

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Scuola di Dottorato in Scienze Farmacologiche
Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale

Corso di Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Applicate alle Scienze Mediche
Ciclo XXV

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E FUNZIONALE DEL GENE CHRFAM7A, FORMA DUPLICATA DELLA
SUBUNITÀ ALPHA7 DEL RECETTORE NICOTINICO

Settore scientifico disciplinare: Bio/14

Tesi di dottorato di:
Valentina Alari

Relatore: Prof. Diego Fornasari

Coordinatore: Prof. Alessandro Gianni

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

1- INTRODUZIONE	1
1.1 L'infiammazione	1
1.1.1 Relazione tra risposta infiammatoria e stati patologici	2
1.2 Meccanismi di controllo della risposta infiammatoria	2
1.1.2 1.2.1 Pathway Umorale	2
1.1.3 Pathway neurale e riflesso infiammatorio	3
1.1.4 L'arco afferente del riflesso infiammatorio	4
1.3 Arco efferente del riflesso infiammatorio.	4
1.1.5 Il pathway colinergico anti-infiammatorio	5
1.4 Recettori nicotinici e muscarinici per l'acetilcolina	7
1.1.6 Identificazione del ruolo dei recettori nicotinici nel pathway colinergico anti-infiammatorio	9
1.1.7 Il recettore nicotinico $\alpha 7$	10
1.5 Meccanismi che regolano l'assemblaggio e l'espressione funzionale del recettore nicotinico $\alpha 7$	11
1.1.8 Ruolo della palmitoilazione nell'espressione funzionale del recettore nicotinico $\alpha 7$	13
1.1.9 RIC3: chaperone specifica per $\alpha 7$	14
1.1.10 L'attività di RIC3 dipende dal suo livello di espressione	15
1.1.11 La subunità $\alpha 7$ esiste in due differenti conformazioni	16
1.6 Meccanismi molecolari di trasduzione del segnale	17
1.7 Relazione tra "pathway colinergico anti-infiammatorio" e disturbi causati da un eccesso nella risposta infiammatoria	20
1.1.12 Il "Pathway colinergico anti-infiammatorio" in malattie neurodegenerative e disturbi mentali.	21
1.1.13 Schizofrenia	22
1.1.14 Morbo di Alzheimer	23

1.8	Regolazione epigenetica di CHRNA7 e coinvolgimento nella Sindrome di Rett e Autismo	23
1.9	gene CHRFAM7A	25
1.9.1	Isoforme proteiche codificate dal gene CHRFAM7A	26
2-	<i>SCOPO DELLA TESI</i>	30
3-	<i>MATERIALI E METODI</i>	32
3.1	Tecniche di manipolazione del DNA	32
3.1.1	Digestione con enzimi di restrizione	32
3.1.2	Defosforilazione di un vettore plasmidico	32
3.1.3	Ligazione	32
3.1.4	Costrutti utilizzati	33
3.2	Colture batteriche	38
3.2.1	Trasformazione	38
3.2.2	Cell Cracking	38
3.2.3	Mini	39
3.2.4	Midi	39
3.3	Colture cellulari	39
3.3.1	Linee cellulari	39
3.3.2	Tecniche di trasfezione transiente	40
3.4	Tecniche di manipolazione dell'RNA	40
3.4.1	Estrazione dell'RNA totale	40
3.4.2	Retrotrascrizione	41
3.4.3	Real time PCR	42
3.5	5' Race PCR	43

3.5.1 Fase 1: reazione con enzima CIP	44
3.5.2 Fase 2: precipitazione RNA	44
3.5.3 Fase 3: reazione con enzima TAP	44
3.5.4 Fase 4: ligazione 5' RACE "adapter"	45
3.5.5 Fase 5: Retrotrascrizione	45
3.5.6 Fase 6: "Nested" PCR	45
3.6 Tecniche di manipolazione delle proteine	47
3.6.1 Preparazione estratti proteici totali	47
3.6.2 Preparazione "post nuclear supernatant" (PNS)	48
3.6.3 Western Blot	48
3.7 Saggio dell'attività lucifera sica	49
3.8 Immunofluorescenza	49
3.8.1 Trattamento con Concanavalina A per la marcatura della superficie cellulare.	50
4- <i>RISULTATI</i>	51
4.1 Identificazione della regione regolatoria del gene CHRFAM7A	51
4.2 Determinazione dello start di trascrizione	53
4.2.1 Determinazione dell'inizio di trascrizione in THP-1	54
4.2.2 Determinazione del sito d'inizio della trascrizione in colture primarie di macrofagi umani	58
4.2.3 Detrminazione del sito di inizio della trascrizione nella linea di neuroblastoma umano SHSY5Y	60
4.3 Analisi funzionale delle sequenze regolatorie identificate	62
4.4 Generazione di nuovi costrutti per lo studio della regione regolatoria di CHRFAM7A	65
4.5 Trasfezioni transienti nella linea cellulare THP-1	65

4.6	Studio delle proteine codificate da CHRFAM7A	66
4.7	Strategia per lo studio delle isoforme derivate da CHRFAM7A	69
4.8	Trasfezioni transienti con i costrutti taggati Myc in cellule Hela	71
4.9	Esperimenti di co-trasfezione dei costrutti taggati Myc con la chaperone RIC3	75
5-	DISCUSSIONE	81
6-	BIBLIOGRAFIA	88

1-INTRODUZIONE

1.1 L' Infiammazione

Con il termine infiammazione, o flogosi, si intende un meccanismo di difesa non specifico e innato, volto a proteggere l'organismo dall'azione dannosa di agenti fisici, chimici, biologici o in seguito a lesione tissutale.

I segni tipici con cui si manifesta clinicamente sono: *calor* (aumento della temperatura locale dovuto all'aumentata vascolarizzazione), *tumor* (gonfiore determinato dalla formazione dell'essudato), *rubor* (arrossamento legato all'iperemia attiva) e *dolor* (indolenzimento provocato dalla compressione e dall'intensa stimolazione delle terminazioni sensitive da parte dell'agente patogeno e dei componenti dell'essudato). I processi infiammatori sono essenziali per la sopravvivenza ma, allo stesso tempo, se non sono finemente regolati e mantenuti sotto controllo possono causare gravi stati patologici acuti e cronici.

Uno dei risultati più drammatici di un' eccessiva e incontrollata risposta infiammatoria è lo shock settico, una sindrome potenzialmente letale, caratterizzata da bassa pressione sanguigna, coagulazione intravascolare e alterazioni metaboliche. Lo shock settico è la conseguenza più temuta della sepsi, un'infezione generalizzata dell'organismo, sostenuta dalla presenza di batteri Gram negativi nel torrente circolatorio e, in particolare, dall'alta concentrazione di Lipopolisaccaride (il principale costituente della parete esterna di questi organismi Gram-). L'LPS è costituito da un "core" formato da un acido grasso (lipide A), che è il componente maggiormente tossico, e da un rivestimento polisaccaridico complesso. Questa endotossina esplica la sua funzione nociva inducendo il rilascio da parte di macrofagi di varie citochine: interleuchine (IL-1, IL-6, IL-8), tumor necrosis factor α (TNF α) e altri mediatori tardivi dell'infiammazione tra cui l'HMGB1 (High mobility group B1). Granulociti neutrofili e macrofagi rispondono a questi mediatori rilasciando enzimi lisosomiali e prodotti reattivi dell'ossigeno (radicali liberi). Anche le cellule endoteliali rispondono ai mediatori dell'infiammazione aumentando il livello di espressione di molecole di adesione quali selectine e integrine, necessarie per il reclutamento e l'extravasazione di leucociti. Durante la diapedesi, infatti, questi ultimi legano e superano l'endotelio vasale e si dirigono per chemiotassi verso il focolaio infiammatorio.

Se da una parte la risposta a questi mediatori dell'infiammazione è importante per proteggere l'organismo dalle infezioni, dall'altra una loro eccessiva produzione può causare danni più gravi di quelli causati dall'infezione originaria.

1.1.1 Relazione tra risposta infiammatoria e stati patologici

Recenti studi hanno dimostrato uno stretto rapporto tra i meccanismi infiammatori e la genesi di diverse patologie. La presenza di un'infiammazione persistente può favorire l'insorgenza di malattie e, in particolare, può contribuire al loro mantenimento o interferire con i processi di guarigione. Reazioni infiammatorie locali, a livello del sistema digerente, possono, ad esempio, determinare la comparsa di colite, gastrite, meteorismo, difficoltà di assorbimento di minerali e altri nutrienti, o contribuire allo sviluppo di patologie croniche come il morbo di Crohn.

Reazioni infiammatorie generali contribuiscono a provocare dolori muscolari, artrite, psoriasi, epatopatie croniche, malattie demielinizzanti neurologiche, cefalea e emicrania. Esistono inoltre numerose evidenze che supportano l'ipotesi secondo cui fenomeni infiammatori hanno un ruolo rilevante nel provocare o promuovere lo sviluppo di malattie croniche neurodegenerative, come il morbo di Alzheimer e Parkinson (*Block et al., 2005*), e altri disturbi neurologici come la schizofrenia (*Monji et al., 2009*).

1.2 Meccanismi di controllo della risposta infiammatoria

Il rilascio di citochine pro-infiammatorie (IL-1, TNF- α , IL-6) durante un' infezione determina l'insorgenza di sintomi come febbre, stanchezza, perdita di appetito, iperalgesia, a dimostrazione del fatto che il sistema immunitario è in grado di influenzare circuiti neurali, inducendo una risposta da parte del sistema nervoso. (*Dantzer, 2006*). Tuttavia, questo meccanismo non è unidirezionale. Il sistema nervoso, a sua volta, attraverso il rilascio di neurotrasmettitori, modula la risposta infiammatoria tenendola sotto controllo e cercando di promuovere e mantenere l'omeostasi sistemica (*Olofsson, 2012*).

Stimoli pro-infiammatori periferici possono raggiungere il sistema nervoso centrale attraverso differenti vie: il pathway umorale o il pathway neurale.

1.2.1 Pathway Umorale

Citochine e chemochine sono in grado di modulare l'attività di varie popolazioni neuronali, che svolgono un ruolo in condizioni fisiologiche e/o patologiche. L'insorgere di uno stato infiammatorio determina un'

alterazione dei livelli ematici di svariati ormoni e peptidi. Tali variazioni sono captate dal sistema nervoso e ne influenzano l'attività, stimolando risposte appropriate.

Le citochine possono agire su tessuti periferici, inducendo il rilascio di ormoni che hanno un effetto a livello centrale, come la leptina; oppure stimolare nervi periferici che proiettano al cervello attraverso il nervo vago; o ancora, raggiungere direttamente il sistema nervoso centrale, sfruttando l'aumentata permeabilità della barriera ematoencefalica, conseguente all'incremento dei livelli di LPS (Goehler et al., 1997).

Inoltre, le citochine possono anche stimolare la sintesi e il rilascio di mediatori solubili, come prostaglandine e ossido nitrico, che a loro volta modulano l'attività di specifici neuroni. Ad esempio, la prostaglandina E2 attiva l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene ed è in grado di raggiungere i neuroni termoregolatori della regione preottica dell'ipotalamo, causando l'insorgenza di febbre (Schilts et al., 2002; Banks, 2006).

1.2.2 Pathway neurale e riflesso infiammatorio

Il sistema nervoso ha come funzione principale quella di ricevere e trasmettere segnali. Rispetto ai fattori endocrini, i nervi inviano segnali indirizzandoli in modo preciso a specifici target. Il sistema nervoso centrale (CNS) comunica con ogni parte del corpo attraverso neuroni sensoriali e motori. Input interni ed esterni, trasmessi da neuroni sensoriali, vengono processati e integrati a livello del CNS, che elabora specifiche risposte inviate alla periferia attraverso neuroni motori.

Il sistema nervoso autonomo (SNA), detto anche vegetativo o viscerale, innerva organi interni e controlla le cosiddette funzioni vegetative, ovvero quelle funzioni che generalmente sono al di fuori del controllo volontario, come i livelli di pressione sanguigna e temperatura corporea, la respirazione, la motilità intestinale. Caratteristica fondamentale del SNA è quella di agire attraverso archi riflessi, dove, col termine riflesso, si intende la risposta involontaria ad uno stimolo. Esistono riflessi autonomici, che controllano l'azione di organi interni, e riflessi somatici, che regolano i movimenti muscolari. In ogni caso, alla base di un riflesso vi è sempre una componente sensoriale (arco afferente) interconnessa ad una componente motoria (arco efferente).

Anche il sistema immunitario è regolato da un "riflesso infiammatorio", analogamente costituito da un arco afferente, che capta la presenza di molecole pro-infiammatorie, e da un arco efferente, che modula la risposta difensiva.

1.2.3 L'arco afferente del riflesso infiammatorio

Il nervo vago, che costituisce una componente fondamentale del sistema nervoso parasimpatico, regola attraverso le sue fibre efferenti la funzione di molti organi, inclusa la frequenza cardiaca, la motilità dell'apparato digerente e la costrizione bronchiale. Inoltre, possiede una componente sensitiva in grado di ricevere informazioni dalle vie respiratorie, dal cuore, dal fegato e dagli altri organi innervati, attraverso recettori che rispondono a pressione e temperatura. Recenti evidenze sperimentali hanno suggerito che la componente afferente del nervo vago trasporta anche informazioni riguardanti i processi infiammatori che avvengono a livello periferico. È stato dimostrato, ad esempio, che in seguito a somministrazione intraperitoneale di IL-1, dopo vagotomia, non si verifica l'insorgenza di febbre, cosa che invece accade quando il nervo vago è intatto (*Tracey, 2009*). Inoltre, la somministrazione di IL-1 induce l'espressione di c-fos, un tipico marcatore di attivazione neuronale, nelle fibre vagali afferenti (*Rosas-Ballina et al., 2009*). Questo è possibile perché a livello delle fibre vagali sono presenti recettori per la citochina IL-1 (IL-1R). Più precisamente, è stato dimostrato attraverso l'antagonista competitivo IL-1RA biotinilato che i recettori si trovano su cellule specializzate in contatto con le fibre sensoriali del nervo vago. Altri studi hanno dimostrato che la co-somministrazione di IL-1 con l'antagonista competitivo IL-1RA diminuisce significativamente la febbre indotta da IL-1 (*Tracey, 2009*). Le fibre afferenti del nervo vago terminano nel complesso vagale dorsale (DCV) del midollo allungato, costituito dal nucleo del tratto solitario (NTS), il nucleo motore dorsale del vago (DMN) e l'area postrema (AP). Inoltre, alcuni segnali afferenti possono attivare neuroni che proiettano all'ipotalamo e ad altri nuclei del CNS. Anche queste proiezioni sono importanti nella risposta infiammatoria, soprattutto nella regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, associato alla produzione di glucocorticoidi e all'induzione di febbre (*Olofsson et al., 2012*)

La componente efferente del vago origina dal nucleo motore dorsale, mentre dal nucleo del tratto solitario partono le proiezioni dirette ai nuclei ipotalamici (come il paraventricolare), all'amigdala e alla corteccia insulare.

1.3 L'arco efferente del riflesso infiammatorio

Il sistema nervoso autonomo, in seguito ad uno stimolo pro-infiammatorio proveniente dalla periferia, può rispondere attraverso due differenti vie: l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) o il pathway colinergico anti-infiammatorio (fig.1).

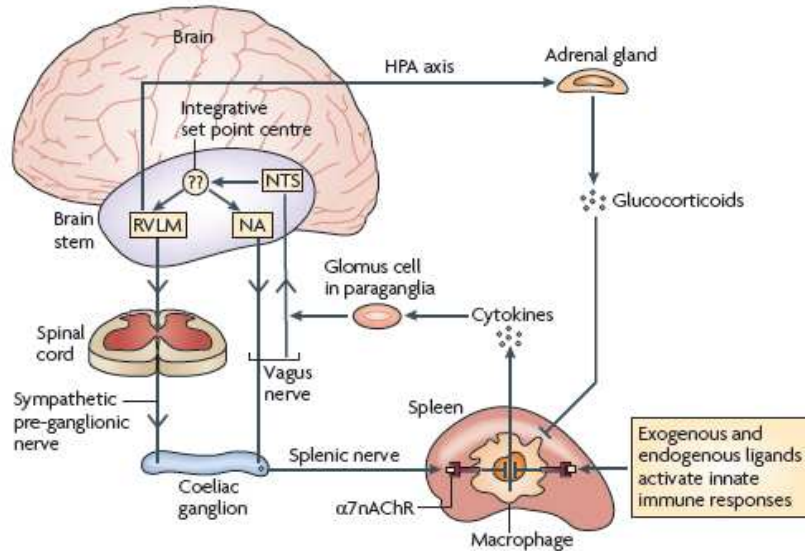


Fig.1: Vie efferenti del rifleso infiammatorio: 1-attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi surrene, che determina il rilascio di GC; 2-pathway colinergico anti-infiammatorio, mediato dalle fibre efferenti del vago.

L'asse ipotalamo-ipofisario è costituito dal nucleo paraventricolare, l'adenipofisi e la corticale surrenale. È attivato da fattori di stress, ferite o infezioni, che provocano il rilascio di CRH (Corticotropin Releasing Factor) da parte dell'ipotalamo. Il CRH raggiunge l'ipofisi anteriore, dove stimola a sua volta il rilascio di ACTH (Ormone Adrenocorticotropo). Quest'ultimo è un ormone di natura proteica che, rilasciato in circolo, va ad agire sulla corticale del surrene, stimolando la produzione di glucocorticoidi, che hanno un effetto anti-infiammatorio in quanto riducono i livelli di sintesi delle citochine. (Pavlov et al., 2003). Solo recentemente è stata dimostrata l'esistenza della seconda via dell'arco efferente, ovvero il pathway colinergico anti-infiammatorio.

1.3.1 Il pathway colinergico anti-infiammatorio

Recenti studi clinici hanno dimostrato che il trattamento con nicotina può avere un effetto nel ridurre i livelli di citochine pro-infiammatorie in alcuni casi di malattia infiammatoria intestinale. Stimoli trasmessi alla periferia attraverso il nervo vago culminano con un aumento del rilascio di acetilcolina (ACh), che interagisce, attraverso specifici recettori, con i macrofagi, cellule responsabili dell'immunità innata (Fig. 1.2). Queste cellule derivano da monociti circolanti che, richiamati da uno stimolo flogistico, passano

attraverso l'endotelio e per chemiotassi raggiungono il focolaio infiammatorio dove vanno incontro a differenziamento. Prodotti derivanti da microrganismi patogeni, ma anche le stesse citochine, sono in grado di attivarli, inducendo la produzione di mediatori dell'infiammazione; l'ACh è in grado di inattivare queste cellule, stimolando il rilascio di molecole anti-infiammatorie (come IL-10) da parte delle stesse. Alcuni esperimenti hanno messo in evidenza come in culture primarie di macrofagi, trattate con ACh, si abbia una riduzione, dose dipendente, nella produzione di TNF α , in seguito ad esposizione a LPS. E' stato inoltre dimostrato, in un modello animale di endotossemia, che la stimolazione elettrica del nervo vago causa una significativa diminuzione nella produzione di citochine pro-infiammatorie da parte di macrofagi nella milza, nel fegato, nel tratto intestinale e in altri tessuti innervati dal vago. In particolare, si osserva una diminuzione dei livelli di TNF α , IL-1, IL-6 e IL-8, mentre non viene alterata la produzione di corticosteroidi e IL-10 (*Borovikova et al., 2000*).

Inizialmente si è ipotizzato che l'ACh responsabile di questo processo provenisse direttamente dalle fibre efferenti vagali, e, quindi, che la componente neuronale del riflesso infiammatorio fosse costituita unicamente dal nervo vago. In realtà, recentemente, è stato dimostrato che i potenziali d'azione responsabili del "pathway colinergico anti-infiammatorio" attraversano il nervo vago sub-diaframmatico, il ganglio celiaco e il nervo splenico. Quindi, la produzione di citochine è controllata da due neuroni in serie: uno che origina nel nucleo motore dorsale e percorre il nervo vago e il secondo che origina nel ganglio celiaco e attraverso il nervo splenico raggiunge la milza.

Il nervo splenico è costituito principalmente da fibre catecolaminergiche, che terminano in corrispondenza delle cellule immunitarie della polpa rossa, della polpa bianca e della zona marginale della milza. Una deplezione di catecolamine attraverso l'uso di reserpina annulla l'effetto inibitorio sulla produzione di TNF α in seguito a stimolazione vagale. Cio` suggerisce che l'attenuazione della produzione di TNF α da parte dei macrofagi della milza, indotta da stimolazione del nervo vago, è mediata dalla noradrenalina liberata dal nervo splenico (*Huston et al., 2006; Rosas-Ballina et al., 2008*).

Gli stessi autori, inoltre, hanno dimostrato che una stimolazione elettrica del nervo splenico causa il rilascio di una grande quantità di ACh all'interno della milza e nella vena splenica. Quindi, la noradrenalina rilasciata dal nervo splenico nella polpa bianca della milza e` in grado di interagire con i recettori β -adrenergici dei linfociti T e B, che producono ACh. L'ACh prodotta dai linfociti può interagire con i macrofagi, inibendo la sintesi di mediatori dell'infiammazione (fig.2).

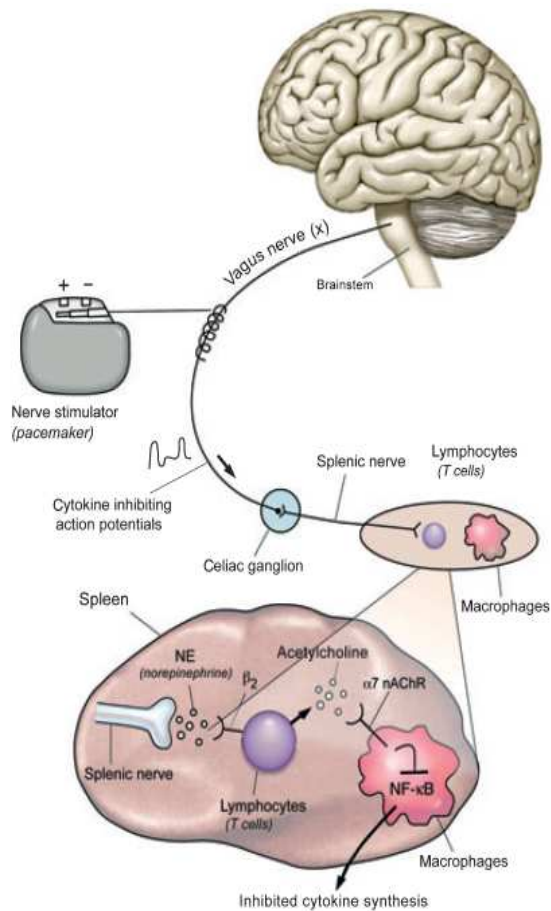


Fig.2 I potenziali d'azione che transitano nel nervo vago vengono trasmessi al nervo splenico a livello del ganglio celiaco. Il nervo splenico controlla l'attivazione dei linfociti nella milza, i quali possono a loro volta secernere acetilcolina che modula la risposta dei macrofagi. La trasduzione del segnale intracellulare porta all'inibizione di NF- κ B e all'arresto della produzione di citochine pro-infiammatorie. L'esistenza di questo meccanismo di regolazione suggerisce come la stimolazione elettrica del "pathway colinergico anti-infiammatorio" possa essere usata per revertire i sintomi in modelli preclinici di artrite reumatoide, pancreatite, sepsi e altri disturbi causati dall'eccesso di citochine pro-infiammatorie.

L'acetilcolina endogena puo' agire attraverso due diversi tipi di recettori: recettori nicotinici ionotropici o recettori muscarinici metabotropici.

1.4 Recettori nicotinici e muscarinici per l'acetilcolina

I recettori nicotinici (nAChR) sono proteine transmembrana appartenenti alla famiglia dei recettori-canale cationici. Sono pentameri costituiti dalla combinazione di cinque subunita' proteiche, disposte

simmetricamente in modo da circoscrivere un poro centrale. In seguito al legame con il neurotrasmettitore ACh o con agonisti, come la nicotina, si ha un cambio conformazionale che determina l'apertura del poro centrale e un aumento della permeabilità a cationi come Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . Questi ioni, spinti dal gradiente elettrochimico, determinano una variazione del potenziale elettrico di membrana.

Ogni subunità di cui è costituito il recettore è formata da una catena polipeptidica che attraversa quattro volte la membrana plasmatica (4 domini idrofobici M1- M4). Le regioni N-terminale e C-terminale sono entrambe extracellulari, così come il sito di legame per il ligando; la lunga sequenza situata tra i domini M3 e M4 forma il loop citoplasmatico del recettore, fondamentale per il legame con molecole intracellulari che mediano la trasduzione del segnale. Sono state individuate dieci sottotipi di subunità α ($\alpha 1$ - $\alpha 10$), quattro di subunità β ($\beta 1$ - $\beta 4$), e subunità γ , ϵ e δ . Esistono recettori omopentamerici o eteropentamerici a seconda che si associno cinque subunità tutte identiche o diverse tra loro. Le isoforme recettoriali più studiate sono quelle espresse a livello delle sinapsi neuronali e delle giunzioni neuromuscolari.

I recettori nicotinici muscolari si trovano a livello della placca neuromuscolare, sulla membrana post-sinaptica. Qui, in seguito al legame con l'ACh liberata dalla terminazione presinaptica, determinano un aumento della permeabilità al Na^+ , dando origine ad una serie di eventi che portano alla contrazione muscolare. Sono eteropentameri costituiti nell'embrione da due subunità $\alpha 1$, una $\beta 1$, una γ e una ϵ . Quest'ultima, nell'adulto, viene sostituita dalla subunità δ .

I recettori nicotinici neuronali sono ampiamente distribuiti in tutto il sistema nervoso (fig.3), sia a livello pre- sia post-sinaptico. Intervengono nella modulazione del rilascio di neurotrasmettitori, nella regolazione dell'eccitabilità cellulare e nell'integrazione dei segnali a livello del sistema nervoso centrale. Hanno anche un ruolo cruciale in funzioni fisiologiche quali veglia, sonno, fatica, ansia, dolore, assunzione di cibo e funzioni cognitive. Rappresentano una classe molto eterogenea di recettori. Infatti, possono essere omopentameri, costituiti da cinque subunità α identiche, oppure eteropentameri, formati dall'associazione di subunità α e β . I recettori nicotinici neuronali, inoltre, vengono raggruppati in due principali sottocategorie:

- recettori sensibili all' α -bungarotossina, costituiti dalle subunità $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$ o $\alpha 10$.
- recettori non sensibili all' α -bungarotossina, solitamente eteropentameri costituiti dalle subunità $\alpha 2$ -6 e $\beta 2$ -4.

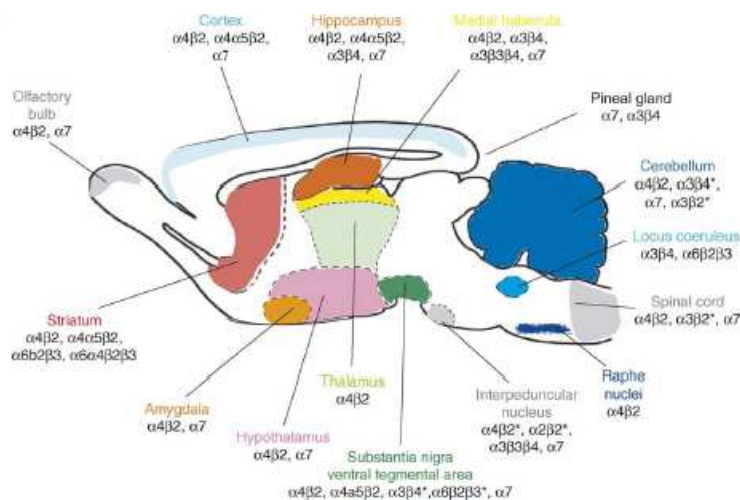


Fig.3 Distribuzione dei recettori nicotinici, omopentamerici ed eteropentamerici, nel sistema nervoso centrale.

I recettori muscarinici (M1-M5) sono membri della famiglia dei recettori a sette domini transmembrana, accoppiati a proteine G. Sono caratterizzati dall'aver la porzione N-terminale extracellulare, mentre il C-terminale è citoplasmatico. La sequenza che forma il terzo loop intracellulare, tra il quinto e il sesto dominio transmembrana, è fondamentale per la trasmissione del segnale alle proteine G accoppiate al recettore, in seguito ad interazione con il ligando ACh. Sono espressi sia a livello del sistema nervoso centrale, sia in periferia, sulla membrana di cellule del sistema immunitario come macrofagi, monociti, linfociti e mast-cellule.

1.4.1 Identificazione del ruolo dei recettori nicotinici nel pathway colinergico anti-infiammatorio

Per identificare quale dei due sottotipi di recettori colinergici (nicotinici o muscarinici) fosse in grado di mediare la risposta dei macrofagi all'acetilcolina, sono stati effettuati esperimenti con agonisti specifici per ciascuna delle due categorie.

La muscarina è risultata in grado di ridurre la produzione di TNF α solo lievemente e a concentrazioni maggiori rispetto a quelle fisiologiche (Pavlov et al., 2006). Al contrario, la nicotina mostra un effetto persino superiore all'acetilcolina nell'inibire il rilascio di TNF α e di altre citochine pro-infiammatorie, in maniera dose-dipendente. Questi dati, dunque, hanno messo in luce come la modulazione della risposta infiammatoria avvenga attraverso l'interazione con recettori colinergici di tipo nicotino.

Successivi studi hanno poi dimostrato l'importanza del recettore nicotinic $\alpha 7$ nel pathway colinergico anti-infiammatorio. È espresso, infatti, sulla membrana di macrofagi e rappresenta un punto di connessione fondamentale tra sistema immunitario e sistema nervoso. Esperimenti in vitro su macrofagi umani, in cui l'mRNA di $\alpha 7$ è stato silenziato con oligonucleotidi antisense, mostrano che la nicotina non è più in grado di ridurre i livelli di TNF α in seguito a trattamento con LPS. Analogamente, in topi Knock-out per $\alpha 7$, la stimolazione elettrica del nervo vago non è più efficace nell'inibire la produzione di citochine pro-infiammatorie (Wang et al., 2003). In entrambi i casi, l'assenza del recettore nicotinic $\alpha 7$, elemento chiave del pathway colinergico anti-infiammatorio, porta alla mancata modulazione dei livelli di infiammazione, causando una risposta immunitaria sistemica incontrollata.

1.4.2 Il recettore nicotinic $\alpha 7$

Il recettore nicotinic $\alpha 7$ è un recettore canale omomeroico composto da cinque subunità $\alpha 7$, con un'alta permeabilità al calcio (fig.4).

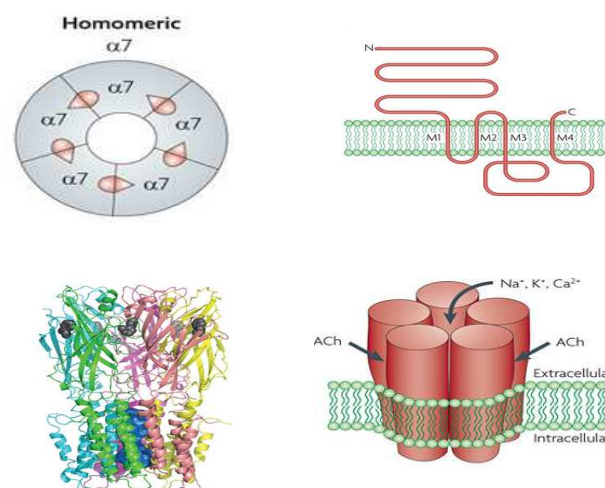


Fig.4. Rappresentazione della struttura del recettore nicotinic $\alpha 7$.

Il gene che codifica per la subunità $\alpha 7$, CHRNA7, è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 15, nella regione 15q13-15q14, ed è lungo 138 Kb. È composto da dieci esoni, che danno origine ad un trascritto codificante una proteina di 55 KDa. Di questi, i primi 6 codificano per il dominio N-terminale extracellulare, che contiene il sito di legame per l'acetilcolina; gli esoni 7 e 8 danno origine alla porzione corrispondente ai primi tre domini transmembrana, il secondo dei quali costituisce il canale ionico; gli esoni 9 e 10 codificano per il loop citoplasmatico e il quarto dominio transmembrana (fig.5).

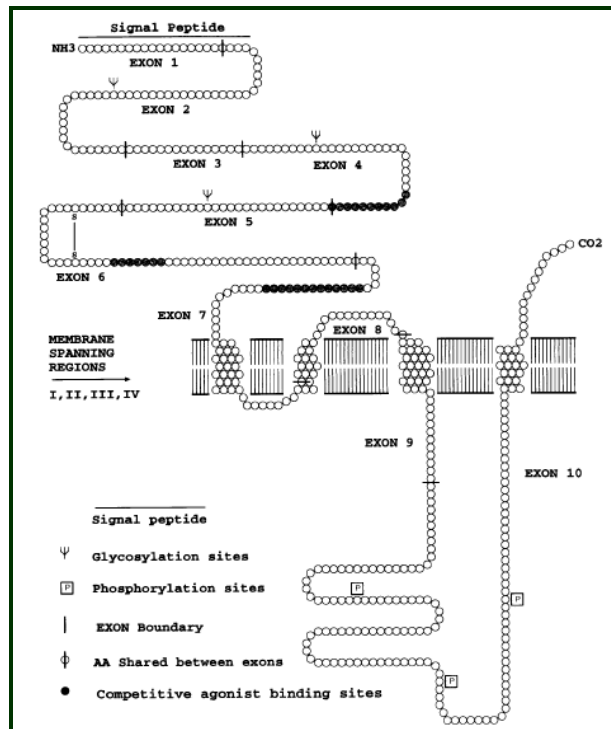


Fig.5- Rappresentazione schematica della struttura della subunità $\alpha 7$ del recettore nicotinic.

Il recettore $\alpha 7$ è ampiamente distribuito nel sistema nervoso centrale e periferico. Nel sistema nervoso centrale è localizzato sia a livello presinaptico, dove modula il rilascio di neurotrasmettitori, sia post-sinaptico, dove genera un impulso eccitatorio che permette la propagazione dello stimolo nervoso.

Il recettore $\alpha 7$ mostra anche una localizzazione in cellule non neuronali come cellule endoteliali, cellule dell'epitelio bronchiale, cheratinociti, astrociti, cellule della microglia e macrofagi. Evidenze sperimentali suggeriscono che il recettore $\alpha 7$ in queste cellule non eccitabili possa avere un ruolo in processi come proliferazione, differenziamento e migrazione cellulare, attraverso un meccanismo di trasmissione autocrino e paracrino (Wessler et al., 2008).

1.5 Meccanismi che regolano l'assemblaggio e l'espressione funzionale del recettore nicotinic $\alpha 7$

Il recettore nicotinic $\alpha 7$ è una proteina multimerica, formata da cinque subunità, che va incontro ad una serie di eventi che ne mediano il corretto folding, l'oligomerizzazione e l'espressione funzionale in membrana. I meccanismi di assemblaggio sono molto complessi. Infatti, non solo è importante che ciascun

dominio abbia una corretta conformazione, ma è anche necessaria una corretta interazione tra le subunità vicine. Diversi studi hanno evidenziato come alcuni eventi di folding avvengano solo secondariamente all'associazione delle varie subunità. Ad esempio, il sito di legame per la bungarotossina non si forma fino a quando non si è assemblato il complesso pentamerico (Green and Millar, 1995).

La serie di step che porta alla maturazione di un recettore nicotinic, ha inizio a livello della membrana luminale del reticolo endoplasmatico (ER), dove avvengono le prime modifiche post-traduzionali, che includono il taglio della sequenza segnale all'N-terminale ed eventi di glicosilazione, formazione di ponti disolfuro, palmitoilazione e assemblaggio in pentameri. Successivamente, solo i recettori correttamente assemblati sono trasportati alla membrana plasmatica (fig.6). Un' alterata maturazione o un' incompleta associazione delle subunità causano la ritenzione della proteina "misfoldata" nel reticolo endoplasmatico e la sua successiva degradazione (Treinin, 2008).

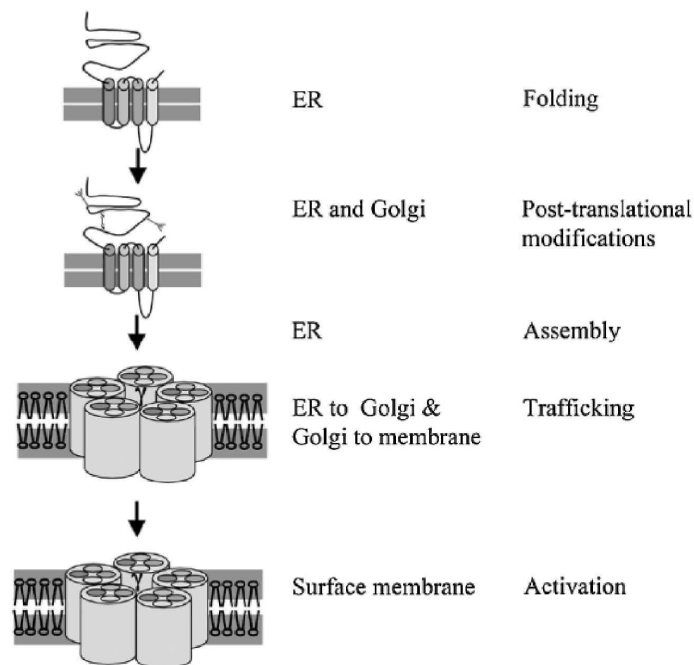


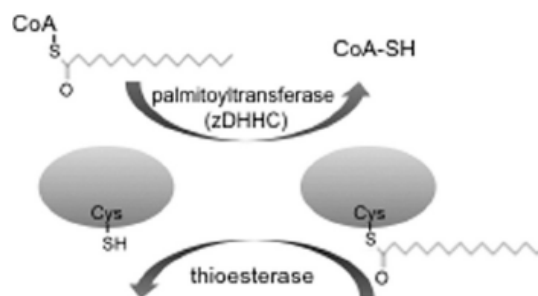
Fig.6 Rappresentazione schematica delle fasi di maturazione, assemblaggio e trasporto in membrana del recettore nicotinic $\alpha 7$.

Precedenti studi condotti sui recettori nicotinic $\alpha 7$ indicano che un'inappropriata formazione di ponti disolfuro preclude il corretto folding delle subunità, in diverse linee cellulari (Rakhilin et al., 1999). Inoltre, la presenza dell'enzima ciclofillina, una proliil isomerasi, è necessaria affinché le subunità assumano la corretta conformazione (Helekar et al., 1994; Helekar et al., 1997). Dati più recenti mettono in luce l'importanza di un dominio α -elica, posto all'N-terminale della sequenza di $\alpha 7$, in grado di interagire con i β -strand $\beta 2$ e $\beta 3$ localizzati in prossimità del terzo loop. Questo risulta essere un passaggio chiave nella biogenesi del

recettore (Valles *et al.*, 2012). Infine, una corta sequenza amminoacidica posta nel loop citoplasmatico di $\alpha 7$, tra i segmenti transmembrana M3 e M4, risulta fondamentale per il trafficking del recettore, dopo assemblaggio nel ER. Infatti, mutazioni degli amminoacidi di questa regione riducono il targeting e l'espressione funzionale di $\alpha 7$ (Mukherjee *et al.*, 2009).

1.5.1 Ruolo della palmitoilazione nell'espressione funzionale del recettore nicotinic $\alpha 7$

La palmitoilazione è una modificazione post-traduzionale, reversibile, che consiste nell'aggiunta di una molecola di acido palmitico ad un residuo di cisteina, mediante legame tioestere.



Questo processo interessa un gran numero di proteine di membrana, tra cui i recettori per la bungarotossina (BgtRs). Nel caso dei recettori nicotinici composti da subunità $\alpha 7$, la palmitoilazione è uno step fondamentale per la loro corretta maturazione ed espressione funzionale (Drisdell *et al.*, 2004). Innanzitutto, è necessario che si verifichi un cambio conformazionale, che renda accessibili i residui di cisteina agli enzimi che catalizzano la reazione di palmitoilazione, le acil-palmitoil-transferasi. L'aggiunta dell'acido palmitico avviene nel reticolo endoplasmatico, durante l'assemblaggio delle subunità recettoriali ed è indispensabile per la formazione del sito di legame del ligando. Infatti, il trattamento con bromopalmitato (un inibitore della palmitoilazione) impedisce la formazione del sito di legame per la bungarotossina (Alexander J.K. *et al.*, 2009). L'aggiunta dell'acido palmitico può modificare il grado di idrofobicità della proteina e, quindi, influenzarne lo stato conformazionale e l'interazione con altre molecole. Questa specifica modificazione post-traduzionale, inoltre, riveste un ruolo importante non solo nell'assemblaggio, ma anche nel trafficking e nell'inserimento dei recettori in membrana.

La palmitoilazione è un meccanismo reversibile. Una volta che i recettori hanno raggiunto la superficie cellulare vengono de-palmitoilati, da apposite tio-esterasi. Il processo di palmitoilazione non può avvenire

in tutti i tipi di cellule. Ciò potrebbe rappresentare una spiegazione del perché solo in alcune linee cellulari si riesce ad ottenere l'espressione funzionale di recettori nicotinici $\alpha 7$, in grado di legare bungarotossina. Alcuni recenti dati, inoltre, mostrano che una disregolazione del meccanismo di palmitoilazione, può comportare l'insorgenza di patologie, tra cui ritardo mentale e schizofrenia (Shipston, 2011). Infine, numerose proteine associate a disordini neurologici come la corea di Huntington (Huang et al., 2004), l'Alzheimer (Sidera et al., 2005) e la Schizofrenia (Karayiorgou and Gogos, 2004), sono state identificate come proteine altamente palmitoilate (Alexander et al., 2010).

1.5.2 RIC3: chaperone specifica per $\alpha 7$

Tutte le fasi, dalla sintesi all'espressione in superficie, sono mediate da una serie di proteine che assistono la maturazione dei recettori nicotinici $\alpha 7$. Alcune di queste sono "chaperone" non specifiche, come BIP (proteina legante le immunoglobuline) e Calnexina, che intervengono nei processi di folding di varie proteine, altre invece interagiscono specificamente con $\alpha 7$, come la chaperone RIC3.

Questa proteina è stata identificata in *C.elegans* nel 1995. È composta da un N-terminale citoplasmatico, un dominio che attraversa la membrana luminale del reticolo e un C-terminale con due domini coiled-coil. L'omologo umano presenta alcune differenze strutturali rispetto alla proteina identificata in *C.elegans*: ha un N-terminale più corto e un solo dominio coiled coil (Valles et al., 2012) (fig.7). RIC3 è indispensabile per il corretto assemblaggio del recettore, favorendo un'aumento dei livelli di proteina funzionale. Recenti studi hanno dimostrato che, in assenza di RIC3, $\alpha 7$ non viene palmitoilata. La presenza della chaperone, infatti, è strettamente necessaria in quanto rende accessibili alla palmitoilazione i residui di cisteina delle subunità $\alpha 7$ (Vallès et al., 2009).

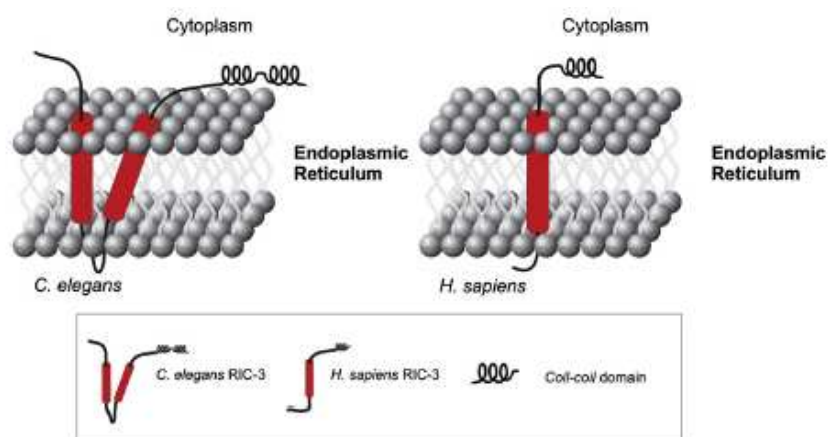


Fig.7 Struttura della proteina RIC3 in *C.Elegans* (a sinistra) e nell'uomo (a destra).

Il processo di maturazione dei recettori nicotinici risulta spesso inefficiente. Solo il 30% delle subunità trascritte e tradotte, va a costituire recettori funzionali sulla superficie cellulare. La presenza di RIC3 è fondamentale nel favorire un incremento dei livelli di proteina funzionale in membrana e, quindi, nel mediare la risposta cellulare all'Acetilcolina.

1.5.3 L'attività di RIC3 dipende dal suo livello di espressione

Un recente lavoro ha messo in luce come il livello di espressione della chaperone RIC3 sia in grado di modificarne la funzione. In particolare, a bassi livelli, RIC3 è attivo nel promuovere l'assemblaggio dei recettori nicotinici $\alpha 7$ e di mediarne l'uscita dal reticolo endoplasmatico e il trafficking in membrana. Al contrario, alte concentrazioni di questa chaperone inibiscono il trasporto dei recettori assemblati verso la superficie cellulare, favorendone la ritenzione nel reticolo endoplasmatico. Questi dati sono stati ottenuti mediante esperimenti di co-trasfezione, in cellule HEK, di $\alpha 7$ (5 μg) e RIC3 a diverse concentrazioni (bassa concentrazione: 0,01 μg ; alta concentrazione: 5 μg) (Alexander et al., 2010). Ad alti livelli, RIC3 non modifica la quantità di recettore espresso e assemblato, ma ne inibisce il raggiungimento della membrana, trattenendolo in aggregati, formati dalla stessa chaperone a livello del reticolo endoplasmatico. Il grafico sottostante (fig.8) mostra, infatti, come bassi livelli di RIC3 determinino un incremento dell'ampiezza delle correnti evocate, indice di un maggior numero di recettori funzionali, sulla superficie cellulare.

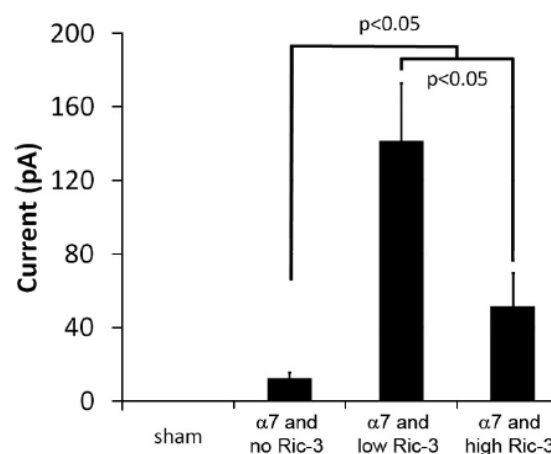


Fig.8 Effetto di RIC3 sulle correnti evocate dall'ACh, sui recettori nicotinici $\alpha 7$. RegISTRAZIONI di whole cell patch-clamp su cellule che overesprimono $\alpha 7$ senza RIC3 o con RIC3 a concentrazioni basse e alte.

1.5.4 La subunità $\alpha 7$ esiste in due differenti conformazioni

Uno studio condotto da Rakhilin e colleghi (Rakhilin *et al.*, 1999) ha dimostrato l'esistenza di due diversi tipi di subunità $\alpha 7$, distinguibili per lo stato di ossidoriduzione e per la conseguente formazione del sito di legame per la bungarotossina. $\alpha 7$, quindi, può avere due diverse conformazioni: conformazione SH (stato ridotto) o conformazione S-S (stato ossidato). Nel primo caso (stato SH), non avviene l'ossidazione delle cisteine presenti in posizione 128 e 142. Di conseguenza, non si forma il loop di circa 15 amminoacidi, tra queste cisteine, importante per la corretta formazione del sito di legame per la bungarotossina (fig.9-A). In alcuni tipi cellulari, come le tsA201, tutte le subunità $\alpha 7$ sono foldate nella conformazione S-H e, pertanto, non si ottengono recettori funzionali (nessun segnale di "binding" con bungarotossina). Nella conformazione S-S, invece, si forma un ponte disolfuro tra i residui di cisteina in posizione 128 e 142 (fig.9-B-freccia rossa). Questo ponte disolfuro è in grado di formarsi in seguito ad una modificazione conformazionale dell' N-terminale, che, a sua volta, sembra determinata da cambiamenti nel loop citoplasmatico del dominio COOH (fig.9-B-freccia blu). Nelle linee cellulari SHSY5Y e PC-12, le subunità $\alpha 7$ vengono assemblate in entrambi gli stati redox (SH ed S-S) e si complessano a formare pentameri misti, in cui le subunità nello stato S-S permettono la formazione dei siti leganti la bungarotossina, mentre le subunità nella conformazione SH hanno un ruolo strutturale.

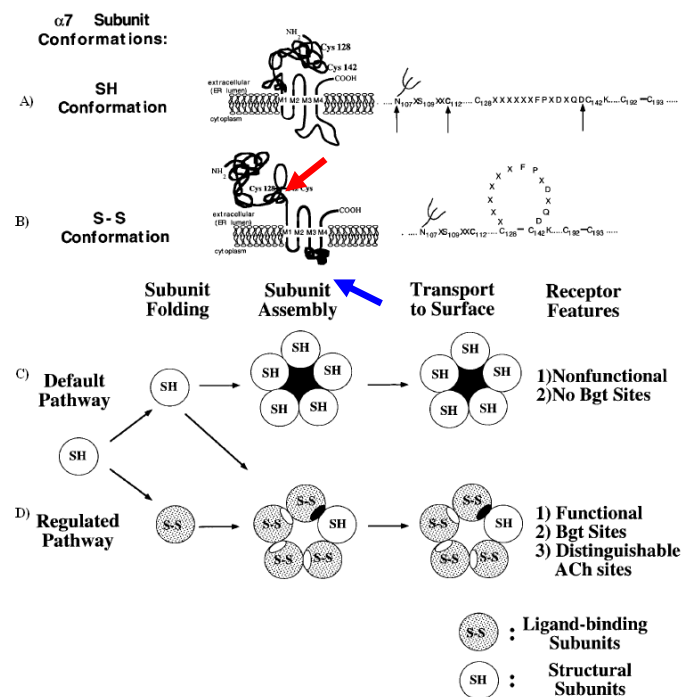


Fig.9 Schema rappresentativo delle due conformazioni in cui può essere foldata la subunità $\alpha 7$. A) conformazione SH: le cisteine 128 e 142 sono in uno stato ridotto. B) conformazione S-S: tra le cisteine 128 e 142 (ossidate) si genera un ponte disolfuro, che rende possibile la formazione del sito di legame con la bungarotossina. C) recettori formati da 5

subunità SH non sono funzionali (come in cellule tsA201). D) recettori misti, costituiti da subunità S-S ed SH, risultano essere funzionali (come quelli in cellule SHSY5Y e PC12).

La completa delucidazione di tutti i passaggi e mediatori, coinvolti nella sintesi, nell' assemblaggio e nel trafficking dei recettori nicotinici $\alpha 7$, sarà determinante anche per la piena comprensione dei meccanismi patofisiologici alla base delle malattie in cui $\alpha 7$ è coinvolta e per lo sviluppo di futuri target terapeutici.

1.6 Meccanismi molecolari di trasduzione del segnale

Il fattore di trascrizione NF- κ B è il mediatore chiave della risposta infiammatoria a prodotti batterici e citochine. La sua attivazione può essere mediata da due differenti meccanismi: la via canonica, attivata da prodotti microbici e citochine come IL-1, TNF α e TLR, o la via alternativa, attivata dal ligando CD40, dal fattore attivante le cellule B (BAFF) e dal ligando del recettore attivatore di NF- κ B (RANKL). I due pathway si differenziano per la chinasi di I κ B (IKK) coinvolta e per le diverse subunità che formano il fattore di trascrizione (fig10).

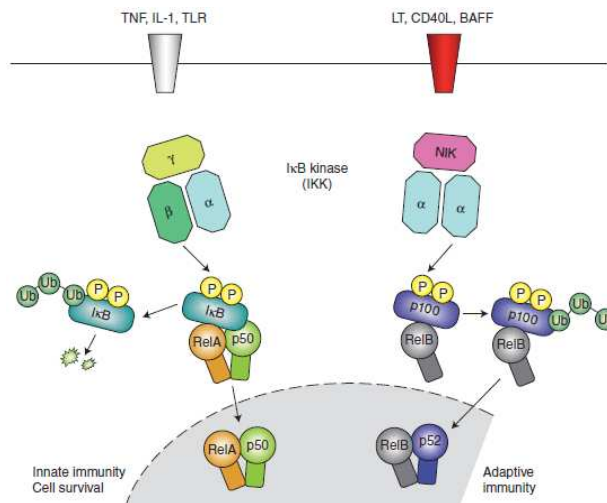


Fig.10 : Rappresentazione dei due meccanismi di attivazione del fattore trascrizionale NF- κ B: via canonica (a sinistra) e via alternativa (sulla destra).

In assenza di stimoli, NF- κ B è legato al suo inibitore (I κ B), che lo trattiene nel citoplasma in forma inattiva. Citochine pro-infiammatorie o molecole esogene (come LPS) dopo interazione coi recettori di TNF α , di IL-1

e Toll-like Receptor (TLR), attivano vie di trasduzione del segnale, che inducono la fosforilazione e la degradazione da parte del proteosoma, di I κ B. La dissociazione dal suo inibitore permette la traslocazione di NF- κ B (formato dalle subunita` p50 e RelA) dal citoplasma al nucleo, dove promuove la trascrizione di geni target. Questi codificano per chemochine, citochine pro-infiammatorie, molecole di adesione, enzimi che producono mediatori secondari dell'infiammazione e inibitori dell'apoptosi: tutti importanti componenti dell'immunita` innata, prodotti in risposta all'invasione di microrganismi e necessari per la migrazione di fagociti nei focolai infiammatori.

La via alternativa richiede IKK α che, mediante fosforilazione, induce la maturazione delle subunita` p100 e p52 di NF- κ B, che dimerizzano e migrano insieme a RelB nel nucleo, dove attivano specifici geni target (Lawrence, 2009)(fig.11).

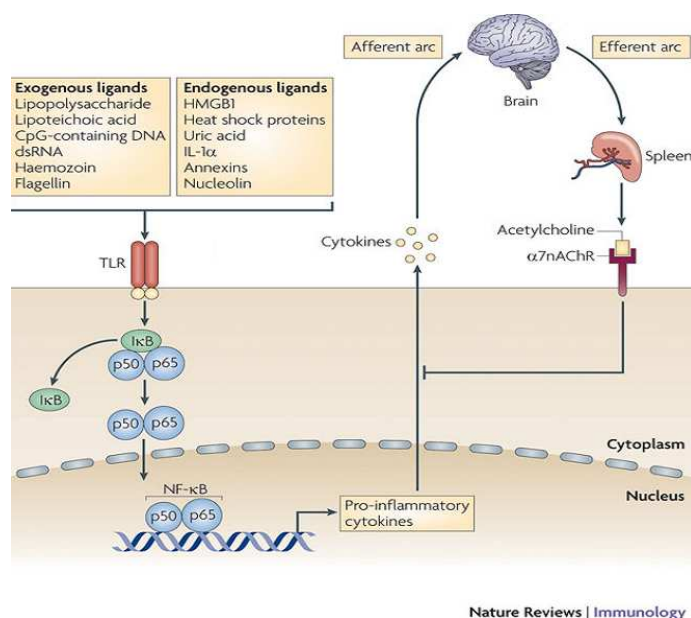


Fig.11 : Ruolo di CHRNA7 nel pathway colinergico anti-infiammatorio e interazione con NF- κ B.

Alcuni studi hanno messo in evidenza come, in cellule endoteliali umane, la nicotina sia in grado di inibire l'attivazione di NF- κ B in maniera dose dipendente, facendo aumentare i livelli di I κ B (Saeed *et al.*, 2004). È visto che l'effetto della nicotina è mediato dall'interazione con il recettore $\alpha 7$; una riduzione dei livelli di questo recettore, infatti, permette il recupero dell'attività del fattore trascrizionale. In monociti umani, la stimolazione del recettore $\alpha 7$ con nicotina non altera l'espressione di I κ B, ma ne inibisce la fosforilazione e, quindi, la dissociazione da NF- κ B, impedendo la traslocazione del fattore nel nucleo (Yoshikawa *et al.*, 2006). Recentemente, è stato individuato un mediatore tardivo dell'infiammazione denominato HMGB1, che viene rilasciato dai macrofagi circa 20 ore dopo lo stimolo indotto da endotossine o altri stimoli

infiammatori; questa molecola contribuisce alla patogenesi di molti disordini, caratterizzati da una componente flogistica, esplicando la sua funzione di citochina pro-infiammatoria. L'aspetto più interessante è che l'ACh, e ancor meglio la nicotina, sono in grado di inibire la secrezione di HMGB1 da parte di macrofagi attivati. Anche questa inibizione è mediata dal recettore $\alpha 7$, in particolare, attraverso un meccanismo post-traduzionale, in quanto i livelli di mRNA e di proteina rimangono invariati. Più precisamente, l'attivazione recettoriale provocherebbe l'inibizione di NF- κ B, necessario per garantire il passaggio di HMGB1 dal nucleo al citoplasma, passaggio cruciale per permetterne la secrezione, che avviene attraverso meccanismi ancora ignoti (Wang et al., 2004).

Un'altra via di trasduzione del segnale attivata dal "pathway colinergico anti-infiammatorio" è quella mediata da JAK2-STAT3 (fig.12). Il recettore $\alpha 7$, quando attivato, è in grado di reclutare JAK2, una tirosin-chinasi. Questa, a sua volta, fosforila STAT3 che, dopo traslocazione nucleare, è in grado di legare specifiche sequenze su geni codificanti per molecole anti-infiammatorie, attivandone la trascrizione. In particolare, STAT3 è in grado di attivare il gene del recettore dell' IL-10, anche in assenza di ligando, innescando una serie di reazioni che portano alla soppressione dell'attività macrofagica. Inoltre, attraverso la proteina SOCS3, la cui espressione è indotta dall'attivazione di STAT3, viene inibita la via di segnale pro-infiammatoria innescata dal recettore dell' IL-6. E' stato anche osservato che STAT3 blocca il legame di NF- κ B con il DNA, probabilmente attraverso un' interazione diretta con lo stesso fattore trascrizionale (Rosas-Ballina et al., 2009).

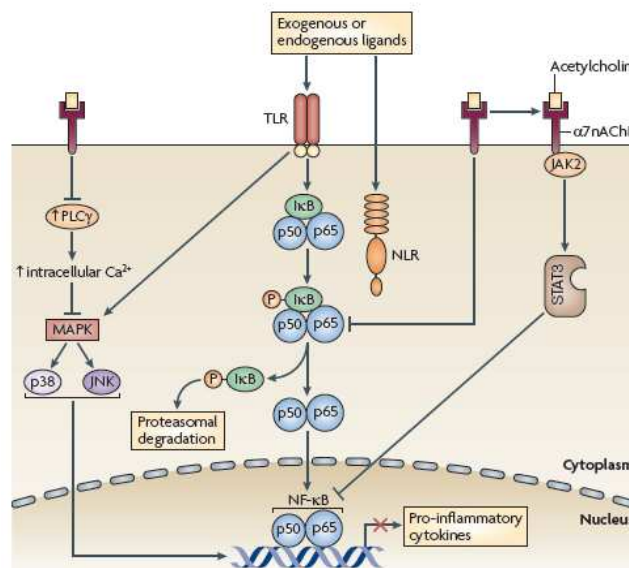


Fig.12 : Rappresentazione schematica dell'effetto inibitorio di *CHRNA7* sull'espressione di citochine pro-infiammatorie, attraverso la via di trasduzione mediata da JAK2 e STAT3.

1.7 Relazione tra “pathway colinergico anti-infiammatorio” e disturbi causati da un eccesso nella risposta infiammatoria

Studi clinici in corso su pazienti affetti da disturbi causati da un aumento della produzione di citochine pro-infiammatorie, inclusi artrite reumatoide, sepsi e psoriasi, stanno fornendo nuovi dettagli riguardo l'efficienza del riflesso infiammatorio e la sua diretta correlazione con lo sviluppo di disturbi causati da un'eccessiva risposta infiammatoria. Un metodo molto diffuso per misurare l'attività vagale, e quindi l'efficienza del riflesso infiammatorio, è basato sulla fisiologia cardiaca. La frequenza cardiaca è controllata da potenziali d'azione trasmessi dal nervo vago (sistema parasimpatico) e dal sistema nervoso simpatico al nodo seno atriale. L'ACh rilasciata dalle fibre vagali essenzialmente prolunga il tempo che intercorre tra un battito e l'altro, diminuendo quindi la frequenza. Attraverso la misurazione della variabilità della frequenza cardiaca (HRV), che permette di valutare lo stato del bilanciamento tra il sistema nervoso simpatico e parasimpatico, è stato possibile mettere in evidenza, in diverse malattie, una relazione tra la diminuzione dell'attività del nervo vago con il peggioramento dello stato patologico; per esempio pazienti affetti da artrite reumatoide mostrano una significativa riduzione dell'attività vagale rispetto a pazienti sani.

Un'altra area di studio di grande interesse riguarda il ruolo dell'infiammazione nello sviluppo e nella progressione dell'aterosclerosi. Alcuni studi recenti hanno esplorato la potenziale relazione tra il riflesso infiammatorio e il rischio aterogenico attraverso la misurazione, in 670 soggetti, dei livelli della proteina CRP (C-reactive protein) nel sangue, la cui alta concentrazione è indice della presenza di un focolaio infiammatorio a livello cardiovascolare. Le concentrazioni della proteina nel sangue sono inversamente correlate all'attività vagale; questi dati hanno fornito l'evidenza clinica che l'attività del nervo vago può modulare in senso negativo la risposta infiammatoria, diminuendo il rischio di sviluppare disturbi cardiovascolari (*Huston et al., 2010*).

Questi risultati suggeriscono come la diminuita attività vagale, che normalmente attraverso il pathway colinergico anti-infiammatorio esercita un effetto inibitorio sulla produzione di citochine, possa contribuire alla disregolazione della produzione di TNF α o altri mediatori dell'infiammazione, determinando una risposta eccessiva e dannosa.

Fino ad oggi il trattamento di patologie infiammatorie è stato effettuato attraverso l'uso clinico di agenti che modulano selettivamente l'attività di TNF α , IL-1 e IL-6. In alcuni casi, questi farmaci possono dare immunosoppressione, un'effetto collaterale molto pericoloso che può causare l'insorgenza di infezioni secondarie. Evidenze raccolte da studi su animali indicano invece che stimolazioni elettriche o

farmacologiche, specificamente mirate ad aumentare l'attività del riflesso infiammatorio, normalizzano la risposta immunitaria innata, portando la concentrazione delle citochine pro-infiammatorie a livelli fisiologici piuttosto che tossici, senza causare immunosoppressione (*Tracey, 2009*). Partendo da questo aspetto molto vantaggioso, molti studi hanno cercato di esplorare il potenziale terapeutico del "pathway colinergico anti-infiammatorio" nel trattamento di disordini causati dalla produzione incontrollata di citochine pro-infiammatorie.

E' stato dimostrato, in modelli di sepsi, che la somministrazione di nicotina o dell'agonista competitivo di $\alpha 7$ GTS-21 è in grado di aumentare le probabilità di sopravvivenza, diminuendo i livelli di TNF α e HMGB1. Altri esperimenti hanno evidenziato come, in un modello di pancreatite acuta, l'attivazione del "pathway colinergico anti-infiammatorio" tramite somministrazione di GTS-21 riduca la gravità della pancreatite. Inoltre, la stimolazione elettrica del nervo vago aumenta la probabilità di sopravvivenza, diminuendo i livelli di TNF α e prevenendo lo sviluppo di ipotensione in modelli di ischemia da riperfusione. Agonisti nicotinici sono stati usati per prevenire gli effetti dell'ischemia da riperfusione a livello renale; il trattamento con GTS-21 riduce i danni ai tubuli renali, diminuisce i livelli di TNF α e riduce l'infiltrazione di neutrofili all'interno del tessuto (*Rosas-Ballina et al., 2009*).

Tutti questi dati preclinici supportano la possibilità che terapie basate sulla stimolazione del riflesso infiammatorio possano essere utilizzate per il trattamento di disturbi causati dalla produzione incontrollata di citochine pro-infiammatorie, migliorando o sostituendo le terapie farmacologiche già esistenti.

1.7.1 Il "Pathway colinergico anti-infiammatorio" in malattie neurodegenerative e disturbi mentali.

La maggior parte delle malattie neurodegenerative è associata a stati di infiammazione cronica, provocata da un' eccessiva attivazione delle cellule fagocitarie mononucleate cerebrali: la microglia. Normalmente, queste cellule hanno il ruolo di proteggere e supportare un'appropriata funzionalità neuronale. Tuttavia, in certe situazioni patologiche, potrebbero rimanere in uno stato attivato per un periodo di tempo troppo prolungato. Diverse evidenze hanno dimostrato che l'iper-attività di queste cellule, che nel cervello costituiscono la fonte primaria di citochine pro-infiammatorie, può causare apoptosi neuronale e danni cerebrali, comuni nelle malattie di Alzheimer e Parkinson (*Block et al., 2005*). Inoltre, è stato visto che l'iper-attivazione della microglia esercita un ruolo fondamentale anche nello sviluppo della schizofrenia (*Monji et al., 2009*).

Il recettore nicotinico $\alpha 7$, espresso sulla membrana delle cellule microgliali, esercita un ruolo importante nel controllo dell'attivazione di queste cellule. E' noto da tempo che, in cervelli *post-mortem* di pazienti con malattia di Alzheimer, Parkinson e altri disordini neurodegenerativi, si verifica una significativa perdita di recettori nicotinici. Questa perdita risulta essere molto selettiva in quanto i recettori muscarinici non appaiono ridotti in modo sostanziale (*Burghaus et al., 2000; Leonard et al., 2000; Guan et al., 2002*). Un'ulteriore prova è fornita da studi epidemiologici che hanno riportato una correlazione inversa tra l'assunzione di nicotina (attraverso fumo di sigaretta) e l'incidenza di patologie neurodegenerative come Parkinson e Alzheimer, suggerendone una funzione neuroprotettiva (*Morens et al., 1995; Brenner et al., 1997*). Altri esperimenti, effettuati su culture primarie di neuroni di ratto, hanno dimostrato che la nicotina esercita una funzione neuroprotettiva contro la citotossicità indotta da glutammato e dalla β -amiloide, principale componente delle placche senili caratteristiche del morbo di Alzheimer (*Shimohama, 2009*). Sulla base di queste evidenze è stata proposta l'esistenza di un "pathway colinergico anti-infiammatorio" anche a livello del sistema nervoso centrale, in grado di tenere sotto controllo l'attivazione della microglia. Recenti studi mostrano infatti che la subunità $\alpha 7$ è in grado di mediare l'azione dell'ACh nel ridurre il rilascio di TNF α e altre citochine pro-infiammatorie, in seguito a trattamento con LPS, anche in cellule microgliali (*Shytle et al., 2004*).

1.7.2 Schizofrenia

Esistono diverse evidenze che infezioni materne, insorte durante i mesi di gravidanza, possano provocare un aumentato rischio di schizofrenia. In esperimenti su modelli animali si sono riscontrati una serie di disturbi cognitivi e comportamentali nella progenie, dopo esposizione a patogeni virali o citochine pro-infiammatorie delle madri gravide (*Patterson, 2009*). La perdita delle normali funzioni neuropsicologiche può essere ricondotta ad alterazioni in varie strutture cerebrali, insorte in seguito ad un danno immunologico avvenuto precocemente, nello sviluppo (*Meyer et al., 2009*). Inoltre, in pazienti schizofrenici, vi è un'aumentata concentrazione nel siero di citochine pro-infiammatorie (come IL-2, IL-6, IL-8). Due diversi esperimenti con microarray hanno mostrato, poi, un incremento dell'espressione di geni con funzione immunitaria nella corteccia prefrontale e hanno registrato modificazioni della trascrizione genica nelle varie fasi della patologia, dai primi stadi alla fase cronica.

Anche la microglia sembra avere un ruolo attivo nella patogenesi della schizofrenia. Cellule microgliali attivate possono indurre una serie di disfunzioni in pazienti schizofrenici, come degenerazione neuronale, riduzione della neurogenesi e alterazioni della materia bianca.

Un altro aspetto interessante è il fatto che il gene *CHRNA7* risulta “in linkage” con la schizofrenia. La subunità $\alpha 7$ è coinvolta nel deficit del gating sensoriale p50, ovvero un’alterazione funzionale, riscontrata durante l’ascolto dicotico, della corteccia uditiva sinistra dei pazienti affetti da schizofrenia.

1.7.3 Morbo di Alzheimer

La teoria più diffusa sulla patogenesi del morbo di Alzheimer si basa sulla presenza di ammassi neurofibrillari e placche senili, costituite da aggregati di peptide amiloide $A\beta$, sulla membrana extracellulare dei neuroni. La malattia è accompagnata da una forte diminuzione di acetilcolina nel cervello, che impedisce così ai neuroni di trasmettere gli impulsi nervosi, portando a neurodegenerazione, atrofia progressiva e compromissione delle facoltà intellettive. Sebbene questa teoria sia generalmente accettata, i meccanismi patogenetici non sono ancora stati chiariti del tutto.

Inoltre, anche l’infiammazione ha un ruolo critico nella progressione del morbo di Alzheimer. Gli ammassi neurofibrillari e le placche β -amiloidi innescano un processo infiammatorio mediato da astrociti e microglia, con conseguente rilascio di citochine, chemochine, $TNF-\alpha$ e radicali dell’ossigeno. La produzione di questi mediatori determina il reclutamento di altre cellule del sistema immunitario, attraverso la barriera ematoencefalica, come monociti e linfociti, con incremento dei fattori infiammatori rilasciati e danno irreversibile dei neuroni (*Lee et al., 2010*).

1.8 Regolazione epigenetica di *CHRNA7* e coinvolgimento nella Sindrome di Rett e Autismo

Alcuni geni, definiti 'geni imprinted', hanno un'espressione dipendente dal genitore d'origine. Alcuni di questi sono espressi solo se ereditati dal padre, altri se ereditati dalla madre. L'altro allele parentale viene mantenuto in uno stato represso, mediante metilazione del DNA, una delle più importanti modificazioni epigenetiche ereditabili. Alcuni geni sottoposti a imprinting sono raggruppati in particolari domini cromosomici e controllati da un elemento regolativo, definito 'centro di imprinting'. Tali geni svolgono un ruolo significativo nello sviluppo: un errato imprinting o un'espressione non appropriata di questi geni sono alla base di diverse malattie genetiche umane. Il “centro dell’ imprinting” di Prader Willy (PWS-IC) è in grado di regolare, in cis, l’espressione di un cluster di geni, localizzati nella regione 15q11.2-13.3. Questa regione contiene numerosi geni con funzioni critiche nello sviluppo neurologico, tra cui *CHRNA7*, e il gene parzialmente duplicato, *CHRFAM7A*, di cui non è nota la funzione. In particolare, *CHRNA7* sembra essere

importante per il corretto sviluppo neuronale e una variazione nel numero di copie di sequenze ripetute (CNV), nella regione 15q13.3, dove il gene *CHRNA7* è situato, risulta in associazione con autismo (Miller D.T. et al., 2009), ritardo mentale (Ben-Shachar et al., 2009) ed epilessia (Helbig I. et al., 2009). Yasui e colleghi hanno condotto esperimenti per caratterizzare la struttura cromatinica della regione 15q11.2-13.3, importanti per la comprensione dei meccanismi epigenetici che regolano questo locus durante il normale sviluppo neuronale. Hanno svolto analisi di "Chromosome capture conformation on chip" (4C), in cellule di neuroblastoma SHSY5Y. Questi studi hanno mostrato che PWS-IC regola l'espressione del gene *CHRNA7*, nonostante questo sia localizzato a 7Mb di distanza. In particolare, PWS-IC è in grado di regolare l'espressione del gene codificante per $\alpha 7$, grazie all'interazione diretta di MeCP2, che fa da ponte tra il centro dell'imprinting e il gene, posto a 7Mb di distanza, legando specifiche sequenze di DNA fiancheggianti *CHRNA7* (Yasui et al., 2011). Questi esperimenti forniscono i primi dati di un ruolo diretto di MeCP2 come modulatore della trascrizione di *CHRNA7*. Mutazioni del gene MeCP2 impediscono il rimodellamento cromatinico diretto da PWS-IC, causando una riduzione dei livelli di espressione di *CHRNA7* e contribuendo all'insorgenza di disordini neurologici come la sindrome di Rett e l'Autismo.

I livelli di espressione di *CHRNA7* sono stati trovati notevolmente ridotti nella corteccia frontale di pazienti con sindrome di Rett e Autismo, quando MeCP2 risulta, a sua volta, ridotto e mutato (Fig.17). In questi studi, si è anche visto che l'espressione del gene varia con l'età. Si ha infatti una diminuzione dei livelli di *CHRNA7* di circa 4 volte, tra i 4 e i 50 anni, anche nei cervelli di controlli sani. I livelli di *CHRNA7*, nella corteccia frontale di pazienti con sindrome di Rett o autismo, appaiono, tuttavia, molto ridotti rispetto ai controlli sani. Inoltre, subiscono una riduzione drastica tra il primo e il secondo anno di vita, momento che coincide con l'insorgenza dei sintomi autistici e periodo in cui, generalmente, viene fatta la diagnosi di Sindrome di Rett.

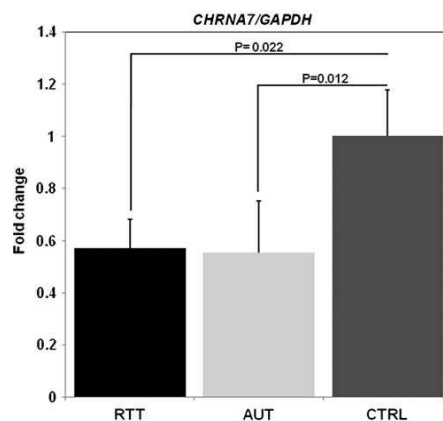


Fig.17 Nella sindrome di Rett e Autismo l'espressione del trascritto di *CHRNA7* è notevolmente ridotta, a livello della corteccia frontale. L'esperimento è stato condotto su RNA estratto dall'area 9 di Brodmann, da 7 pazienti con sindrome di Rett e 11 pazienti autistici.

Il gene *CHRNA7*, quindi, fa parte di un locus soggetto a rimodellamenti cromatinici, che ne influenzano direttamente l'espressione, e alterazioni di questi meccanismi epigenetici possono determinare l'insorgenza di patologie del neuro sviluppo.

1.9 Il gene *CHRFAM7A*

Alcuni studi hanno messo in evidenza che, nell'uomo, la porzione del gene *CHRNA7*, corrispondente agli esoni 5-10, si è parzialmente duplicata con un'identità superiore al 99%. Questa parziale duplicazione si è fusa con gli esoni A, B e C provenienti dal gene *ULK4* (codificante per una serin/treonin chinasi) e con l'esone D del gene *FAM7A* (di cui non è nota alcuna funzione), dando origine così ad un nuovo gene, chiamato *CHRFAM7A*. Inoltre, è stata anche descritta la presenza di un nuovo esone, chiamato E, posto tra gli esoni A e B (*Gault et al., 1998; Riley et al., 2002*). Gli eventi genetici che hanno portato alla formazione di questo gene ibrido sono avvenuti recentemente, da un punto di vista evolutivo, infatti la duplicazione è presente solo nell'uomo e non negli altri primati superiori. Questo gene è situato sul cromosoma 15, nella regione 15q13-q14, a circa 1,6 Mb di distanza dal gene *CHRNA7*, ma in orientamento opposto rispetto a quest'ultimo.

Il gene *CHRFAM7A* è presente in una o due copie nella maggior parte della popolazione (>95%). Tuttavia esiste una piccola percentuale di soggetti che mancano di questo gene. L'assenza di *CHRFAM7A* in alcuni cromosomi potrebbe rappresentare, rispetto all'evento primario di duplicazione, un evento di delezione tardiva che ha causato un'ulteriore ricombinazione.

Inoltre, in molti casi, *CHRFAM7A* presenta una delezione di 2 paia di basi nell'esone 6 (*Riley et al., 2002*). Questa delezione risulta essere strettamente collegata all'orientamento del gene rispetto ai *loci* circostanti. In cromosomi che contengono la delezione, *CHRFAM7A* è quasi sempre nello stesso verso rispetto a *CHRNA7*. Mentre, se la delezione non è presente, *CHRFAM7A* risulta avere orientamento opposto (fig.13). Studi clinici hanno mostrato un'associazione tra questo polimorfismo e la schizofrenia, sebbene non sia chiaro come la delezione possa causare alterazioni funzionali della proteina (*Sinkus et al., 2009*).

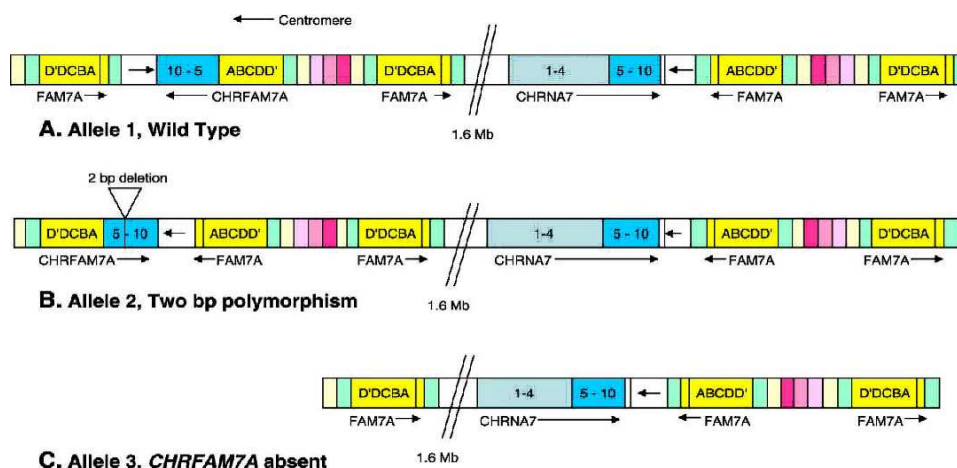


Fig.13 – Mappa genomica dei geni *CHRNA7* e *CHRFA7A*. (A) Allele 1, “wild-type”. (B) Allele 2, polimorfismo di 2 bp e inversione del gene *CHRFA7A*. (C) Allele 3, gene *CHRFA7A* assente.

1.9.1 Isoforme proteiche codificate dal gene *CHRFA7A*

L’*mRNA* trascritto da *CHRFA7A* contiene solo gli esoni 5-10 del gene *CHRNA7*, che corrispondono ai domini transmembrana e al loop citoplasmatico della forma convenzionale. Manca, invece, degli esoni 1-4. L’esone 1 del gene *CHRNA7* codifica una sequenza peptidica segnale per l’ingresso della proteina nel reticolo endoplasmatico, dove avviene l’assemblaggio del recettore. Gli esoni 2-4 contribuiscono alla formazione del dominio di legame per il ligando. Gli esoni D-A, presenti nell’*mRNA* trascritto da *CHRFA7A*, non contengono domini di legame noti e neanche sequenze segnale di localizzazione, per cui la funzione della forma duplicata della subunità $\alpha 7$ non è conosciuta. Tuttavia, il trascritto è stato identificato nell’ippocampo, nella corteccia, nel corpo calloso, nel talamo, nel cervelletto e anche in cellule non appartenenti al sistema nervoso, come linfociti e monociti.

In realtà, il gene codifica per 2 diverse isoforme proteiche, generate da eventi di “splicing” alternativo dello stesso *mRNA*, il cui peso molecolare è rispettivamente di 46.2 kDa e di 35.5 kDa.

Esperimenti condotti in leucociti primari umani allo scopo di caratterizzare questa proteina, hanno evidenziato delle peculiari proprietà farmacologiche. E’ stato dimostrato che, diversamente dal classico recettore nicotino $\alpha 7$, la subunità non convenzionale di $\alpha 7$ non è in grado di legare α -bungarotossina e,

inoltre, non è in grado di evocare correnti rilevabili in seguito al trattamento con ACh o nicotina (Villinger et al., 2002).

Recentemente, nel nostro laboratorio, è stato dimostrato che il trattamento con LPS della linea monocitaria umana THP-1, provoca una diminuzione dell'espressione della forma duplicata (fig.14, A), principalmente attraverso un meccanismo trascrizionale, mediato da NF- κ B (dimostrato grazie ad esperimenti con l'inibitore specifico parthenolide) (Benfante et al., 2011). Questi risultati hanno fornito la prima evidenza che la forma non convenzionale della subunità α 7 partecipa ad un processo fisiologico. Questo meccanismo è stato confermato in colture primarie di macrofagi (fig.14, B).

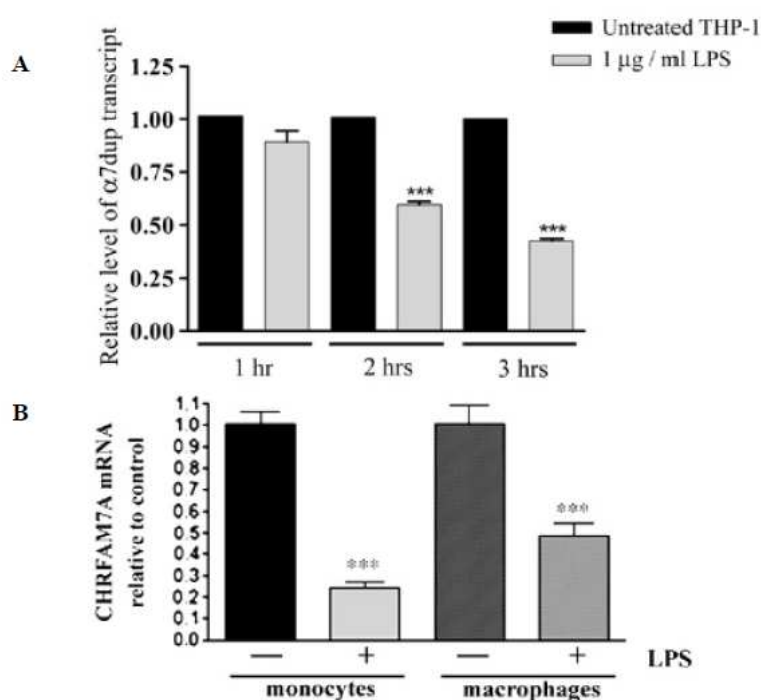


Fig14. Downregolazione di CHRFA7A dopo trattamento con LPS: in (A) esperimenti sulla linea cellulare monocitaria THP-1, in (B) esperimenti su colture primarie di monociti e macrofagi umani.

Inoltre, a differenza della linea THP-1, dove CHRFA7A è l'unica forma espressa, in macrofagi primari sono espresse sia la forma convenzionale di α 7 (CHRNA7) sia quella non convenzionale (CHRFA7A). Il trattamento con LPS induce l'espressione del gene CHRNA7 (Fig.15), suggerendo che sulla membrana di queste cellule possano esserci recettori α 7 eteromerici, costituiti da entrambe le subunità α 7.

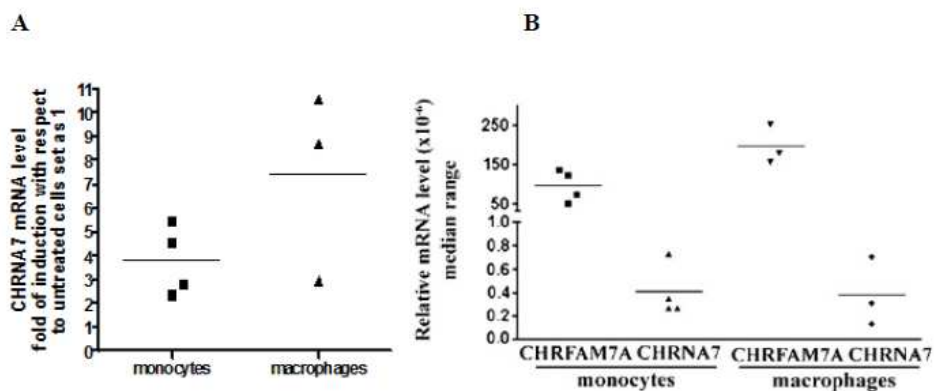


Fig.15 (A) *CHRNA7* è up-regolata in monociti e macrofagi primari, dopo trattamento con LPS; **(B)** Livelli di espressione di *CHRNA7* e *CHR FAM7A* in monociti e macrofagi derivati da sangue periferico.

Questo recettore avrebbe una capacità inferiore di rispondere all'acetilcolina, in quanto la subunità non convenzionale non possiede il sito di legame per il ligando (fig.16). Se fosse vero, la regolazione negativa del gene *CHR FAM7A* potrebbe essere coinvolta nella regolazione dei livelli del recettore nicotico $\alpha 7$ omomero sulla membrana dei macrofagi, in risposta all'acetilcolina rilasciata dal nervo vago durante un'infezione. Stimoli pro-infiammatori quindi porterebbero ad un'intensificazione della trascrizione della subunità convenzionale da una parte e ad un'inibizione di quella della subunità duplicata dall'altra, aumentando così la capacità di rispondere all'ACh.

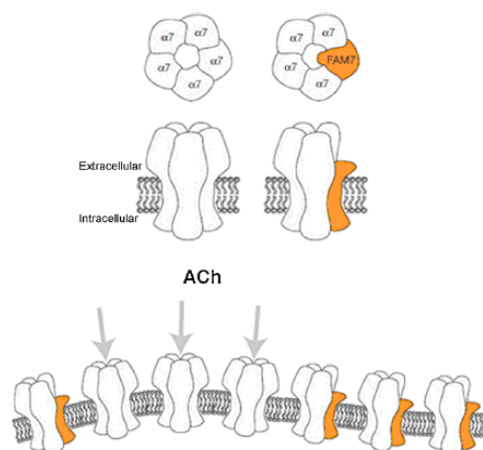


Fig.16 Putativa incorporazione della forma derivata dal gene *CHR FAM7A*, nei recettori nicotici $\alpha 7$. *CHR FAM7A* manca della porzione N-terminale, compreso il sito di legame per il ligando (ACh). La sua presenza causa una diminuzione delle correnti indotte dall'ACh (Araud et al.,2011).

La stessa ipotesi, secondo la quale la subunità $\alpha 7$ duplicata agirebbe come un regolatore dominante negativo dell'attività del recettore nicotinicco $\alpha 7$, è stata formulata indipendentemente in un altro laboratorio, grazie a dati sperimentali ottenuti attraverso la co-iniezione in oociti di *Xenopus* di mRNA appartenente alla subunità $\alpha 7$ convenzionale insieme a mRNA della forma duplicata. Attraverso registrazioni elettrofisiologiche è stato dimostrato che la corrente indotta dopo stimolazione con nicotina diminuisce proporzionalmente alla diminuzione del rapporto degli mRNA iniettati ($\alpha 7$ mRNA: $\alpha 7$ dup mRNA) (De Lucas-Cerrillo et al., 2011).

2-SCOPO DELLA TESI

In colture primarie di monociti e macrofagi, il gene *CHRFAM7A* è espresso da 200 a 1000 volte in più, rispetto al gene *CHRNA7*, ed è down-regolato dal trattamento con uno stimolo pro-infiammatorio, come LPS. Al contrario, il gene *CHRNA7*, coinvolto nel pathway colinergico anti-infiammatorio e, quindi, importante nel mantenere sotto controllo i livelli di infiammazione sistemica, viene up-regolato dal medesimo trattamento. La nostra ipotesi è che *CHRFAM7A* possa svolgere un ruolo nella regolazione dei livelli del recettore $\alpha 7$ in membrana. A supporto di questa teoria, due recenti lavori (*Montiel et al., 2010; Araud et al., 2011*) mostrano un effetto dominante negativo della forma duplicata sulla funzionalità dei recettori nicotinici $\alpha 7$. La co-espressione delle due proteine (convenzionale e duplicata), in oociti di *Xenopus*, determina una riduzione delle correnti evocate dall'acetilcolina, mentre non altera il legame della Bungarotossina (I-BTX). Questo dato, in particolare, dimostrerebbe la presenza, sulla membrana cellulare, di recettori eteromerici con una ridotta capacità di evocare correnti e, quindi, con una diminuita capacità di rispondere a stimoli pro-infiammatori. Se fosse vero, *CHRFAM7A* giocherebbe un ruolo nel "pathway colinergico anti-infiammatorio", regolando il numero di recettori in grado di legare l'acetilcolina rilasciata dal nervo vago. Tuttavia, attualmente, manca in letteratura un dato che dimostri l'effettiva interazione delle due proteine, sulla superficie cellulare.

Allo scopo di approfondire e verificare quest'ipotesi, per far luce sulla funzione del gene *CHRFAM7A*, abbiamo deciso di generare dei costrutti che esprimano le proteine, convenzionale e duplicata, fuse ad un tag, che renda distinguibili le due isoforme. Lo scopo finale della generazione di questi "tools" è quello di effettuare esperimenti di immunoprecipitazione, per confermare l'interazione tra le proteine, oltre a permetterci di studiarne la localizzazione intracellulare con tecniche di immunofluorescenza.

Inoltre, il fatto che lo stesso stimolo infiammatorio possa determinare l'overespressione di *CHRNA7* e la downregolazione di *CHRFAM7A*, suggerisce la presenza di elementi regolatori in grado di modulare differentemente i livelli di trascrizione dei due geni. Ad oggi, nessuno ha ancora dimostrato la presenza di un promotore specifico per *CHRFAM7A*. Con lo scopo finale di caratterizzare questa regione regolatoria, compresi i siti di legame attraverso cui potrebbe agire NF- κ B, siamo partiti dall'identificazione del sito di inizio della trascrizione. Per fare questo, abbiamo eseguito esperimenti di 5'-RACE, un approccio che permette di amplificare la porzione al 5' di un RNA messaggero, a partire da RNA totale estratto da differenti tipi cellulari. Infine, *CHRFAM7A* è espresso sia in cellule dell'immunità innata, sia in cellule neuronali. La putativa regione regolatoria è stata clonata in vettori reporter, al fine di valutarne la funzionalità mediante esperimenti di trasfezione transiente. Questi esperimenti sono stati condotti in due

differenti modelli cellulari: una linea monocitaria umana, THP-1, e una linea derivata da neuroblastoma, SHSY5Y, allo scopo di identificare elementi regolatori, in grado di modulare l'espressione del gene in maniera tessuto specifica.

3-MATERIALI E METODI

3.1 Tecniche di manipolazione del DNA

3.1.1 Digestione con enzimi di restrizione

Per le digestioni enzimatiche è stata utilizzata una concentrazione finale di DNA compresa tra i 200 e i 500 ng/μl, con un rapporto tra l'enzima di restrizione (unità) e il DNA (microgrammi) pari a 2U: 1μg.

La miscela di reazione era così composta:

DNA	1-20 μg
Enzima di restrizione	2U/μg
Buffer 10X	1/10 del volume finale
H ₂ O	a volume

La reazione è stata incubata 2 ore alla temperatura ottimale per l'enzima di restrizione utilizzato.

3.1.2 Defosforilazione di un vettore plasmidico

Il gruppo fosfato al 5' dei vettori plasmidici digeriti con enzimi di restrizione, è stato eliminato tramite una reazione catalizzata dall'enzima SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Roche). Alla reazione di taglio con l'enzima di restrizione sono stati aggiunti 1 μl di SAP (1 U/μl), il tampone 10X e H₂O a volume. Si è proceduto, poi, con un'incubazione di 30 minuti, a 37°C.

3.1.3 Ligazione

Per le reazioni di ligazione intermolecolare è stato utilizzato un rapporto molare tra vettore e frammento di 1:3. La quantità di vettore utilizzata era compresa tra i 25 e i 100 ng, da cui si può ricavare la quantità di frammento:

$$X(\text{ng}) = \frac{(\text{bp frammento} \times \text{ng vettore} \times 3)}{\text{bp vettore}}$$

La miscela di reazione era così composta:

- DNA vettore 50 ng
- DNA inserto X ng
- T4 ligasi (1 U/ μ l) 1 μ l
- Tampone T4 ligasi 5X 1X
- H₂O a volume

La reazione è stata incubata a 16°C per 12-16 ore.

3.1.4 Costrutti utilizzati

pTK-RL

Plasmide contenente un gene reporter, codificante per la luciferasi di *Renilla reniformis*, sotto il controllo del promotore minimo della timidina chinasi del virus *Herpes simplex* (HSV-TK). Viene cotrasfettato insieme a pGL4b e utilizzato come normalizzatore per valutare l'efficienza di trasfezione.

PGL4b

pGL4b è un vettore di 4.2 kb contenente il gene reporter per la luciferasi *Firefly*, posto a valle di un sito multiplo per il clonaggio di sequenze, di cui si vuole determinare l'attività trascrizionale. Contiene anche il gene per la resistenza all'ampicillina, per permetterne la selezione in cellule batteriche. Questo plasmide è stato utilizzato per il clonaggio delle regioni al 5' di CHR FAM7A, allo scopo di identificare le sequenze regolatorie del gene.

CHR FAM7A FULL-LENGTH (-2196/ATG)

Costrutto contenente la porzione al 5', fiancheggiante il gene CHR FAM7A, comprendente i primi tre esoni (D, C e B) e la regione genomica di 2196 paia di basi a monte del codone di inizio, presente nell'esone B.

La regione genomica compresa tra le basi -2196/-156 (rispetto all'ATG presente nell'esone B), che include anche il primo esone, è stata amplificata mediante PCR e subclonata nel vettore PCR II. La sequenza che va dall'esone D fino all'ATG nell'esone B (-249/-1) è stata ottenuta con un RT-PCR a partire da mRNA estratto da THP-1 e subclonata in PCR II. Al fine di ottenere il costrutto completo (FULL LENGTH), il vettore contenente la sequenza genomica -2196/-156 è stato digerito con Hind III e, successivamente, le estremità coesive sono state rese "blunt" grazie all'attività enzimatica del frammento Klenow, per poi essere digerite con Sac II. Il vettore contenente gli esoni D-B è stato digerito con Sac II/EcoRV e, in seguito, il frammento è

stato ligato nel vettore blunt, descritto prima. L'intera regione genomica così ottenuta (-2196/-1) è stata excisa da PCRII, mediante digestione con NcoI, e clonata nel vettore pGL4b, a monte del gene per la luciferasi di lucciola.

CHRFAM7A -2196 Δ5'UTR

In questo costrutto, è stata deleta la regione genomica compresa tra l'ATG, posto nell'esone B, e le 732 paia di basi a monte del codone d'inizio, ovvero la porzione genomica corrispondente al 5' UTR del gene. Viene mantenuto, tuttavia, il 5'UTR del gene reporter per la luciferasi *Firefly*.

Il vettore PCRII contenente la regione genomica di CHRFAM7A comprendente l'esone D (-2196/-156), è stato digerito con gli enzimi EcoRV ed NruI, generando un frammento corrispondente alla regione -2191/-738, che è stata successivamente inserita nel vettore plasmidico pGL4b.

CHRFAM7A -2196 Δ5'UTR/ΔAlu

In questo costrutto, rispetto al "full length", è stata deleta la regione -260/-560, che include la sequenza Alu.

La porzione genomica posta tra le basi -4246 / -1207 è stata amplificata con una PCR convenzionale, usando i seguenti primers:

Forward Primer: -4246 HindIII : AAGCTT AGACTGATGCTCAGCCCCTT

Reverse Primer: -1207 NruI : TCGCGA CCAGACACATCTAACCTACCAAG

Il primer forward contiene al 5' il sito di restrizione per HindIII, mentre il primer reverse contiene la sequenza di taglio per l'enzima NruI.

Una volta amplificata, la regione di interesse è stata subclonata nel vettore pCRII e l'orientamento determinato mediante analisi di restrizione con gli enzimi BamHI/EcoNI. Infine, è stata clonata nel vettore pGL4b contenente il costrutto full length, utilizzando gli enzimi NruI/HindIII.

CHRFAM7A -4246 Δ5'UTR

Questo costrutto contiene una porzione più lunga del 5' fiancheggiante il gene CHRFAM7A, comprendente 4246 basi a monte dell' ATG (posto nell'esone B). La sequenza corrispondente al 5' UTR (-732/-1) è stata deleta.

Siamo partiti, dunque, dal vettore PCRII contenente il tratto -4246/-1207 e dal vettore PCRII con l'inserito -2196/-156, entrambi digeriti con l'enzima di restrizione XbaI. Il frammento generato dalla digestione del

costruito -2196/-156 è stato clonato nel vettore PCRII -4246/-1207. L'intera regione così ricostituita è stata excisa dal vettore di subclonaggio PCRII, con gli enzimi NruI ed EcoRV, e inserita nel vettore pGL4b, precedentemente linearizzato con EcoRV. L'analisi di restrizione, per determinare l'orientamento dell'inserito in pGL4b, è stata condotta con l'enzima Bgl II.

CHRFAM7A -4246 Δ5'UTR/ΔAlu

Questo costrutto , contiene le 4246 paia di basi a monte del codone d'inizio, ad esclusione della sequenza corrispondente al 5'UTR e alla porzione genomica corrispondente alla sequenza Alu.

Per generare questo costrutto abbiamo amplificato, mediante PCR convenzionale, la regione -885/-737. Per la reazione di amplificazione abbiamo utilizzato la "Deep Vent Polymerase", un enzima con attività proofreading, in grado di generare frammenti con estremità piatte. I primers utilizzati per la PCR sono:

Forward Primer:

-885 : CTCCTGACCTCCTGATCCAC

Reverse Primer

-737 : CTTCTCACACTCGCGACTG

La sequenza così ottenuta è stata inserita nel vettore PCRII contenente la regione -4246/-1207, opportunamente digerito con NruI, che lascia estremità "blunt". I plasmidi ricombinanti sono stati selezionati in base all'orientamento del frammento clonato, mediante digestione con XbaI/NruI. Il costrutto corretto, infatti, deve contenere l'inserito nella stessa direzione della regione -4246/-1207, già presente nel vettore PCRII. L'intera regione genomica, quindi, è stata excisa dal vettore di subclonaggio PCRII, grazie ad una digestione con gli enzimi EcoRV/NruI, e inserita in pGL4b, nel sito per EcoRV.

pCDNA3.1 Myc-His

pCDNA3.1 Myc His è un vettore di 5.5 Kb, utilizzato per l'espressione di proteine ricombinanti, fuse al loro C-terminale con l'epitopo Myc, seguito da una sequenza di sei istidine ripetute. A monte del sito multiplo di clonaggio, questo plasmide contiene il promotore del citomegalovirus umano (CMV), che garantisce un'elevata espressione del costrutto clonato, quando transfettato in linee cellulari di mammifero.

CHRNA7, CHRFAM7A-201 e CHRFAM7A-202 in pCDNA3.1 Myc-His

Costrutti contenenti le sequenze codificanti per la proteina α7 convenzionale e per le due isoforme codificate dal gene CHRFAM7A, clonate tra i siti BamHI/XhoI del vettore di espressione pCDNA3.1 Myc His.

Le sequenze sono state dapprima amplificate con specifici primers da cDNA di IMR32 e THP-1 e subclonate in PCR II (mediante TA cloning). In seguito, i costrutti sono stati digeriti con gli enzimi BamHI/SmaI e i

frammenti ottenuti, che corrispondono alla porzione N-terminale delle sequenze delle proteine di interesse, sono state clonate nel vettore pGEM7ZF. La porzione C-terminale delle sequenze proteiche, comune a tutte e tre le isoforme, è stata amplificata utilizzando una coppia di primers disegnati in modo da eliminare il codone di stop e permettere l'espressione delle proteine fuse al tag Myc His al C-terminale.

α 7 C-ter NO stop codon FW

5' GGGGCAAGATGCCCAAGTGGACCA 3'

α 7 C-ter NO stop codon Rev

5' CCGCGGCGCAAAGTCTTTGGACAC 3'

Una volta ottenuta la porzione C-terminale è stata clonata nei vettori pGEM7ZF contenenti la prima porzione delle sequenze proteiche, in modo da ottenere le sequenze complete, private del codone di stop. I costrutti ottenuti sono stati digeriti con BamHI/XhoI, al fine di exciderli dal vettore pGEM7ZF, e sono stati clonati nel vettore pCDNA3.1 Myc His, in modo da risultare "in frame" con il tag. La traduzione di questi costrutti determina l'espressione di proteine di fusione, con l'epitopo Myc, seguito da una coda di istidine, al C-terminale.



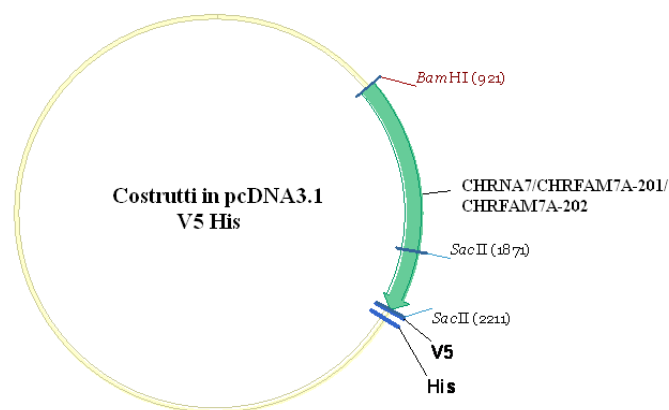
pCDNA3.1 V5-His

pCDNA3.1 V5 His è un vettore di 5.5 Kb, utilizzato per l'espressione di proteine ricombinanti, fuse al loro C-terminale con l'epitopo V5, seguito da una sequenza di sei istidine ripetute. A monte del sito multiplo di clonaggio, anche questo plasmide contiene il promotore del citomegalovirus umano (CMV), che garantisce un'elevata espressione del costrutto clonato, quando transfettato in linee cellulari di mammifero.

CHRNA7, CHR FAM7A-201 e CHR FAM7A-202 in pCDNA3.1 V5-His

Costrutto contenente la sequenze codificanti per le proteine $\alpha 7$ convenzionale, CHR FAM7A-201 e CHR FAM7A-202, clonate tra i siti BamHI/SacII del vettore di espressione pCDNA3.1 V5 His.

Siamo partiti dalle sequenze precedentemente clonate in PCR II e le abbiamo digerite con gli enzimi BamHI/SacII, in modo da ottenere la porzione N-terminale. Questa è stata inserita nel vettore di espressione pCDNA3.1 V5-His, in corrispondenza degli stessi siti. La porzione C-terminale, priva del codone di stop, già amplificata con i primers utilizzati per il clonaggio in pCDNA3.1-Myc His e inserita in PCR II, è stata excisa mediante digestione con SacII e clonata nel vettore di destinazione, a valle della porzione N-terminale di ciascuna sequenza. Anche in questo caso, il risultato è una proteina di fusione, che presenta al C-terminale il tag V5, seguito da sei istidine.



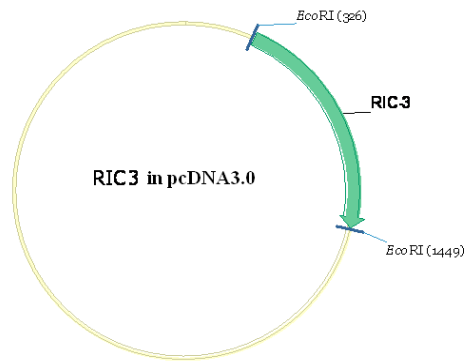
RIC3 in pCDNA3.0

Costrutto contenente la sequenza della chaperone RIC3, specifica per $\alpha 7$.

Abbiamo amplificato RIC3 da cellule SHSY5Y, che esprimono endogenamente CHRNA7 e CHR FAM7A e, quindi, possiedono la chaperone specifica, utilizzando la seguente coppia di primers:

RIC3 FW	5' CACCATGGCGTACTCCACAGT 3'
RIC3 Rev	5' TCACTCTAAACCCTGGGGGT 3'

Una volta amplificata, abbiamo inserito la banda ottenuta dalla PCR nel vettore PCR II, mediante TA cloning. Abbiamo poi estratto il frammento corrispondente a RIC3, utilizzando i siti per EcoRI presenti alle sue estremità, e l'abbiamo inserito nel vettore di destinazione pCDNA3.0



3.2 Colture batteriche

3.2.1 Trasformazione

Per la trasformazione sono stati utilizzati 100 µl di batteri del ceppo JM109 di *E.coli*, resi artificialmente competenti e conservati a -80°C. Dopo scongelamento in ghiaccio sono stati aggiunti 10 µl della reazione di ligazione e mantenuti ancora in ghiaccio per 30 minuti; al termine i batteri sono stati sottoposti a shock termico a 42°C per 90 secondi. Dopo aggiunta di 900 µl di terreno di crescita LB, i batteri sono stati fatti crescere per un'ora in agitazione a 37°C. A questo punto, 200 µl della miscela di trasformazione sono stati piastrati su piastre LB-agar contenenti carbenicillina (100 µg/ml) per permettere la selezione delle colonie trasformanti. Queste, infatti, avendo acquisito il plasmide, esprimeranno la resistenza per la crescita in presenza di antibiotico. Le piastre sono state infine incubate a 37°C per 12-16 ore.

- Bactotriptone 10 g
- Bacto yeast 5 g
- NaCl 10 g
- NaOH 10N ~90 µl
- Bactoagar 15 g
- H₂O fino ad un litro

3.2.2 Cell Cracking

Per selezionare, tra le colonie trasformanti, quelle contenenti il costrutto corretto, sono state prelevate singole colonie dalla piastra e risospese in 25 µl di acqua. A ciascuna colonia sono stati aggiunti 25 µl di cracking solution (NaOH 10N; EDTA pH 8.0 0,5M, SDS 10%, Bromocresol green, Glicerolo 100%), una miscela contenente agenti denaturanti e detergenti, che lisano le cellule. La soluzione contiene anche del colorante, per seguire la corsa elettroforetica. I campioni sono stati miscelati tramite vortex, lasciati 5 minuti a temperatura ambiente e caricati su gel di agarosio all'1%.

3.2.3 Mini

Per l'estrazione di DNA plasmidico da colture batteriche di piccola scala è stato usato il kit commerciale NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel), in accordo col protocollo fornito.

3.2.4 Midi

Per l'estrazione di DNA plasmidico da colture batteriche di media scala è stato usato il kit commerciale Plasmid Plus (QIAGEN), seguendo le istruzioni del protocollo fornito.

3.3 Colture cellulari

3.3.1 Linee cellulari

Le linee cellulari di neuroblastoma umano SH-SY5Y ed SK-N-BE(2)C e la linea monocitaria umana THP-1 sono cresciute in terreno RPMI 1640 con aggiunta di siero fetale bovino (FBS, Lonza) ad una concentrazione finale del 10%, penicillina (100U/ml, Lonza), streptomicina (0.1 mg/ml, Lonza) ed L-glutamina (2 mM, Lonza).

Le cellule HeLa (carcinoma epitelioide della cervice uterina) sono cresciute in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium), 100U/ml di penicillina, 0.1 mg/ml streptomicina e 2 mM L-glutamina

Le linee cellulari che crescono in adesione sono state mantenute in fiasche da 75-175 cm², in 12-25 ml di terreno, a 37°C e al 5% di CO₂, mediante passaggi di diluizione 1:3 o 1:4 ogni 3-4 giorni, a seconda dello stato di confluenza prima del passaggio.

Le cellule THP-1, che crescono in sospensione, sono state mantenute ad una densità compresa tra le 2 x 10⁵ cellule/ml e le 1 x 10⁶ cellule/ml.

3.3.2 Tecniche di trasfezione transiente

Fugene HD

Le cellule SH-SY5Y, SK-N-BE(2)C e HeLa sono state trasfettate con il metodo della lipofezione utilizzando la miscela liposomica FuGene HD (Roche).

Le cellule sono state piastrate 24 ore prima della trasfezione in terreno privo di antibiotico, in numero variabile a seconda del tipo cellulare e dell'area della petri utilizzata, in modo che il giorno seguente

raggiungessero una confluenza del 40-50%. Per la trasfezione è stata preparata una miscela contenente FuGene HD (μl) e DNA (μg) in rapporto 3:1 (3 μl Fugene HD/ 1 μg DNA), in accordo col protocollo fornito dalla ditta. Alla miscela è stato poi aggiunto terreno DMEM, fino al volume finale raccomandato dal kit. Dopo un'incubazione di 10-15 minuti a temperatura ambiente, la miscela è stata aggiunta alle cellule goccia a goccia.

Effectene

Le cellule THP-1 sono state trasfettate utilizzando il kit Effectene Transfection Reagent (Qiagen), che si avvale di una formulazione lipidica non liposomica creata per ottenere alte efficienze di trasfezione.

1 x 10⁶ cellule sono state risospese in 1,6 ml di terreno RPMI completo circa 3 ore prima della trasfezione. Per ogni pozzetto è stata preparata una miscela contenente DNA (800 ng totali), tampone EC (fino a 100 μl), ed Enhancer (6,4 μl). Alla miscela è stato poi aggiunto l'Effectene (8 μl). Dopo 10 minuti di incubazione a temperatura ambiente la soluzione è stata addizionata di 600 μl di terreno completo e, infine, è stata aggiunta goccia a goccia alle cellule (i valori sopra riportati sono riferiti ad un pozzetto da 3,5 cm di diametro).

3.4 Tecniche di manipolazione dell'RNA

3.4.1 Estrazione dell'RNA totale

L'estrazione di RNA totale è stata effettuata con il kit "RNeasy Mini" (Qiagen), seguendo le istruzioni. Brevemente, circa 5 x 10⁶ cellule sono state lavate con PBS 1X, staccate dalla petri con metodo meccanico mediante scraper e raccolte tramite centrifugazione a 4°C a 10000 rpm per 5 minuti. Ciascun pellet è stato risospeso in 350 μl di tampone RTL precedentemente addizionato di β -mercaptoetanololo (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ di buffer) e il lisato trasferito in una colonna "QIAshredder". Dopo centrifugazione alla massima velocità, per 2 minuti, un volume di etanolo 70% è stato aggiunto all'eluato. L'RNA precipitato è stato purificato mediante l'utilizzo di una colonna "RNeasy mini". Dopo centrifugazione per 30 secondi a 10000g, per permettere il legame dell'RNA alla membrana, l'eventuale contaminazione da DNA genomico è stata rimossa mediante digestione con DNasi (2.73 U/ μl), in colonna, per 15 minuti, a temperatura ambiente. Dopo successivi lavaggi, l'RNA è stato eluito in un nuovo tubo di raccolta con 30 μl di H₂O "RNasi free". La concentrazione

dell'RNA estratto è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro a 260 nm ($1 \text{ OD}_{260}=40 \mu\text{g/ml}$) e la purezza stimata mediante il rapporto 260/280 nm (≥ 2).

3.4.2 Retrotrascrizione

Per la retrotrascrizione è stato utilizzato il kit SuperScript III First-Strand Synthesis System RT-PCR (Invitrogen). Per la reazione di retrotrascrizione è stata preparata una prima miscela contenente:

- RNA 1 μg
- dNTPs mix 10 mM 1 μl
- Random primers (50 ng/ μl) 1 μl
- H₂O/DEPC a volume fino a 10 μl

Dopo un'incubazione a 65 °C di 5 minuti, per permettere la denaturazione del RNA e dei Random primers, seguita da raffreddamento in ghiaccio per 1 minuto, è stata aggiunta la miscela di sintesi composta da:

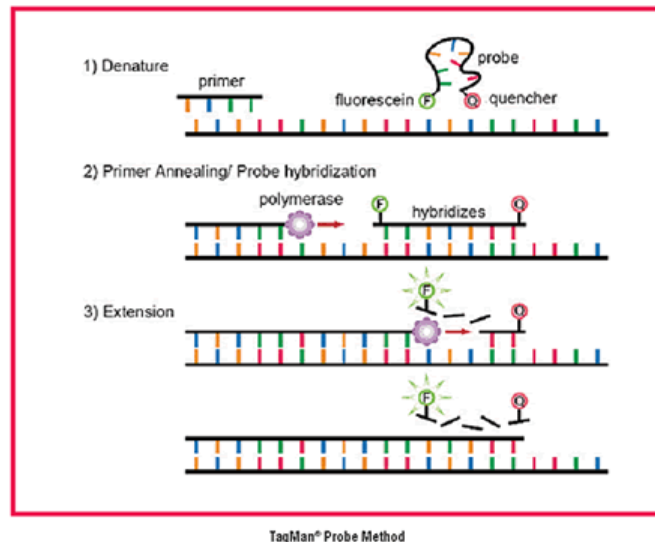
- Tampone RT 10X 2 μl
- MgCl₂ 25 mM 4 μl
- DTT 0.1 M 2 μl
- Rnase OUT (40 U/ μl) 1 μl
- SuperScript III RT (200 U/ μl) 1 μl

La reazione è stata mantenuta a 25°C, per 10 minuti, al fine di permettere l'appaiamento dei "Random hexamer". L'estensione è stata ottenuta mediante incubazione a 50°C per 50 minuti. Infine, la reazione è stata bloccata a 85°C per 5 minuti, per inattivare la retrotrascrittasi.

3.4.3 Real time PCR

I campioni retrotrascritti sono stati usati in Real-Time PCR, al fine di determinare la quantità di template presente all'inizio della reazione.

L'amplificazione dei cDNA è stata eseguita mediante tecnologia TaqMan (Applied Biosystem).



Ogni saggio è stato condotto in triplicato e ogni campione analizzato in almeno tre esperimenti indipendenti. La piastra per la reazione è stata assemblata mettendo in ogni pozzetto 10 µl di Master mix 2X (Applied Biosystem) e 1 µl della miscela contenente i primers (reverse e forward) e la sonda TaqMan. Successivamente, è stata aggiunta una miscela con 1 µl di cDNA (concentrato 50 ng/µl) e 8 µl H₂O.

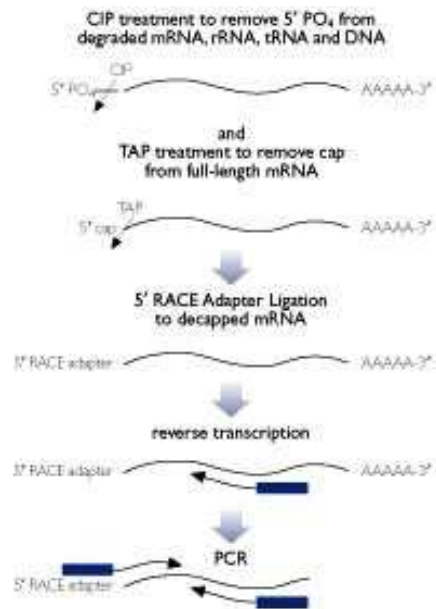
Il programma utilizzato in RT-PCR prevedeva un ciclo a 50°C per 2 minuti, che permette l'attivazione della polimerasi, 40 cicli di denaturazione a 95°C per 30 secondi, appaiamento ed estensione per 1 minuto a 60°C. Il programma è stato eseguito con il termociclatore Step One Plus. Come normalizzatore della reazione è stato utilizzato un saggio per misurare il livello di mRNA del gene housekeeping gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH). Per valutare la significatività delle variazioni di espressione dell'mRNA del gene di interesse, si sono normalizzati i cicli soglia (Ct) dei campioni amplificati con il Ct del normalizzatore. È stata prima di tutto calcolata la media dei Ct (mCt) di ciascun triplicato e, successivamente, si è determinata la differenza tra mCt dei campioni e mCt del normalizzatore (ΔCt). Dopo aver scelto il campione di riferimento (calibratore) è stata calcolata la differenza tra il ΔCt del campione di interesse e il ΔCt e del calibratore (ΔΔCt).

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{campione}) - \Delta Ct (\text{campione di riferimento})$$

Le differenti quantità di trascritto dei campioni in studio, normalizzati rispetto ad un controllo interno e relativi ad un calibratore, sono stati calcolati come valore esponenziale $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.5 5' Race PCR

Per la 5'RACE PCR (Rapid amplification of cDNA ends) è stato utilizzato il kit commerciale FirstChoice RLM-RACE (AMBION), il cui schema è riportato in figura.



3.5.1 Fase 1: reazione con enzima CIP

RNA totale estratto da cellule THP-1 e SH-SY5Y è stato innanzitutto trattato con l'enzima CIP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase), per rimuovere il 5' fosfato da molecole come RNA ribosomiale, mRNA frammentato, tRNA e DNA genomico contaminante. La struttura proteica che permette il "capping" del 5' degli mRNA non è intaccata da questa reazione. Utilizzando tubi eppendorf "RNase-free" è stata preparata una soluzione con i seguenti componenti:

- | | |
|------------------------------------|------------------|
| - Estratto totale RNA | 10 µg |
| - Tampone CIP 10x | 2 µl |
| - CIP | 2 µl |
| - H ₂ O "nuclease-free" | a volume (20 µl) |

La reazione è stata incubata a 37 °C per un'ora.

3.5.2 Fase 2: precipitazione RNA

Terminata la reazione di CIP l'RNA è stato precipitato. Alla reazione precedente sono stati quindi aggiunte le seguenti componenti:

- Ammonio acetato 15 µl
- H₂O "nuclease-free" 115 µl
- Fenolo/cloroformio acido 150 µl

La soluzione è stata miscelata tramite vortex e centrifugata per 5 minuti a temperatura ambiente a 10000xg. La fase acquosa è stata quindi trasferita in un nuovo tubo da 1,5 ml "nuclease-free". Dopo aver aggiunto 150 µl di cloroformio la soluzione è stata di nuovo miscelata tramite vortex e centrifugata per 5 minuti a temperatura ambiente a 10000xg. La fase acquosa è stata quindi trasferita in un nuovo tubo, a cui sono stati aggiunti 150 µl di isopropanolo, e incubata in ghiaccio per 10 minuti. L'RNA così precipitato è stato raccolto mediante centrifugazione per 20 minuti, alla massima velocità, a 4 °C. Dopo lavaggio con 0,5 ml di etanolo 70%, il pellet è stato risospeso in 11 µl di H₂O "nuclease-free".

3.5.3 Fase 3: reazione con enzima TAP

L'RNA è stato trattato con l'enzima TAP (Tobacco acid pyro-phosphatase) che rimuove il "capping" dagli mRNA completi, lasciando un gruppo fosfato all'estremità 5'. Utilizzando tubi eppendorf "RNase-free" è stata preparata una soluzione con i seguenti componenti:

- RNA precipitato 5 µl (5 µg)
- Tampone TAP 10x 1 µl
- TAP 2 µl
- H₂O "nuclease free" 2 µl

La reazione è stata incubata a 37 °C per 1 ora.

3.5.4 Fase 4: ligazione 5' RACE "adapter"

Un oligonucleotide di RNA di 45 basi detto "Adapter" è stato legato alla popolazione di RNA, utilizzando la ligasi T4. L'adapter non si può legare agli RNA defosforilati in quanto mancano del gruppo fosfato al 5' necessario per la ligazione. Durante la reazione di ligazione, la maggior parte degli mRNA completi e

“decappati”, acquisisce l’adapter in posizione 5’. Si assembla la seguente reazione in tubi eppendorf RNase-free:

- | | |
|------------------------------------|-------------|
| - RNA decappato | 2 µl (1 µg) |
| - 5’ RACE adapter (0,3 µg/ µl) | 1 µl |
| - Tampone ligasi 10x | 1 µl |
| - T4 RNA ligasi (2,5U/ µl) | 2 µl |
| - H ₂ O “nuclease free” | 4 µl |

La reazione è stata incubata a 37 °C per 1 ora.

3.5.5 Fase 5: Retrotrascrizione

Per questo processo è stato utilizzato il kit SuperScript III First-Strand Synthesis System RT-PCR (Invitrogen), precedentemente descritto (3.4.2).

3.5.6 Fase 6: “Nested” PCR

Per questo esperimento è stato utilizzato l’enzima GoTaq Flexi DNA polymerase (PROMEGA), enzima privo di attività di “proof-reading”, che permette il clonaggio mediante la tecnica “TA cloning” .

Per la PCR-1 (outer 5’RACE PCR)è stata preparata una miscela contenente:

- | | |
|------------------------------------|------------------|
| - Tampone GoTaq 5x | 10 µl |
| - MgCl ₂ (25 mM) | 3 µl (1.5 mM) |
| - dNTPs (10 mM) | 1 µl (200 nM) |
| - Enhancer 10x | 5 µl |
| - Primer FW | 400 nM |
| - Primer REV | 400 nM |
| - GoTaq DNA polymerase | 0.25 µl (1.25 U) |
| - RNA retrotrascritto | 1 µl |
| - H ₂ O “nuclease free” | a volume (50 µl) |

Per la PCR-2 (inner 5’ RACE PCR) è stata prepaata la stessa miscela, sostituendo l’RNA retrotrascritto con 2 µl del prodotto della PCR-1 e utilizzando “primers” che si appaiano più internamente. Entrambe le reazioni sono state assemblate in tubi da 0,5 ml.

Tramite l'utilizzo del termociclatore la reazione è stata sottoposta alle seguenti temperature:

Denaturazione iniziale 95°C per 3-5 minuti

Ciclo ripetuto 35-40volte:

- Denaturazione 95°C per 30-45 secondi
- Appaiamento dei primer 55-60°C per 45 secondi
- Allungamento 72°C per 60-80 secondi
- Allungamento finale 72°C per 1-5 minuti

In questo caso, il tubo è stato inserito nel termociclatore una volta raggiunta la temperatura di 95°C.

I primer utilizzati per amplificare il cDNA della subunità CHR7A erano i seguenti:

outer 5'RACE PCR

primer FW (forniti dal kit):

- 5' RACE outer primer: 5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3'

Primer REV:

- Primer EX 5: 5'-GTTAGTGTGGAATGTGGCGTCAAAGC-3'

- Primer EX 6: 5'-ACATCGATGTAGCAGGAACTCTTGA-3'

inner 5' RACE PCR

Primer FW (forniti dal kit):

- 5' RACE inner primer:

- 5'-CGCGATCCGAACACTGCGTTTTGCTGGCTTTGATG-3'

Primer REV

- Primer EX A: 5'-GCAGTTTGCAGCTATCCACAAAATGC-3'

-Primer EX 5 new: 5'-TAGTGTGGAATGTGGCGTCAAAGCG-3'

3.6 Tecniche di manipolazione delle proteine

3.6.1 Preparazione estratti proteici totali

Gli estratti proteici totali sono stati preparati a partire da cellule subconfluenti cresciute in petri da 10 cm. Le cellule sono state lavate con 1 ml di PBS 1X, staccate meccanicamente e raccolte per centrifugazione per 5 minuti a 10000 rpm, a 4°C, in una centrifuga Eppendorf. Sono state poi risospese in un appropriato volume di tampone di lisi contenente: NaCl (150mM), Tris HCl pH7.5 (50mM), EDTA (2mM), Triton 1%, PMSF (0.2 mM), inibitori delle fosfatasi (cocktail I, Sigma), inibitori delle proteasi (cocktail II, Sigma) e DTT(0,5 mM). L'omogenato è stato lasciato in incubazione a 4 °C, per un'ora, su ruota. Quindi, è stata misurata la concentrazione, valutata utilizzando il metodo di Bradford (Bradford M., 1976).

3.6.2 Preparazione "post nuclear supernatant" (PNS)

I PNS sono stati preparati a partire da cellule subconfluenti cresciute in petri da 10 cm. Le cellule sono state lavate con 1 ml di PBS 1X, staccate meccanicamente e raccolte per centrifugazione per 5 minuti a 10000 rpm, a 4°C, in una centrifuga Eppendorf. I pellet ottenuti sono stati risospesi in 100 µl di tampone ipotonico (Hepes pH8 10mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10mM, DTT 1mM) e lasciati in incubazione 15 minuti, in ghiaccio. Si procede poi con l'omogenizzazione, mediante 50 passaggi completi in una siringa da 1mL. Segue una centrifugazione di 5 minuti a 3000 rpm, a 4°C. Il surnatante, che corrisponde alla frazione deprivata dei nuclei (PNS), è stato risospeso in un ugual volume di tampone di lisi 2X (NaCl 280mM, SDS 2%, PMSF 0,2 mM, inibitori delle proteasi -cocktail II, Sigma-) e fatto bollire per 2 minuti a 100 °C, prima di aggiungere la soluzione di caricamento.

3.6.3 Western Blot

30 µg di ogni estratto proteico o 30µl di PNS, sono stati caricati su un gel di poliacrilammide al 10% denaturante, in presenza di SDS 0.1% (sodio dodecilsolfato). Prima del caricamento ogni campione è stato risospeso nella soluzione di caricamento Laemli (1X: Tris-HCl pH 8.5 20 mM, SDS 2%, β-mercaptoetanololo 3%, glicerolo 8%, blu di bromofenolo 0.03%) e denaturato a 100°C per 10 minuti.

Dopo una corsa a 25 mA in tampone Tris-glicina (Trizma base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%) per circa 2 ore, le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (Schleicher e Schuell) mediante elettroblotting a 30 V, per tutta la notte, in tampone di trasferimento (Trizma base 25 mM, Glicina 192 mM, MetOH 20%). La membrana è stata quindi colorata con ponceau S per controllare l'avvenuto trasferimento,

decolorata con H₂O distillata e saturata con blocking buffer (5% latte scremato in polvere, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.3% Tween-20). Dopo un'ora di incubazione sono stati aggiunti gli anticorpi primari, diluiti in blocking buffer, e lasciati in incubazione per due ore. Dopo tre lavaggi, da 10 minuti ciascuno, con blocking buffer, la membrana è stata incubata in presenza dell'appropriato anticorpo secondario coniugato a perossidasi, diluito in blocking buffer, per 1 ora. L'anticorpo in eccesso è stato quindi rimosso mediante due lavaggi da 10 minuti con blocking buffer, cinque lavaggi in TS 1X (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl)+ 0.3% Tween-20 e 3 lavaggi in TS 1X+ 0.1% Tween-20.

La membrana è stata infine incubata per 5 minuti con il substrato della perossidasi, Super Signal West Dura (Pierce) e il segnale rilevato con esposizione a tempi variabili in presenza di lastre Hyperfilm (Amersham). In parallelo è stato caricato un marcatore di peso molecolare (New England Biolabs) e la massa relativa delle proteine di interesse è stata calcolata mediante un'analisi computerizzata.

3.7 Saggio dell'attività luciferasica

La determinazione dell'attività dei diversi costrutti è stata misurata mediante lettura al luminometro (Berthold Lumat 9501) dell'attività delle luciferasi *Firefly* e *Renilla*, utilizzando il kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) secondo il protocollo fornito dalla ditta.

Brevemente, dopo 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state lavate con 2 ml di PBS 1X (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄ pH 7.4), staccate con 1 ml di PSB 1X / EDTA 1 mM e raccolte per centrifugazione a 10000 rpm per 5 minuti in microcentrifuga Eppendorf a temperatura ambiente. Il pellet è stato risospeso in un adeguato volume di 1X Passive Lysis Buffer e incubato 20 minuti a temperatura ambiente. Il lisato è stato quindi chiarificato mediante centrifugazione a 13000 rpm per 5 minuti.

Per la lettura al luminometro sono stati utilizzati 20 µl di estratto, con l'aggiunta di 95µl di Luciferase Assay Reagent II (LAR II) per la determinazione dell'attività della luciferasi *Firefly*, seguiti dall'aggiunta di 95µl di reagente Stop&Glo per la determinazione della luciferasi di *Renilla*.

I valori dell'attività di luciferasi in estratti di cellule trasfettate indicano l'attività trascrizionale dei vari costrutti. L'attività trascrizionale di ogni costrutto è definita come la pendenza della retta calcolata dai rapporti tra il valore della luciferasi *Firefly* e della luciferasi di *Renilla* (espressi come unità relative di luminescenza, URL) per quel costrutto e avente un coefficiente di correlazione tra 0.75 e 0.99 (GraphPad Prism 4.0).

3.8 Immunofluorescenza

5 x 10⁴ cellule Hela sono state coltivate su vetrini copri-oggetto 1.7x1.7 cm e trasfettate con EugeneHD, secondo il protocollo di trasfezione descritto. Dopo 24 ore le cellule sono state fissate con paraformaldeide 4% in tampone fosfato di sodio 120mM pH 7.4, per 20 minuti a 37°C e lavate con PBS 1X per cinque volte. I vetrini, quindi, sono stati capovolti su una goccia di GDB (Gelatin Dilution Buffer: 0.2% gelatina, 0.3% Triton-X 100, 20 mM tampone fosfato di sodio pH 7.4, 0.45 M NaCl) e incubati per 30 minuti a temperatura ambiente per bloccare l'autofluorescenza dovuta ai gruppi aldeidici. Dopo tre lavaggi da 5 minuti l'uno con tampone ad alto sale HS (500 mM NaCl, 20 mM tampone fosfato di sodio pH 7.4) le cellule sono state incubate per 2 ore con l'anticorpo primario, diretto contro la proteina di interesse, diluito in GDB 1X. Dopo tre lavaggi da 5 minuti ciascuno con HS per eliminare l'anticorpo in eccesso, è stato aggiunto l'anticorpo secondario coniugato a specifici fluorofori e diretto contro il primario, sempre diluito in GDB 1X. Dopo un' incubazione di un' ora, i vetrini sono stati lavati quattro volte per 5 minuti con HS; il terzo lavaggio è stato effettuato con HS freddo contenente DAPI per la colorazione dei nuclei. Infine, i vetrini sono stati lavati per 5 minuti con tampone a basso sale LS (150 mM NaCl, 20 mM tampone fosfato di sodio pH 7.4) e, successivamente, montati con una soluzione di montaggio contenente Mowiol (Polyvinyl alcohol) e fissati a vetrini porta-oggetto con smalto.

3.8.1 Trattamento con Concanavalina A per la marcatura della superficie cellulare.

La Concanavalina A (Con A) è una lectina, in grado di legare glicoproteine e glicolipidi presenti sulla membrana plasmatica. Alle cellule trasfettate, prima del fissaggio, è stato fatto un lavaggio con un buffer così composto: Hepes 10mM pH 7.2, NaCl 150 mM, MgSO₄ 0,1 mM, CaCl₂ 0,1 mM. Alle cellule, quindi, è stata aggiunta la Con A biotinilata, diluita nello stesso tampone, ad una concentrazione finale di 3 µg/ml, e lasciata in incubazione per 30 minuti a 4°C. Sono stati poi fatti tre lavaggi con PBS1X, prima di procedere con il fissaggio in paraformaldeide 4%. La rilevazione della Con A è stata effettuata con streptavidina-TX red.

4-RISULTATI

4.1 Identificazione della regione regolatoria del gene *CHRFAM7A*

Sebbene il gene *CHRFAM7A* sia originato da una duplicazione del gene *CHRNA7*, la notevole distanza dallo stesso, 1.6 Mb, rende improbabile che la sequenza regolatoria responsabile della sua espressione sia la stessa che sottende all'espressione di *CHRNA7*. Inoltre la diversa risposta a stimoli pro-infiammatori, una diminuzione della trascrizione nel caso di *CHRFAM7A* e un aumento nel caso di *CHRNA7*, conferma l'ipotesi dell'esistenza di elementi di regolazione gene-specifici. Allo scopo di identificare la sequenza regolatoria responsabile dell'espressione del gene *CHRFAM7A*, abbiamo iniziato il nostro lavoro effettuando un'analisi in silico della sequenza del gene *CHRFAM7A*, utilizzando le informazioni fornite dalle banche dati ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Il gene è composto da 10 esoni (D-A/5-10), la cui trascrizione dà origine per splicing alternativo a due RNA messaggeri (Fig. 4.1), che differiscono per la presenza dell'esone B. Questi due trascritti contengono ciascuno una "open reading frame" che dà luogo a due isoforme della proteina rispettivamente di 46.22 KDa (isoforma 1; messaggero tradotto a partire dal codone ATG contenuto nell'esone B) e 35.48 KDa (isoforma 2; start di traduzione all'interno dell'esone 6).

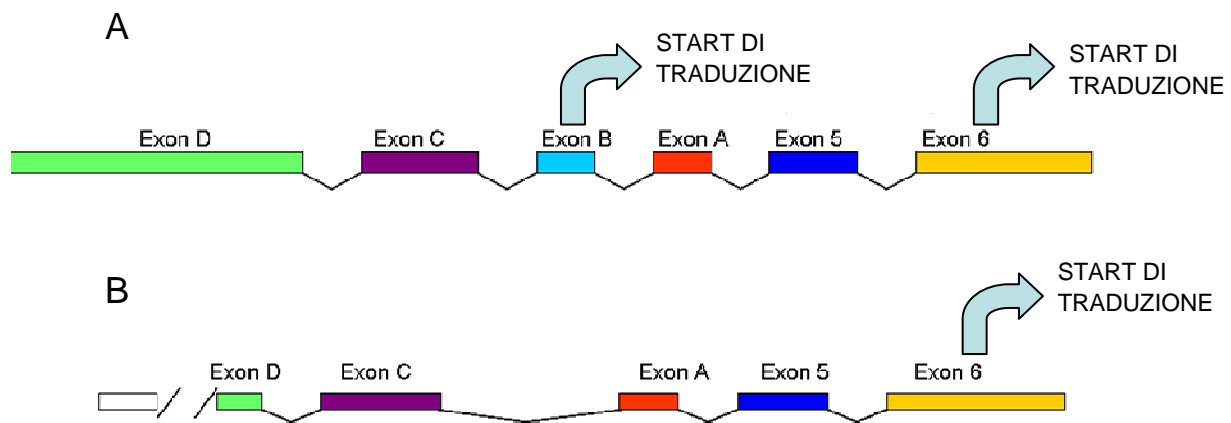


Fig 4.1 – A: schema dell' mRNA contenente l'esone B. B: schema dell' mRNA senza esone B. Sono evidenziati gli start di traduzione.

L'analisi di EST (Expressed Sequence Tag) del gene *CHRFAM7A*, ha previsto che lo start di trascrizione si trovi a 566 paia di basi a monte del 1° start di traduzione (localizzato nell'esone B), definendo quindi una

lunghezza per l'esone D di 410 paia di basi e una lunghezza per la regione 5' non tradotta (5'-UTR) di 566 paia di basi, nel caso dell' mRNA codificante l'isoforma 1, e di 919 bp, nel caso dell'isoforma 2 (start di traduzione nell'esone 6).

Sulla base di queste informazioni abbiamo analizzato 2600 paia di basi a monte dell'esone D per ricercare la presenza di elementi regolatori riconosciuti da fattori di trascrizione noti. Questa analisi è stata condotta utilizzando il software MatInspector (<http://www.genomatix.de>); sono stati identificati diversi siti per il fattore Sp1, per il recettore Aryl hydrocarbon receptor (AhR), per fattori della famiglia Kruppel-like, e un sito di legame per il fattore di trascrizione NF-kB. Quest'ultimo riveste un'importanza fondamentale nella regolazione della subunità non convenzionale del recettore nicotinic $\alpha 7$, in quanto potrebbe essere il sito attraverso cui NF-kB regola negativamente l'espressione di CHRFA7A in risposta a LPS (Fig 4.2).

```

                CGTGCTGATGGTGGTTCGTGTTGATGTGCGCCGATGATGCCGAGTGCCTCC - 3110
TTCAGCACGTGGTACATGCGCAGCATCTCGTCGCGCCACTGTGCCTGCTCTGCCGACTCT - 3050
TCCATCAGCGTTTTCTGGTCCCCACGTGAGTACAGGTTGGACAGCAGCTCCGAGAAGATG - 2990
AACTCCTTGGTCTGAGAGCGGGCAAAGAGGGAAGGAGGTTGGGACCTGATGCCTTTGCTG - 2930
CCCTGGCCCTCCTGCCGGGCCCTGCTGGGACTGTGTGCTGGACTTGGAGCCCTGAGTATGG - 2870
CTTTTCAGACGCGGCTTCTACACCGCTTAGACTCAAAGATCTGCCTCCCCACCGCCCTTT - 2810
TCTCACTCAGATAGGGACTGAGGTCCAAAGGAAAAGTCACTGTCCAAGGTCACACAT - 2750
CTGGGAGGGGACCCAGGACCTATCATGCCACCAGGACACCGGTCTACTCAGTTTCTTAAA - 2690
AATGTTTTTTGGAGATAGGATCTTGCTCTGTCTGCTAGGCTGGAGGACAGTGGGCGAGATC - 2630
ACCACCTCACTGTAGCCTCAACTTCTTGGGCTCAAAGTGATCCTCCAATGTCAGCCTGTCCG - 2570
AGTAGCTAGGACTATAGGTACGTGCCACCACCAAGCCAGCTATTTTTAAAATTTTAGTG - 2510
TAGAGATCAGGTCTCACTATGTTGCCAAGCTGGTCTCGAACTCCTGGGCTCAAGCTATC - 2450
CTCTTGCCCTGGCCCTCCAAAGTGCTGGGATTACAGACATGGGCCACTGTCCCCAGTCCC - 2390
ACGTTATATTTCTATGAGACAGCTCTGGTCTGGACTGTGCCTCCCTCCCTGGACCTTGGT - 2330
CCCATAGGGCTGGTCAGCATCTCCCCAGGCCAACATGGCCACCTGCATCCCCAGTGCTA - 2270
TAGGAGCCCCCTGCCCTATGAGGCAGTGCATGCACGTTGTTGATCATGACGTGCATGAT - 2210
GGTCTTGGGCATGACACCAACCATGAGGTCCCACACGGTCTTGTGACAATGGCCATGTA - 2150
GGAGTCCACAAGGTTCTGGGTGGTTTTCCATTTGCCGCTCCAGCTATGGGTCCATGGAGTG - 2090
CATGAAGTCTCGGAGCCATTCTCCTCAGCCTTGTCTGCTCATGGAGAACACACAGTGG - 2030
CATCAGGGTGGCCAGGCCATGCAGCCAGGCTCCAGGAATCCCTAGGATCTCAGCACCTCC - 1970
AAGGGTACCTGGAACATTGAGGCACAGAGAAAAACAAGTGGCGTGAACATGCACCGAGCT - 1910
CCCCACACGCTCTAGACGGTTTCAGGTATCTGCCCTCTCAGGACCCAGACTCCCCTGATT - 1850
CAGTCTCCTCTTAGTCTGACTCTAGTGCCAGAATCTGCCTCAAGTTACCAATCCAGAA - 1790
ATTGGAATAAATATCTCCAGGTCCCCTGTTGGAGACTGGCCAGAGCTTGTGCCAGGCT - 1730

                NF-kB
GCAGACACCTGGCAGGGGGCAAAGAAAGGGGCATACTCACTTTCCCCTTGTCCTGGGAGGC - 1670
CCATGCACCAACACTGCCACCGCCGCCACCAGGGAACACGGCAAAGTAGACACACAC - 1610
AGAGAGGAAAACGGGAAGGGTTGAGTGAACCTGGGACACTGCACCCCAACTTTAATGTGT - 1550
TGTGGAATTCAGTTAGCTAATATTTTATTGAGGATTTTGCATCAATATTCATCAGTGAT - 1490
ATTGGCCTGTAGTTTTCTTTTTTTGGTCTGTGTGTTTGATTTTGTATCAGGGTAATGCTA - 1430
GCCCTGTAGAATGAGTTTGCAAGTATTCCCTCCTTCTCTATTTTTGGAATCGTTTGGGTA - 1370
AGGTTGGTATTAGTTCTTCTTTAAATGTTTGCTAGAAATCAGCAGTGAATCATCAGGTCC - 1310
CAGGCTTTTCTTTGCTGGGAGACTTTTTATTACCCTTTGATCCCATTATTTGTTATTGG - 1250
TTTGTTACAGTTTTGGGTTTCATCATGGTTCAATCTGGTAGGTTAGATGTGTCTGGAAA - 1190
TTTATCCATTTTTGGTAGGTTTTCTATTTATTTGCACACAGTTGCTGACCCTAGTGAT - 1130
CCTTTGAGGTTTTTTTTCTTTTTCTTTTTTATATGGAGTCTTGGTCTGTGCGCCAGGCTG - 1070
GAGTGCAGTGGCGCGCTCTCAGCTCAGTGAAGCTCTGCCTCCCGTTTCACGCCATTCT - 1010
CTCCCTCAGCTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGCTCCGCCACCACGCCCTGCTAATT - 950
TTTTGTATTTTTCCGTAGAGACGGGTTTTACCCTGTTAGCCAGGATAGTCTTATCTCC - 890
TGACCTCCTGATCCACCCGCTTAGCCTCCCAAGTGGTGGGATTACAGGCGTGAGCCAC - 830
GCCCCCTTGGGACAGGGACACACACACACACATAGACACACACACACACACACACACA - 770

                Sp1                Nru I
CACAGAGTTGGTGGTTGTGCGCCAGTCGCGAGTGTGAGGAAGGGACCAGATCGGTCCG - 710

```



```

                                AhR
GCAGAAAGGTGCTGGGTCAAGAGAGGAGGGGGCAGCCGGTAGCGCGGGCACGCCGGGTGC - 650
      Sp1                                Krueppel-like
CGCGGGGGCGCGCCGGGTTGAGGGGGTGAGGGGTAGGGGTAAGAGGTGAGGGGCGACGAG - 590
      Sp1
GACCGGGGCGGGGTAGGGGCAGCCCTTTCCAGGCGGTAGCGGGGGCAGTGGTGTGTTG - 530
CCCTTTTAAACTGCGGCTTGACGGGAGCCGCGCCTCCTGTCGGTGGAGTCGGTTATAAAG - 469
GGAGCAGCCCCGCGAGGCCACATAGCTCCCGCCAAGTCTCGGTGCCCTTGCCATTT - 409
TCCAGCCGCGCTCCACGAGGGTCACGGCGGGGAGAGGTGGAGCCGCGAGAGCTCGG - 349
CCGGGGGGCCCGCTGGTGGTTCGCGGCCATGACAGCGGCTCGGGACAGGCTCCTTTTCCG - 289
CGCCCCGCCCGCGAGGTGAGGGGAAGATGTCCATGTCGGGGTTCAAGGCCAAACCGAA - 229
GTTACTGGCCTCTATCTTCCAGGAGAACCAGGAGCCACAGCCGCGGCTCACGCCCCACCG - 168
CAACATTAAGATTACAAGTGGACACCTGAGTCAGCAGGACCTGGAATCCCAGATGAGAGA - 107
GCTTATCTACACGACTCAGATCTTGTGTACCCCCATTATTGACAATCCAAAGGTGCAG - 47
AAAGCACTCTGACAAATAATGAAACAACCACCATCGGTTAAATTTGATGCAAAAATATTG + 14
CATCTACCAGCATTTTCAGTTCCAATTGCTAATCCAGCATTTGTGGATAGCTGCAAACCTG + 74
CGATATTAGTGTGATGAGCGCTTTGACGCCACATTCACACTAACGTGTTGGTGAATTC + 134
TTCTGGGCATTGCCAGTACCTGCCTCCAGGCATATTC AAGAGTTCTGCTACATCGATGT + 194
ACGCTGGTTTCCCTTTGATGTGCAGCACTGCAAACCTGAAGTTTGGGTCTGCTTACGG + 254
AGGCTGGTCCCTTGGATCTGCAGATGCAGGAGGAGGAGATATCAGTGGCTATATCCCCAATGG + 314
AGAATGGGACCTAGTGG

```

Fig.4.2 - Sequenza dei primi sei esoni e della regione al 5' del gene *CHRFAM7A*: Esone D. ■, Esone C ■, Esone B ■, Esone A ■, Esone 5 ■, Esone 6 ■, sequenza Alu ■, Sito NF-kB. ■. I due start di traduzione (ATG) nell'esone B e nell'esone 6, sono sottolineati. La freccia indica lo start di trascrizione.

La presenza di queste sequenze consenso per fattori di trascrizione suggerisce che in questa regione possano essere presenti tutti gli elementi di regolazione dell'espressione di *CHRFAM7A*.

L'analisi in silico della sequenza ci ha portati, inoltre, all'identificazione di una sequenza Alu localizzata tra 560 e 260 paia di basi a monte del putativo inizio di trascrizione (-1155/-821 rispetto all'ATG nell'esone B), come predetto dall'analisi di EST. Questa sequenza, lunga generalmente 300 paia di basi, è altamente ripetuta all'interno del genoma umano; ad essa è stato associato un ruolo regolatorio negativo dell'espressione genica.

4.2 Determinazione dello start di trascrizione

Al fine di caratterizzare sia dal punto di vista funzionale che molecolare la sequenza regolatoria del gene *CHRFAM7A*, in diversi sottotipi cellulari, abbiamo condotto esperimenti per determinare se lo start di trascrizione predetto dal progetto genoma fosse confermato. RNA totale estratto dalla linea cellulare monocitaria THP-1, da una linea di neuroblastoma umano, SH-SY5Y, e da colture primarie di macrofagi umani è stato analizzato mediante la tecnica della 5'-RACE, che permette l'amplificazione della regione 5' dell' mRNA e quindi la determinazione dell'inizio della trascrizione. Le cellule THP-1 non esprimono il gene *CHRNA7*, mentre le SH-SY5Y esprimono sia il gene convenzionale sia la forma duplicata.

4.2.1 Determinazione dell'inizio di trascrizione in THP-1

La linea monocitaria umana THP-1, da noi utilizzata come modello cellulare per studiare l'espressione della forma duplicata di alpha7, esprime unicamente CHR7A. Abbiamo quindi deciso di utilizzare inizialmente solo RNA estratto da THP-1 per effettuare gli esperimenti di 5'RACE. Abbiamo eseguito la prima amplificazione del cDNA retrotrascritto utilizzando come primer specifico (reverse) un oligonucleotide complementare a una regione dell'esone 5 (Primer EX5), che ci garantisce di amplificare proprio CHR7A (5'-RACE OUTER). La seconda amplificazione (nested-PCR) è stata ottenuta con un oligonucleotide complementare a una regione dell'esone A (primer EX A; 5'-RACE INNER). Come primers forward sono stati usati rispettivamente un oligonucleotide complementare alla regione 5' distale dell'adapter (5'-RACE OUTER), e un oligonucleotide complementare alla regione 3' dell'adapter (5'-RACE INNER).

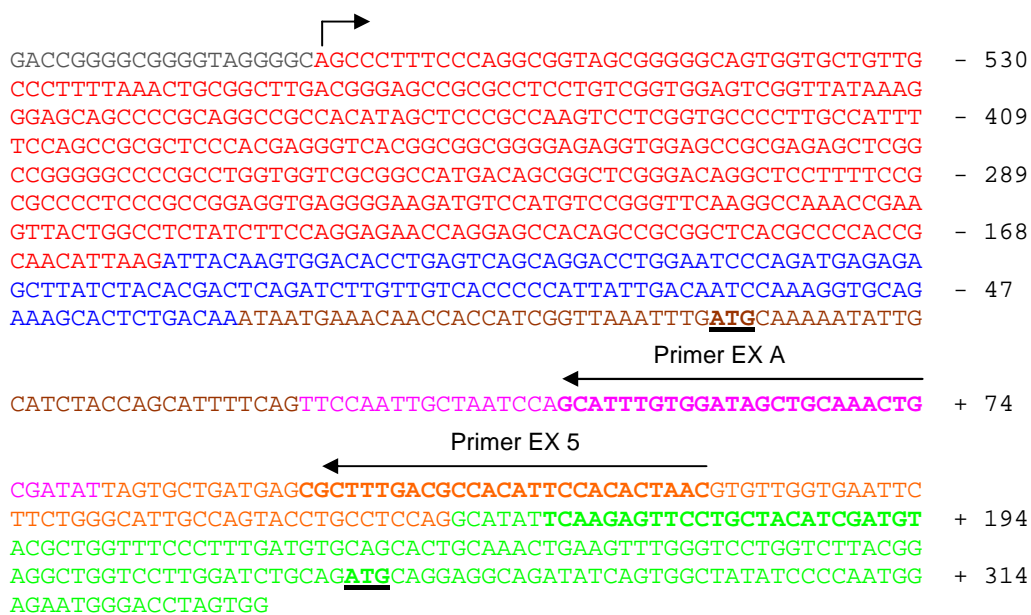


Fig.4.3 - Sequenza dei primi sei esoni del gene CHR7A. ■ Esone D ■ Esone C ■ Esone B ■ Esone A ■ Esone 5 ■ Esone 6. ATG: Start di traduzione. Le frecce indicano i primer utilizzati per la 5'-RACE PCR.

L'amplificazione ha generato un prodotto di 500 paia di basi (linea 1), che abbiamo clonato nel vettore PCR11.

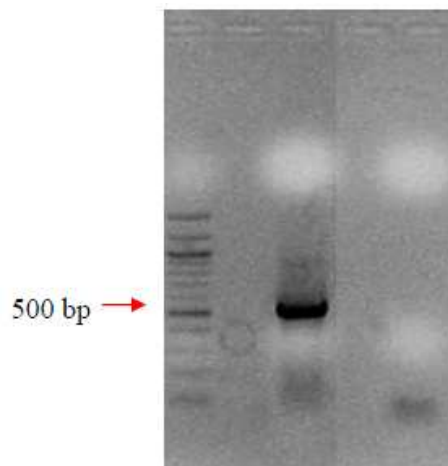
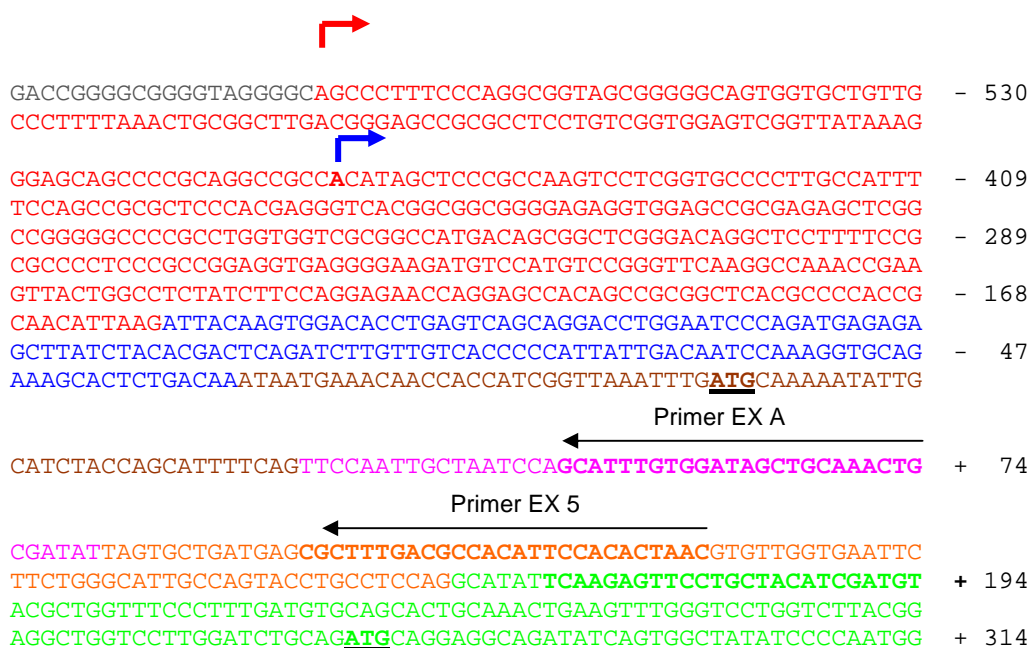


Fig. 4.4 - A) 5' race sul cDNA da THP-1. Linea 1: è visibile la banda da 500bp, amplificata con nested PCR; linea 2: controllo negativo.

Il prodotto clonato è stato quindi sequenziato e l'identità, come cDNA codificante CHRFAM7A, confermata mediante analisi BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). Per mappare esattamente l'inizio della trascrizione abbiamo quindi allineato la sequenza ottenuta con la sequenza degli esoni e di una regione di circa 2000 bp al 5' del gene di CHRFAM7A presente in banca dati, mediante l'utilizzo del software Vector NTI. Questa analisi ha mostrato che il primo nucleotide della sequenza del frammento corrisponde ad un residuo all'interno dell'esone D, 120 paia di basi a valle del sito predetto dall'analisi di EST (Fig 4.5, pannello A), e 447bp a monte dell'ATG nell'esone B. Inoltre, questo trascritto corrisponde all'isoforma 2, in quanto delecto dell'esone B (Fig. 4.5, pannello B).

A



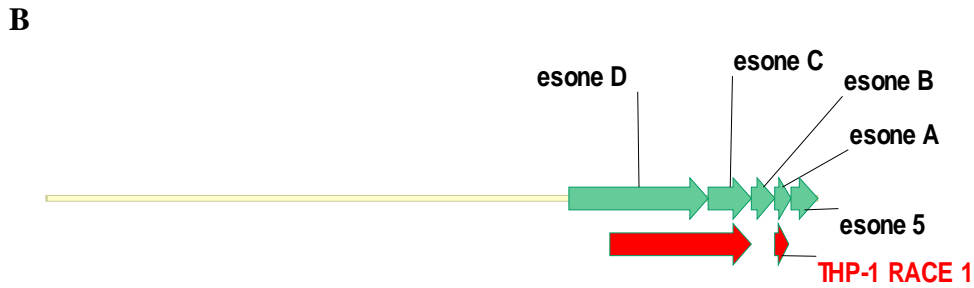


Fig.4.5 – Identificazione dell’inizio di trascrizione del gene CHRFAM7A nella linea cellulare THP-1.

Pannello A: ■ Esone D ■ Esone C ■ Esone B ■ Esone A ■ Esone 5 ■ Esone 6. ATG Start di traduzione. Le frecce indicano i primer utilizzati per la 5'-RACE PCR. La freccia blu indica lo start di trascrizione identificato in THP-1. La freccia rossa indica il putativo start identificato dall'analisi di EST. **Pannello B:** Allineamento tra la sequenza ottenuta dalla 5' RACE inner PCR e la sequenza, contenuta in banca dati, della regione al 5' del gene CHRFAM7A e gli esoni D, C, B, A e 5 (sequenza controllo).

Dal momento che la linea cellulare THP-1 esprime entrambe le isoforme, per valutare la presenza di un trascritto codificante per l'isoforma 1, che dovrebbe contenere anche l'esone B, abbiamo ripetuto l'esperimento in condizioni meno stringenti. Abbiamo modificato la temperatura di "annealing" dei primers (Ta 50°C) e allungato il tempo di estensione (T 72°C per 70 sec). L'amplificazione del cDNA preparato per l'esperimento di 5'-RACE in queste condizioni ha però generato tre bande di diversa lunghezza, rispettivamente di 300, 400 e 500 paia di basi, come dimostrato dalla digestione con l'enzima EcoRI, dopo clonaggio dei frammenti in PCR II (Fig. 4.6-B).

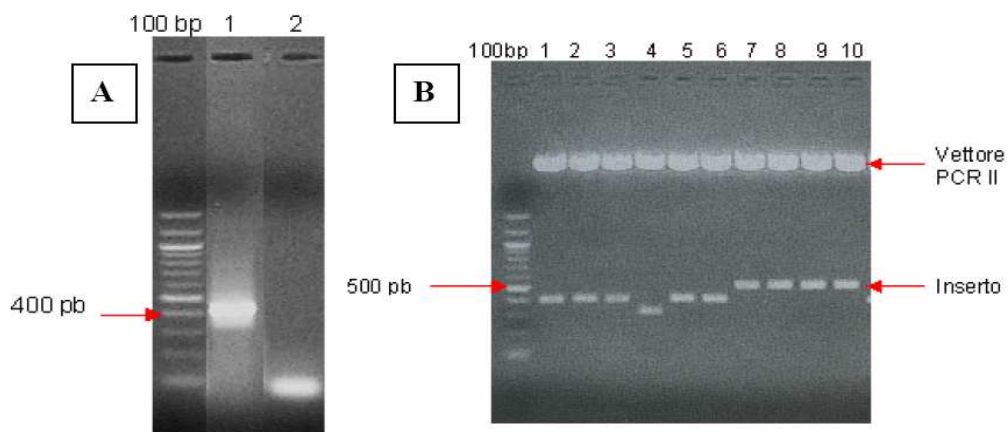


Fig.4.6 - A) Nested PCR. Linea 1: banda di circa 400 pb amplificata dalla nested PCR. Linea 2: controllo negativo. **B)** Digestione con EcoRI per l'analisi dei cloni ricombinanti.

I diversi prodotti sono stati sequenziati per confermare la loro identità; ciò ha permesso di identificare il frammento di 300 paia di basi come risultato di una amplificazione aspecifica. Il frammento di 500 paia di basi corrisponde al prodotto identificato tramite il primo esperimento di 5' RACE, confermando quindi l'inizio di trascrizione 447 paia di basi a monte dell' ATG presente nell'esone B. Il frammento di 400 paia di basi identifica un trascritto alternativo, mancante della regione compresa tra - 208 e - 703 (Fig. 4.8), con un inizio di trascrizione a - 771 paia di basi rispetto al primo ATG (esone B) e corrispondente all'isoforma 1, contenente l'esone B (Fig. 4.7).

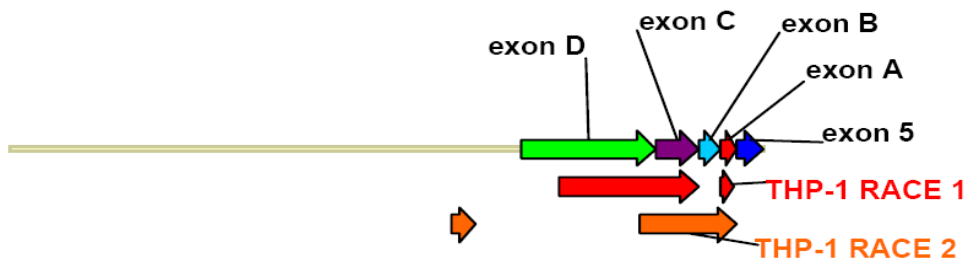


Fig. 4.7 –Rappresentazione schematica del cDNA di CHR FAM7A e allineamento dei prodotti di 5'RACE.

```

TTTATCCATTTTGGTAGGTTTTCCTATTTATTTGCACACAGTTGCTGACCACTAGTGAT - 1130
CCTTTGAGGTTTTTTTTCTTTTCTTTTTTATATGGAGTCTTGGTCTGTGCGCCAGGCTG - 1070
GAGTGCAGTGGCGCGCTCAGCTCACTGCAAGCTCTGCCTCCCGGTTTCACGCCATTCT - 1010
CCTCCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGCGTCCGCCACCACGCCCTGCTAATT - 950
TTTTGTATTTTTCCGTAGACGCGGGTTTTACCGTGTAGCCAGGATAGTCTTATCTCC - 890
TGACCTCCTGATCCACCCGCCTTAGCCTCCCAAAGTGGTGGGATTACAGGCGTGAGCCAC - 830
                                                                                   ↴
GCCCCCTTGGGACAGGGACACACACACACACACATAGACACACACACACACACACACA - 770
      Sp1                               Nru I
CACAGAGTTGGTGGTTGTGCCGCCAGTCGCGAGTGTGAGGAAGGGACCAGATCGGTCGG - 710
                                                                                   AhR
GCAGAAAGGTGCTGGGTCAAGAGAGGAGGGGCGAGCCGGTAGCGCGGGCACGCCGGGTGC - 650
      Sp1                               Krueppel-like
CGCGGGGCGCGCGCGGCTTGAGGGGTGAGGGGTGAGGGGTAAGAGGTGAGGGGCGACGAG - 590
      Sp1
GACCGGGGCGGGGAGGGGCAGCCCTTTCCAGGGGTAAGCGGGGCGAGTGGTGGTGTG - 530
CCCTTTTAAACTSCGGCTTGACGGGAGCCGCGCTTCTCTCGGTGGAGTCGGTTATAAAG - 469
GGAGCAGCCCGCGAGGCGCCACATAGCTCCCGCCAGGTCTCGGTGCGCCCTTSCCATTT - 409
TCCAGCCTCGCTCCACAGAGGCTCAGGGCGGCGGGAGAGGTGGAGCCCGGAGAGCTCGG - 349
CGGGGGGCGCGGCTGCTGCTGGTGGCGGCGCATGACAGCGGCTCGGGACAGGCTCTTTTCCG - 289
CGCCCTCCCGCGGAGGTGAGGGGAGATGTCCATGTCCGGTTCAAGGCCAAACCGAA - 229
GTTACTGSCCTCTATCTTCCAGGAGAACCCAGGAGCCACAGCCGCGGCTCACGCCCCACCG - 168
CAACATTAAGATTACAAGTGGACACCTGAGTCAGCAGGACCTGGAATCCCAGATGAGAGA - 107
GCTTATCTACAGACTCAGATCTTGTGTCACCCCATTTATTGACAATCCAAAGGTGCAG - 47
AAAGCACTCTGACAAATAATGAAACAACCACCATCGGTTAAATTTGATGCAAAAATATTG + 14
CATCTACCAGCATTTTTCAGTTCCAATTGCTAATCCAGCATTTGTGGATAGCTGCAAACCTG + 74
CGATATTAGTGCTGATGAGCGCTTTGACGCCACATTCCACACTAACGTGTTGGTGAATTC + 134
TTCTGGGCATTGCCAGTACCTGCCTCCAGGCATATTCAAGAGTTCTCTGCTACATCGATGT + 194
ACGCTGGTTTTCCCTTTGATGTGCAGCACTGCAAACTGAAGTTTGGGTCTGCTTACGG + 254
AGGCTGGTCTTGGATCTGCAGATGCAGGAGGCAGATATCAGTGGCTATATCCCCAATGG + 314
AGAATGGGACCTAGTGG

```

Fig 4.8 – Schema della regione a monte del gene *CHRFAM7A*. Esone D. ■, Esone C ■, Esone B ■, Esone A ■, Esone 5 ■, Esone 6 ■, sequenza Alu ■, Sito NF-κB. ■. I siti di inizio della traduzione (esone B ed esone 6) sono sottolineati. In grigio è evidenziata la regione -703/-208, assente nell' mRNA codificante l'isoforma 1. La freccia indica lo start di trascrizione a -771bp, rispetto all'ATG nell'esone B

4.2.2 Determinazione del sito d'inizio della trascrizione in colture primarie di macrofagi umani

Le THP-1 rappresentano un valido modello sperimentale in quanto sono una linea cellulare umana, di origine monocitaria. Data la loro natura di cellule immortalizzate, abbiamo voluto verificare se i trascritti identificati in THP-1 rappresentassero i trascritti fisiologici della linea monocitaria umana. A tale scopo, RNA totale estratto da colture primarie di macrofagi umani, isolati da sangue periferico, è stato sottoposto a 5'-RACE. Gli oligonucleotidi usati per l'amplificazione sono gli stessi degli esperimenti precedenti in THP-1.

L'analisi dei prodotti ottenuti dall'amplificazione (Fig 4.9, linea 1) ha evidenziato la presenza di tre bande rispettivamente di 300, 400 e 550 paia di basi.

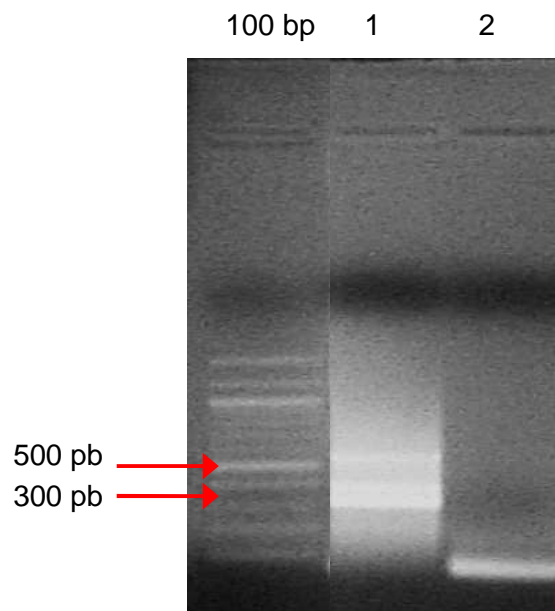


Fig 4.9 – 5'RACE del gene *CHRFAM7A* in macrofagi primari umani. Linea 1: prodotto ottenuto dalla 5' RACE Linea2: controllo negativo.

Dopo clonaggio in PCR II e sequenziamento, si è proceduto con l'analisi delle sequenze. E' stato così identificato un frammento compatibile con il trascritto alternativo, già descritto in THP-1, mancante di parte dell'esone D (regione -703/-208), con l'inizio di trascrizione a -771 pb e, pertanto, corrispondente all'isoforma 1 (esone B presente). L'analisi ha anche evidenziato la presenza di un secondo trascritto, che mostra un'omologia interna del 100% col precedente, ma mancante dell'esone B (Fig. 4.10).

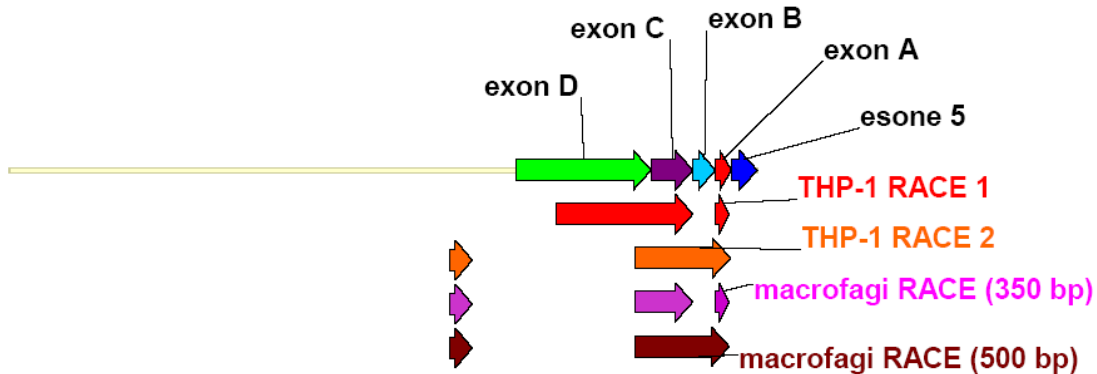


Fig. 4.10 - Allineamento tra la sequenza controllo e i cDNA ottenuti dalla 5'RACE su macrofagi primari. Nei diversi tipi cellulari sono presenti varianti di splicing alternativo, appartenenti alle isoforme 1 e 2.

4.2.3 Determinazione del sito di inizio della trascrizione nella linea di neuroblastoma umano SHSY5Y

Sebbene il gene codificante CHRFAM7A sia stato da noi caratterizzato in un modello cellulare responsabile dell'immunità innata, la sua espressione è stata confermata anche in un modello cellulare neuronale, la linea di neuroblastoma SH-SY5Y. Rispetto ai macrofagi, dove CHRFAM7A risulta essere la forma prevalentemente espressa, nella linea SH-SY5Y il rapporto tra la forma codificante il recettore nicotino $\alpha 7$, prodotto del gene CHRNA7, e CHRFAM7A è di 2:1. Abbiamo quindi voluto indagare, attraverso l'analisi degli inizi di trascrizione, l'esistenza di trascritti alternativi che possano predire l'esistenza di promotori tessuto-specifici, responsabili di una differente regolazione della subunità duplicata del recettore $\alpha 7$ in cellule neuronali rispetto a cellule dell'immunità innata. Per essere sicuri di amplificare sia il trascritto codificante per CHRNA7 sia quello per CHRFAM7A, abbiamo disegnato due nuovi oligonucleotidi, uno

complementare a una regione dell'esone 6 (primer EX 6), utilizzato nel primo ciclo di amplificazione, e un nuovo oligonucleotide complementare a una regione diversa, rispetto a quella usata negli esperimenti precedenti, dell'esone 5 (primer EX 5 new), per la seconda amplificazione.

```
Primer exon 6:          5' ACATCGATGTAGCAGGAACTCTTGA 3'  
Primer exon 5 new:     5' TAGTGTGGAATGTGGCGTCAAAGCG 3'
```

Sono state così identificate tre bande, rispettivamente di 550, 500 e 400 pb, prodotte dall'amplificazione mediante nested PCR (Fig.4.11, linea1).

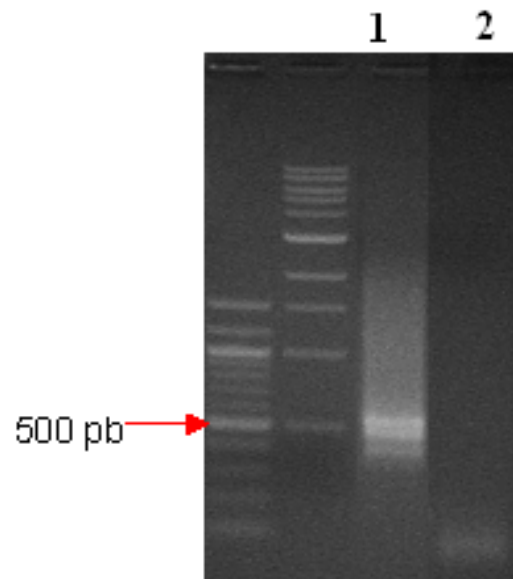


Fig.4 11- Analisi di 5'RACE in SHSY5Y. Linea 1: prodotti amplificati dalla nested PCR. Linea2: controllo negativo.

L'analisi della sequenza (con il programma BLAST) ha evidenziato che il frammento di circa 400 paia di basi corrisponde ad una porzione del cDNA del gene CHRNA7, codificante per la subunità $\alpha 7$ convenzionale; il frammento di circa 550 paia di basi, invece, corrisponde alla sequenza di CHR FAM7A. Tuttavia, l'analisi di allineamento rispetto alla sequenza controllo identifica un'inizio di trascrizione differente da quelli finora noti, posto a 415 paia di basi a monte dell'ATG dell'esone B (Fig 4.12). Al momento non abbiamo

informazioni riguardo all'identità del frammento di circa 500 paia di basi per problemi nel sequenziamento di questo DNA.

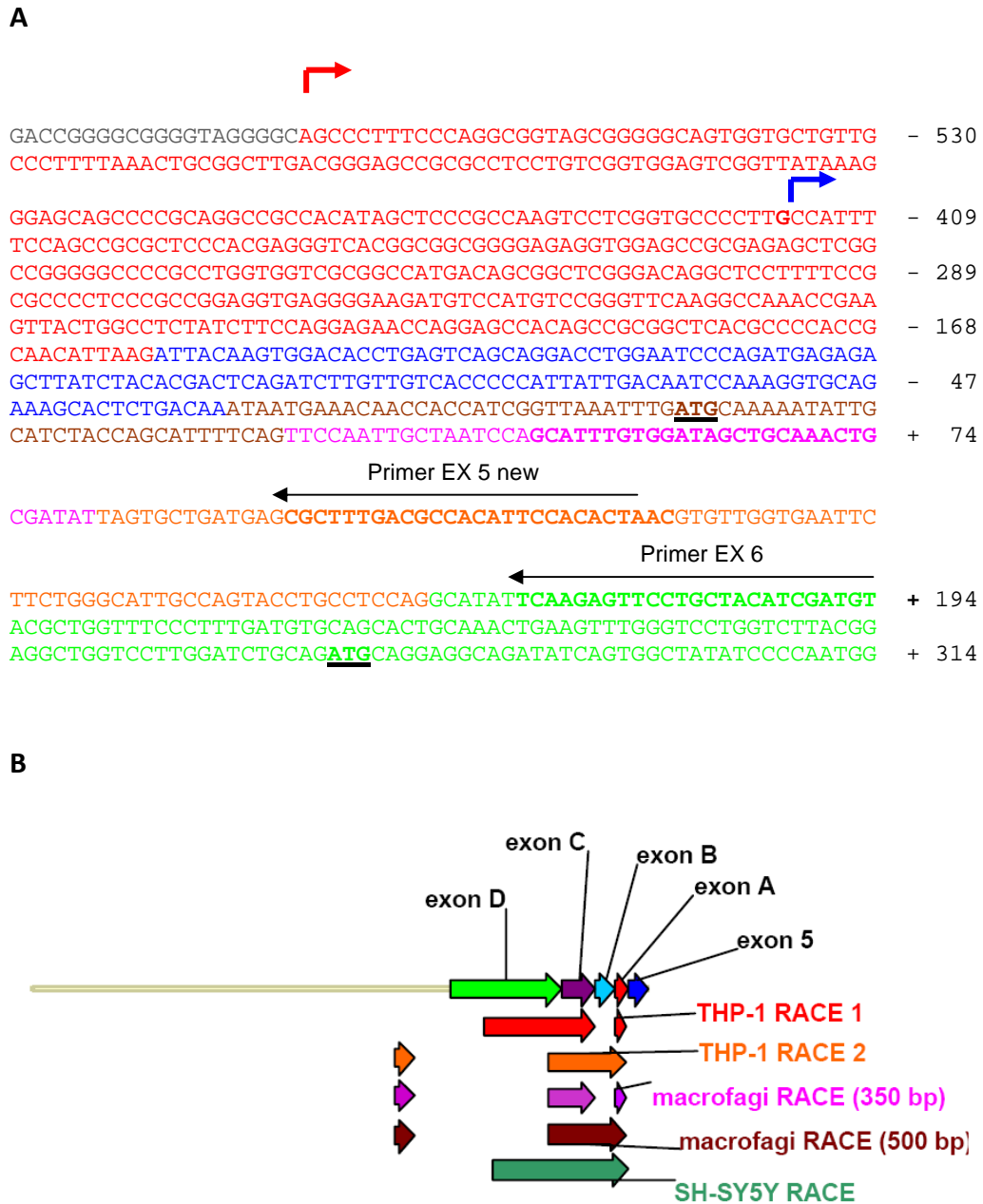


Fig. 4.12 – A–Allineamento tra la sequenza controllo e il cDNA ottenuto dalla 5'RACE inner PCR, effettuata su estratto totale di RNA da cellule di neuroblastoma SH-SY5Y. **B**–Viene individuato un nuovo start di trascrizione, posizionato all'interno dell'esone D, 415 pb a monte dell'ATG nell'esone B.

4.3 Analisi funzionale delle sequenze regolatorie identificate

Gli esperimenti di 5'RACE hanno permesso l'identificazione di trascritti alternativi, in differenti tipi cellulari, caratterizzati da differenti siti di inizio della trascrizione e dalla presenza/assenza di alcune regioni degli esoni D e B. Questi dati ci portano ad ipotizzare che la regione del promotore sia localizzata nel tratto al 5', fiancheggiante le sequenze di mRNA identificate. Allo scopo di valutare questa ipotesi, abbiamo generato un costrutto contenente un frammento di 2100 paia di basi, comprendente parte dell'esone B (a monte dell'ATG), l'esone C, l'esone D e una porzione della regione genomica al 5'. Questa sequenza è stata clonata nel vettore pGL4 basic, a monte del gene reporter codificante per la luciferasi (*firefly*) di lucciola (CHRFAM7A FULL-LENGTH).

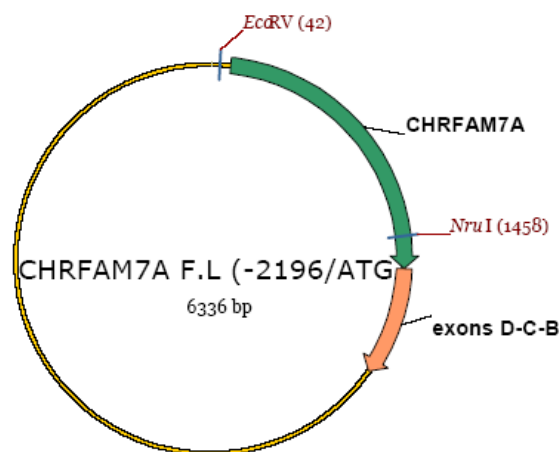


Fig.4.13 – Rappresentazione del vettore CHRFAM7A FULL-LENGTH.

Per valutare se questa regione contenesse elementi funzionali in grado di sostenere la trascrizione del gene reporter, abbiamo eseguito esperimenti di trasfezione transiente nella linea cellulare THP-1. Sorprendentemente, l'attività trascrizionale di questo costrutto risulta più bassa persino rispetto al vettore senza promotore (pGL4b), utilizzato come riferimento per l'attività basale. Questo risultato suggerisce che la porzione genomica clonata non contiene elementi funzionali necessari per la trascrizione di CHRFAM7A, oppure, in alternativa, in questa regione potrebbero essere presenti elementi in grado di regolare negativamente l'espressione del gene (fig.4.14).

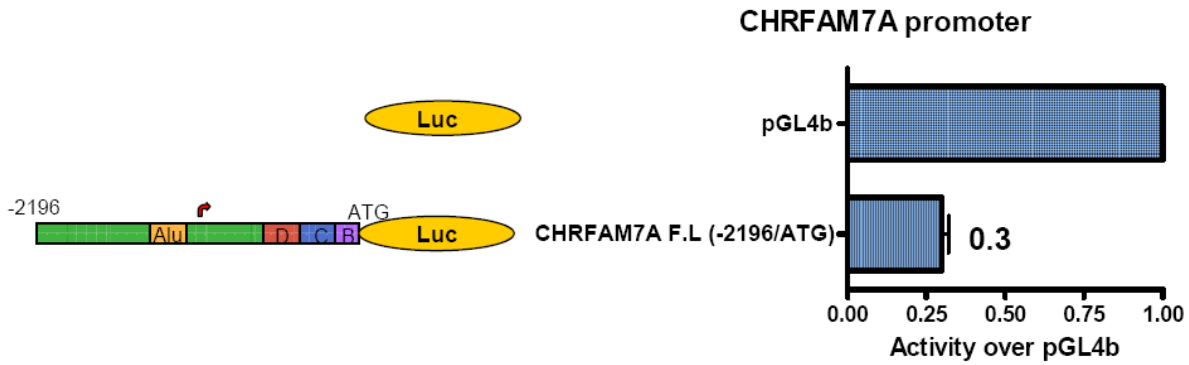


Fig. 4.14 Rappresentazione schematica dell'analisi funzionale del costrutto CHRFAM7A FULL LENGTH, rispetto al vettore vuoto pGL4b.

Un'analisi più approfondita di questa regione ha mostrato la presenza di una sequenza Alu, localizzata tra -1083 e -830 paia di basi a monte del codone d'inizio (fig.4.15) (Polak et al., 2006).

```

TTTATCCATTTTTGGTAGGTTTTCCTATTTATTTGCACACAGTTGCTGACCACTAGTGAT - 1130
CCTTTGAGGTTTTTTTTCTTTTTCTTTTTTATATGGAGTCTTGGTCTGTGCGCCAGGCTG - 1070
GAGTGCAGTGGCGCGCTCTCAGCTCACTGCAAGCTCTGCCTCCCGGTTTCACGCCATTCT - 1010
CCTCCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGCGTCCGCCACCACGCCCTGCTAATT - 950
TTTTGTATTTTTTCCGTAGAGACGGGGTTTTACCCTGTTAGCCAGGATAGTCTTATCTCC - 890
TGACCTCCTGATCCACCCGCCTTAGCCTCCCAAAGTGGTGGGATTACAGGCGTGAGCCAC - 830
GCCCCCTTGGGACAGGGACACACACACACACATAGACACACACACACACACACACACA - 770
                                     Nru I
CACAGAGTTGGTGGTTGTGCCGCCAGTCGCGAGTGTGAGGAAGGGACCAGATCGGTCGG - 710
GCAGAAAGGTGCTGGGTCAAGAGAGGAGGGGGCAGCCGGTAGCGCGGGCACGCCGGGTGC - 650
GCGCGGGGCGCGCCGGGTTGAGGGGTGAGGGGTGAGGGGTAAGAGGTGAGGGGCGACGAG - 590
GACCGGGGCGGGGTAGGGGCAGCCCTTTCCAGGCGGTAGCGGGGGCAGTGGTGCTGTTG - 530
CCCTTTTAAACTGCGGCTTGACGGGAGCCGCGCCTCCTGTCGGTGGAGTCGTTATAAAG - 469
GGAGCAGCCCCGCAGGCCGCCACATAGCTCCCGCCAAGTCTCGGTGCCCTTGCCATTT - 409
TCCAGCCGCGCTCCACGAGGGTCACGGCGGCGGGGAGAGGTGGAGCCGCGAGAGCTCGG - 349
CCGGGGCCCCCGCCTGGTGGTCGCGGCCATGACAGCGGCTCGGGACAGGCTCCTTTTCCG - 289
CGCCCCTCCCGCCGGAGGTGAGGGGAAGATGTCCATGTCCGGGTTCAAGGCCAAACCGAA - 229
GTTACTGGCCTCTATCTTCCAGGAGAACCAGGAGCCACAGCCGCGGCTCACGCCCCACCG - 168
CAACATTAAGATTACAAGTGGACACCTGAGTCAGCAGGACCTGGAATCCAGATGAGAGA - 107
GCTTATCTACAGACTCAGATCTTGTGTGACCCCCATTATTGACAATCCAAAGGTGCAG - 47
AAAGCACTCTGACAAATAATGAAACAACCACCATCGGTTAAATTTGATGCAAAAATATTG + 14

```

Fig. 4.15 Porzione della regione a monte del gene CHRFAM7A. EsoneD ■ EsoneC ■ EsoneB ■ Sequenza Alu ■
Lo start di traduzione nell'esone B. è sottolineato.

Questa sequenza potrebbe avere un effetto negativo sulla trascrizione del gene. Per testare questa ipotesi, abbiamo generato un costrutto delecto della sequenza Alu e contenente la porzione genomica del gene *CHRFAM7A* compresa tra le basi -4246 e -1207. Il costrutto così ottenuto contiene anche il sito di inizio della trascrizione identificato mediante 5'RACE in THP-1 (vedi fig. 4.5).

Una volta trasfettato in cellule THP-1, però, anche questo costrutto ha mostrato un'attività trascrizionale più bassa di quella del vettore pGL4b, indicando la presenza di altri elementi negativi, oltre alla sequenza Alu delecta, in grado di inibire la trascrizione del gene reporter.

4.4 Generazione di nuovi costrutti per lo studio della regione regolatoria di CHRFAM7A

Gli esperimenti di 5' RACE PCR hanno rivelato la presenza di differenti siti di inizio della trascrizione, suggerendo l'esistenza di promotori alternativi nei diversi tessuti. Inoltre, la regione -703/-208 è sempre assente nei trascritti identificati nei macrofagi e manca anche in uno dei due trascritti co-espressi in THP-1. Questi dati suggeriscono che questa regione possa rappresentare un introne, che viene trattenuto soltanto dal secondo trascritto in THP-1. La presenza di questa regione, insieme alla sequenza Alu, potrebbe spiegare l'effetto negativo sull'espressione dei nostri costrutti reporter, negli esperimenti di trasfezione transiente. Per valutare in modo più approfondito il ruolo di queste due sequenze, abbiamo generato una serie di costrutti in cui sono delecte le porzioni -737/-1 e /o la sequenza Alu:

- ***CHRFAM7A -2191 Δ5'UTR***: in questo costrutto è stata delecta la regione genomica compresa tra l'ATG, posto nell'esone B, e le 732 paia di basi a monte del codone d'inizio, ovvero la porzione genomica corrispondente al 5' UTR del gene.

- ***CHRFAM7A -4246 Δ5'UTR***: questo costrutto contiene una porzione più lunga del 5' fiancheggiante il gene *CHRFAM7A*, comprendente 4246 basi a monte dell' ATG (posto nell'esone B). La sequenza corrispondente al 5' UTR è stata delecta.

- ***CHRFAM7A -4246 Δ5'UTR/ΔAlu***: questo costrutto include le 4246 paia di basi a monte del codone d'inizio, ad esclusione della sequenza corrispondente al 5'UTR e alla porzione genomica corrispondente alla sequenza Alu.

Tutti questi costrutti mantengono il sito di inizio della trascrizione identificato in macrofagi (-771 paia di basi a monte dell'ATG nell'esone B).

4.5 Trasfezioni transienti nella linea cellulare THP-1

I vettori plasmidici generati, contenenti le diverse porzioni del gene *CHRFAM7A*, sono stati testati in cellule della linea monocitaria THP-1, mediante esperimenti di trasfezione transiente. L'attività del promotore è stata valutata in base ai valori di attività della luciferasi *Firefly*, in rapporto al vettore pGL4b senza inserto (fig.4.16). La delezione del 5'UTR (-2196/ Δ 5'UTR) determina un incremento dell'attività del gene reporter di 2,8 volte, se paragonato al vettore vuoto pGL4b, e di 10 volte, in rapporto al vettore full length, nonostante nel costrutto sia ancora presente la sequenza -773/ATG.

L'ulteriore rimozione della sequenza Alu (*CHRFAM7A* -2196 Δ 5'UTR/ Δ Alu) induce un aumento dell'attività della regione regolatoria di *CHRFAM7A* di 5 volte, rispetto a pGL4b, e di ben 15 volte, se confrontata con il costrutto full length. La presenza di una porzione genomica più a monte, compresa tra le basi -4246 e -2196, invece, risulta avere un effetto negativo sull'attività del promotore, nonostante la delezione del 5'UTR (*CHRFAM7A* -4246 Δ 5'UTR) e della sequenza Alu (*CHRFAM7A* -4246 Δ 5'UTR/ Δ Alu). L'attività misurata è solo di 1,5 e 1,7 volte superiore a quella del vettore vuoto. Questi dati suggeriscono la presenza, in questa regione genomica, di elementi in grado di modulare negativamente l'attività trascrizionale.

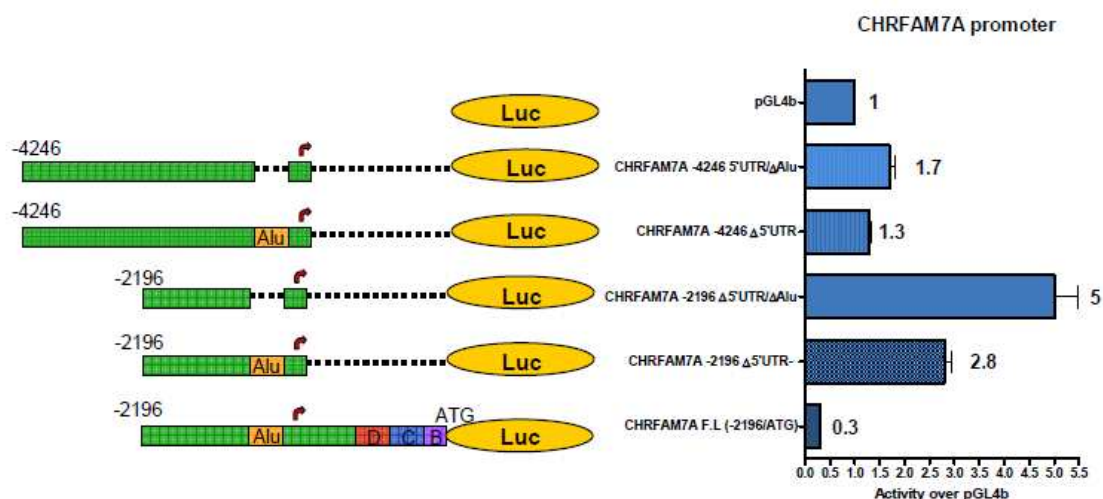


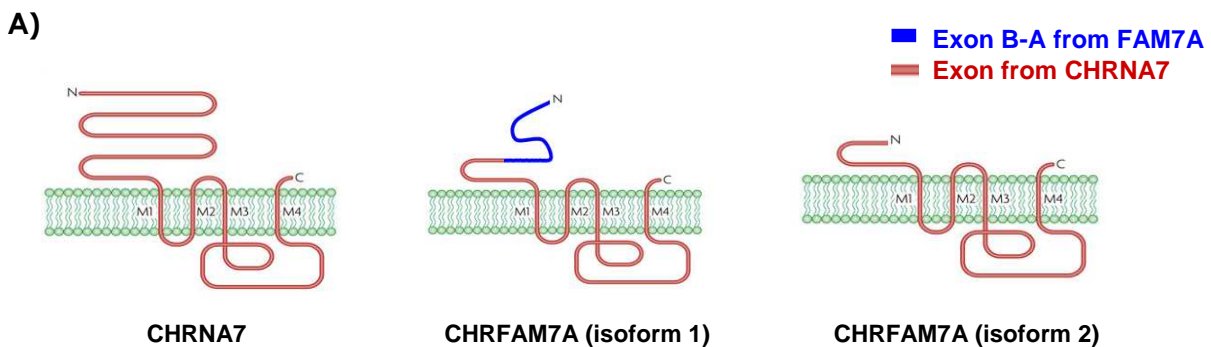
Fig.4.16 – Rappresentazione grafica delle diverse porzioni della regione al 5' fiancheggiante il gene *CHRFAM7A*, clonate nel vettore pGL4b. Le colonne rappresentano i valori di firefly luciferasi, corrispondenti all'attività trascrizionale

del promotore, normalizzate sui valori della luciferasi di Renilla ed espresse come numero di volte rispetto al vettore vuoto. I valori sono una media \pm S.D. di tre esperimenti indipendenti, ciascuno eseguito in duplicato.

4.6 Studio delle proteine codificate da *CHRFAM7A*

La duplicazione che ha originato *CHRFAM7A* è evolutivamente molto recente, infatti, il gene è presente solo nella specie umana e non tutti gli individui lo possiedono.

Inoltre, per splicing alternativo, lo stesso gene dà origine a due proteine, rispettivamente di 36 e 46 KDa, che mantengono la porzione corrispondente ai domini transmembrana del recettore nicotinico (esoni 5-10), ma mancano di gran parte del dominio N-terminale contenente il sito di legame per l'acetilcolina (sostituito dagli esoni D, C, B e A) (fig.4.17-B). La localizzazione cellulare e la funzione svolta da queste due varianti non sono, ad oggi, note. Tuttavia, la presenza dei domini transmembrana, conservati con un'omologia del 100% tra le diverse isoforme, rende plausibile la presenza in membrana delle proteine derivate dal gene *CHRFAM7A* (fig.4.17-A).



B)

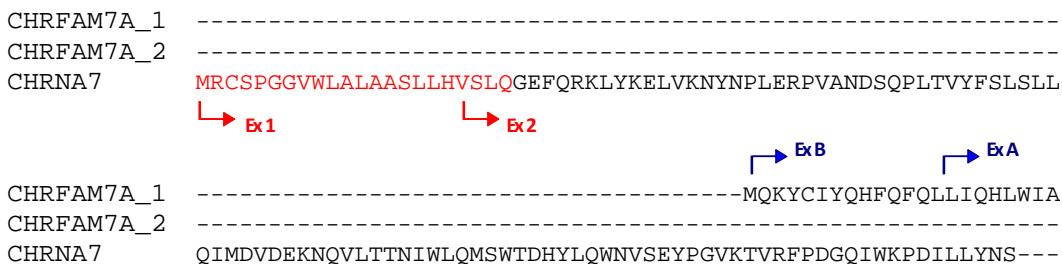




Fig.4.17 – A) Rappresentazione schematica della struttura delle proteine codificate da CHRNA7 e CHRFAM7A. I domini TM e il C-terminale sono comuni a tutte e tre le isoforme, cambia invece il dominio N-terminale. **B)** Allineamento delle sequenze proteiche delle tre isoforme. Sono evidenziati: i domini *trasmembrana*, i domini *citoplasmatici*, la *sequenza del peptide segnale*. Le frecce blu indicano l'inizio degli esoni B e A, della forma 201; le frecce rosse indicano l'inizio degli esoni di a7. Gli asterischi (*) indicano i residui identici tra le diverse sequenze.

Ad avvalorare questa ipotesi, recenti studi hanno evidenziato come la più lunga tra le due isoforme determini una riduzione delle correnti evocate dall'acetilcolina, quando co-espressa con la subunità $\alpha 7$ convenzionale in oociti di *Xenopus*, in maniera proporzionale alla quantità di CHFRAM7A trasfettata. Ciò

suggerisce la capacità di CHR7A, di eteromerizzare con CHR7, dando origine a recettori misti, con una ridotta capacità di generare correnti, in risposta al legame dell'acetilcolina. Questo dato mette in evidenza un ruolo dominante negativo di CHR7A, nella regolazione dell'attività e dell'espressione in membrana del recettore convenzionale (*de Lucas-Cerrillo et al., 2011; Araud et al., 2011*).

Nel nostro laboratorio è stato anche dimostrato che cellule di linee monocitarie umane (THP-1, U937, Mono-Mac-6) esprimono esclusivamente la forma duplicata e che, in seguito a trattamento con uno stimolo pro-infiammatorio (LPS), la sua espressione diminuisce attraverso un meccanismo trascrizionale mediato da NFkB (*Benfante et al., 2011*).

Inoltre, anche culture primarie di monociti e macrofagi umani mostrano livelli di espressione della variante duplicata 200-1000 volte maggiori rispetto alla forma convenzionale. Nelle stesse colture, dopo stimolazione con LPS, oltre alla riduzione dei livelli di CHR7A, si assiste ad un aumento di espressione della forma convenzionale CHR7.

Tutti questi dati suggeriscono un coinvolgimento della forma duplicata nella regolazione dei livelli di recettore $\alpha 7$ sulla superficie cellulare. Se così fosse, CHR7A potrebbe giocare un ruolo nel "pathway colinergico anti-infiammatorio", regolando il numero di recettori in grado di legare l'acetilcolina rilasciata dal nervo vago. Tuttavia, manca in letteratura un dato che dimostri l'effettiva interazione tra le due proteine. Allo scopo di approfondire e verificare quest'ipotesi, in vista di esperimenti futuri di immunoprecipitazione, che fornirebbero la conferma definitiva di una reale interazione, abbiamo deciso di generare dei "tools" che ci permettano di distinguere le diverse isoforme, in modo da poterne studiare anche la localizzazione cellulare, con esperimenti di immunofluorescenza.

4.7 Strategia per lo studio delle isoforme derivate da CHR7A

Come primo approccio, abbiamo pensato di generare anticorpi specifici, che permettessero di discriminare tra le diverse varianti. Tuttavia, l'isoforma 202 è identica alla proteina convenzionale, anche se troncata degli esoni 1-5, che corrispondono al dominio di interazione col ligando. Pertanto, non è possibile generare anticorpi indirizzati esclusivamente verso questa isoforma. Inoltre, anche la maggior parte della sequenza di CHR7A-201 (esoni 5-10) presenta un'omologia del 100% con quella di CHR7. Di conseguenza, l'unica porzione peptidica, utilizzabile per la generazione di anticorpi selettivi per CHR7A, è risultata essere il tratto amminoacidico posto all'N-terminale della forma 201 (fig.4.18)



Fig.4.18 – Sequenza peptidica corrispondente ai primi 27 aminoacidi dell’isoforma 201, utilizzabile per la generazione di un anticorpo specifico.

L’analisi più approfondita del peptide selezionato, che è costituito soltanto dai primi 27 aminoacidi dell’ isoforma 201, ha messo in evidenza un’elevata idrofobicità del tratto di sequenza in esame, tale da renderlo inadatto alla generazione di un anticorpo, per insolubilità del peptide sintetizzato. Il grafico sottostante, ottenuto da un’analisi in silico utilizzando il sito “www.expasy.org/tools/protscale”, riporta il valore degli indici di idrofobicità (asse Y), calcolati sulla base delle proprietà idrofobiche di ciascun residuo (secondo la scala Kyte and Doolittle), in funzione della posizione lungo la sequenza (asseX). Il risultato rappresenta il profilo di idrofobicità del peptide, che risulta per la maggior parte superiore a zero e quindi, altamente idrofobico.

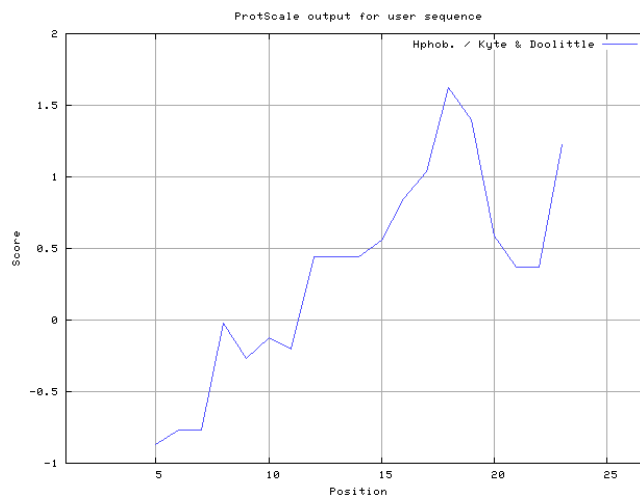


Fig.4.19 - Analisi bioinformatica del profilo di idrofobicità (secondo la scala Kyte & Doolittle) del peptide selezionato, dal sito : <http://www.expasy.org/tools/protscale.html>.

Dunque, al momento disponiamo solo di un anticorpo il cui epitopo antigenico è localizzato nel dominio citoplasmatico, posto tra il terzo e il quarto segmento transmembrana, una porzione comune a tutte e tre le proteine (anti α 7-848) (Gotti *et al.*, 1995). Per tale ragione, non potendo disporre di anticorpi specifici in

grado di discriminare tra le diverse isoforme, si è reso necessario il loro clonaggio in vettori di espressione contenenti un “tag”, per poterle visualizzare a livello intracellulare.

Abbiamo amplificato le sequenze codificanti per CHRNA7 e per le due isoforme proteiche originate da CHR7A a partire da cDNA di IMR32 e THP-1 e le abbiamo clonate nel vettore pCDNA3.1 Myc His, in modo da risultare “in frame” con il tag. La traduzione di questi costrutti determina l’espressione di proteine di fusione, con l’epitopo Myc, seguito da una coda di istidine, al C-terminale.

4.8 Trasfezioni transienti con i costrutti taggati Myc in cellule Hela

I costrutti plasmidici generati, contenenti le proteine di interesse col tag Myc His, sono stati testati, singolarmente, in esperimenti di trasfezione transiente, in cellule Hela. Quindi, sono stati analizzati in esperimenti di western blot ed immunofluorescenza.

Per l’analisi biochimica di western blot abbiamo utilizzato estratti proteici totali da cellule Hela. Per la rilevazione abbiamo utilizzato l’anticorpo anti α 7-848.

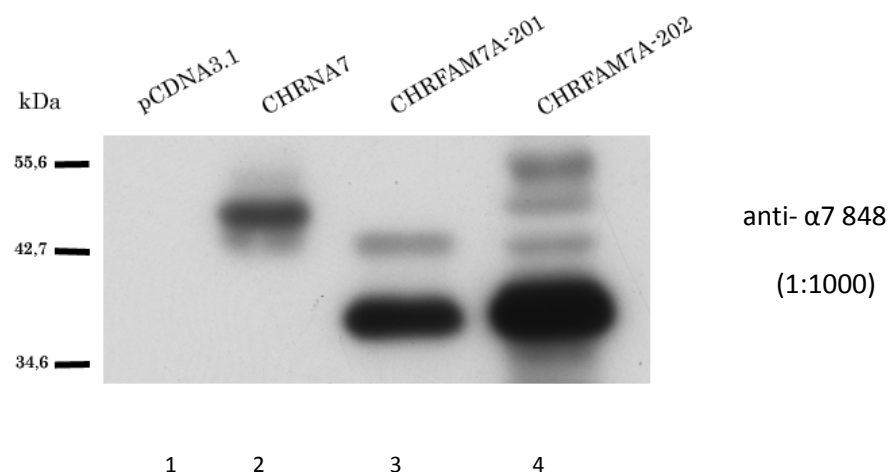


Fig.4.20 –30 μ g di estratti proteici totali, ottenuti da cellule Hela, trasfettate con α 7-Myc His, CHR7A-201 myc His e CHR7A-202 Myc His, sono stati caricati su gel di poliaccrilammide al 10% e analizzati tramite western blot. E’ stato utilizzato l’anticorpo primario contro α 7(1:1000) e un anticorpo secondario anti rabbit coniugato alla perossidasi (1:100.000). L’immagine mostra il segnale ottenuto da un’esposizione di 10 secondi.

L'analisi ha evidenziato la presenza di una banda del peso molecolare di 50 kDa , nella linea corrispondente a CHRNA7 (linea 2). Per quanto riguarda CHRFA7A-202 (lane 4), è evidente la banda da 36 kDa, che indica una buona espressione del costrutto. L'isoforma CHRFA7A-201, invece, presenta due bande, di circa 42 e 36 kDa, rispettivamente. Di queste, la prima banda ha un peso che corrisponde a quello dell'isoforma 201, ma risulta meno espressa, rispetto alla banda da 36 kDa. E' probabile che vengano tradotte due proteine, a partire dai due differenti ATG, localizzati nell'esone B e nell'esone 6 della sequenza codificante. In particolare, è evidente una netta preferenza per il secondo codone d'inizio (nell'esone 6), dimostrata dalla maggiore intensità della banda da 36 kDa, che, infatti, migra come la proteina ottenuta trasfettando il costrutto per la forma corta (lane 4).

Per gli esperimenti di immunofluorescenza, cellule Hela trasfettate con i costrutti taggati Myc His, sono state fissate 48 ore dopo la trasfezione e analizzate con un anticorpo diretto contro il tag (anti-myc, Sigma Aldrich, in rosso in fig. 4.21), e un anticorpo diretto contro $\alpha 7$ (Gotti et al., 1995; in verde in fig. 4.21), che riconosce anche le forme CHRFA7A-201 e 202, perché indirizzato verso una sequenza comune, situata nel loop citoplasmatico. Abbiamo deciso di utilizzare cellule Hela, che non esprimono endogenamente CHRNA7 e CHRFA7A, in modo da valutare solo il segnale proveniente dai costrutti trasfettati. La colocalizzazione indica la corretta espressione del tag.

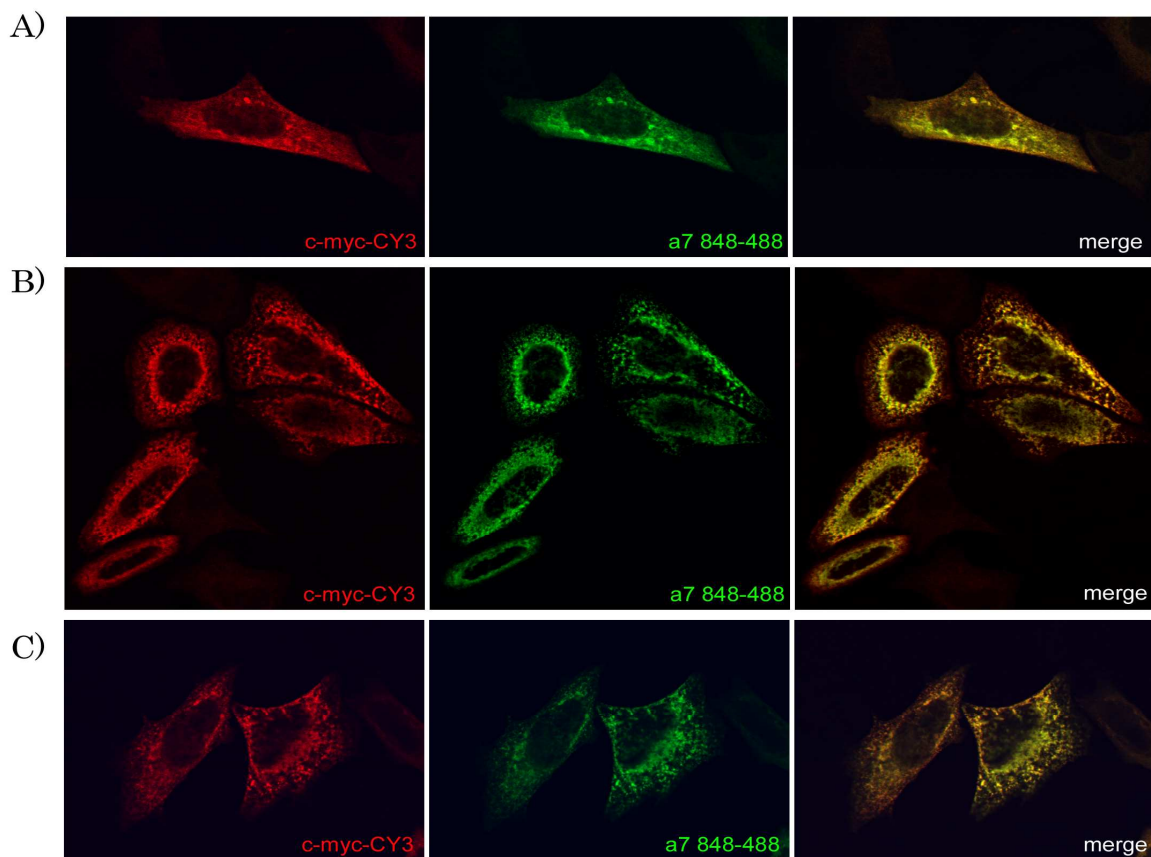


Fig.4.21 – 50.000 cellule HeLa sono state piastrate su vetrino e trasfettate 24 ore dopo con il DNA dei costrutti generati: $\alpha 7$ -201 e 202 in pCDNA3.1 Myc His. 48 ore dopo la trasfezione, i vetrini sono stati fissati in paraformaldeide 4%, per 20 minuti, e successivamente colorati con anticorpi contro Myc (in rosso) e contro $\alpha 7$ (in verde). L'analisi di immunofluorescenza è stata effettuata con un microscopio confocale L510 Meta Zeiss, con un obiettivo ad ingrandimento 60X. **A)** HeLa trasfettate con $\alpha 7$ -Myc His; **B)** HeLa trasfettate con 201-Myc His; **C)** HeLa trasfettate con 202-Myc His.

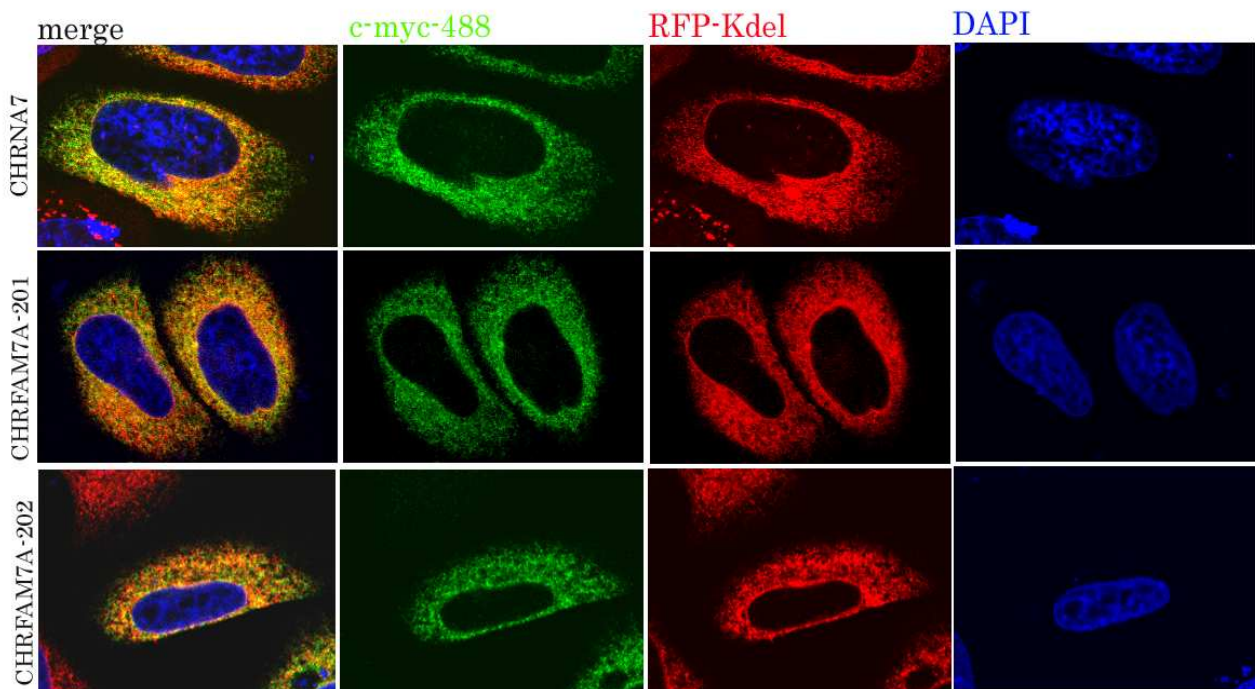


Fig.4.22 – 50.000 cellule HeLa sono state piastrate su vetrino e trasfettate 24 ore dopo con il DNA dei costrutti taggati Myc His e con il costrutto pKDEL-RFP, che contiene la sequenza di ritenzione nel reticolo endoplasmatico (KDEL), coniugata alla RFP (in rosso). 48 ore dopo la trasfezione, i vetrini sono stati fissati in paraformaldeide 4%, per 20 minuti, e successivamente colorati con un anticorpo contro Myc (in verde). I nuclei sono stati marcati con colorante DAPI. L'analisi di immunofluorescenza è stata effettuata con un microscopio confocale L510 Meta Zeiss, con un obiettivo ad ingrandimento 60X.

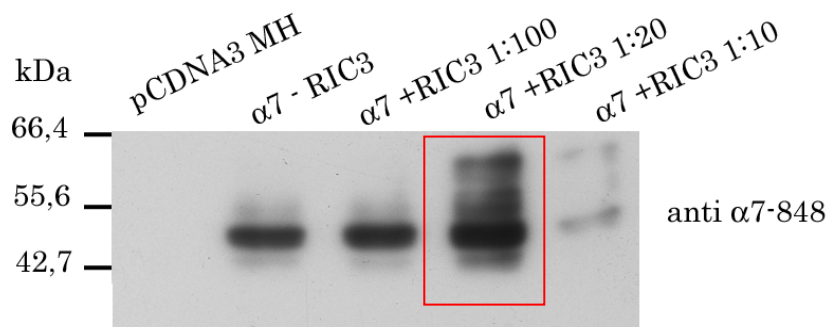
Tuttavia, la maggior parte del segnale è localizzato a livello del reticolo endoplasmatico, come dimostra la colocalizzazione dei costrutti taggati Myc con il costrutto pKDEL-RFP, contenente la sequenza di ritenzione nel reticolo endoplasmatico KDEL (Lys-Asp-Glu-leu), fusa al C-terminale con la red fluorescence protein (RFP) (figura 4.22). La prevalente concentrazione di CHRNA7, CHRFA7A-201 e CHRFA7A-202 nel reticolo endoplasmatico può essere spiegata, oltre che dalla grande quantità di proteina tradotta (siamo infatti in

condizione di overespressione), dalla mancanza di apposite chaperone, necessarie per il corretto assemblaggio e inserimento in membrana delle proteine. In particolare, è nota dalla letteratura l'esistenza di una chaperone specifica per $\alpha 7$: RIC3. Recettori $\alpha 7$ funzionali sono molto difficili da ottenere in tutte le linee cellulari di mammifero (Vallès *et al.*, 2009). La presenza di RIC3 è fondamentale per il corretto folding del recettore e affinché possano avere luogo le modificazioni post-traduzionali necessarie alla sua completa maturazione.

Al fine di migliorare l'espressione delle proteine taggate e, in particolare, di stimolarne il corretto assemblaggio, per incrementare i livelli in membrana, abbiamo deciso di clonare la sequenza della chaperone RIC3 in un vettore di espressione, in modo da poterla co-trasfettare con i nostri costrutti. Quindi, abbiamo amplificato RIC3 da cellule SHSY5Y, che esprimono endogenamente CHRNA7 e CHRFA7A e possiedono la chaperone specifica, e l'abbiamo clonata nel vettore pcDNA3.0.

4.9 Esperimenti di co-trasfezione dei costrutti taggati Myc con la chaperone RIC3

Abbiamo pensato di co-trasfettare, in cellule Hela, il DNA dei costrutti di CHRNA7 e delle due isoforme derivate dal gene CHRFA7A, insieme a quello di RIC3. E' noto dalla letteratura che elevate quantità di chaperone possono risultare in una ridotta espressione del recettore, che viene trattenuto in aggregati a livello del reticolo endoplasmatico, mentre quantità ridotte ne favoriscono i processi di maturazione post-traduzionale (Alexander *et al.*, 2010). Abbiamo messo a punto l'esperimento, trasfettando diverse quantità di RIC3, in rapporto al DNA del costrutto $\alpha 7$ -Myc His e, dai dati di western blot ottenuti (Fig. 4.23), abbiamo deciso di utilizzare un rapporto DNA-RIC3 :DNA- $\alpha 7$ di 1:20.



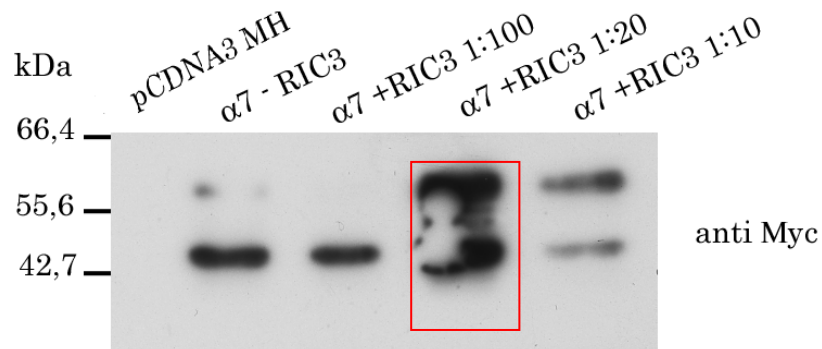


Fig. 4.23 - Cellule HeLa trasfettate con $\alpha 7$ -Myc His e diverse quantità di RIC3. In particolare, abbiamo usato rapporti $\mu\text{g DNA } \alpha 7$: $\mu\text{g DNA RIC3}$ pari a 1:100; 1:20; 1:10. 30 μg di estratti proteici totali, ottenuti da ciascun campione, sono stati caricati su gel di poliaccrilammide al 10% e analizzati tramite western blot. Sono stati utilizzati anticorpi primari contro CHRNA7 (1:1000) e contro il tag Myc (1:1000). Come anticorpi secondari abbiamo utilizzato, rispettivamente, un anti-rabbit e un anti mouse, entrambi coniugati alla perossidasi.

Abbiamo quindi trasfettato tutte e tre le isoforme proteiche taggate insieme alla chaperone, in rapporto 1:20, e le abbiamo successivamente analizzate in western blot (fig.4.24).

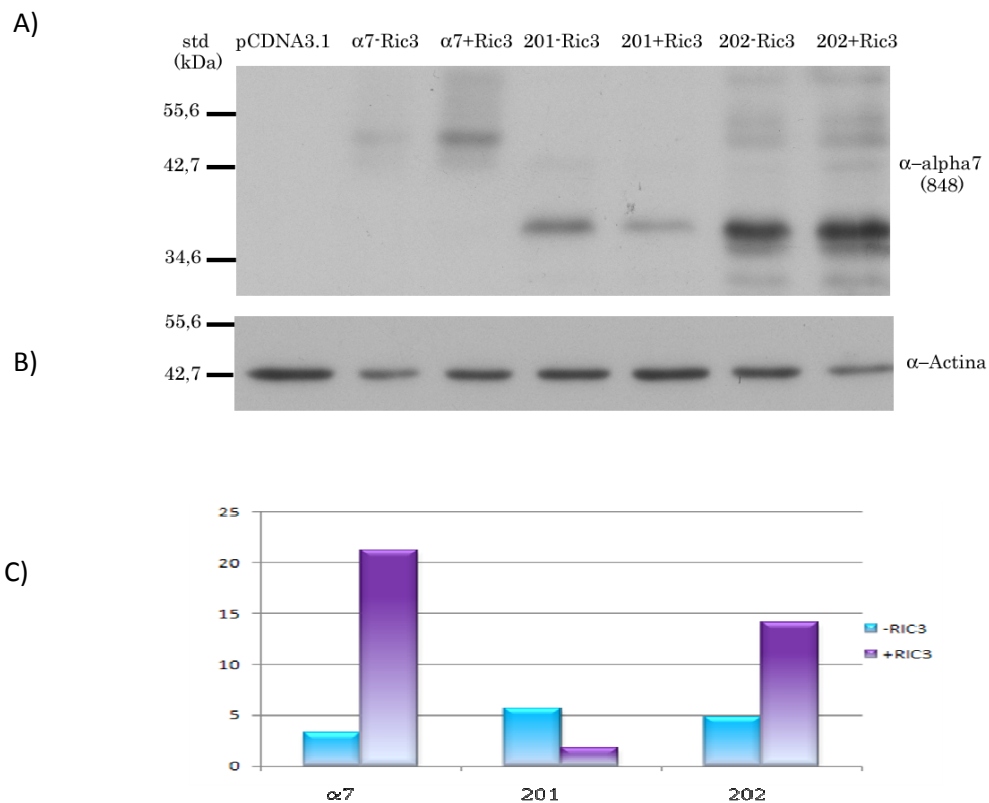


Fig 4.24 – A) Cellule Hela trasfettate con $\alpha 7$ -Myc His, FAM7A-201 myc His e FAM7A-202 Myc His, con o senza la chaperone RIC3. 30 μ g di estratti proteici totali, ottenuti da ciascun campione, sono stati caricati su gel di poliaccrilammide al 10% e analizzati tramite western blot. E' stato utilizzato l'anticorpo primario contro CHRNA7 (1:1000) e un anticorpo secondario anti-rabbit coniugato alla perossidasi (1:100.000). L'immagine mostra il segnale ottenuto da un'esposizione di 10 secondi. **B)** Stessi campioni del pannello A, colorati con un anticorpo anti-actina, per la normalizzazione. **C)** Quantificazione del western blot. La banda di ciascun campione è normalizzata in base al rispettivo segnale dell'actina.

L'immagine del western blot e la successiva quantificazione, mostrano un incremento nei livelli di espressione di CHRNA7 e dell'isoforma corta di CHR FAM7A, in presenza di RIC3. Per quanto riguarda l'isoforma lunga (CHR FAM7A-201), invece, la co-trasfezione con la chaperone sembra addirittura ridurre l'espressione della proteina. Inoltre, dopo un'esposizione di 10 secondi, è visibile solo la banda da 36 kDa, mentre ad esposizioni maggiori compare anche la banda da 42kDa (fig.4.25).

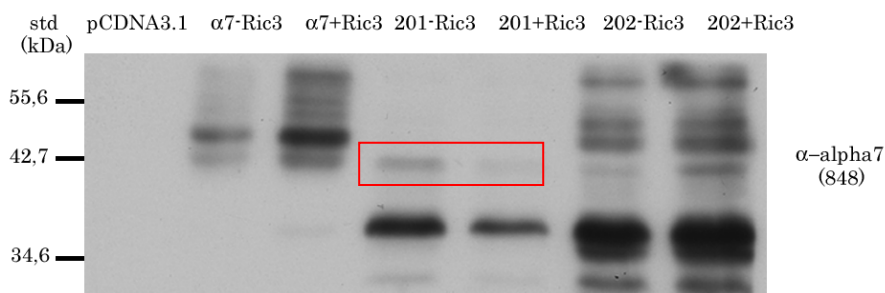


Fig.4.25 – Stesso esperimento mostrato in figura 4.37 A. L'immagine mostra il segnale ottenuto da un'esposizione di 30 secondi. Il riquadro rosso indica la banda da 42 kDa, della proteina CHR FAM7A-201.

Anche in questo caso, quindi, viene preferito il codone d'inizio posto nell'esone 6, determinando un'espressione preponderante della forma più corta (36kDa). Non è da escludere l'ipotesi che CHR FAM7A richieda altre chaperone, differenti o in aggiunta a RIC3, non espresse dalla linea cellulare utilizzata. Al momento, tuttavia, non sono note in letteratura chaperone specifiche per la proteina CHR FAM7A-201. Inoltre, prossimi esperimenti prevedono anche la mutagenesi dell'ATG localizzato nell'esone 6, della sequenza codificante per l'isoforma 201, al fine di forzare l'espressione della forma più lunga da 42 kDa.

Abbiamo anche condotto esperimenti di immunofluorescenza, dopo co-trasfezione in cellule HeLa, dei costrutti taggati Myc-His insieme con RIC3 (fig.4.26). Per l'analisi abbiamo utilizzato anticorpi anti $\alpha 7$ -848 (in verde) e anti-Myc (in rosso). Per la marcatura dei nuclei (in blu), è stato utilizzato il colorante nucleare DAPI.

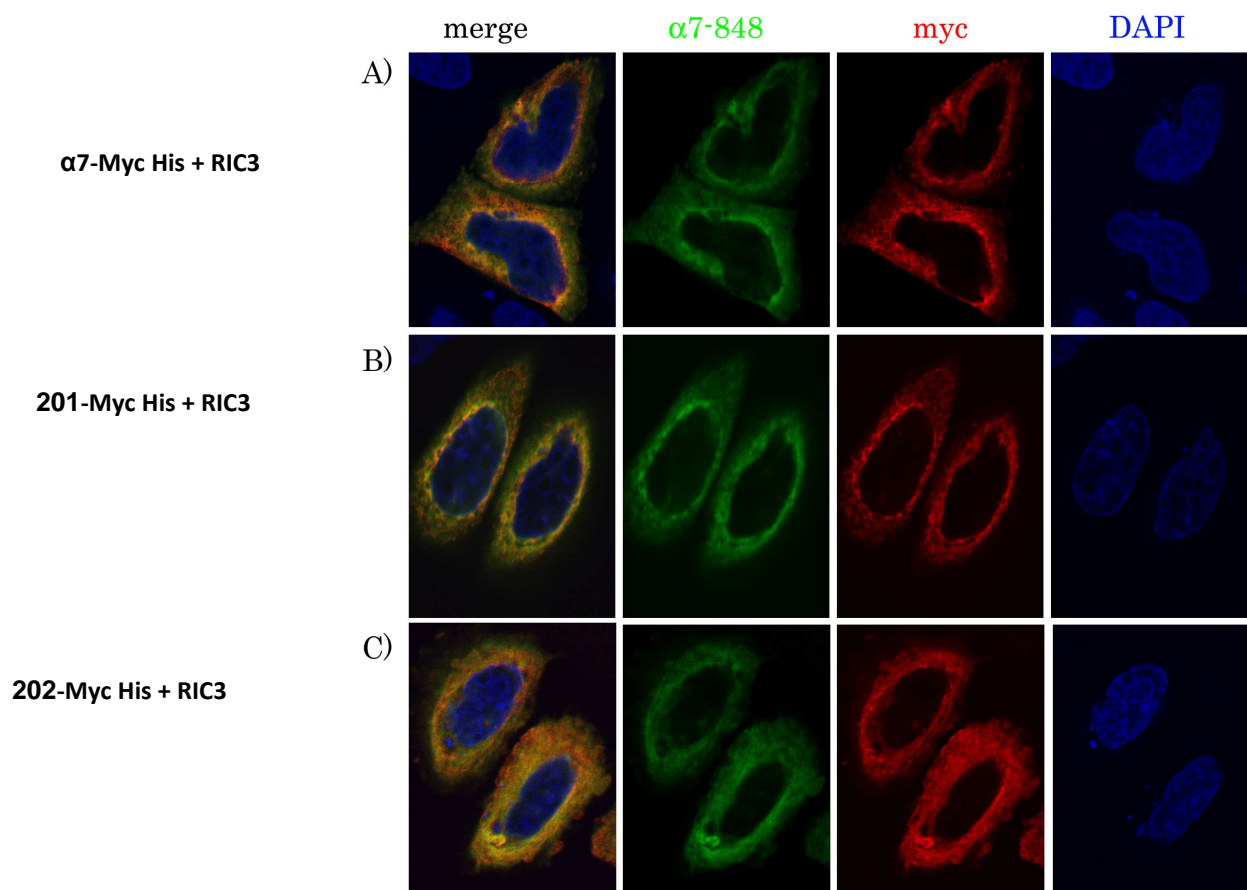


Fig.4.26 - 50.000 cellule HeLa sono state piastrate su vetrino e trasfettate 24 ore dopo con il DNA dei costrutti $\alpha 7$ -201 e 202 in pCDNA3.1 Myc His, insieme al DNA della chaperone RIC3. 48 ore dopo la trasfezione, i vetrini sono stati fissati in paraformaldeide 4%, per 20 minuti, e successivamente colorati con anticorpi contro Myc (in rosso) e contro $\alpha 7$ (in verde). In blu sono visibili i nuclei (colorazione col colorante DAPI). L'analisi di immunofluorescenza è stata effettuata con un microscopio confocale L510 Meta Zeiss, con un obiettivo ad ingrandimento 40X. **A)** HeLa trasfettate con $\alpha 7$ -Myc His + RIC3; **B)** HeLa trasfettate con 201-Myc His + RIC3; **C)** HeLa trasfettate con 202-Myc His + RIC3.

Dall'osservazione del pannello non si notano evidenti differenze nell'espressione dei costrutti a livello intracellulare, rispetto all'esperimento condotto in assenza della chaperone (fig.4.21). Continua ad esserci

un forte segnale proveniente dal reticolo endoplasmatico e il contorno cellulare non appare netto e distinguibile, suggerendo che la proteina non raggiunge correttamente la superficie. Questa affermazione è stata verificata con un esperimento di immunofluorescenza, in cui la membrana plasmatica è stata marcata con Concanavalina A, una lectina in grado di legare glicolipidi e glicoproteine di membrana, marcando in modo specifico la superficie cellulare. L'esperimento è stato condotto in cellule Hela, trasfettate con il costrutto $\alpha 7$ -Myc His e con RIC3. La rilevazione è stata effettuata mediante anticorpo anti $\alpha 7$ -848 (fig.4.27, in verde), mentre per la Concanavalina A-biotinilata, abbiamo utilizzato streptavidina-TX red (fig.4.27, in rosso).

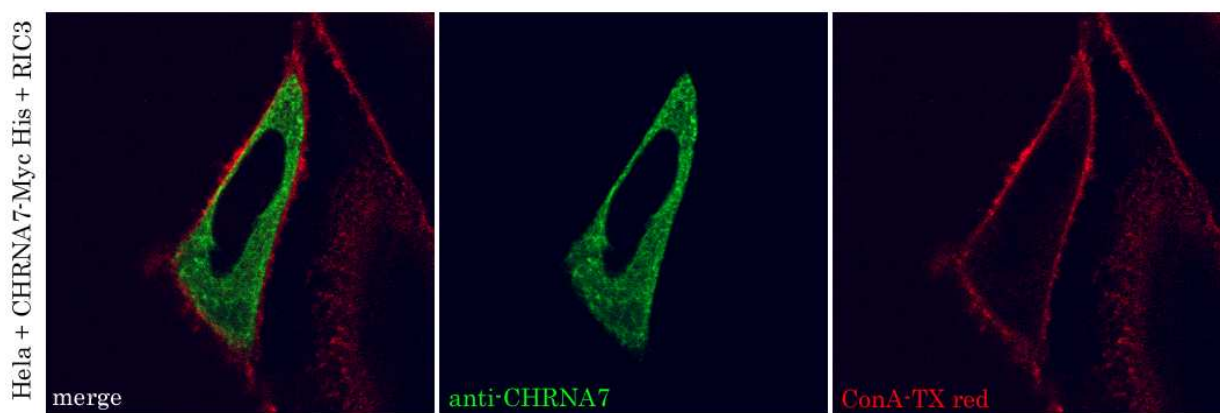


Fig.4.27.- 50.000 cellule Hela sono state piastrate su vetrino e trasfettate 24 ore dopo con il DNA del costrutto $\alpha 7$ in pCDNA3.1 Myc His, con RIC3 (pannello A) o senza (pannello B). 48 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state trattate con Concanavalina A biotinilata, per 30 minuti a 4°C e, successivamente, fissate in paraformaldeide 4%, per 20 minuti. La rilevazione è stata fatta con un anticorpo contro $\alpha 7$ (in verde) e con streptavidina-TX red. L'analisi di immunofluorescenza è stata effettuata con un microscopio confocale BioRad, con un obiettivo ad ingrandimento 60X.

L'assenza di colocalizzazione tra $\alpha 7$ e il marcatore di superficie, conferma l'incapacità del recettore di localizzarsi correttamente in membrana, anche in presenza della specifica chaperone RIC3. Saranno effettuati, tuttavia, successivi esperimenti anche con altri marcatori di membrana. Inoltre, dal momento che l'espressione eterologa di $\alpha 7$ è strettamente influenzata dalla linea cellulare (Cooper and Millar, 1997), ripeteremo gli esperimenti appena descritti in SHSY5Y, che risultano tra le linee in grado di generare recettori funzionali, e in cellule THP-1, che esprimono endogenamente le due isoforme codificate dal gene CHRFAM7A. Le THP-1, in particolare, da noi utilizzate come modello in cui studiare il ruolo di CHRFAM7A e

CHRNA7 nella risposta infiammatoria, crescono in sospensione. Per tale ragione, l'adesione delle cellule al vetrino e il fissaggio risultano passaggi critici, ancora da migliorare, in vista di futuri esperimenti di immunofluorescenza; attualmente stiamo cercando di mettere a punto un protocollo che ci permetta di fare aderire le cellule al vetrino dopo trasfezione.

Allo scopo di poter eseguire delle co-trasfezioni e, in seguito, esperimenti di immunoprecipitazione, per valutare la possibilità che la forma convenzionale e la duplicata si assemblino a formare recettori eteromerici, abbiamo pensato di clonare le sequenze anche in un secondo vettore di espressione, con un diverso tag al C-terminale, il plasmide pCDNA3.1 V5 His.

Purtroppo, nonostante il risultato positivo del sequenziamento, questi costrutti non si esprimono correttamente nè in immunofluorescenza, nè, soprattutto, in western blot, dove non si rileva alcun segnale in corrispondenza delle bande attese. Per questo motivo, non è ancora stato possibile eseguire co-trasfezioni ed esperimenti di immunoprecipitazione.

E' noto da tempo che anticorpi conformazionali non sono in grado di riconoscere e legare $\alpha 7$ in linee cellulari che mancano dei corretti apparati per l'assemblaggio del recettore (*Cooper and Millar, 1997*). Dunque, il folding della proteina gioca un ruolo chiave non solo nella sua espressione funzionale, ma anche nella sua rilevazione mediante specifici anticorpi. E' anche possibile che l'aggiunta del tag V5, al dominio C-terminale, possa in qualche modo alterare la conformazione della proteina, interferendo con la sua rilevazione.

5-DISCUSSIONE

Il recettore nicotino $\alpha 7$ (CHRNA7) ha un ruolo chiave nel sistema nervoso, dove agisce modulando il rilascio di neurotrasmettitori e favorendo la trasmissione sinaptica. Recentemente, è emersa l'importanza di questo recettore anche in contesti non neuronali. CHRNA7, infatti, è espresso anche nelle cellule del sistema immunitario ed è fondamentale nel controllo dei livelli di infiammazione sistemica, attraverso il "pathway colinergico anti-infiammatorio", di cui è parte fondamentale (Tracey, 2009). Il gene CHRNA7 è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 15, nella regione 15q11.2-13.3, una regione genomica con un'elevata incidenza di eventi di ricombinazione, come delezioni e duplicazioni. Uno di questi eventi di duplicazione, avvenuto recentemente da un punto di vista evolutivo, ha dato origine ad un nuovo gene ibrido, CHRFA7A, in cui gli esoni 5-10 del gene CHRNA7 si sono fusi con gli esoni C, B e A del gene per la serin-treonin chinasi ULK4 e con un esone D, di provenienza ignota. Questo nuovo gene, presente solo nell'uomo, mostra un'omologia del 100% con il gene CHRNA7, nella porzione corrispondente agli esoni 5-10, mentre differisce per il dominio N-terminale e manca del sito di legame per l'acetilcolina. La funzione di CHRFA7A è ancora sconosciuta. Tuttavia, un recente lavoro del nostro laboratorio (Benfante et al., 2011), dimostra che i livelli di espressione di CHRFA7A in colture primarie di macrofagi umani, sono controllati da un meccanismo trascrizionale mediato da NF- κ B, uno dei principali fattori di trascrizione che regola i geni coinvolti nell'infiammazione. Inoltre, il trattamento di colture primarie macrofagiche con uno stimolo pro-infiammatorio, l'LPS, causa un incremento dei livelli di espressione della forma convenzionale, CHRNA7, mentre determina una down-regolazione della trascrizione della forma duplicata, CHRFA7A. Questa differenza nell'effetto mediato dall'LPS sull'espressione delle diverse subunità del recettore $\alpha 7$, avvalorava l'ipotesi di un ruolo di CHRFA7A, nella modulazione dell'attività del pathway colinergico anti-infiammatorio.

La regione regolatoria di CHRFA7A non è ancora stata identificata, anche a causa dell'elevato grado di ricombinazione del locus genico in cui è localizzata. In alcuni soggetti CHRFA7A è assente, altri, invece, presentano un polimorfismo costituito dalla delezione di due paia di basi (associato a schizofrenia e disturbi bipolari), che risulta in linkage disequilibrium con l'inversione del gene, che si viene così a trovare nello stesso orientamento di CHRNA7. Tuttavia, la notevole distanza tra i due geni, 1.6 Mb, sembra escludere la possibilità che esista un'unica regione regolatoria in grado di regolare la trascrizione di entrambi.

La regione genomica comprendente le 2196 bp a monte dello start di trascrizione nell'esone B, clonata in un vettore reporter al fine di identificare il promotore di CHRFA7A, non ha però mostrato alcuna attività significativa, con livelli trascrizionali più bassi del vettore vuoto (senza frammento). Ciò potrebbe essere

dovuto alla mancanza di elementi regolatori positivi, enhancer, presenti a monte della porzione genomica clonata, o, viceversa, alla presenza di elementi regolatori negativi, in grado di reprimere l'espressione del gene.

Abbiamo effettuato esperimenti di 5'RACE, per mappare il 5'UTR dell'mRNA del gene e verificare che il sito di inizio della trascrizione, predetto dall'analisi di sequenze EST a -569 bp rispetto all'ATG presente nell'esone B, coincida effettivamente con lo "start" fisiologico. Grazie a questa analisi abbiamo identificato più siti di inizio della trascrizione, a seconda del tipo cellulare considerato.

Colture primarie di macrofagi esprimono due differenti trascritti, con e senza l'esone B. Il sito di inizio della trascrizione si trova a -771 bp, indicando una diversa lunghezza dell'esone D rispetto a quella predetta dall'analisi di sequenze EST. Inoltre, l'assenza del tratto compreso tra le basi -702/-208 suggerisce che si tratti di una sequenza intronica. Questo potrebbe anche spiegare i risultati negativi ottenuti dalle trasfezioni del costrutto full-length, in quanto la presenza della regione intronica potrebbe aver interferito negativamente con l'espressione del gene reporter. Nella linea cellulare THP-1, il trascritto corrispondente all'isoforma 1, contenente l'esone B, presenta un differente sito di inizio della trascrizione, localizzato 447 paia di basi a monte dell'ATG (esone B), conservando parte della sequenza intronica, inizialmente identificata come esone D. Il gene *CHRFAM7A*, così come *CHRNA7*, è espresso anche nella linea cellulare di neuroblastoma umano SHSY5Y. In queste cellule, a differenza dei macrofagi, dove la subunità maggiormente espressa è *CHRFAM7A* (200-1000 volte in più rispetto a *CHRNA7*), i livelli di espressione di *CHRNA7* sono il doppio rispetto a quelli del gene duplicato. Gli esperimenti di 5'RACE hanno identificato un unico sito di inizio per *CHRFAM7A*, in queste cellule, posto a -415 paia di basi dall' ATG. L'esistenza di differenti siti di inizio della trascrizione nei diversi tipi cellulari, suggerisce l'esistenza di promotori alternativi, che potrebbero anche spiegare le differenze nei livelli di espressione del gene *CHRFAM7A*.

Basandoci sui dati ottenuti dagli esperimenti di 5'RACE, abbiamo generato una serie di costrutti, in accordo con i siti di inizio della trascrizione identificati. L'ipotesi sulla natura intronica della sequenza compresa tra le basi -702/-208 è stata confermata dall' incremento dell'attività trascrizionale del costrutto (3 volte, rispetto al vettore vuoto e 10 volte, rispetto al costrutto full-length), ottenuto in seguito alla delezione della regione del 5'UTR. Un altro possibile elemento regolatorio negativo è rappresentato dalla sequenza Alu, localizzata nella regione -1155/-821. E' noto dalla letteratura che sequenze Alu siano in grado di influenzare la trascrizione genica, se poste vicino a promotori, sia positivamente, sia negativamente (*Fornasari et al.,1996*). La delezione di questa porzione ha determinato un ulteriore aumento dell'attività del promotore (5 volte superiore al vettore vuoto e 17 volte superiore al costrutto full length), confermando il ruolo negativo della sequenza Alu sull'espressione del gene reporter.

Precedenti dati del nostro laboratorio (*Benfante et al., 2011*) hanno mostrato che l'LPS è in grado di down-regolare l'espressione di CHR7A, attraverso un meccanismo trascrizionale mediato da NF- κ B. L'analisi in silico ha predetto tre putativi siti di legame per questo fattore di trascrizione, uno localizzato a -1670 bp e gli altri due, posti circa 2000 paia di basi a monte della regione clonata. Questa porzione genomica potrebbe contenere anche altri elementi regolatori positivi, in grado di aumentare l'attività trascrizionale del promotore. Tuttavia, esperimenti col costrutto contenente le 4000 paia di basi a monte dell' ATG (nell'esone B di CHR7A), con delezione della porzione corrispondente al 5' UTR e/o la sequenza Alu, non hanno evidenziato un incremento dell'attività del promotore, sul gene reporter. E' possibile che questa regione contenga degli elementi "silencer", in grado di influenzare negativamente l'attività trascrizionale, oppure, in alternativa, potrebbero mancare altri elementi, ad esempio enhancer, localizzati ancora più a monte rispetto alla porzione clonata. E' noto, infatti, che queste sequenze possono essere localizzate anche a grande distanza dal sito di inizio e risultano spesso fondamentali nella regolazione dell'espressione tessuto specifica.

Oltre alla caratterizzazione del promotore di CHR7A, è anche fondamentale lo studio delle due proteine, generate per splicing alternativo da questo gene. Entrambe mantengono la sequenza corrispondente ai domini transmembrana (esoni 5-10), mentre mancano dei siti di legame per l'acetilcolina e per la bungarotossina. In particolare, l'isoforma più corta, CHR7A-202, manca di un dominio N-terminale, dal momento che è tradotta a partire dall'ATG presente nell'esone 6, mentre CHR7A-201 presenta un dominio N-terminale differente, composto dagli esoni B e A, di cui non è ancora stato identificato alcun ligando. La funzione di queste due isoforme non è nota. Alcune evidenze, in vitro, suggeriscono la presenza di recettori eteromerici, formati dall'associazione di CHR7A-201 con la subunità convenzionale α 7. In particolare, CHR7A sembra svolgere un ruolo dominante negativo nei confronti di CHR7A, regolando il numero di recettori funzionali in grado di rispondere all'ACh. Infatti, la misurazione elettrofisiologica delle correnti del Ca^{2+} , evocate dall' acetilcolina in oociti di *Xenopus*, in cui sono co-esprese CHR7A e CHR7A, mostra una riduzione proporzionale alla quantità di CHR7A presente (*De Lucas-Cerrillo et al., 2011; Araud et al., 2011*). Tuttavia, il meccanismo molecolare attraverso cui CHR7A svolge il ruolo dominante negativo su CHR7A non è chiaro e manca, in letteratura, un dato che dimostri l'effettiva interazione tra le due proteine. Abbiamo generato dei costrutti in cui le sequenze di CHR7A, CHR7A-201 e CHR7A-202 sono fuse al tag Myc al dominio C-terminale, al fine di discriminare tra le diverse isoforme e di studiarne la localizzazione intracellulare. Mentre CHR7A e CHR7A-202 si esprimono correttamente, l'isoforma 201 viene tradotta a partire dai due differenti ATG (esone B-esone6), generando due bande in western blot. L'intensità delle bande suggerisce una maggiore espressione dell'isoforma corta, da 36 kDa. Non abbiamo evidenze sul fatto che questa preferenza,

riscontrata in vitro, possa avere una qualche rilevanza e contribuire alla delucidazione del ruolo di CHRFA7A. I costrutti trasfettati mancano delle sequenze introniche, del 5' e del 3' non tradotti, che potrebbero, in vivo, influenzare lo splicing a favore dell'una o dell'altra isoforma. Inoltre, in letteratura, non ci sono dati che dimostrino che l'isoforma effettivamente espressa, in grado di determinare la riduzione delle correnti del Ca^{2+} , sia CHRFA7A-201.

L'accumulo delle proteine tradotte a livello del reticolo endoplasmatico, dimostrato dalla co-localizzazione col costrutto pKDEL-RFP, può essere spiegato dal fatto che la maturazione del recettore nicotinic $\alpha 7$ è un processo molto complesso, che include una serie di step, che hanno luogo a livello della membrana luminale del reticolo endoplasmatico (ER). Solo i recettori correttamente assemblati sono trasportati alla membrana plasmatica. E' possibile che i costrutti vadano incontro ad un' alterata maturazione o ad un' incompleta associazione delle subunità, che impediscono la formazione di recettori funzionali sulla superficie cellulare. Inoltre, l'accumulo potrebbe essere dovuto all'assenza di proteine indispensabili per il corretto assemblaggio del recettore, come la chaperone RIC3, che è noto essere specifica per $\alpha 7$ (Halevi et al., 2003; Vallès et al., 2009; Vallès et al., 2012). La co-trasfezione di RIC3, insieme ai costrutti taggati Myc His, infatti, determina un incremento dei livelli di CHRNA7 e CHRFA7A-202, in western blot. Si osserva, tuttavia, una riduzione dei livelli di CHRFA7A-201. E' noto in letteratura che la presenza di RIC3 determini un incremento della quantità del recettore DEG-3/DES-2 (recettore nicotinic presente in *C. elegans*) e del recettore nAChR $\alpha 7$, quando espressi in oociti di *Xenopus* (dimostrato da esperimenti di western blot - Ben-Ami et al., 2005; Valles et al., 2012; Castillo et al., 2005). In particolare, la presenza di RIC3 determina un aumento dei livelli di DEG-3/DES-2, attraverso un meccanismo post-traduzionale, che aumenta la stabilità della proteina (Ben-Ami et al., 2005). RIC3, oltre ad incrementare l'espressione eterologa di $\alpha 7$, può interagire anche con altri recettori nicotinic, come $\alpha_3\beta_4$ e $\alpha_4\beta_2$, inibendone però l'espressione funzionale (Halevi et al., 2003). I nostri dati di western blot confermano quanto riportato in letteratura, per quanto riguarda l'aumento di espressione di CHRNA7 e CHRFA7A-202. La riduzione dei livelli di CHRFA7A-201 può essere spiegata attraverso un meccanismo inibitorio, mediato da RIC3, come per $\alpha_3\beta_4$ e $\alpha_4\beta_2$, oppure potrebbe suggerire l'esistenza di altre chaperone, specifiche per questa isoforma, non ancora identificate. In esperimenti di immunofluorescenza, la presenza di RIC3 non influenza l'espressione in membrana dei costrutti taggati, come dimostra il trattamento con Concanavalina A. Una possibile motivazione può essere legata al modello cellulare scelto per gli esperimenti. L'espressione funzionale di nAChR $\alpha 7$ è un processo altamente inefficiente, strettamente dipendente dalla natura della linea cellulare utilizzata (Cooper and Millar, 1997). Nella maggior parte delle linee, l'espressione eterologa di CHRNA7, risulta nell'assemblaggio di recettori non funzionali, che non legano bungarotossina e non raggiungono la superficie cellulare. E' possibile, quindi, che le cellule Hela non siano in grado di generare recettori funzionali, per mancanza di

chaperone o di qualche enzima necessario per le modificazioni post-traduzionali richieste durante la maturazione di $\alpha 7$ e delle isoforme duplicate. Se è vero che CHRFA7A interviene nella regolazione dei livelli di CHRNA7 in membrana, mediante la formazione di recettori eteromerici, è anche possibile che l'overespressione dei singoli costrutti delle isoforme duplicate non sia sufficiente alla loro espressione in membrana, ma sia necessaria la presenza della forma convenzionale perché si possano formare i recettori corretti.

Al fine di effettuare co-trasfezioni e allo scopo di effettuare esperimenti di immunoprecipitazione, abbiamo generato dei costrutti taggati V5 His. Tuttavia, è possibile che l'aggiunta del tag V5, al dominio C-terminale, possa in qualche modo aver alterato la conformazione della proteina, interferendo con la sua rilevazione. Infatti, non si ottiene alcun segnale in western blot. E' noto da tempo che anticorpi conformazionali non sono in grado di riconoscere e legare $\alpha 7$ in linee cellulari che mancano dei corretti apparati per l'assemblaggio del recettore (*Cooper and Millar, 1997*). Dunque, il folding della proteina gioca un ruolo chiave non solo nella sua espressione funzionale, ma anche nella sua rilevazione mediante specifici anticorpi. Inoltre, recenti studi hanno dimostrato che, sebbene i siti di legame per l'acetilcolina e la bungarotossina siano localizzati all'N-terminale, il dominio C-terminale è fondamentale nel determinare lo stato conformazionale della proteina e la corretta formazione di questi siti (*Rakhilin et al., 1999*). Un'alterazione a livello dell'estremità COOH potrebbe alterare il corretto assemblaggio e la funzionalità del recettore.

PROSPETTIVE FUTURE

La regione regolatoria del gene CHRFAM7A verrà meglio caratterizzata con futuri esperimenti di delezione o mutagenesi dei putativi siti regolatori. Inoltre, ci proponiamo di approfondire il ruolo di NF- κ B nella down-regolazione del gene, dopo trattamento con LPS.

Futuri esperimenti prevedono anche la mutagenesi dell'ATG presente nell'esone 6, al fine di "forzare" l'espressione della proteina CHRFAM7A-201. Ripeteremo gli esperimenti di caratterizzazione delle isoforme taggate in altri modelli cellulari: le SHSY5Y e le THP-1. Queste cellule esprimono endogenamente le proteine CHRNA7 e/o CHRFAM7A e l'espressione eterologa dei costrutti dovrebbe generare recettori funzionali. La linea THP-1 è poi un buon modello in cui studiare il ruolo di CHRFAM7A e CHRNA7 in risposta a stimoli pro-infiammatori. Uno degli obiettivi principali, inoltre, resta quello di dimostrare l'effettiva interazione delle isoforme convenzionale e duplicata, con esperimenti di immunoprecipitazione.

La possibilità che CHRFAM7A rivesta un ruolo nella regolazione della localizzazione e della funzionalità del recettore CHRNA7 convenzionale e la possibilità che possa intervenire, quindi, nella corretta modulazione della risposta ad uno stimolo pro-infiammatorio, rendono questa proteina un potenziale mediatore del "pathway colinergico anti-infiammatorio", nell'uomo. Sarebbe interessante studiare se patologie caratterizzate da un'inflammatione cronica presentino anche una dis-regolazione di questo meccanismo, dovuta non solo alla mancanza di CHRFAM7A, ma anche a difetti nella regolazione della trascrizione del gene. Inoltre, alcuni recenti lavori hanno mostrato che, nonostante i sintomi di patologie come artriti e coliti ulcerative, possano essere alleviati dal trattamento con anticorpi anti-TNF α o nicotina (*de Jonge and Ulloa, 2007; Feldmann 2002; Pullan et al., 1994*), questi trattamenti sono inefficaci nel caso di sepsi o sindrome da shock tossico, a causa dei numerosi effetti avversi della nicotina. CHRFAM7A potrebbe rappresentare, quindi, un nuovo target farmacologico per terapie anti-infiammatorie, che utilizzino agonisti selettivi e permettano trattamenti specifici, con una riduzione degli effetti collaterali.

BIBLIOGRAFIA

1. A. M. De Lucas-Cerrillo, M. C. Maldifassi, F. Arnalich, J. Renart, G. Atienza, R. Serantes, J. Crucis, A. Sanchez-Pacheco, E. Andrés-Mateos, C. Montiel "Function of partially duplicated human $\alpha 7$ nicotinic receptor subunit CHRFAM7A gene" *Journal of Biological chemistry* 286, 594-606 2011.
2. A. Monji, T. Kato, S. Kanba "Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia" *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 63, 257-265 2009
3. Alexander JK, Govind AP, Drisdell RC, Blanton MP, Vallejo Y, Lam TT, Green WN. "Palmitoylation of nicotinic acetylcholine receptors." *J Mol Neurosci.* 2010 Jan;40(1-2):12-20. doi: 10.1007/s12031-009-9246-z. Epub 2009 Aug 20.
4. Alexander JK, Sagher D, Krivoshein AV, Criado M, Jefford G, Green WN. "Ric-3 promotes alpha7 nicotinic receptor assembly and trafficking through the ER subcompartment of dendrites." *J Neurosci.* 2010 Jul 28;30(30):10112-26.
5. Araud T, Graw S, Berger R, Lee M, Neveu E, Bertrand D, Leonard S. "The chimeric gene CHRFAM7A, a partial duplication of the CHRNA7 gene, is a dominant negative regulator of $\alpha 7$ *nAChR function." *Biochem Pharmacol.* 2011 Oct 15;82(8):904-14. doi: 10.1016/j.bcp.2011.06.018. Epub 2011 Jun 28.
6. B. Riley, M. Williamson, D. Collier, H. Wilkie, A. Makoff "A 3-M b map of a large segmental duplication overlapping the $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7) at human 15q13-q14" *Genomics* 79, 197-209, 2002.
7. Ben-Ami HC, Yassin L, Farah H, Michaeli A, Eshel M, Treinin M." RIC-3 affects properties and quantity of nicotinic acetylcholine receptors via a mechanism that does not require the coiled-coil domains." *J Biol Chem.* 2005 Jul 29;280(30):28053-60. Epub 2005 Jun 2.
8. Ben-Shachar, S., Lanpher, B., German, J.R., Qasaymeh, M., Potocki, L., Nagamani, S.C., Franco, L.M., Malphrus, A., Bottenfield, G.W., Spence, J.E. et al. (2009) Microdeletion 15q13.3: a locus with incomplete penetrance for autism, mental retardation, and psychiatric disorders. *J. Med. Genet.*, 46, 382–388.
9. Block ML, Hong JS. (2005) "Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism". *Progress in neurobiology* 76: 77-98.
10. Bradford M.M.- "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
11. Brenner DE, Kukull WA, van Belle G, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Larson EB. (1993) "relationship between cigarette smoking and Alzheimer disease in a population-based case-control study". *Neurology* 43: 293-300.
12. Burghaus L, Schütz U, Krempel U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Wevers A, Lindstrom J, Schröder H." Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients." *Brain Res Mol Brain Res.* 2000 Mar 29;76(2):385-8.
13. Castillo M, Mulet J, Gutiérrez LM, Ortiz JA, Castelán F, Gerber S, Sala S, Sala F, Criado M." Dual role of the RIC-3 protein in trafficking of serotonin and nicotinic acetylcholine receptors." *J Biol Chem.* 2005 Jul 22;280(29):27062-8. Epub 2005 May 31.

14. Cooper ST, Millar NS, "Host cell-specific folding and assembly of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit." *J. Neurochem.* 1997 May;68(5):2140-51.
15. Darwin K. Berg, William G. Conroy "Nicotinic $\alpha 7$ Receptors: Synaptic Options and Downstream Signaling in Neurons" *Journal of Neurobiology* 53, 512-523 2002
16. de Jonge WJ, Ulloa L." The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation." *Br J Pharmacol.* 2007 Aug;151(7):915-29. Epub 2007 May 14.
17. De Rosa MJ, Dionisio L, Agriello E, Bouzat C, Esnadi C. (2009) "Alpha 7 nicotinic receptor modulates lymphocyte activation". *Life sciences* 85: 444-449.
18. Drisdell RC, Manzana E, Green WN. "The role of palmitoylation in functional expression of nicotinic alpha7 receptors". *J Neurosci.* 2004 Nov 17;24(46):10502-10.
19. E. Charpentier, A. Wiesner, K. Huh, R. Ogier, J. Hoda, G. Allaman, M. Raggenbass, D. Feuerbach, D. Bertrand, C. Fuhrer "alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor are negatively regulated by tyrosine phosphorylation and Src-family kinases" *Journal of Neuroscience* 25, 9836-9849, 2005.
20. Feldmann M., "Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis" *Nat Rev Immunol.* 2002 May;2(5):364-71.
21. Fornasari D, Battaglioli E, Flora A, Terzano S, Clementi F. "Structural and functional characterization of the human alpha3 nicotinic subunit gene promoter." *Mol Pharmacol.* 1997 Feb;51(2):250-61.
22. Gaimarri A, Moretti M, Riganti L, Zanardi A, Clementi F, Gotti C. (2007) "Regulation of neuronal nicotinic receptor traffic and expression". *Brain research reviews* 55: 134-143.
23. Gotti C, Briscini L, Verderio C, Oortgiesen M, Balestra B, Clementi F." Native nicotinic acetylcholine receptors in human IMR32 neuroblastoma cells: functional, immunological and pharmacological properties." *Eur J Neurosci.* 1995 Oct 1;7(10):2083-92.
24. Gotti C, Zoli M, Clementi F. (2006) "Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance". *Trends in Pharmacological sciences* 27: 482-491.
25. Green WN, Millar NS, "Ion-channel assembly". *Trends Neurosci.* 1995 18, 280-287.
26. Guan ZZ, Nordberg A, Mousavi M, Rinne JO, Hellström-Lindahl E." Selective changes in the levels of nicotinic acetylcholine receptor protein and of corresponding mRNA species in the brains of patients with Parkinson's disease." *Brain Res.* 2002 Nov 29;956(2):358-66.
27. H. Wang, H. Liao, M. Ochani, M. Justiniani, M. Lin, L. Yang, Y. Al-Abed, H. Wang, C. Metz, E. J. Miller, K. J. Tracey, L. Ulloa "Cholinergic agonist inhibit HGMB1 release and improve survival in experimental sepsis" *Nature Medicine* 10, 1216-1220 2004
28. H. Wang, M. Yu, M. Ochani, C. A. Amella, M. Tanovic, S. Susarla, J. H. Li, H. Wang, H. Yang, L. Ulloa, Y. Al-Abed, C. J. Czura, K. J. Tracey "Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation" *Nature* 421, 384-388, 2003.
29. H. Yoshikawa, M. Kurokawa, N. Ozaki "Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7" *Clinical Experimental Immunology* 146, 116-123 2006

30. Halevi S, Yassin L, Eshel M, Sala F, Sala S, Criado M, Treinin M." Conservation within the RIC-3 gene family. Effectors of mammalian nicotinic acetylcholine receptor expression" *J. Biol Chem.* 2003 Sep 5;278(36):34411-7. Epub 2003 Jun 23.
31. Helbig, I., Mefford, H.C., Sharp, A.J., Guipponi, M., Fichera, M., Franke, A., Muhle, H., de Kovel, C., Baker, C., von Spiczak, S. et al. (2009) "15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy." *Nat. Genet.*, 41, 160–162.
32. Helekar SA, Char D, Neff S, Patrick J."Prolyl isomerase requirement for the expression of functional homo-oligomeric ligand-gated ion channels." *Neuron.* 1994 Jan;12(1):179-89.
33. Helekar SA, Patrick J." Peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity of cyclophilin A in functional homo-oligomeric receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 13;94(10):5432-7
34. Huang K, Yanai A, Kang R, Arstikaitis P, Singaraja RR, Metzler M, Mullard A, Haigh B, Gauthier-Campbell C, Gutekunst CA, Hayden MR, El-Husseini A." Huntingtin-interacting protein HIP14 is a palmitoyl transferase involved in palmitoylation and trafficking of multiple neuronal proteins." *Neuron.* 2004 Dec 16;44(6):977-86.
35. Huston JM, Tracey KJ." The pulse of inflammation: heart rate variability, the cholinergic anti-inflammatory pathway and implications for therapy." *J Intern Med.* 2011 Jan;269(1):45-53. doi: 10.1111/j.1365-2796.2010.02321.x. Review.
36. J. C. Schiltz, P. E. Sawchenko "Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults" *The Journal of Neuroscience* 22, 5606-5618 2002
37. J. Gault, M. Robinson, R. Berger, C. Drebing, J. Logel, J. Hopkins, T. Moore, S. Jacobs, J. Meriwether, M. J. Choi, E. J. Kim, K. Walton, K. Buiting, A. Davis, C. Breese, R. Freedman, S. Leonard "Genomic organization and partial duplication of the human $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7)" *Genomics* 52, 173-185, 1998
38. J. M. Huston, M. Ochani, M. Rosas-Ballina, H. Liao, K. Oceani, V. A. Pavlov, M. Gallowitsch-Puerta, M. Ashok, C. J. Czura, B. Foxwell, K. J. Tracey & L. Ulloa "Splentectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis" *The Journal of Experimental Medicine* 203, 1623-1628 2006.
39. K.J. Tracey "Reflex control of immunity". *Nature Immunology Reviews*, 2009.
40. Karayiorgou M, Gogos JA." The molecular genetics of the 22q11-associated schizophrenia." *Brain Res Mol Brain Res.* 2004 Dec 20;132(2):95-104. Review.
41. L. E. Goehler, J. K. Relton, D. Dripps, R. Kiechle, N. Tartaglia, S. E. Maier, L. R. Watkins "Vagal paraganglia bind biotinylated interleukin-1 receptor antagonist: a possible mechanism for immune-to-brain communication". *Brain Research Bulletin* 43, 3, 357-364 1997.
42. L. V. Borovikova, S. Ivanova, M. Zhang, H. Yang, G. I. Botchkina, L. Watkins, H. Wang, N. Abumarad, J. W. Eaton, K. J. Tracey "Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin" *Nature* 405, 458-462 2000.
43. L. Vitkovic, JP Konsman, J. Bockaert, R. Dantzer, V. Homburg and C. Jacque "Cytokine signals propagate through brain" *Molecular Psychiatry* 5, 604-615 2000.

44. Leonard S, Breese C, Adams C, Benhammou K, Gault J, Stevens K, Lee M, Adler L, Olincy A, Ross R, Freedman R." Smoking and schizophrenia: abnormal nicotinic receptor expression." *Eur J Pharmacol.* 2000 Mar 30;393(1-3):237-42.
45. M. L. Sinkus, M. J. Lee, J. Gault, J. Logel, M. Short, R. Freedman, S. L. Christian, J. Lyon, S. Leonard "A 2-base pair deletion polymorphism in the partial duplication of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine gene (CHRFAM7A) on chromosome 15q14 is associated with schizophrenia" *Brain Research* 1291, 1-11 2009
46. M. Rosas-Ballina, K. J. Tracey "Cholinergic control of inflammation" *Journal of Internal Medicine* 265, 663-679 2009.
47. M. Rosas-Ballina, M. Ochani, W. R. Parrish, K. Ochani, Y. T. Harris, J. M. Huston, S. Chavan, K. J. "Tracey Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia" *PNAS* 105 11008-11013 2008
48. Miller, D.T., Shen, Y., Weiss, L.A., Korn, J., Anselm, I., Bridgemohan, C., Cox, G.F., Dickinson, H., Gentile, J., Harris, D.J. et al. (2009) Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders. *J. Med. Genet.*, 46, 242–248.
49. Morens DM, Grandinetti A, Reed D, White LR, Ross GW." Cigarette smoking and protection from Parkinson's disease: false association or etiologic clue?" *Neurology.* 1995 Jun;45(6):1041-51. Review.
50. Mukherjee J, Kuryatov A, Moss SJ, Lindstrom JM, Anand R."Mutations of cytosolic loop residues impair assembly and maturation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors." *Neurochem.* 2009 Sep;110(6):1885-94. Epub 2009 Jul 17.
51. Olofsson PS, Rosas-Ballina M, Levine YA, Tracey KJ. "Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity". *Immunol Rev.* 2012 Jul;248(1):188-204. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01138.x.
52. P. H. Patterson "Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models" *Behavioural Brain Research* 204, 313-321 2009.
53. P. Polak, E. Domany "Alu elements contain many binding sites for transcription factors and may play a role in regulation of developmental processes" *BMC genomics* 7, 2006.
54. Pullan RD, Rhodes J, Ganesh S, Mani V, Morris JS, Williams GT, Newcombe RG, Russell MA, Feyerabend C, Thomas GA. "Transdermal nicotine for active ulcerative colitis." *N Engl J Med.* 1994 Mar 24;330(12):811-5.
55. R. Benfante, R. Adele, M. De Pizzol, C. Gotti, F. Clementi, M. Locati, D. Fornasari, "Expression of the $\alpha 7$ nAChR subunit duplicate form (CHRFAM7A) is down-regulate in the monocytic cell line THP-1 on threatment with LPS" *Journal of Neuroimmunology* 230, 74-84 2011.
56. R. Dantzer "Cytokine, sickness behavior, and depression" *Neurologic Clinics* 24, 441-460 2006.
57. Rakhilin S, Drisdell RC, Sagher D, McGehee DS, Vallejo Y, Green WN." Alpha-bungarotoxin receptors contain alpha7 subunits in two different disulfide-bonded conformations". *J Cell Biol.* 1999 Jul 12;146(1):203-18.
58. Robbins & Cotran "Pathological basis of diseases" Elsevier 7 Edition 2005.
59. RW. Saeed, S. Varma, T. Peng-Nemeroff "Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocytes recruitment during inflammation" *Journal of Experimental Medicine* 201, 1113-1123 2005.

60. Shimohama S. "Nicotinic receptor-mediated neuroprotection in neurodegenerative disease models." *Biol Pharm Bull.* 2009 Mar;32(3):332-6. Review.
61. Shipston MJ. "Ion channel regulation by protein palmitoylation." *J Biol Chem.* 2011 Mar 18;286(11):8709-16. Epub 2011 Jan 7.
62. Shytle RD, Mori T, Townsend K, Vendrame M, Sun N, Zeng J, Ehrhart J, Silver AA, Sanberg PR, Tan J. "Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors." *J Neurochem.* 2004 Apr;89(2):337-43.
63. Sidera C, Parsons R, Austen B. "Post-translational processing of beta-secretase in Alzheimer's disease." *Proteomics.* 2005 Apr;5(6):1533-43.
64. T. Lawrence "The Nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation" *Cold Spring Harbor Perspective in Biology* Dec;1(6):a001651. Epub 2009 Oct 7. Review.
65. Treinin M. "RIC-3 and nicotinic acetylcholine receptors: Biogenesis, properties, and diversity." *Biotechnol.J.* 2008. 3,1539-1547.
66. U. Meyer, J. Feldon "Neural basis of psychosis-related behaviour in the infection model of schizophrenia" *Behavioural Brain Research* 204 322-334 2009
67. V. A Pavlov, M. Ochani, M. Gallowitsh-Puerta, K. Oceani, J. M. Huston, C. J. Czura, Y. Al-Abed, K. J. Tracey "Central muscarinic cholinergic regulation of the system inflammatory response during endotoxemia" *PNAS* 13, 103, 5219-5223, 2006.
68. V. A. Pavlov, H. Wang, C. J. Czura, S. G. Friedman, K. J. Tracey "The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in the neuroimmunomodulation". *Molecular Medicine* 9, 125-134 2003.
69. Vallés AS, Barrantes FJ. "Chaperoning α 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors." *Biochim Biophys Acta.* 2012 Mar;1818(3):718-29. Epub 2011 Oct 22. Review.
70. Vallés AS, Roccamo AM, Barrantes FJ. "Ric-3 chaperone-mediated stable cell-surface expression of the neuronal alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in mammalian cells." *Acta Pharmacol Sin.* 2009 Jun;30(6):818-27.
71. W. A. Banks "The blood-brain-barrier in psychoneuroimmunology" *Neurologic clinics* 24 413-419 2006
72. Wessler I, Kirkpatrick CJ. "Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans." *Br J Pharmacol.* 2008 Aug;154(8):1558-71. Epub 2008 May 26.
73. Y. Lee, S. B. Han, S. Nam, K. Oh, J. T. Hong "Inflammation and Alzheimer disease" *Archives of Pharmacal Research* 33, 1539-1556 2010
74. Y. Villinger, I. Szanto, S. Jaconi, C. Blanchet, B. Buisson, K. H. Krause, D. Bertrand, J. A. Romand, "expression of an α 7 duplicate nicotinic acetylcholine receptor-related protein in human leukocytes" *Journal of neuroimmunology* 126, 86-98 2002.
75. Yasui DH, Scoles HA, Horike S, Meguro-Horike M, Dunaway KW, Schroeder DI, Lasalle JM. "15q11.2-13.3 chromatin analysis reveals epigenetic regulation of CHRNA7 with deficiencies in Rett and autism brain." *Hum Mol Genet.* 2011 Nov 15;20(22):4311-23. Epub 2011 Aug 12.