154
E2F-myc activator/cell cycle regulator	1147	1163	1155
Fork head domain factors	1162	1178	1170
Ubiquitous GLI - Krueppel like zinc finger involved in cell cycle regulation	1166	1178	1172

Tabella 5: Risultato ottenuto sottoponendo la regione 960-1165 ad analisi bioinformatica (software MatInspector, della Genomatix). Nella regione compresa tra i nucleotidi 960-1165 sono stati identificati numerosi siti di binding per fattori trascrizionali sia tessuto specifici che basali.

E' interessante notare la presenza ripetuta in questa regione di fattori di trascrizione CREB responsivi all'AMP ciclico. Tuttavia è stato recentemente dimostrato che la

TG in cellule tiroidee FRTL-5 non attiva la cascata di segnali attivata dall'AMP ciclico. I segnali regolatori che mediano l'azione della TG così come il sistema responsabile della sua internalizzazione sono in gran parte sconosciuti. La comprensione di tali meccanismi risulta di particolare importanza poiché proprio questi meccanismi potrebbero costituire nuovi target per lo sviluppo di farmaci che modulano la funzione e la crescita tiroidea.

Ci proponiamo quindi di allestire esperimenti di DNA "footprinting" per mappare con maggiore precisione quali siano i nucleotidi coinvolti nella regolazione dell'espressione del gene SLC26A4 mediata dalla tireoglobulina. Successivamente cercheremo di risalire dagli elementi in cis ai fattori trascrizionali che attivano tale cascata regolatoria. Questo permetterà una migliore comprensione della fisiologia tiroidea e delle patologie ad essa associate

9.3 CONCLUSIONI

Il gene SLC26A4 codifica per uno scambiatore cloruro/anione, mutazioni a carico di tale gene sono alla base di una patologia nota come sindrome di Pendred, caratterizzata dalla associazione di una grave forma di sordità e da difetti nel processo di organificazione dello ioduro. La distribuzione tissutale di tale gene è altamente specifica e questo fa pensare ad una regolazione fine della sua espressione. Per comprendere i meccanismi molecolari alla base della trascrizione tessuto specifica del gene abbiamo condotto esperimenti in due diverse linee cellulari andando a ricercare sequenze utili per la trascrizione tessuto specifica. I nostri esperimenti hanno evidenziato la possibile presenza di "elementi in cis" che regolano negativamente l'espressione del gene, tali sequenze sono differenti nel modello renale rispetto a quello tiroideo.

Inoltre con il lavoro qui presentato abbiamo identificato il promotore minimo del gene SLC26A4, in una regione di soli 286 nucleotidi, in grado di mediare la trascrizione basale del gene sia in rene sia in tiroide.

Infine abbiamo studiato la regolazione ormonale del gene PDS e dimostrato, in accordo con quanto riportato dalla letteratura, che la somministrazione di

tireoglobulina (1mg/ml) al medium di coltura delle cellule PC-CL3 attiva in modo specifico ed efficace la trascrizione del gene e che la regione coinvolta in tale modulazione è compresa in una regione di soli 205 nucleotidi.

Bibliografia

- Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW et al., 1999. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 97:175-87.
- Accardi A, Miller C. 2004. Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl⁻ channels. *Nature* 427:803–807.
- Accardi A, Kolmakova-Partensky L, Williams C, Miller C. 2004. Ionic currents mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl⁻ channels. *J Gen Physiol* 123:109–119.
- Ackerman MJ, Wickman KD, Clapham DE. 1994. Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 103:159-79.
- Ackerman MJ, Krapivinsky GB, Gordon E, Krapivinsky L, Clapham DC. 1994 bis. Characterization of a native swelling-induced chloride current, I_{Cl,swell}, and its regulatory protein, pICln, in *Xenopus* oocytes. *Jpn. J. Physiol* 44 Suppl 2:S17-S24.
- Adler L, Efrati E, Zelikovic I. 2008. Molecular mechanisms of epithelial cell-specific expression and regulation of the human anion exchanger (pendrin) gene. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C1261-C1276.
- Ahn W, Kim KH, Lee JA, Kim JY, Chor JY, Moe OW, Milgram SL, Muallem S, Lee MG. 2001. Regulatory interaction between the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and. *J Biol Chem* 276:17236-17243.
- Al-Awqati Q, Schwartz GJ. 2004. A fork in the road of cell differentiation in the kidney tubule. *J Clin Invest* 113:1528-1530.
- Alper SL. 1991. The band 3-related anion exchanger family. *Annu Rev Physiol* 53:549–564.
- Alper SL, Stuart-Tilley A, Simmons CF, Brown D, Drenckhahn D. 1994. The fodrin-ankyrin cytoskeleton of choroid plexus preferentially colocalizes with apical Na⁺/K⁺-ATPase rather than with basolateral anion exchanger AE2. *J Clin Invest* 93:1430–1438.
- Alper SL, Stuart-Tilley AK, Biemesderfer D, Shmukler BE, Brown D. 1997. Immunolocalization of AE2 anion exchanger in rat kidney. *Am J Physiol* 273:F601–F614.

- Alper SL, Rossmann H, Wilhelm S, Stuart-Tilley AK, Shmukler BE, Seidler U. 1999. Expression of AE2 anion exchanger in mouse intestine. *Am J Physiol* 277:G321–G332.
- Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. 1999. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:361–398.
- Amlal H, Petrovic S, Xu J, Wang Z, Sun X, Barone S, Soleimani M. 2010. Deletion of the anion exchanger Slc26a4 (pendrin) decreases apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger activity and impairs bicarbonate secretion in kidney collecting duct. *Am J Physiol Cell Physiol* 299:C33-41.
- Aravind L, Koonin EV. 2000. The STAS domain – a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Curr Biol* 10:R53-R55.
- Azzouz TN, Pillai RS, Dapp C, Chari A, Meister G, Kambach C, Fischer U, Schumperli D. 2005. Toward an assembly line for U7 snRNPs: interactions of U7-specific Lsm proteins with PRMT5 and SMN complexes. *J Biol Chem* 280:34435-34440.
- Bai Y, Pontoglio M, Hiesberger T, Sinclair AM, Igarashi P. 2002. Regulation of kidney-specific Ksp-cadherin gene promoter by hepatocyte nuclear factor-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F839-F851.
- Baumgarten CM, Clemo HF. 2003. Swelling-activated chloride channels in cardiac physiology and pathophysiology. *Prog Biophys Mol Biol* 82:25-42.
- Bidart JM, Mian C, Lazar V, Russo D, Filetti S, Caillou B, Schlumberger M et al. 2000. Expression of pendrin and the Pendred syndrome (PDS) gene in human thyroid tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 85:2028-2033.
- Beaufort-Krol GC, van den Berg MP, Wilde AA, van Tintelen JP, Viersma JW, Bezzina CR, et al. 2005. Developmental aspects of long QT syndrome type 3 and Brugada syndrome on the basis of a single SCN5A mutation in childhood. *J Am Coll Cardiol* 46:331-7.
- Benz R, Maier E, Thinnies FP, Götz H, Hilschmann N. 1992. Studies on human porin. VII. The channel properties of the human B-lymphocyte membrane-derived "Porin 31HL" are similar to those of mitochondrial porins. *Biol Chem Hoppe Seyler* 373:295-303.
- Blomqvist SR, Vidarsson H, Fitzgerald S, Johansson BR, Ollerstam A, Brown R, Persson AE, Bergstrom GG, Enerback S. 2004. Distal renal tubular acidosis in mice that lack the forkhead transcription factor Foxi1. *J Clin Invest* 113:1560-1570.
- Boucher RC. 1994. Human airway ion transport. *Am J Respir Crit Care Med* 150:271–281.

- Brosius FC III, Pisoni RL, Cao X, Deshmukh G, Yannoukakos D, Stuart-Tilley, A. K., Haller, C, Alper SL. 1997. AE anion exchanger mRNA and protein expression in vascular smooth muscle cells, aorta, and renal microvessels. *Am J Physiol* 273:F1039–F1047.
- Brosius FC, III, Alper SL, Garcia AM, Lodish HF. 1989. The major kidney band 3 gene transcript predicts an amino-terminal truncated band 3 polypeptide. *J Biol Chem* 264:7784–7787.
- Buyse G, De Greef C, Raeymaekers L, Droogmans G, Nilius B, Eggermont J. 1995. The ubiquitously expressed pI_{Clh} protein forms homomeric complexes in vitro. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 218:822-827.
- Calinisan V, Gravem D, Chen RP, Brittin S, Mohandas N, Lecomte MC, Gascard P. 2006. New insights into potential functions for the protein 4.1 superfamily of proteins in kidney epithelium. *Front Biosci* 11:1646-1666.
- Caron L, Rousseau F, Gagnon E, Isenring P. 2000. Cloning and functional characterization of a cation-Cl⁻ cotransporter-interacting protein. *J Biol Chem* 275:32027–32036.
- Casey JR, Reithmeier RAF. 1991. Analysis of the oligomeric state of band 3, the anion transport protein of the human erythrocyte membrane, by size exclusion high performance liquid chromatography: Oligomeric stability and origin of heterogeneity. *J Biol Chem* 266:15726–15737.
- Choi B, Stewart A, Madeo A, Yang Y, Pryor S, Lenhard S, Kittles R, Eisenman D, Kim H, Niparko J et al. 2008 SLC26A4 variants associated with nonsyndromic hearing loss and enlargement of the vestibular aqueduct: genotype–phenotype correlation or coincidental polymorphisms? *Human Mutation* 30:599-608.
- Cunningham SA, Awayda MS, Bubien JK, Ismailov II, Arrate MP, Berdiev BK, Benos DJ, Fuller CM. 1995. Cloning of an epithelial chloride channel from bovine trachea. *J Biol Chem* 270: 31016–31026.
- Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Gui P, Hill MA, Wilson E. 2002. Regulation of ion channels by integrins. *Cell Biochem Biophys* 36:41-66.
- Delpire E, Lu J, England R, Dull C, Thorne T. 1999. Deafness and imbalance associated within activation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat Genet* 22:192–195.
- Dentice M, Luongo C, Elefante A, Ambrosio R, Salzano S, Zannini M, Nitsch R, Di Lauro R, Rossi G, Fenzi G, Salvatore D. 2005. Pendrin is a novel in vivo downstream target gene of the TTF-1/Nkx-2.1 homeodomain transcription factor in differentiated thyroid cells. *Mol Cell Biol* 25:10171-10182.

- Dermietzel R, Hwang TK, Buettner R, Hofer A, Dotzler E, Kremer M, Deutzmann R, Thinner FP, Fishman GI and Spray DC. 1994. Cloning and in situ localization of a brain-derived porin that constitutes a large-conductance anion channel in astrocytic plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 499-503.
- Dorwart MR, Shcheynikov N, Yang D, Muallem S. 2008. The Solute Carrier 26 Family of Proteins in Epithelial Ion Transport. *Physiology* 23:104-114.
- Dossena S, Rodighiero S, Vezzoli V, Bazzini C, Sironi C, Meyer G, Fürst J, Ritter M, Garavaglia ML, Fugazzola L, Persani L, Zorowka P, Storelli C, Beck-Peccoz P, Bottá G, Paulmichl M. 2006. Fast fluorometric method for measuring pendrin (SLC26A4) Cl⁻/I⁻ transport activity. *Cell Physiol Biochem*. 18:67-74.
- Dossena S, Rodighiero S, Vezzoli V, Nofziger C, et al. 2009. Functional characterization of wild- type and mutated pendrin (SLC26A4), the anion transporter involved in Pendred syndrome. *J Mol Endocrinol* 43:93-103.
- Dou H, Vazquez AE, Namkung Y, Chu H, Cardell EL, Nie L, Parson S, Shin HS, Yamoah EN. 2004. Null mutation of alpha1D Ca²⁺ channel gene results in deafness but no vestibular defect in mice. *J Assoc Res Otolaryngol* 5:215-226.
- Dror AA, Politi Y, Shahin H, Lenz DR, Dossena S, Nofziger C, Fuchs H, Hrabé de Angelis M, Paulmichl M, Weiner S, Avraham KB. 2010. Calcium oxalate stone formation in the inner ear as a result of an Slc26a4 mutation. *J Biol Chem*. 285:21724-35.
- Duan D, Winter C, Cowley S, Hume JR, Horowitz B. 1997. Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature* 390:417-421.
- Duan D. 2009. Phenomics of cardiac chloride channels: the systematic study of chloride channel function in the heart. *J Physiol* 587:2163-77.
- Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. 2002. X-ray structure of a Cl⁻ channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415:287-294.
- Eggermont J. 2004. Calcium-activated chloride channels (Un)known, (Un)loved? *Proc Am Thorac Soc* 1:22-27.
- Emma F, Breton S, Morrison R, Wright S, Strange K. 1998. Effect of cell swelling on membrane and cytoplasmic distribution of pICln. *Am J Physiol* 274:C1545-1551.
- Emma F, Sanchez-Olea R, Strange K. 1998bis. Characterization of pI(Cln) binding proteins: identification of p17 and assessment of the role of acidic domains in mediating protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta* 1404:321-328.

- Evans RL, Park K, Turner RJ, Watson GE, Nguyen HV, Dennett MR, Hand AR, Flagella M, Shull GE, Melvin JE. 2000. Severe impairment of salivation in Nap/Kp/2Cl⁻ cotransporter (NKCC1)-deficient mice. *J Biol Chem* 275:26720–26726.
- Everett LA, Belyantseva IA, Noben-Trauth K, Cantos R, Chen A, Thakkar SI, Hoogstraten-Miller SL, Kachar B, Wu DK, Green ED. 2001. Targeted disruption of mouse Pds provides insight about the inner-ear defects encountered in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet* 10:153-161.
- Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M, Adawi F, Hazani E, Nassir E, Baxevanis AD, Sheffield VC, Green ED. 1997. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* 17:411-422.
- Farre D, Roset R, Huerta M, Adsuara JE, Rosello L, Alba MM, Messeguer X. 2003. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res* 31: 3651-3653.
- Ferguson KM, Lemmon MA, Schlessinger J, Singler PB. 1994. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the pleckstrin homology domain from human dynamin. *Cell*. 79:199-209.
- Flagella M, Clarke LL, Miller ML, Erway LC, Giannella RA, Andringa A, Gawenis LR, Kramer J, Duffy JJ, Doetschman T, Lorenz JN, Yamoah EN, et al. 1999. Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf. *J Biol Chem* 274:26946–26955.
- Friedrich T, Breiderhoff T, Jentsch TJ. 1999. Mutational analysis demonstrates that ClC-4 and ClC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J Biol Chem* 274:896-902.
- Friesen WJ, Paushkin S, Wyce A, Massenet S, Pesiridis GS, Van Duyne G, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. 2001. The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins. *Mol Cell Biol* 21:8289-8300.
- Friesen WJ, Wyce A, Paushkin S, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. 2002. A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. *J Biol Chem* 277:8243-8247.
- Frings S, Reuter D, Kleene SJ. 2000. Neuronal Ca²⁺-activated Cl⁻ channels-homing in on an elusive channel species. *Prog. Neurobiol.* 60:247–289.
- Frische S, Kwon TH, Frokiaer J, Madsen KM. 2003. Nielsen S. Regulated expression of pendrin in rat kidney in response to chronic NH₄Cl or NaHCO₃ loading. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F584-F593.

- Frzsche S, Zolotarev AS, Kim YH, Praetorius J, Alper S, Nielsen S, Wall SM. 2004. AE2 isoforms in rat kidney: Immunohistochemical localization and regulation in response to chronic NH₄Cl loading. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F1163–F1170.
- Fürst J, Jakab M, König M, Ritter M, Gschwentner M, Rudzki J, Danzl J, Mayer M, Burtscher CM, Schirmer J, Maier B, Nairz M, Chwatal S, Paulmichl M. 2000. Structure and function of the ion channel ICln. *Cell Physiol Biochem* 10:329-334.
- Fürst J, Gschwentner M, Ritter M, Bottà G, Jakab M, Mayer M, Garavaglia L, Bazzini C, Rodighiero S, Meyer G, Eichmuller S, Woll E, Paulmichl M. 2002. Molecular and functional aspects of anionic channels activated during regulatory volume decrease in mammalian cells. *Pflugers. Arch.* 444:1-25.
- Fürst J, Ritter M, Rudzki J, Danzl J, Gschwentner M, Scandella E, Jakab M, König M, Oehl B, Lang F, Deetjen P, Paulmichl M. 2002. ICln ion channel splice variants in *Caenorhabditis elegans*: voltage dependence and interaction with an operon partner protein. *J Biol Chem* 277:4435-4445.
- Fürst J, Schedlbayres A, Gandini R., Garavaglia LM, Saino S, Gschewentner M, Sarg B, Lindner H, Jakab M, Ritter M, Bazzini C, Bottà G, Meyer G, Kontaxis G, Tilly BC, Konrat R, Paulmichl M. 2005. Icln₁₅₉ Folds into a Pleckstrin Homology Domain-like Structure. *JBC* 280:31276-31282.
- Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Vannucchi G, Beck-Peccoz P. 2001. The role of pendrin in iodide regulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109:18-22.
- Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M, Miyanoshita A, Lytton J, Hediger MA, Brenner BM, Hebert SC. 1993. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2749–2753.
- Gamba G. 2005. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 85:423–493.
- Gillam MP, Bartolone L, Kopp P, Bevenga S. 2005 Molecular analysis of the PDS gene in a nonconsanguineous Sicilian family with Pendred's syndrome. *Thyroid* 15:734-741.
- Greenwood IA. 2004. CLC-3 knockout hints at swelling-activated chloride channel complexity. *J Physiol* 557:439-56.
- Grichtchenko II, Choi I, Zhong X, Bray-Ward P, Russell JM, Boron W.F. 2001. Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a human electroneutral Na⁺-driven Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger. *J Biol Chem* 276:8358–8363.
- Grubb BR, Gabriel SE. 1997. Intestinal physiology and pathology in gene-targeted mouse model of cystic fibrosis. *Am J Physiol* 273:G258–G266.

- Gründer S, Thiemann A, Pusch M and Jentsch TJ. 1992. Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* 360:759-762.
- Gschwentner M, Nagl UO, Schmarda A, Woll E, Ritter M, Waitz W, Detjen P, Paulmichl M. 1994. Structure-function relation of a cloned epithelial chloride channel. *Renal Physiol. Biochem.* 17:148-152.
- Gschwentner M, Susanna A, Woll E, Ritter M, Nagl UO, Schmarda A, Laich A, Pinggera GM, Ellemunter H, Huemer H, et al. 1995. Antiviral drugs from the nucleoside analog family block volume-activated chloride channels. *Mol Med* 1:407-417.
- Gschwentner M, Fürst J, Ritter M, Bazzini C, Woll E, Dienstl A, Jakab M, König M, Scandella E, Rudzki J, Bottà G, Meyer G, Lang F, Deeyjen P, Paulmichl M. 1999. ICln, an ion channel-forming protein associated with volume regulation. *Exper Physiol.* 84:1023-1031.
- Hagiwara N, Masuda H, Shoda M, Irisawa H. 1992. Stretch-activated anion currents of rabbit cardiac myocytes. *J Physiol* 456:285-302.
- Hans S, Liu D, Westerfield M. 2004. Pax8 and Pax2a function synergistically in otic specification, downstream of the Foxi1 and Dlx3b transcription factors. *Development* 131:5091-5102.
- Hartzell C, Putzier I, Arreola J. 2005. Calcium-activated chloride channels. *Ann Rev Physiol* 67:719–758.
- Hartzell C, Qu Z, Putzier I, Artinian L, Chien LT, Cui Y. 2005 bis. Looking chloride channels straight in the eye: Bestrophins, lipofuscinosis, and retinal degeneration. *Physiology* 20:292–302.
- Haussinger D, Kurz AK, Wettstein M, Graf D, Vom Dahl S, Schliess F. 2003. Involvement of integrins and Src in tauroursodeoxycholate-induced and swelling-induced choleresis. *Gastroenterology* 124:1476-1487.
- Hiraokaa M, Kawanoa S, Hiranoa Y, Furukawab T. 1998. Role of cardiac chloride currents in changes in action potential characteristics and arrhythmias. *Cardiovascular Research* 40:23–33.
- Howard HC, Mount DB, Rochefort D, Byun N, Dupre N, Lu J, Fan X, Song L, Riviere JB, Prevost C, Horst J, Simonati A, et al. 2002. The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet* 32:384–392.
- Huang P, Liu J, Di A, Robinson NC, Musch MW, Kaetzel MA, Nelson DJ. 2001. Regulation of human CLC-3 channels by multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 276:20093–20100.

- Hubner S, Couvillon AD, Kas JA, Bankaitis VA, Vegners R, Carpenter CL, Janmey PA. 1998. Enhancement of phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase) activity by membrane curvature and inositol-phospholipid-binding peptides. *Eur J Biochem* 258:846-853.
- Hulander M, Kiernan AE, Blomqvist SR, Carlsson P, Samuelsson EJ, Johansson BR, Steel KP, Enerbäck S. 2003. Lack of pendrin expression leads to deafness and expansion of the endolymphatic compartment in inner ears of Foxi1 null mutant mice. *Development* 130:2013-2025.
- Idriss H, Hannun YA, Boulpaep E, Basavappa S. 2000b. P-glycoprotein regulation of volume activated Cl channels. *J Physiol* 524:629–636.
- Iyer R, Iverson TM, Accardi A, Miller C. 2002. A biological role for prokaryotic ClC chloride channels. *Nature* 419:715–718.
- Jackson PS, Strange K. 1996. Single channel properties of a volume sensitive anion channel: lessons from noise analysis. *Kidney Int* 49:1695-1699.
- Jentsch TJ, Steinmeyer K, Schwarz G. 1990. Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in Xenopus oocytes. *Nature* 348:510–514.
- Jentsch TJ, Günther W, Pusch M, Schwappach B. 1995. Properties of voltage-gated chloride channels of the ClC gene family. *J Physiol* 482:19S–25S.
- Jentsch T.J. 1996. Chloride channels: a molecular perspective. *Curr Op Neurobiol* 6:303-310.
- Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. 2002. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 82:503–568.
- Kass RS. and Moss AJ. 2003. Long QT syndrome: novel insights into the mechanisms of cardiac arrhythmias. *JBC* 112:810-815.
- Kawano S, Hirayama Y, Hiraoka M. 1995. Activation mechanism of Ca²⁺ sensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 486:593–604.
- Kawasaki M, Uchida S, Monkawa T, Miyawaki A, Mikoshiba K, Marumo F, Sasaki S. 1994. Cloning and expression of a protein kinase c-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. *Neuron* 12:597-604.
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245:1073-80.

Khositseth A, Tester DJ, Will ML, Bell CM, Ackerman MJ. 2004. Identification of a common genetic substrate underlying postpartum cardiac events in congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm* 1:60-4.

Kim YH, Pech V, Spencer KB, Beierwaltes WH, Everett LA, Green ED, Shin W, Verlander JW, Sutliff RL, Wall SM. 2007. Reduced ENaC protein abundance contributes to the lower blood pressure observed in pendrin-null mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F1314-F1324.

Kopp P. 2002. Perspective: genetic defects in the etiology of congenital hypothyroidism. *Endocrinology* 143:2019-2024.

Kopp P, Pesce L, Solis SJ. 2008. Pendred syndrome and iodide transport in the thyroid. *Trends Endocrinol. Metab* 19:260-268.

Kornak U, Kasper D, Bösl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ. 2001. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* 104:205-215.

Krapivinsky GB, Ackerman MJ, Gordon EA, Krapivinsky LD, Clapham DE. 1994. Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pICln. *Cell* 76:439-448.

Krude H, Schütz B, Biebermann H, von Moers A, Schnabel D, Neitzel H, Tönnies H, Weise D, Lafferty A, Schwarz S, DeFelice M, von Deimling A, van Landeghem F, DiLauro R, Grüters A. 2002. Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. *J Clin Invest* 109:475-480.

Kudrycki KE, Newman PR, Shull GE. 1990. cDNA cloning and tissue distribution of mRNAs for two proteins that are related to the band 3 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger. *J Biol Chem* 265:462-471.

Kuzmin D, Gogvadze E, Kholodenko R, Grzela DP, Mityaev M, Vinogradova T, Kopantzev E, Malakhova G, Suntsova M, Sokov D, Ivics Z, Buzdin A. 2010. Novel strong tissue specific promoter for gene expression in human germ cells. *BMC Biotechnol.* 10:58.

Lacroix L, Mian C, Caillou B, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, Bidart JM. 2001. Na⁽⁺⁾/I⁽⁻⁾ symporter and Pendred syndrome gene and protein expressions in human extra-thyroidal tissues. *Eur. J. Endocrinol.* 144:297-302.

Lang F, Busch GL, Ritter L, Volki H, Wladegger S, Gulbins E, Haussinger D. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanism. *Physiol. Rev.* 78:247-306.

Lang F, Volky H, Paulmichl M. 1998 bis. How do cells regulate their volume. *Pflügers Arch.* 411:R4-R5.

- Large WA, Wang Q. 1996. Characteristics and physiological role of the Ca^{2+} -activate Cl^- conductance in smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 271:C435–C454.
- Larkin D, Murphy D, Reilly DF, Cahill M, Sattler E, Harriott P, Cahill DJ, Moran N. 2004. ICln, a novel integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -associated protein, functionally regulates platelet activation. *J Biol Chem* 279:27286-27293.
- Littler DR, Harrop SJ, Goodchild SC, Phang JM, Mynott AV, Jiang L, Valenzuela SM, Mazzanti M, Brown LJ, Breit SN, Curmi PMG. 2010. The enigma of the CLIC proteins: Ion channels, redox proteins, enzymes, scaffolding proteins? *FEBS Letters* 584:2093–2101.
- Lohi H, Kujala M, Mäkelä S, Lehtonen E, Kestilä M, Saarialho-Kere U, Markovich D, Kere J. 2002. Functional characterization of three novel tissue-specific anion exchangers SLC26A7, -A8, and -A9. *J Biol Chem* 277:14246–14254.
- Lohi H, Mäkelä S, Pulkkinen K, Höglund P, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Kere J. 2002bis. Upregulation of CFTR expression but not SLC26A3 and SLC9A3 in ulcerative colitis. *Am J Physiol* 238:G567–G575.
- Lytle C. 1997. Activation of the avian erythrocyte Na-K-Cl cotransport protein by cell shrinkage, cAMP, fluoride, and calyculin-A involves phosphorylation at common sites. *J Biol Chem* 272:15069–15077.
- Macchia PE, Lapi P, Krude H, Pirro MT, Missero C, Chiovato L, Souabni A, Baserga M, Tassi V, Pinchera A, Fenzi G, Grüters A, Busslinger M, Di Lauro R. 1998. PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat Genet* 19:83-86
- Mannella CA, Marko M, Buttle K. Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. 1997. *Trends Biochem Sci.* 22:37-8.
- Mannella CA, Forte M, Colombini M. 1992. Toward the molecular structure of the mitochondrial channel, VDAC. *J Bioenerg Biomembr.* 24:7-19.
- Marmorstein AD, Marmorstein LY, Rayborn M, Wang X, Hollyfield JG, Petrukhin K. 2000. Bestrophin, the product of the best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral membrane of the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12758–12763.
- McPhee JC, Dang YL, Davidson N, Lester HA. 1998. Evidence for a functional interaction between integrins and G protein-activated inward rectifier K^+ channels. *J Biol Chem* 273:34696-34702.
- Medeiros A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde P, Itty A, Ye B, et al., 2006. Sodium channel B4 subunit mutation causes congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm* 3:S34.

- Medeiros-Domingo A, Iturralde-Torres P, Ackerman MJ. 2007. Clinical and genetic characteristics of long QT syndrome. *Rev Esp Cardio* 60: 739-752.
- Meister G, Eggert C, Buhler D, Brahms H, Kambach C, Fischer U. 2001. Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. *Curr Biol* 11:1990-1994.
- Meyer G., Rodighiero S., Guizzardi F., Bazzini C., Bottà G., Bertocchi C., Garavaglia L., Dossena S., Manfredi R., Sironi C., Catania A., Paulmichl M. 2004. Volume-regulated Cl⁻ channels in human pleural mesothelioma cells. *FEBS Letters* 559:45-50.
- Miller C. 2006. ClC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature* 440:484-489.
- Mohler PJ, Splawski I, Napolitano C, Bottelli G, Sharpe L, Timothy K, et al. 2004. A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9137-42.
- Moorman JR, Palmer CJ, John JE, Durieux ME and Jones LR. 1992. Phospholemman expression induces a hyperpolarization-activated chloride current in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 267:14551-14554.
- Moorman JR, Ackerman SJ, Kowdley GC, Griffin MP, Mounsey JP, Chen Z, Cala SE, O'Brian JJ, Szabo G, Jones LR. 1995. Unitary anion currents through phospholemman channel molecules. *Nature* 377:737-740.
- Moss AJ, Zareba W, Jackson Hall W, Schwartz PJ, Crampton RS, Benhorin J, Vincent GM, Locati EH, Priori SG, Napolitano C, Medina A, Zhang L, Robinson JL, Timothy K, Towbin JA, Andrews ML. 2000. Effectiveness and Limitations of β -Blocker Therapy in Congenital Long-QT Syndrome. *Circulation* 101:616-623.
- Mount DB, Romero MF. 2004. The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers Arch* 447:710-721.
- Muscella A, Marsigliante S, Verri T, Urso L, Dimitri C, Bottà G, Paulmichl M, Beck-Peccoz P, Fugazzola L, Storelli C. 2008. PKC-epsilon-dependent cytosol-to-membrane translocation of pendrin in rat thyroid PC Cl3 cells. *J Cell Physiol* 217(1):103-12.
- Musch MW, Luer CA, Davis-Amaral EM, Goldstein L. 1997. Hypotonic stress induces translocation of the osmolyte channel protein pICln in embryonic skate (*Raja eglanteria*) heart. *J. Exp. Zoology* 277:460-463.
- Musch MW, Davis-Amaral EM, Vandenberg HH, Goldstein L. 1998. Hypotonicity stimulates translocation of ICln in neonatal rat cardiac myocytes. *Eur. J. Physiol.* 436:415-422.

- Nagl UO, Erdel M, Schmarda A, Seri M, Pinggera GM, Gschwentner M, Duba C, Galiotta LJ, Deetjen P, Utermann G, Paulmichl M. 1996. Chromosomal localization of the genes (CLNS1A and CLNS1B) coding for the swelling-dependent chloride channel ICln. *Genomics* 38:438-441.
- Nakaya K, Harbidge DG, Wangemann P, Schultz BD, Green ED, Wall SM, Marcus DC. 2007. Lack of pendrin HCO₃⁻ transport elevates vestibular endolymphatic [Ca²⁺] by inhibition of acid-sensitive TRPV5 and TRPV6 channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F1314-F1321.
- Nakazato M, Chung HK, Ulianich L, Grassadonia A, Suzuki K, Kohn LD. 2000. Thyroglobulin repression of thyroid transcription factor 1 (TTF-1) gene expression is mediated by decreased DNA binding of nuclear factor I proteins which control constitutive TTF-1 expression. *Mol Cell Biol* 20:8499-8512 .
- Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, Bloise R, Ronchetti E, Nastoli J, et al., 2005. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA* 294:2975-80.
- Okada Y. 1997. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am. J. Physiol.* 273:C755-C789.
- Okada Y, Maeno E. 2001. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 130:377-83.
- Ortiz L., Zannini M., Di Lauro R. & Santisteban P. 1997. Transcriptional control of the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 by thyrotropin, insulin, and insulin-like growth factor I. *J Biol Chem* 272:23334-23339.
- Pace AJ, Lee E, Athirakul K, Coffman TM, O'Brien DA, Koller BH. 2000. Failure of spermatogenesis in mouse lines deficient in the Na-K-2Cl cotransporter. *J Clin Invest* 105:441-450.
- Paulmichl M, Li Y, Wikman K, Ackerman M, Peralta B, Clapham D. 1992. New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature* 356:238-241.
- Pera A, Dossena S, Rodighiero S, Gandia M, Botta G, Meyer G, Moreno F, Nofziger C, Hernandez-Chico C, Paulmichl M. 2008. Functional assessment of allelic variants in the SLC26A4 gene involved in Pendred syndrome and nonsyndromic EVA. *PNAS* 105:18608-18613.
- Pfarr N, Borck G, Turk A, Napiontek U, Keilmann A, Muller-Forell W, Kopp P, Pohlenz J. 2006. Goitrous congenital hypothyroidism and hearing impairment associated with mutations in the TPO and SLC26A4/PDS genes. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2678-2681.
- Piccolo A, Pusch M. 2005. Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CLC-4 and CLC-5. *Nature* 436:420-423.

- Piwon N, Günther W, Schwake M, Bösl MR, Jentsch TJ. 2000. CIC-5 Cl⁻-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* 408:369–373.
- Presta I, Arturi F, Ferretti E, Mattei T, Scarpelli D, Tosi E, Scipioni A, Celano M, Gulino A, Filetti S, Russo D. 2005. Recovery of NIS expression in thyroid cancer cells by overexpression of Pax8 gene. *BMC Cancer* 5:80.
- Priori SG, Bloise R, Crotti L. 2001. The long QT syndrome. *Europace* 3:16-27.
- Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. 1999. Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation* 99:529-33.
- Pryor SP, Madeo AC, Reynolds JC, Sarlis NJ, Arnos KS, Nance WE, Yang Y, Zalewski CK, Brewer CC, Butman JA. 2005. SLC26A4/PDS genotype-phenotype correlation in hearing loss with enlargement of the vestibular aqueduct (EVA): evidence that Pendred syndrome and non-syndromic EVA are distinct clinical and genetic entities. *J Med Genet* 42:159-165.
- Pu WT, Krapivinsky GB, Krapivinsky L, Clapham DE. 1999. pICln inhibits snRNP biogenesis by binding core spliceosomal proteins. *Mol Cell Biol* 19:4113-4120.
- Pu WT, Wickman K, Clapham DE. 2000. ICln is essential for cellular and early embryonic viability. *J. Biol. Chem.* 275:12363-12366.
- Reardon W, Trembath RC. 1997. Pendred syndrome – 100 years of underascertainment? *Q J Med* 90:443–447.
- Rillema JA., Hill MA. 2003. Prolactin regulation of the pendrin-iodide transporter in the mammary gland. *Am J Physiol* 284: E25-E28.
- Riordan JR. 2008. CFTR Function and Prospects for Therapy. *Annu Rev Biochem* 77:701–26.
- Ritter M, Revasio A, Jakab M, Chwatal S, Fürst J, Laich A, Gschwentner M, Signorelli S, Burtscher C, Eichmüller S, Paulmichl M. 2003. Cell swelling stimulates cytosol to membrane transposition of ICln. *J Biol. Chem.* 278:50163-74.
- Robinson NC, Huang P, Kaetzel MA, Lamb FS, Nelson DJ. 2004. Identification of an N-terminal amino acid of the CLC-3 chloride channel critical in phosphorylation-dependent activation of a CaMKII-activated chloride current. *J Physiol* 556:353–368.
- Royaux IE, Suzuki K, Mori A, Katoh R, Everett LA, Kohn LD, Green ED. 2000. Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 141:839-845.

Royaux IE, Wall SM, Karniski LP, Everett LA, Suzuki K, Knepper MA, Green ED. 2001. Pendrin, encoded by the pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4221-4226.

Royaux IE, Belyantseva IA, Wu T, Kachar B, Everett LA, Marcus DC, Green ED. 2003. Localization and functional studies of pendrin in the mouse inner ear provide insight about the etiology of deafness in pendred syndrome. *J. Assoc. Res. Otolaryngol* 4:394-404.

Saier MH Jr, Eng BH, Fard S, Garg J, Haggerty DA, Hutchinson WJ, Jack DL, Lai EC, Liu HJ, Nusinew DP, et al 1999. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim Biophys Acta* 1422:1-56.

Scandella E, Nagl UO, Oehl B, Bergmann F, Gschwentner M, Furst J, Schmarda A, Ritter M, Waldegger S, Lang F, Deetjen P, Paulmichl M. 2000. The promoter for constitutive expression of the human ICln gene CLNS1A. *J Biol Chem* 275:15613-15620.

Scheel O, Zdebik A, Lourdel S, Jentsch TJ. 2005. Voltage-dependent electrogenic chloride proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature* 436:424-427.

Schmarda A, Fresser F, Gschwentner M, Furst J, Ritter M, Lang F, Baier G, Paulmichl M. 2001. Determination of protein-protein interactions of ICln by the yeast two-hybrid system. *Cell Physiol Biochem* 11:55-60.

Schug J, Overton GC. 1997. Modeling transcription factor binding sites with Gibbs Sampling and Minimum Description Length encoding. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 5:268-271.

Schwartz PJ, Zaza A, Locati E, Moss AJ. 1991. Stress and sudden death. The case of the long QT syndrome. *Circulation* 83:71-80.

Schwarzer C, Becker S, Awni LA, Cole T, Merker R, Barnikol-Watanabe S, Thinnies FP, Hilschmann N. 2000. Human voltage-dependent anion-selective channel expressed in the plasmalemma of *Xenopus laevis* oocytes. *Int J Biochem Cell Biol*. 32:1075-84.

Shafir Y, Guy HR. 2004. STAM: simple transmembrane alignment method. *Bioinformatics* 20:758-769.

Shakibaei M, Mobasher A. 2003. Beta1-integrins co-localize with Na, K-ATPase, epithelial sodium channels (ENaC) and voltage activated calcium channels (VACC) in mechanoreceptor complexes of mouse limb-bud chondrocytes. *Histol Histopathol* 18:343-351.

Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, DiPietro A, Sanjad SA, Lifton RP. 1996. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet* 13:183–188.

Simon DB, Nelson-Williams C, Bia MJ, Ellison D, Karet FE, Molina AM, Vaara I, Iwata F, Cushner HM, Koolen M, Gainza FJ, Gitleman HJ, et al. 1996 bis. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet* 12:24–30.

Song L, Mercado A, Vazquez N, Xie Q, Desai R, George AL Jr, Gamba G, Mount DB. 2002. Molecular, functional, and genomic characterization of human KCC2, the neuronal K-Cl cotransporter. *Brain Res Mol Brain Res* 103:91–105.

Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT. 1997. Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet* 17:338-40

Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R et al., 2004. Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multi system disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119:19-31.

Splawski I, Timothy KW, Decher N, Kumar P, Sachse FB, Beggs AH, et al., 2005. Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8089-96.

Steinacker P, Awni LA, Becker S, Cole T, Reymann S, Hesse D, Kratzin HD, Morris-Wortmann C, Schwarzer C, Thinnies FP et al., 2000. The plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes contains voltage-dependent anion-selective porin channels. *Int J Biochem Cell Biol.* 32:225-234.

Sterling D, Casey JR. 2002. Bicarbonate transport proteins. *Biochem Cell Biol* 80:483–497.

Stobrawa SM, Breiderhoff T, Takamori S, Engel D, Schweizer M, Zdebik AA, Bösl MR, Ruether K, Jahn H, Draguhn A, Jahn R, Jentsch TJ. 2001. Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron.* 29:185-96.

Strange K, Emma F, Jackson PS. 1996. Cellular and molecular physiology of volume sensitive anion channels. *Am J Physiol* 270:C711-730.

Stuart-Tilley A, Sardet C, Pouyssegur J, Schwartz MA, Brown D, Alper SL. 1994. Immunolocalization of anion exchanger AE2 and cation exchanger NHE-1 in distinct adjacent cells of gastric mucosa. *Am J Physiol* 35:C559–C568.

- Stuart-Tilley AK, Shmukler BE, Brown D, Alper SL. 1998. Immunolocalization and tissue-specific splicing of AE2 anion exchanger in mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 9:946–959.
- Sun H, Tsunenari T, Yau KW, Nathans J. 2002. The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4008–4013.
- Sung KW, Kirby M, McDonald MP, Lovinger DM, Delpire E. 2000. Abnormal GABA_A receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. *J Neurosci* 20:7531–7538.
- Suzuki K, Mori A, Lavaroni S, Ulianich L, Miyagi E, Saito J, Nakazato M, Pietrarelli M, Shafran N, Grassadonia A, Kim WB, Consiglio E, Formisano S, Kohn LD. 1999. Thyroglobulin regulates follicular function and heterogeneity by suppressing thyroid-specific gene expression. *Biochimie* 81:329–340.
- Suzuki K, Royaux IE, Everett LA, Mori-Aoki A, Suzuki S, Nakamura K, Sakai T, Katoh R, Toda S, Green ED, Kohn LD. 2002. Expression of PDS/Pds, the Pendred syndrome gene, in endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 87:938.
- Suzuki K, Kohn LD. 2006. Differential regulation of apical and basal iodide transporters in the thyroid by thyroglobulin. *J Endocrinol* 189:247–55.
- Sweet RM, Eisenberg D. 1983. Correlation of sequence hydrophobicities measures similarity in three-dimensional protein structure. *J Mol Biol* 171: 79–488.
- Tang CJC, Tang TK. 1998. The 30-kD Domain of protein 4.1 mediates its binding to the carboxyl terminus of pICln, a protein involved in cellular volume regulation. *Blood* 92:1442–1447.
- Taniyama Y, Sato K, Sugawara A, Uruno A, Ikeda Y, Kudo M, Ito S, Takeuchi K. 2001. Renal tubule-specific transcription and chromosomal localization of rat thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter gene. *J Biol Chem* 276:26260–26268.
- Tao GZ, Kobayashi A, Itoh H, Tashima Y. 1998a. Expression of pICln in *Escherichia coli* gives a strong tolerance to hypotonic stress. *FEBS Letters* 434:28–32.
- Taylor JP, Metcalfe RA, Watson PF, Weetman AP, Trembath RC. 2002. Mutations of the PDS gene, encoding pendrin, are associated with protein mislocalization and loss of iodide efflux: implications for thyroid dysfunction in Pendred syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1778–1784.
- Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. 2005. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2:507–17.

- Thiemann A, Gründer S, Pusch M and Jentsch TJ. 1992. A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356:57-60.
- Valverde MA, Díaz M, Sepúlveda FV, Gill DR, Hyde SC, Higgins CF. 1992. Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature*. 355:830-3.
- Vandenberg JJ, Bett GCL, Powell T. 1997. Contribution of a swelling- activated chloride current to changes in the cardiac action potential. *Am J Physiol* 273:C541-C547.
- Vatta M, Ackerman M, Ye B, Makielski J, Ughanze E, Taylor E, et al., 2006. Mutant Caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long QT syndrome. *Circulation* 114:2104-12.
- Venezuela SM, Martin DK, Por SB., Robbins JM, Warton K, Bootcov MR, Schofieldi PR, Campbell TJ, Breit SN. 1997. Molecular Cloning and Expression of a Chloride Ion Channel of Cell Nuclei. *J Biol Chem* 272:12575–12582.
- Verlander JW, Hassell KA, Royaux IE, Glapion DM, Wang ME, Everett LA, Green ED, Wall SM. 2003. Deoxycorticosterone upregulates Pds (Slc26a4) in mouse kidney: role of pendrin in mineralocorticoid-induced hypertension. *Hypertension* 42:356-362.
- Verlander JW, Kim YH, Shin W, Phan TD, Hassell KA, Beierwaltes WH, Green ED, Everett L, Matthews SW, Wall SM. 2006. Dietary Cl(-) restriction upregulates pendrin expression within the apical plasma membrane of type B intercalated cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 291:F833-F839.
- vom Dahl S, Schliess F, Reissmann R, Gorg B, Weiergraber O, Kocalkova M, Dombrowski F, Haussinger D. 2003. Involvement of integrins in osmosensing and signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. *J Biol Chem* 278:27088-27095.
- Wagner JA, Cozens AL, Schulman H, Gruenert DC, Stryer L, Gardner P. 1991. Activation of chloride channels in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells by multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Nature* 3:793–796.
- Wagner CA, Finberg KE, Stehberger PA, Lifton RP, Giebisch GH, Aronson PS, Geibel JP. 2002. Regulation of the expression of the Cl-/anion exchanger pendrin in mouse kidney by acidbase status. *Kidney Int* 62:2109-2117.
- Wall SM, Hassell KA, Royaux IE, Green ED, Chang JY, Shipley GL, Verlander JW. 2003. Localization of pendrin in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F229-F241.
- Wangemann P, Itza EM, Albrecht B, Wu T, Jabba SV, Maganti RJ, Lee JH, Everett LA, Wall SM, Royaux IE, Green ED, Marcus DC. 2004. Loss of KCNJ10 protein

expression abolishes endocochlear potential and causes deafness in Pendred syndrome mouse model. *BMC Med* 20:2-30.

Wangemann P, Nakaya K, Wu T, Maganti RJ, Itza EM, Sanneman JD, Harbidge DG, Billings S, Marcus DC. 2007. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F1345-1353.

Wangemann P, Kim HM, Billings S, Nakaya K, Li X, Singh R, Sharlin DS, Forrest D, Marcus DC, Fong P. 2009. Developmental delays consistent with cochlear hypothyroidism contribute to failure to develop hearing in mice lacking *Slc26a4*/pendrin expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 297:F1435-47.

Weylandt KH, Valverde MA, Nobles M, Raguz S, Amey JS, Diaz M, Nastrucci C, Higgins CF, Sardini A. 2001. Human *ClC-3* is not the swelling-activated chloride channel involved in cell volume regulation. *J Biol Chem*. 276:17461-7.

Wolff J. 1983. Congenital goiter with defective iodide transport. *Endocr Rev* 4:240-254.

Wöll E, Ritter M, Haller T, Völkl H, Lang F. 1996. Calcium entry stimulated by swelling of Madin-Darby canine kidney cells. *Nephron* 74:150-157.

Wright EM, Diamond JM. 1977. Anion selectivity in biological systems. *Physiol Rev* 57:109-56.

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

Yamamoto-Mizuma S, Wang GX, Liu LL, Schegg K, Hatton WJ, Duan D, Horowitz TL, Lamb FS, Hume JR. 2004. Altered properties of volume-sensitive osmolyte and anion channels (VSOACs) and membrane protein expression in cardiac and smooth muscle myocytes from *Clcn3*^{-/-} mice. *J Physiol* 557:439-56.

Yamazaki J, Duan D, Janiak R, Kuenzli K, Horowitz B & Hume JR. 1998. Functional and molecular expression of volume-regulated chloride channels in canine vascular smooth muscle cells. *J Physiol* 507:729-736.

Yang T, Vidarsson H, Rodrigo-Blomqvist S, Rosengren SS, Enerback S, Smith RJ. 2007. Transcriptional control of *SLC26A4* is involved in Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (DFNB4). *Am J Hum Genet* 80:1055-1063.

Yannoukakos D, Stuart-Tilley A, Fernandez HA, Fey P, Duyk G, Alper SL. 1994. Molecular cloning, expression and chromosomal localization of two isoforms of AE3 anion exchanger from human heart. *Circ Res* 75:603-614.

Zareba W. 2006. Genotype-specific ECG patterns in long QT syndrome. *J Electrocardiol* 39:S101-6.

Zhai Y, Saier MH Jr. 2001. A web-based program (WHAT) for the simultaneous prediction of hydrophathy, amphipathicity, secondary structure and transmembrane topology for a single protein sequence. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3:501-502.

Zhang L, Benson DW, Tristani-Firouzi M, Ptacek LJ, Tawil R, Schwartz PJ, et al., 2005. Electrocardiographic features in Andersen-Tawil syndrome patients with KCNJ2 mutations: characteristic T-U-wave patterns predict the KCNJ2 genotype. *Circulation* 111:2720-6

Zygmunt AC. 1994. Intracellular calcium activates a chloride current in canine ventricular myocytes. *Am J Physiol* 267:H1984–H1995.