



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Mediche

Dottorato di Ricerca in
Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Mediche

XXIII ciclo

**SOTTODOMINI DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO IN
FISIOLOGIA E PATOLOGIA**

Tesi di Dottorato di

Elisa Fasana

Docente guida: Prof.ssa Nica Borgese

Coordinatore: Prof. Alberto Panerai

Anno accademico 2009/10

INDICE

RIASSUNTO	2
ABBREVIAZIONI	3
INTRODUZIONE	
1. Il Reticolo Endoplasmatico	6
2. I tre principali compartimenti dell'ER: ER liscio, ER rugoso ed Involucro Nucleare	7
3. Tubuli e cisterne	9
4. Altri sottodomini dell'ER	17
5. Ruolo delle interazioni proteine-lipide nello smistamento di proteine di membrana lungo la via di secrezione	30
SCOPO DELLA TESI	34
MATERIALI E METODI	36
RISULTATI	58
DISCUSSIONE	113
BIBLIOGRAFIA	126

RIASSUNTO

Il reticolo endoplasmatico, l'organello più esteso delle cellule eucariotiche, è dotato di una complessa organizzazione architettonica che rispecchia le sue molteplici funzioni. E' ormai noto come questo organello presenti una serie di subdomini atti ad espletare particolari funzioni, quali il trasporto lungo la via di secrezione e la degradazione di proteine mal ripiegate; subdomini nel reticolo endoplasmatico possono crearsi anche in seguito ad eventi patologici.

Il mio progetto di Tesi è stato finalizzato alla caratterizzazione di due subdomini del reticolo endoplasmatico, uno correlato ad una patologia, l'ALS-8, ed un altro comunemente presente nelle cellule sane.

Per quanto riguarda il subdominio generato in contesto patologico, ho studiato VAPB, una proteina di membrana con ancora C-terminale ("tail-anchored") residente nel reticolo endoplasmatico, la cui mutazione P56S induce la formazione di grosse inclusioni perinucleari. Dato che tali aggregati non erano ancora stati chiaramente ricondotti ad alcun organello cellulare, ho deciso di studiare la biogenesi della proteina *wild type* e mutata sia in vitro che in vivo e di caratterizzare le inclusioni generate dalla proteina mutata. I saggi in vitro sono basati sulla N-glicosilazione di un epitopo attaccato al C-terminale della proteina e su saggi di protezione da proteasi sviluppati nel mio laboratorio, mentre gli esperimenti in vivo sono volti alla valutazione morfologica delle inclusioni indotte dalla proteina mutata. Con questi approcci abbiamo dimostrato che sia la forma *wild-type* che quella mutata si inseriscono nella membrana del reticolo endoplasmatico, seguendo la via post-traduzionale caratteristica delle proteine "tail-anchored" e che il comportamento in vitro del mutante è indistinguibile da quello della proteina *wild-type*. Tuttavia, in vivo, a tempi molto brevi dalla l'inserzione nel reticolo (2 ore), P56S-VAPB si raggruppa in piccoli *cluster* che poi si uniscono per formare grosse inclusioni in posizione paranucleare. Tali inclusioni sono positivi per alcuni marcatori del reticolo endoplasmatico, mentre risultano negativi per marcatori di altri organelli. La continuità delle inclusioni con l'ER restante è stata dimostrata mediante esperimenti di *Fluorescence Recovery After photobleaching* (FRAP) e *Fluorescence Loss in Photobleaching* (FLIP). L'analisi ultrastrutturale ha dimostrato che le inclusioni consistono in coppie di cisterne appaiate da un denso strato citosolico di circa 30 nm. Questa forma di *Organized Smooth ER* (OSER) è probabilmente generata da interazioni ad alta affinità in trans tra i domini citosolici di P56S-VAPB. Questi risultati dimostrano che P56S-VAPB causa una drammatica ristrutturazione del reticolo endoplasmatico che potrebbe spiegare l'azione neurotossica della proteina.

Per quanto riguarda il ruolo dei subdomini del reticolo endoplasmatico in fisiologia, mi sono focalizzata su un possibile ruolo di microdomini lipidici nella segregazione e l'esportazione in superficie di proteine di membrana. Come modelli per il mio studio ho utilizzato una proteina residente del reticolo endoplasmatico, il citocromo b_5 , e una variante di essa, b_522 , differente unicamente dalla forma *wild type* per il dominio transmembrana allungato di 5 amminoacidi. Studi precedenti nel mio laboratorio avevano dimostrato che la variante b_522 si inserisce inizialmente nel reticolo endoplasmatico, ma che si distribuisce non omogeneamente all'interno dell' organello, concentrandosi nei tubuli e nei siti di uscita dai quali gemmano le vescicole di trasporto, ma rimandando esclusa dalle cisterne. Per investigare un possibile coinvolgimento di microdomini lipidici in questo fenomeno, ho messo a punto un sistema sperimentale basato sull'utilizzo di sonde lipidiche radioattive e fotoattivabili e ho analizzato così l'ambiente lipidico del reticolo endoplasmatico nella immediata vicinanza di b_5 *wild-type* e b_522 . Con questo approccio ho osservato che la proteina b_522 è meno accessibile al lipide maggioritario del reticolo, la fosfatidilcolina, in confronto alla proteina *wild-type*. Questa osservazione suggerisce che b_522 si distribuisca in microdomini impoveriti in fosfatidilcolina e quindi arricchiti in qualche altro lipide. Tale segregazione porterebbe poi alla sua concentrazione ai siti di uscita e alla sua esportazione dal reticolo endoplasmatico. I risultati ottenuti illustrano come interazioni proteina-lipide basati su semplici parametri fisico-chimici possano determinare il destino di una proteina lungo la via di secrezione.

In conclusione, il mio lavoro di tesi nel suo insieme contribuisce nuovi elementi alla comprensione della complessità della organizzazione del reticolo endoplasmatico, organello che, benché fisicamente continuo, è formato in realtà da numerosi sub-compartimenti funzionalmente specializzati e dinamicamente interconnessi.

ABBREVIAZIONI

10-ASA: acido 10-azi-stearico

ALS: sclerosi laterale amiotrofica

b₅: citocromo b₅

BAR: *Bin-amphiphysin-Rvs*

BCA: acido biconconinico

Bip/Grp78: 78kDa *glucose regulated protein*

BSA: *bovine serum albumine*

CERT: *ceramide transfer protein*

CFTR: *cystic fibrosis transmembrane regulator*

CLIMP-63: *integral 63 kDa cytoskeleton-linking membrane protein*

COPI: *coat protein complex I*

COPII: *coat protein complex II*

CS: sito di contatto

DMEM: *Dulbecco's-modified essential medium*

DRM: *detergent-resistant membrane*

DTT: ditionitritolo

EndoH: endoglicosidasi H

ER: reticolo endoplasmatico

ERAD: *ER associated degradation*

ERES: *ER exit site*

ERMES: *ER-mitochondria encounter structure*

FBS: *fetal bovine serum*

FFAT: *due fenilalanine in un tratto acidic*

FLIP: *fluorescence loss in photobleaching*

FRAP: *fluorescence recovery after photobleaching*

GEF: *guanosine exchange factor*

GFP: *green fluorescent protein*

GPI: *ancora di glicosil-fosfatidilinositolo*

Grp170: *170kDa glucose regulated protein*

Grp75: *75kDa glucose regulated protein*

GTP: *guanosina trifosfato*

IP₃: *inositolo trifosfato*

LBR: *recettore per la laminina di tipo B*

L_d: *fase liquida*

L_o: *fase liquida-ordinata*

LR: *lipid raft*

LTP: *lipid transfer protein*

MAM: *ER-mitochondria associated membrane*

MSP: *major sperm protein*

NE: involucro nucleare

OSBP: *oxysterol binding protein*

OSER: *organized smooth ER*

PCR: *polymerase chain reaction*

PDI: proteina disolfuro isomerasi

PH: *pleckstrin homology*

PMP-22: *peripheral myelin protein 22*

POPC: palmitoil-oleil-fosfatidilcolina

PtdCho: fosfatidilcolina

RER: reticolo endoplasmatico rugoso

SER: reticolo endoplasmatico liscio

S₀: fase solida

TB: *translocation buffer*

tER: ER di transizione

TMD: dominio transmembrana

UPR: *unfolded protein response*

VAP: *VAMP-associated protein*

VDAC-1: canale anionico voltaggio-dipendente di tipo 1

INTRODUZIONE

1. IL RETICOLO ENDOPLASMATICO

Il Reticolo Endoplasmatico (ER) è il più esteso degli organelli eucariotici; esso occupa infatti circa il 10% del volume cellulare e la metà della superficie coperta da tutte le membrane della cellula (endomembrane più membrana plasmatica) (Giorgi et al., 2009). L'ER riveste numerose funzioni vitali per la cellula. Tra le tante, è la stazione iniziale della via secretoria, ed è quindi il luogo nel quale circa un terzo di tutte le proteine di una cellula viene sintetizzato e ripiegato correttamente (Dancourt and Barlowe, 2010; Margittai and Banhegyi, 2010); in secondo luogo, l'ER è il punto di partenza dal quale numerose proteine vengono smistate e indirizzate verso la loro destinazione finale (Palade, 1975); l'ER è anche il principale sito di stoccaggio cellulare di calcio, le cui dinamiche sono indispensabili per una corretta fisiologia (Bootman et al., 2002); infine, l'ER è una delle principali sedi di produzione e distribuzione di lipidi e di detossificazione della cellula (Giorgi et al., 2009). A causa delle eterogenee funzioni svolte, non è da sorprendersi che l'ER presenti una architettura unica e particolare, in continuo movimento e rimodellamento, la cui composizione è estremamente variabile a seconda del tipo cellulare in analisi (Bola and Allan, 2009; Borgese et al., 2006).

Nonostante sia costituito da un unico sistema di membrane che racchiude un comune spazio luminale, l'ER è un organello altamente compartimentalizzato, potendosi distinguere vari sottodomini con architettura, funzioni e composizione molecolare diversa (Borgese et al., 2006; Voeltz et al., 2002). Il lavoro della mia tesi di dottorato è stato volto alla identificazione e caratterizzazione di sottodomini potenzialmente importanti in fisiologia e patologia. Nella Introduzione della tesi, descriverò le conoscenze attuali sulla sub-compartimentalizzazione dell'ER, conoscenze contribute dal mio e da molti altri laboratori.

2. I TRE PRINCIPALI COMPARTIMENTI DELL'ER: ER LISCIO, RUGOSO ED INVOLUCRO NUCLEARE

Quando osservato al microscopio ottico o elettronico, l'ER all'interfase può essere suddiviso grossolanamente in ER nucleare ed ER periferico: l'ER nucleare è costituito dall'involucro nucleare, struttura che delimita il nucleo; quello periferico, invece, così come suggerito dal nome, è la parte di ER che si estende per tutta la periferia della cellula, ed è costituito sia da tubuli che da cisterne interconnessi tra loro. L'ultrastruttura dell'ER periferico ha messo inoltre in evidenza che parte di esso è rivestita da ribosomi, mentre l'altra parte ne è mancante: da lì le denominazioni di ER rugoso e di ER liscio (Voeltz et al., 2002). In conclusione, l'ER può essere suddiviso in tre grosse sezioni, funzionalmente distinte, che differiscono per una diversa composizione proteica della membrana e del lumen (Fig.1): il reticolo liscio (*smooth ER*, SER), il reticolo rugoso (*rough ER*, RER) e l'involucro nucleare (*nuclear envelope*, NE).

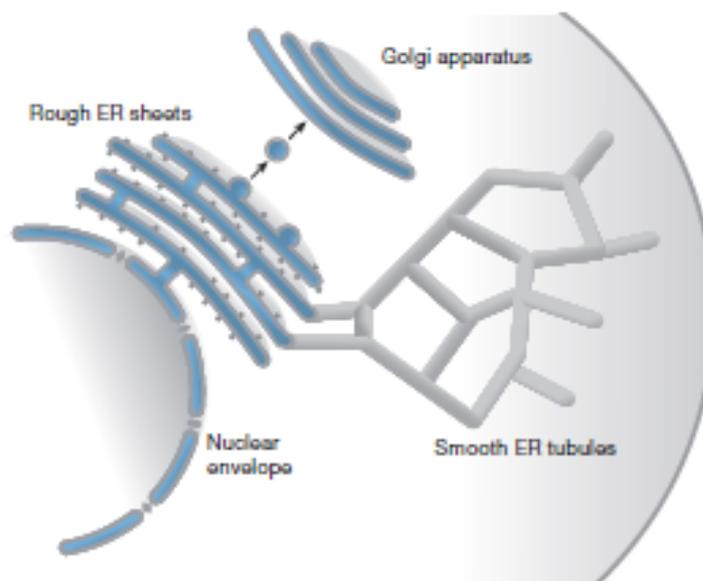


Fig.1: Rappresentazione del Reticolo Endoplasmatico di una cellula eucariotica.

2.1 ER liscio e rugoso

Come appena accennato, la differenza morfologica che determina se una parte di ER è rugosa oppure liscia è la presenza o no di ribosomi a ridosso della membrana. La maggior parte delle proteine dell'ER sono comuni al RER e SER; tuttavia alcune proteine con funzione specifica (sintesi proteica e lipidica, omeostasi del calcio) risultano arricchite in uno dei due compartimenti (Vogel et al., 1990).

Il RER è composto principalmente da cisterne periferiche che risultano rivestite da poliribosomi (Sabatini et al., 1966); il RER è infatti specializzato nella sintesi e nel controllo qualità di proteine integrali di membrana e solubili che verranno poi processate lungo la via secretoria. Componenti di membrana tipici e caratteristici del RER sono quindi il traslocone Sec61 e tutte le sue proteine accessorie che vanno a formare il cosiddetto complesso del traslocone (Nikonov and Kreibich, 2003); attraverso tale complesso, la catena nascente che fuoriesce dal ribosoma posizionato a ridosso di esso viene trasferita nel lume dell'ER, dove verrà quindi sottoposta ad un severo controllo qualità prima di procedere eventualmente verso il Golgi (Aebi et al., 2010). Tra le componenti luminali maggiormente arricchite nel RER figurano quindi le reticuloplasmine, proteine che intervengono nelle prime fasi di maturazione delle proteine secretorie; tra esse figurano la 78kDa glucose regulated protein (Bip/GRP78), la 170kDa glucose regulated protein (Grp170) (Weitzmann et al., 2007) e la proteina disolfuro isomerasi (PDI) (Shnyder and Hubbard, 2002).

Il SER è invece la componente dell'ER periferico caratterizzata da una predominante componente di tubuli sprovvisti di ribosomi. A differenza del RER, il SER non ha una funzione specifica e peculiare, ma il ruolo che riveste è molto variabile a seconda del tipo cellulare che si prende in esame; nel fegato, per esempio, è molto importante nella detossificazione; nel muscolo prende il nome di reticolo sarcoplasmatico e riveste ruoli di primaria importanza nell'uptake e rilascio di calcio; nelle cellule surrenali, infine, è sede di sintesi di grandi quantità di steroidi (Park and Blackstone, 2010).

2.2 Involucro nucleare

L'NE è la struttura che circonda il nucleo. E' costituito da un'unica cisterna delimitata da due membrane, la membrana nucleare esterna e quella interna; queste due membrane delimitano uno spazio intermembrana di circa 10-14 nanometri di spessore; le due

membrane sono in continuità tra loro a livello dei pori nucleari (Voeltz et al., 2002). Dal punto di vista sia morfologico che funzionale, il NE è da considerarsi più affine al RER che al SER: esso è costituito infatti da una cisterna e non da tubuli, e la membrana esterna inoltre è rivestita da ribosomi e quindi sede di sintesi proteica. Nonostante ciò, la restante componente proteica del NE rende questo dominio dell'ER spazialmente e funzionalmente definito dal RER con il quale è in continuità: ad esempio, nei mammiferi, il NE presenta il recettore per la laminina tipo B (LBR) e tante altre proteine accessorie esclusive che intervengono direttamente o indirettamente all'attacco con la cromatina (Dreger et al., 2002; Holmer and Worman, 2001). Mentre a livello della membrana esterna avviene sintesi proteica, le proteine della membrana interna, al contrario, sembrano essere prodotte a livello del RER per poi diffondersi in un secondo momento; la loro ritenzione nella membrana interna avverrebbe quindi per diretta interazione con la laminina o la cromatina, come nel caso del sopra citato LBR (Soullam and Worman, 1995).

3. TUBULI E CISTERNE

Gli organelli cellulari presentano una loro particolare forma. Alcuni, quali i lisosomi e gli endosomi sono approssimativamente sferici, altri invece sono molto più complessi. E' quest'ultimo il caso dell'ER, il quale è costituito da una sola e continua membrana che racchiude un comune spazio luminale, ma che tuttavia è organizzata in un reticolo interconnesso di tubuli e cisterne, la cui formazione è determinata a sua volta da una diversa e localizzata curvatura della membrana (McMahon and Gallop, 2005).

La tipica architettura dell'ER, che consiste appunto nella presenza di cisterne piatte e di un fitto poligono di tubuli connessi da giunzioni a tre bracci (Allan and Vale, 1991; Baumann and Walz, 2001; Dreier and Rapoport, 2000; Lee and Chen, 1988), è altamente conservata in tutti gli eucarioti, dalle piante agli uomini (Staehein, 1997). Le cisterne sono aree dell'ER estese anche per alcuni micron caratterizzate da una bassa curvatura, e quindi relativamente piatte; come detto nei paragrafi precedenti, sono strutture tipiche del RER e del NE. I tubuli, tipici del SER, al contrario, sono lunghe strutture cilindriche caratterizzate da un'alta curvatura di membrana (Voeltz et al., 2002).

Una componente importante nel determinare lo stato di curvatura di una membrana intracellulare è la sua composizione lipidica. In membrane artificiali, infatti, la sola componente lipidica è in grado di ricreare le quattro strutture principali che un doppio strato

può assumere: piatta, cilindrica, fenestrata e sferica. Ad eccezione della struttura piatta, però, per ricreare il fenomeno in vivo, tutte le altre conformazioni necessiterebbero di un forte sbilancio nella composizione lipidica di ciascun monostrato (Zimmerberg and Kozlov, 2006). Indipendentemente dal tipo cellulare preso in considerazione, inoltre, lo spessore di una cisterna e il diametro di un tubulo è tipicamente di 60-100nm. E' dunque comunemente accettato che questa regolarità di curvatura e di spaziatura tra le membrane in entrambi i domini richieda necessariamente energia (Shibata et al., 2009), e che quindi sia mantenuta in maniera attiva dall'azione di proteine (Shibata et al., 2006).

Le proteine possono utilizzare tre meccanismi per generare curvatura di membrana (Fig. 2): applicando una forza meccanica sulla superficie del doppio strato lipidico, generando strutture proteiche (*scaffold*) oppure inserendo una propria porzione idrofobica nei lipidi.

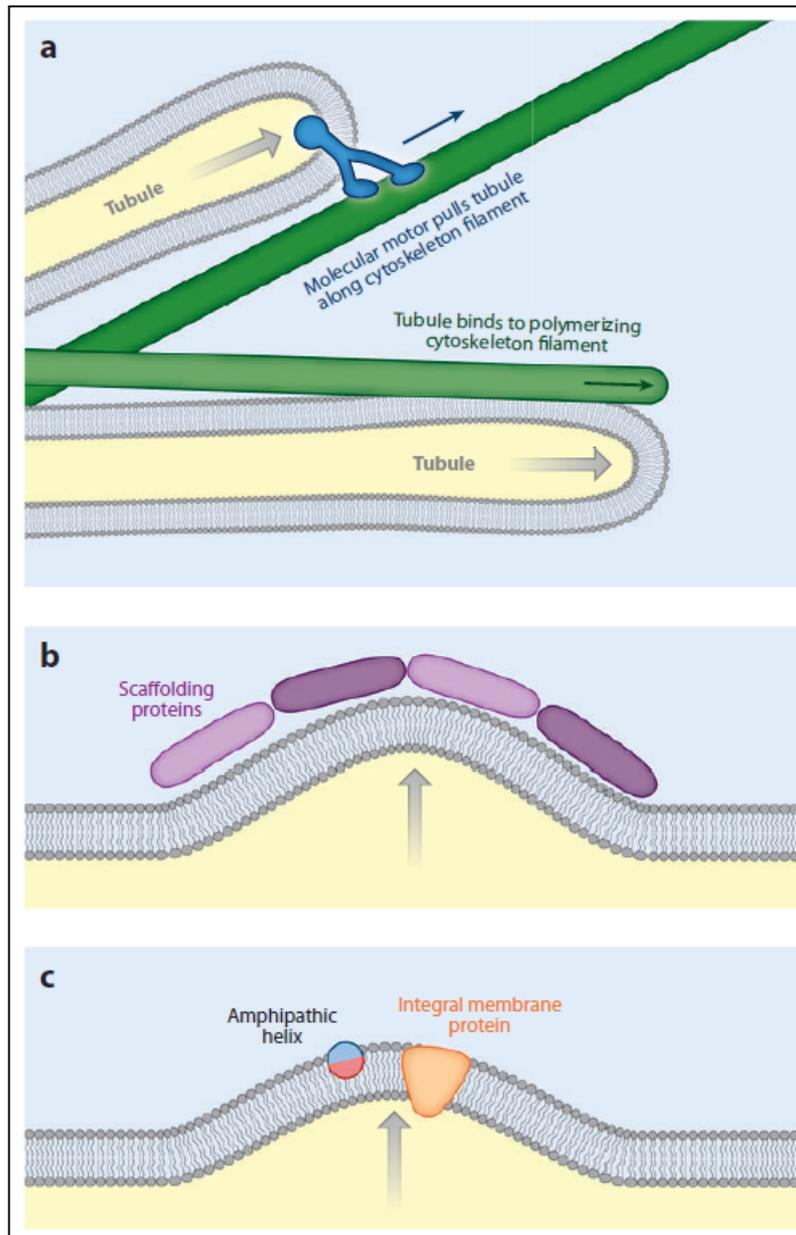


Fig.2: Schematizzazione dei tre meccanismi principali per generare curvatura di membrana (Shibata et al., 2009). a) curvatura generata dalla forza meccanica creata da motori molecolari (in blu); b) curvatura generata dall'azione di proteine scaffold (in viola); c) curvatura generata dalla presenza nel doppio strato di proteine integrali di membrana (in arancione) e da eliche amfipatiche (in blu/rosso)

Riguardo al primo meccanismo, è questo il caso dei motori molecolari i quali, legandosi al citoscheletro, possono generare un'energia sufficiente per deformare la membrana. I motori molecolari possono inoltre provocare curvatura anche in maniera più indiretta, e cioè deformare il doppio strato legandosi a un filamento di actina o a un microtubulo in fase di polimerizzazione; in quest'ultimo caso l'energia sfruttata deriverebbe dall'evento di polimerizzazione del citoscheletro (Zimmerberg and Kozlov, 2006) (Fig.2 pannello a).

La seconda via riguarda le cosiddette *scaffold proteins*, cioè proteine che, associandosi tra loro su uno dei due foglietti lipidici, creano una curva e rigida struttura che forza la membrana ad assumere la stessa conformazione (Fig.2 pannello b). E' stato proposto che tutte le proteine coinvolte nel *coating* utilizzino questo meccanismo per creare invaginazioni od evaginazioni nella membrana che andranno poi a formare le vescicole di trasporto. E' questo quindi il caso della clatrina complessata alle proprie proteine adattatrici (Kirchhausen, 2000), alle proteine con dominio *Bin-amphiphysin-Rvs* (BAR) (Frost et al., 2008) quali endofillina, e ai *coat protein complex I* (COPI) e *coat protein complex II* (COPII), implicati rispettivamente nel traffico retrogrado e anterogrado ER-Golgi (Lee et al., 2004). In aggiunta, la maggior parte dei complessi che includono le proteine *scaffold* sopra citate presentano componenti che contengono porzioni idrofobiche capaci di penetrare nel doppio strato, contribuendo così alla generazione di maggiore curvatura (Campelo et al., 2008).

Ultimo meccanismo proposto riguarda appunto l'inserzione di domini idrofobici di proteine nel doppio strato; questo evento ha come risultato quello di perturbare l'organizzazione delle teste polari dei lipidi generando curvatura locale della membrana (Fig.2 pannello c). Per generare curvatura, tuttavia, è necessario che un dominio idrofobico si inserisca in modo tale da perturbare uno solo dei monostrati (superiore nel caso di curvatura positiva, inferiore nel caso di curvatura negativa): se il dominio è inserito nel piano mediano della membrana, infatti, entrambi i foglietti verrebbero perturbati, causando una generale espansione del doppio strato, ma non curvatura (Campelo et al., 2008).

Recenti lavori hanno proposto numerose proteine con caratteristiche sopra citate e capaci quindi di generare curvatura di membrana localizzata. Tra le tante, quelle maggiormente studiate sono i reticoloni e la proteina DP1/Yop1p, implicati sia per quanto riguarda la formazione di tubuli (Shibata et al., 2008), sia per generare alta curvatura alle estremità delle cisterne (Shibata et al., 2009).

3.1 Generazione di tubuli

La forte dinamicità del reticolo di tubuli periferici dell'ER oltre che la loro frequente prossimità al citoscheletro suggerirebbe che quest'ultimo possa svolgere una funzione importante nel formare e stabilizzare la struttura di un tubulo. Infatti, filamenti di actina e microtubuli sono richiesti per la generazione di nuovi tubuli (Prinz et al., 2000; Terasaki et al., 1986); il citoscheletro, tuttavia, sembra essere implicato solo nel movimento e nei processi dinamici dell'ER, ma non nel mantenimento della sua struttura: la depolimerizzazione dei microtubuli con nocodazolo, infatti, non determina un collasso immediato dell'ER (Prinz et al., 2000; Terasaki et al., 1986). Quindi è ormai opinione comune nel campo che il modello più plausibile per determinare la forma di un tubulo e mantenerla nel tempo è basato su meccanismi che generano e stabilizzano un' alta curvatura di membrana (Park and Blackstone, 2010; Shibata et al., 2009; Shibata et al., 2006; Voeltz et al., 2002; Zimmerberg and Kozlov, 2006).

Esperimenti in vitro dimostrano come proteine appartenenti alla classe dei reticoloni e la proteina DP1 (Yop1p in lievito) siano implicate nel stabilizzare la curvatura di membrana nei tubuli (Dreier and Rapoport, 2000; Hu et al., 2008; Voeltz et al., 2006). In esperimenti in lievito e in mammifero, infatti, si è osservato come rispettivamente la delezione o il silenziamento dei reticoloni e di DP1/Yop1p porta a una forte diminuzione di tubuli periferici, con conversione di quest'ultimi in cisterne (Anderson and Hetzer, 2008; Voeltz et al., 2006). Al contrario, la loro overespressione rende ancora più esteso il reticolo di tubuli (Shibata et al., 2008). Reticoloni e DP1, infine, sono riportati essere localizzati esclusivamente nei tubuli dell'ER, evitando le cisterne del RER e del NE; ciò avvalorava ancora di più l'ipotesi di una loro funzione svolta a livello dei tubuli dell'ER.

La famiglia dei reticoloni annovera proteine integrali di membrana dell'ER presenti in quasi tutti i tipi di cellule eucariotiche; nei mammiferi esistono quattro geni codificanti per i reticoloni, ognuno dei quali presenta numerose varianti di splicing. Tutti i reticoloni presentano una regione C-terminale altamente conservata costituita da due lunghi domini transmembrana separati da una breve ansa citosolica; è stato proposto che le due regioni idrofobiche si organizzino ognuna nel foglietto esterno del doppio strato in una struttura a forcina; tale struttura causerebbe quindi una deformazione del monostrato esterno della membrana, con conseguente formazione di una curvatura positiva (Fig.3 pannello a).

DP1 è una proteina ubiquitaria anch'essa residente nei tubuli dell'ER. Non presenta omologie di sequenza con i reticoloni, ma presenta due estesi domini idrofobici che si

organizzano nel doppio strato in maniera analoga (Voeltz et al., 2006). Infine, reticoloni e DP1 omo- ed eterodimerizzano, andando quindi a formare grosse strutture proteiche relativamente immobili che incrementano ancora di più il grado di deformazione della membrana (Shibata et al., 2008) (Fig.3 pannello b).

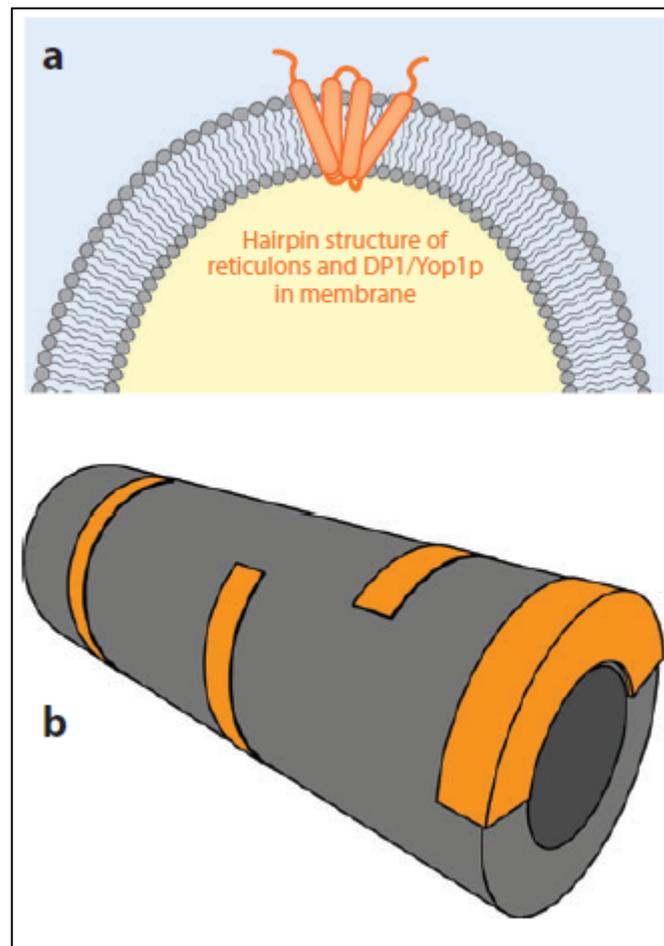


Fig.3: Generazione di tubuli da parte di reticoloni e DP1/Yop1p (Shibata et al., 2009). a) La conservata struttura del dominio transmembrana dei reticoloni e DP1/Yop1p si inserisce nel doppio strato lipidico in modo tale da creare curvatura positiva. b) Reticoloni e DP1/Yop1p omo- ed eterodimerizzano creando strutture ad arco (in arancione) che creano così alta curvatura nel doppio strato (in grigio).

3.2 Generazione di cisterne

Analogamente per quanto accade per i tubuli, le cisterne dell'ER vengono formate grazie all'azione di proteine che mantengono la membrana piatta e senza curvatura.

Sono tre i meccanismi proposti per la formazione di cisterne (Fig.4); il primo riguarda la segregazione dei reticoloni e di DP1 (Fig.4 pannello a); esse infatti si localizzerebbero ai lati della cisterna, creando una struttura ad arco ad alta curvatura. In secondo luogo, proteine transmembrana dell'ER potrebbero interagire tra loro attraverso i propri domini luminali, mantenendo le due facce della cisterna appiattite (Fig.4 pannello b). Infine, proteine *scaffold* localizzate sulla faccia citosolica della membrana della cisterna potrebbero formare strutture che ne mantengono la struttura appiattita (Fig.4 pannello c) (Shibata et al., 2009).

Proteine proposte a mantenere la struttura tipica delle cisterne sono la proteina integrale di membrana p180 e la *integral 63 kDa cytoskeleton-linking membrane protein* CLIMP-63. p180 sembra essere il miglior candidato per assolvere questo ruolo; essa si localizza principalmente nelle cisterne dell'ER e quando overespressa porta a una maggior formazione di quest'ultime. Oltre che avere un ruolo strutturale all'interno di una singola cisterna, p180 è stata proposta per organizzare più cisterne: la sua overespressione, infatti, causa un allineamento spazialmente e geometricamente definito delle membrane neosintetizzate con le cisterne pre-esistenti (Benyamini et al., 2009); quest'ultima sarebbe un'azione analoga a quella rivestita dalle golgine a livello dell'apparato di Golgi (Short et al., 2005).

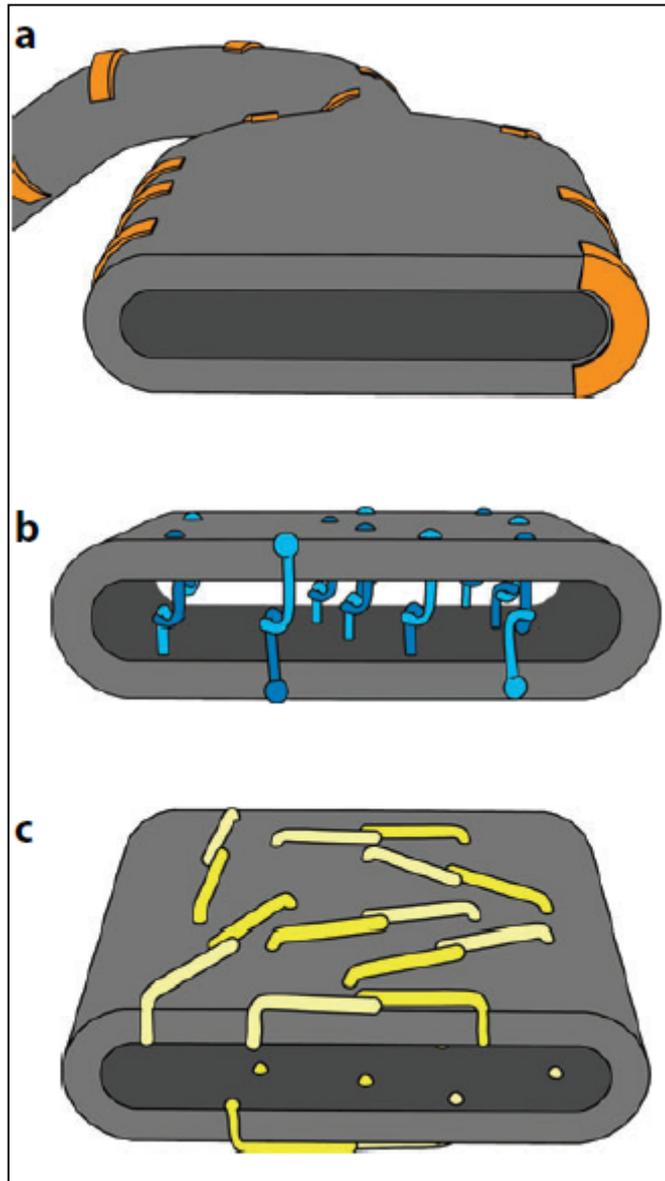


Fig.4: I tre meccanismi principali di generazione di cisterne (Shibata et al., 2009). a) Proteine generanti i tubuli quali reticoloni e DP1/Yop1p possono creare strutture ad arco (in arancione) che si distribuiscono alle estremità della cisterna stabilizzandone la struttura; b) proteine transmembrana (in blu) interagiscono con i propri domini luminali mantenendo la cisterna piatta; c) altre proteine transmembrana (in giallo) possono agire come proteine *scaffold* nella faccia citosolica del doppio strato

4. ALTRI SOTTODOMINI DELL'ER

Oltre alla tradizionale suddivisione dell'ER in ER liscio, rugoso e involucro nucleare, sono state riconosciute zone di minori dimensioni dedicate a una particolare funzione: è questo il caso per piccole regioni dedicate ad esempio al trasporto delle proteine dall'ER all'apparato di Golgi, e per questo chiamati siti di uscita dall'ER (ER Exit Sites, ERES); sono presenti inoltre strutture specializzate a contattare e a scambiare materiale con membrane di altri organelli, e per questo chiamati siti di contatto (Contact Sites, CS); esistono anche regioni dedicate all' ER Associated Degradation (ERAD), nelle quali proteine che non raggiungono il corretto ripiegamento vengono retrotraslocate al citosol e quindi degradate dal proteasoma (Hoseki et al., 2010); in seguito a overespressione di una proteina di membrana residente nell'ER, l'ER liscio reagisce andando a formare domini di membrana chiamati Organized Smooth ER (OSER) caratterizzati da una peculiare struttura e geometria (Borgese et al., 2006); infine, esistono diverse evidenze di eterogeneità lipidica nell'ER: in questa membrana, infatti, vi sarebbero fenomeni di segregazione laterale di lipidi, con formazione di microdomini che potrebbero avere un ruolo importante nella compartimentalizzazione delle complesse funzioni di questo organello (Eggeling et al., 2009; Simons and Ikonen, 1997).

4.1 ER Exit Sites

Le proteine secretorie neo-sintetizzate vengono traslocate nel lume dell'ER dove subiscono un attento controllo qualità che assicura che il futuro cargo non venga riconosciuto dalle componenti di trasporto se non correttamente ripiegato (Aebi et al., 2010; Ellgaard and Helenius, 2003; Vembar and Brodsky, 2008). Una volta pronta per essere trasportata all'apparato di Golgi, la proteina cargo viene quindi trasferita per mezzo di vescicole ricoperte da *coat* COPII (Bonifacino and Glick, 2004); tale trasporto anterogrado è bilanciato da un trasporto di tipo retrogrado dal Golgi all'ER: tali vescicole sono invece rivestite da *coat* COPI (Schekman and Orci, 1996).

Il trasporto da e per l'ER è molto rapido e dinamico; tuttavia, deve assicurare che proteine destinate ad essere secrete procedano lungo la via secretoria, mentre proteine residenti dell'ER non procedano oltre. E' per questa fine regolazione che si è subito avanzata l'idea che i cargo presentino dei segnali di esporto, che consentano quindi loro di abbandonare l'ER, mentre proteine residenti dell'ER contengano segnali di ritenzione, che

impediscono loro quindi di lasciare l'ER oppure, se trasportate comunque al Golgi, di essere subito re-indirizzate all'organello di appartenenza (Barlowe, 2003).

Per quanto riguarda il trasporto retrogrado ER-Golgi, per le proteine transmembrana esistono motivi di di-lisina e di-arginina capaci di reclutare a livello del Golgi l'assemblaggio del *coat* COPI (Murshid and Presley, 2004). Le proteine solubili, invece, si associano a recettori i quali a loro volta presentano sequenze di ritenzione; tra le tante, la sequenza KDEL è quella maggiormente caratterizzata (Lewis and Pelham, 1990; Townsley et al., 1993): ligandi che possiedono tale sequenza, quando trasportati all'apparato di Golgi, si associano al recettore KDEL, il quale a sua volta interagisce, tramite la sua coda citosolica, col *coat* COPI (Townsley et al., 1993), con il risultato di generare una vescicola rivestita che riporterà il ligando all'ER.

I cargo transmembrana che devono essere indirizzati alla via secretoria presentano nella coda citosolica numerose e svariate sequenze, in generale motivi di-acidici (Nishimura and Balch, 1997), di-idrofobici (Otte and Barlowe, 2002) oppure di-aromatici (Nufer et al., 2002), che permettono l'associazione diretta alle componenti COPII. Le proteine di membrana cargo possono essere reclutate anche grazie a caratteristiche del loro dominio transmembrana e l'evidenza disponibile a oggi suggerisce che tale reclutamento dipenda da interazioni proteina-lipidi. Questo modalità di reclutamento sarà discussa più avanti nella Introduzione (sezione 5).

Per quanto riguarda le proteine solubili da esportare, la situazione è complessa, in quanto queste, analogamente a quanto appena descritto per le proteine transmembrana con segnale KDEL, non possono contattare direttamente le componenti, tutte citosoliche, del *coat* (Barlowe, 2003). Sono stati proposti due meccanismi riguardo il trasporto di cargo solubili: un processo di flusso di massa, nel quale quindi la proteina in questione non viene concentrata nella vescicola in quanto ne entra passivamente (Wieland et al., 1987), ed un più probabile processo attivo recettore-dipendente, nel quale il cargo presenta segnali di riconoscimento riconosciuti da un recettore di membrana che si accumula a livello della vescicola nascente (Kuehn et al., 1998; Mizuno and Singer, 1993). Le tappe fondamentali del trasporto anterogrado e retrogrado sono riassunte in Fig. 5.

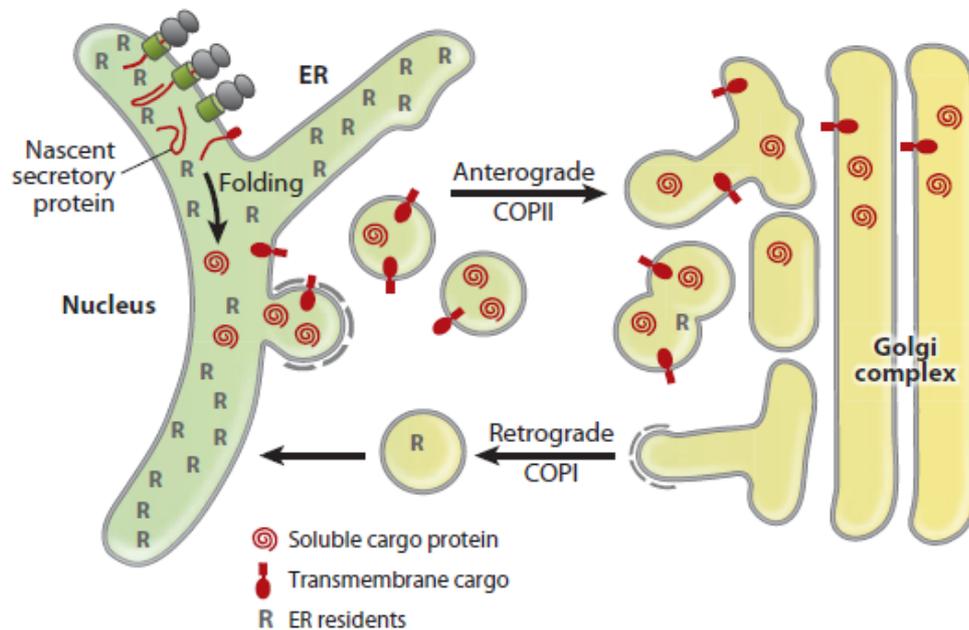


Fig.5: Trasporto vescicolare nell'interfaccia ER-Golgi (Dancourt and Barlowe, 2010). Nel trasporto anterogrado, proteine cargo vengo trasportate per mezzo di vescicole rivestite dal coat COPII dall'ER (in verde) al Golgi (in giallo); nel trasporto retrogrado, al contrario, proteine residenti dell'ER (indicate con R) vengono trasportate dal Golgi all'organello di residenza per mezzo di vescicole rivestite da COPI

Le vescicole COPII si organizzano in regioni specializzate dell'ER liscio chiamate ER di transizione (tER) oppure ERES (Bannykh et al., 1996; Levine and Rabouille, 2005; Orci et al., 1991; Palade, 1975). Esperimenti in vivo mostrano come gli ERES sono strutture altamente dinamiche, anche se un singolo ERES può essere stabile anche per alcuni minuti (Bevis et al., 2002; Hammond and Glick, 2000). L'evento iniziale dell'assemblaggio del coat è l'attivazione della GTPasi Sar1 da parte della sua guanosina trifosfato (GTP) Exchange Factor (GEF), Sec12 (Shindiapina and Barlowe, 2010; Weissman et al., 2001). Una volta legata al GTP, Sar1 espone all'N-terminale un'elica amfipatica e si inserisce nel doppio strato; le componenti del cosiddetto *pre-coat*, le proteine citosoliche Sec23 e Sec24, vengono richiamate dall'azione combinata della GTPasi e dal cargo stesso. Le proteine del coat esterno Sec 13 e Sec31, infine, si assembleranno intorno al complesso di *pre-coat* costituito da Sar1, Sec23 e Sec24, formando una rigida struttura capace di deformare la

membrana e di far gemmare la vescicola di trasporto (Bonifacino and Glick, 2004; Dancourt and Barlowe, 2010) (Fig.6).

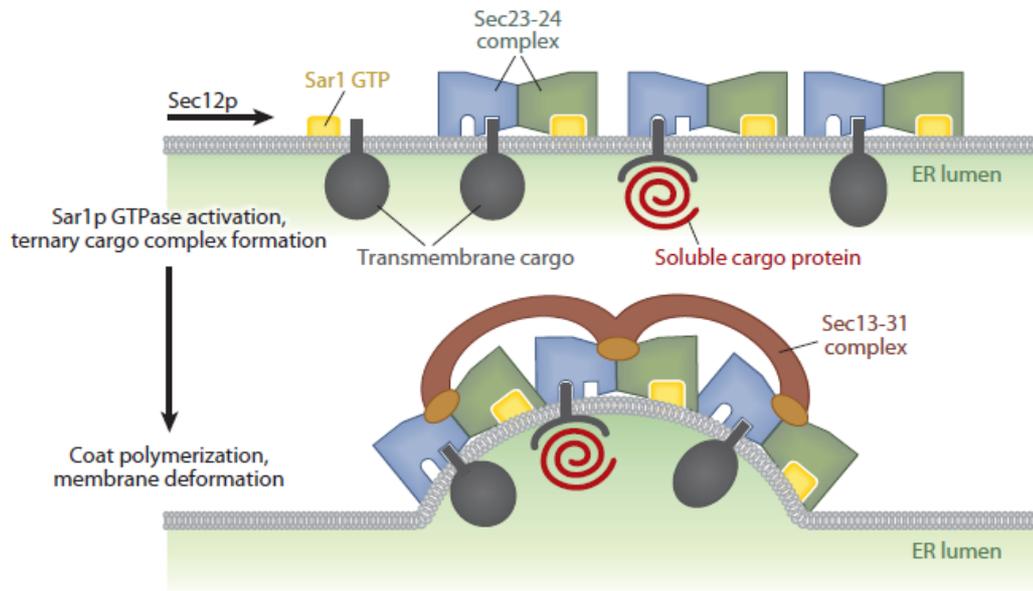


Fig.6: Rappresentazione schematica della formazione del *coat* COPII a livello di un ERES (Dancourt and Barlowe, 2010)

Per quanto riguarda le funzioni specifiche di ciascun componente del *coat*, il complesso di *pre-coat* svolge una triplice funzione: Sec23 riconosce e lega specificatamente Sar1 (Russell and Stagg), mentre, con le sue quattro diverse isoforme, Sec24 è necessario per l'interazione con il cargo (Miller et al., 2003; Wendeler et al., 2007); insieme, infine, Sec23 e Sec24 richiamano il *coat* esterno, determinando in ultima istanza la formazione della vescicola COPII. Sec13 e Sec31 sembrano avere invece un ruolo puramente strutturale, simile a quello della clatrina a livello degli endosomi (Lee and Goldberg, 2010; Stagg et al., 2006); a seconda di come Sec13 e Sec31 sono orientati tra loro nell'eterodimero che formano, essi possono regolare il diametro della vescicola, permettendo quindi il trasporto anche di proteine cargo molto grosse (Fromme and Schekman, 2005; Russell and Stagg, 2010).

4.2 Siti di Contatto

L'ER è in contatto con quasi tutti gli organelli della cellula, con i quali va a formare domini di associazione chiamati siti di contatto, tra cui sono ben conosciuti quelli con l'apparato di Golgi (Ladinsky et al., 1999), con la membrana plasmatica, in particolare nelle cellule muscolari (Rossi et al., 2008) e con i mitocondri (Kornmann and Walter, 2010) (Fig.7). In generale, la funzione di tali strutture sarebbe quella di costituire una piattaforma di scambio attraverso la quale molecole, principalmente lipidi, che sono sintetizzate a livello dell'ER possono essere direttamente trasferite all'organello di destinazione (Voeltz et al., 2002).

Come esempio di CS di ER, vengono descritte con maggior dettaglio qui di seguito le connessioni che l'ER compie con i mitocondri. Riassumerò poi le conoscenze attuali sulle CS ER-Golgi, argomento più direttamente rilevante al lavoro della mia tesi.

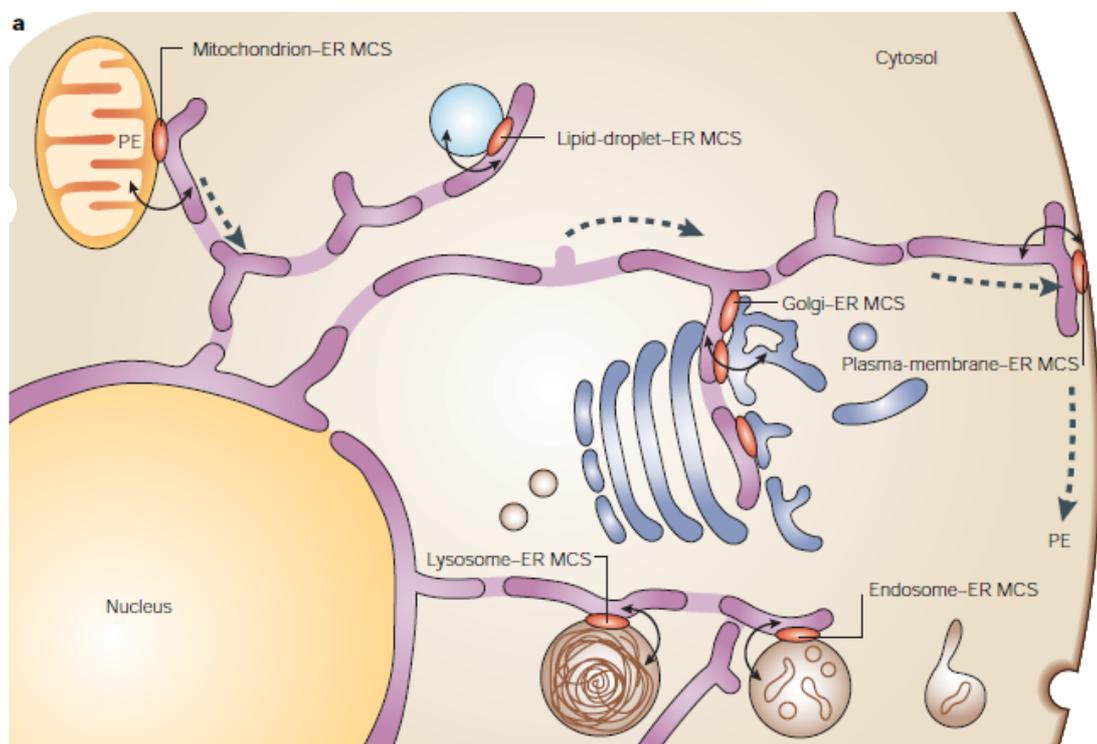


Fig.7: Siti di contatto in una cellula (Holthuis and Levine, 2005). L'ER crea siti di contatto con diversi organelli cellulari, tra i quali mitocondri, Golgi e membrana plasmatica

4.2.1 CS con la membrana dei mitocondri

Analisi ultrastrutturali hanno da sempre mostrato come ER e mitocondri siano fisicamente attaccati tra loro (Csordas et al., 2006; Mannella et al., 1998; Robertson, 1960); tuttavia, solo recentemente cominciano a essere identificate le componenti proteiche implicate in questa associazione.

Le regioni specifiche di contatto dell'ER con i mitocondri (anche chiamate *ER-Mitochondria Associated Membranes*, MAM) sono riportate essere coinvolte in eventi molto importanti per la fisiologia non solo del mitocondrio, ma di tutta la cellula: le funzioni meglio caratterizzate riguardano il trasferimento di lipidi e le dinamiche del calcio; esistono tuttavia altri ruoli che sono svolti a livello dei MAM ma che necessitano di ulteriori investigazioni, quali il ruolo dei contatti ER-mitocondri nell'importo di proteine mitocondriali e nella replicazione del genoma mitocondriale (Kornmann and Walter, 2010).

Riguardo la prima funzione, è ormai noto come il ruolo principale dei MAM sia appunto quello di regolare il metabolismo di numerose classi lipidiche (de Brito and Scorrano); tali lipidi non possono essere trasportati per via vescicolare in quanto non esiste una tale via di trasporto dall'ER al mitocondrio (Daum and Vance, 1997). Fosfatidilserina sintasi 1 e 2, enzimi responsabili della sintesi della fosfatidilserina, ad esempio, sono maggiormente arricchiti nelle membrane dei MAM piuttosto che nell'ER; la conversione di fosfatidilserina a fosfatidiletanolamina per decarbossilazione avviene invece nella membrana mitocondriale interna; la neo-sintetizzata fosfatidiletanolamina può quindi essere trasportata nuovamente a livello dei MAM dove può essere convertita in fosfatidilcolina o nuovamente in fosfatidilserina (Cui et al., 1993). Il MAM è importante anche per il metabolismo degli steroli: molti degli enzimi coinvolti vi sono maggiormente concentrati, mentre l'enzima che converte il colesterolo, generato nell'ER, in progesterone, è localizzato unicamente nei mitocondri; infine, si ritiene che il MAM siano coinvolti nel trasferimento del ceramide dall'ER ai mitocondri (de Brito and Scorrano).

Riguardo il ruolo dei *contact sites* nel omeostasi del calcio, è ormai noto come i mitocondri siano in grado di internalizzare il calcio rilasciato dall'ER, abbassandone quindi la concentrazione citosolica. I trasportatori per il calcio dei mitocondri, tuttavia, hanno una bassa affinità per lo ione, ma l'internalizzazione riesce comunque ad avvenire in quanto il rilascio di calcio dall'ER è spazialmente localizzato a livello dei CS; in questo modo si crea una concentrazione locale di ione sufficiente per attivare i trasportatori mitocondriali (Rizzuto et al., 1993).

Diverse proteine sono state implicate nella genesi dei siti di contatto ER-mitocondri. A livello dei MAM di mammifero sono state riportate essere localizzate proteine coinvolte nel *signalling* del calcio quali il canale anionico a voltaggio dipendente VDAC-1 (Rapizzi et al., 2002), presente nei mitocondri, e il recettore dell'ER per l'inositolo trifosfato (IP₃); queste due proteine sarebbero accoppiate per mezzo dello *chaperone* 75kDa *glucose regulated protein* (Grp75) (Szabadkai et al., 2006); più recentemente è stata implicata una proteina che ha un ruolo importante nella fusione mitocondriale, Mitofusina-2 (de Brito and Scorrano, 2008). Infine, con un approccio genetico innovativo applicato in lievito, è stato recentemente identificato un complesso proteico presente a livello dei siti di contatto e coinvolto nel metabolismo lipidico: si tratta del così detto *ER-mitochondria encounter structure* (ERMES). Il complesso ERMES è composto da due proteine integrali della membrana mitocondriale, Mdm10 e Mdm4, dalla proteina citosolica Mdm12 e dalla proteina di membrana dell'ER Mdm1 (Kornmann et al., 2009). In membrane mitocondriali delete di ERMES è stata vista una ridotta percentuale di lipidi derivanti dall'ER, suggerendo quindi un ruolo del complesso nella regolazione di tali dinamiche (Osman et al., 2009). Fino ad adesso non sono stati identificati gli omologhi di mammifero delle proteine ERMES.

4.2.2 CS con il complesso di Golgi

Come evidenziato nella sezione precedente, il trasporto dei lipidi da un'organello all'altro può non essere essenzialmente di tipo vescicolare; esistono infatti proteine di scambio dei lipidi (*Lipid Transfer Protein*, LTP) che legano il lipide specifico per mezzo di una tasca idrofobica e permettono così al lipide di essere estratto dalla membrana donatrice, attraversare lo spazio citosolico, e essere inserito nella membrana ricevente. Per fare ciò con la massima efficienza, le LTPs sono generalmente proteine periferiche di entrambe le membrane donatrici e riceventi, ed espletano la propria funzione a livello dei CS, in regioni cioè dove lo spazio citosolico che si frappone tra le due membrane è minimo. Il meccanismo d'azione delle LTP è schematizzato in Fig.8 ; brevemente, le LTP presentano due sequenze di legame per componenti proteici presenti sia nella membrana donatrice che quella ricevente: ancorandosi alla membrana donatrice, le LTP estraggono il lipide per le quali sono specifiche e lo trasferiscono a livello della membrana ricevente dove pure è presente una proteina interagente (D'Angelo et al., 2008). Esempi molto studiati di trasporto lipidico dipendente tra LTP sono quelli che avvengono tra l'ER e l'apparato di Golgi da parte della *CEramide Transfer Protein* CERT (Hanada et al., 2003) e della *OxySterol binding protein* OSBP

(Loewen et al., 2003); queste due LTP sono coinvolte nel trasporto all'apparato di Golgi del ceramide e degli steroli, rispettivamente. Entrambe presentano un dominio di localizzazione al Golgi, che è costituito da un dominio *Pleckstrin Homology* (PH), e un dominio di localizzazione all'ER costituito da un motivo di di-felinalanine in una regione acidica (*Two Phenylalanines in an Acidic Tract*, FFAT); quest'ultima sequenza si lega a sua volta con affinità nell'ordine del micromolare al dominio citosolico di una proteina transmembrana residente dell'ER, VAPA o VAPB (*Vesicle-associated-membrane-protein Associated Protein*) (Lev, 2010), proteine il cui ruolo funzionale in fisiologia e patologia verrà discusso dettagliatamente in questa tesi.

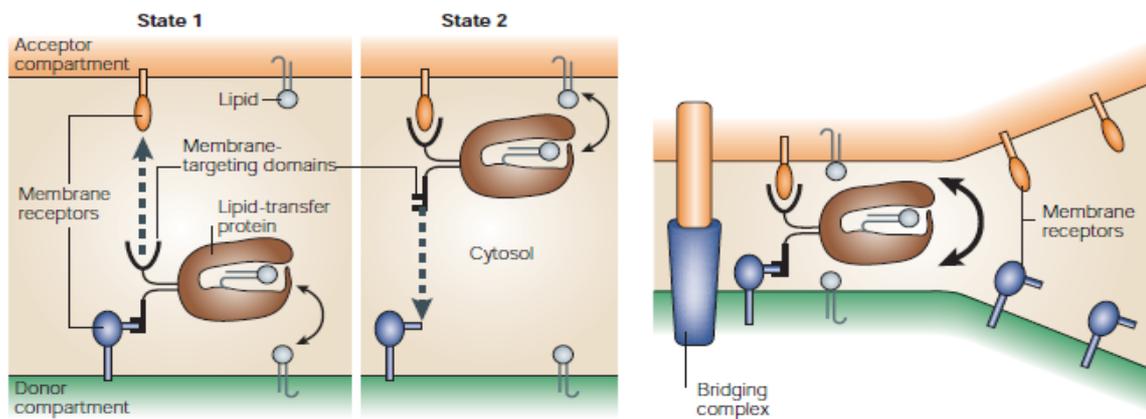


Fig.8: Maccanismo d'azione di una LTP (Holthuis and Levine, 2005). Nello stato 1, la LTP è associata a proteine adattatrici della membrana donatrice per mezzo di un dominio di legame specifico; nello stato 2, invece, la LTP interagisce con una seconda proteina adattatrice localizzata a livello della membrana ricevente.

4.3 Organized Smooth ER

L'ER è un organello molto dinamico; non sono infatti rari cambiamenti nella sua organizzazione strutturale in base alle esigenze specifiche della cellula o in risposta a stimoli esterni. In seguito alla overespressione di proteine residenti della propria membrana, ad esempio, l'ER liscio può espandersi notevolmente e velocemente, convertendo i propri tubuli in cisterne che si dispongono in pile ordinate, distanziate da uno strato di citosol di dimensioni uniformi: da qui il termine OSER (Snapp et al., 2003b). Il lavoro di Snapp et al. (Snapp et al., 2003b) ha dimostrato che la regolare geometria degli OSER è generata da interazioni tra i domini citosolici delle proteine di membrana overesprese e che la grandezza del dominio interagente determina lo spessore dello spazio citosolico frapposto tra le cisterne impilate (Borgese et al., 2006). Tuttavia, queste interazioni sono a bassa affinità, in quanto le proteine che inducono OSER diffondono liberamente tra OSER e l'ER circostante. Questa inattesa osservazione ha dimostrato come anche interazioni a bassa affinità possano indurre ingenti riarrangiamenti strutturali di un organello.

Mentre la formazione di OSER può rappresentare una risposta fisiologica all'aumentata espressione di proteine residenti, essi risultano tuttavia implicati anche in eventi patologici: sono stati infatti osservati in seguito all'espressione della forma mutata del canale *cystic fibrosis transmembrane regulator* (CFTR), responsabile dell'insorgenza della fibrosi cistica (Okiyoneda et al., 2004), oppure in seguito alla presenza della forma mutata della proteina *peripheral myelin protein 22* (PMP-22) associata alla malattia Charcot-Marie-Tooth di tipo 1 (Dickson et al., 2002). In questa tesi è stata poi caratterizzata una nuova forma di OSER indotta da un mutante patogenico della proteina VAPB, associato a una forma familiare della sclerosi laterale amiotrofica.

4.3.1 La proteina VAPB

Come descritto nel paragrafo precedente, VAPB e il suo omologo VAPA sono proteine transmembrana residenti nell'ER appartenenti alla famiglia delle proteine *tail-anchored*; i membri di tale famiglia costituiscono una sottoclasse di proteine transmembrana di tipo 2 che presentano un dominio citosolico ammino-terminale, un singolo transmembrana vicino all'estremità C-terminale e un breve dominio luminale (inferiore a 30 aminoacidi) (Borgese et al., 2007; Borgese et al., 2009; Borgese et al., 2003a; Borgese et al., 2003b). La caratteristica che distingue le proteine *tail-anchored* da altre proteine di membrana è nella

loro particolare biogenesi. A differenza delle altre proteine di membrana, le proteine *tail-anchored* neo-sintetizzate si inseriscono nella membrana di destinazione con meccanismo post-traduzionale.

La porzione citosolica di VAPA e B presenta all’N-terminale un dominio di 150 amminoacidi omologo allo *Major Sperm Protein* (MSP); questo stesso dominio in *C.elegans* svolge la funzione di componente citoscheletrica e di ormone riproduttivo (Kosinski et al., 2005). Il dominio MSP è seguito da un dominio *coiled-coil*; segue il TMD e la piccola coda luminale (Mitne-Neto et al., 2007) (Fig. 9). All’interno del TMD e nelle immediate vicinanze, VAPB presenta due sequenze consenso per la omo- ed eterodimerizzazione GxxxG (Russ and Engelman, 2000), mentre VAPA possiede solo quello all’interno del TMD.

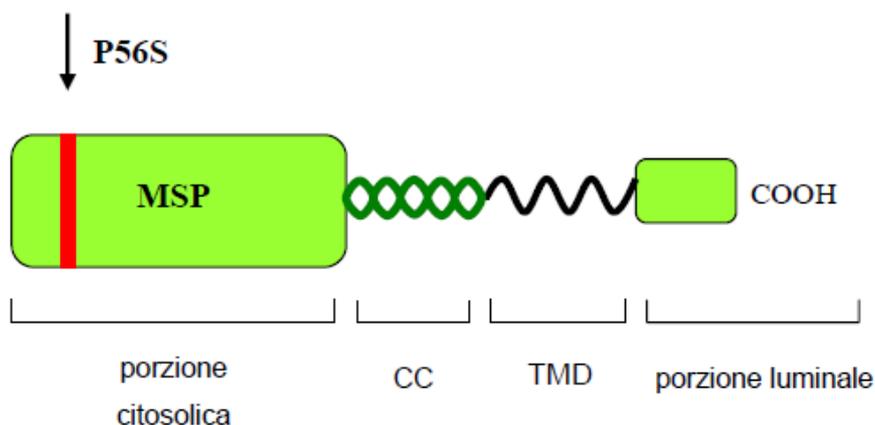


Fig. 9: Schematizzazione della struttura della proteina VAPB. La mutazione P56S all’interno del dominio *major sperm protein*

VAPA e B sono proteine ubiquitarie: fungono da adattatrici che interagiscono con i propri ligandi provvisti del motivo FFAT. Sono numerose le funzioni attribuite alle proteine VAP; tra le tante, essa sembra essere implicata nella regolazione del traffico di membrana (Skehel et al., 1995), nell’ *Unfolded Protein Response* (UPR) (Kanekura et al., 2006), e nell’organizzazione dei microtubuli (Amarilio et al., 2005); la funzione più importante e studiata attribuita è sicuramente quella di adattatore per il trasporto di lipidi: tra i suoi più noti interattori risultano infatti CERT (Kawano et al., 2006) e OSBP (Nikawa et al., 1995)

(Kagiwada et al., 1998), implicati rispettivamente nel trasporto di ceramide e steroli dall'ER al Golgi (si veda la sezione 4.2.2).

Una mutazione missenso nel gene codificante per VAPB che causa una sostituzione amminoacidica da serina a prolina in posizione 56 della proteina è stata associata a una forma tardiva ad eredità autosomica dominante di sclerosi laterale amiotrofica (ALS), chiamata ALS8 (Chen et al., 2010; Nishimura et al., 2004). La mutazione si trova nel dominio MSP e risulta presumibilmente in un *fold*ing errato della proteina (Teuling et al., 2007). L'overespressione di tale forma mutata genera aggregati intracellulari la cui origine e struttura non erano chiare. La caratterizzazione di questi aggregati prodotti da una proteina residente dell'ER è stata uno degli obiettivi di questa tesi.

4.4 Microdomini lipidici

Il modello di membrana proposto da Singer e Nicolson nel 1972 prevede che il doppio strato lipidico sia in uno stato liquido-cristallino, e che le proteine in esso contenute, grazie alla grande fluidità dei lipidi costituenti, possano muoversi liberamente e casualmente all'interno di esso. Non viene escluso, tuttavia, che piccoli assembramenti (con dimensione inferiore ai 100 nanometri) possano formarsi a causa di specifiche interazioni (Singer and Nicolson, 1972). Negli anni successivi, numerosi sforzi sono stati fatti per meglio chiarire la natura e la funzione dei così detti "microdomini di membrana", e cioè di queste piccole ed ordinate strutture che differiscono nella composizione lipidica e proteica dalla restante membrana che li circonda (Lindner and Naim, 2009). In questo paragrafo verranno discussi i microdomini di membrana basati su interazioni lipidiche, chiamati anche "zattere lipidiche" (*lipid rafts*, LR).

4.4.1 Lipid rafts

Il modello di Singer e Nicolson sopra descritto propone che i lipidi in un doppio strato abbiano sostanzialmente la funzione di solvente per le proteine in esso contenute. Tuttavia, nelle membrane, le diverse classi di lipidi sono distribuite asimmetricamente nei due foglietti, nei quali sono inoltre osservabili zone dove lipidi appartenenti a una o più classi diverse si organizzano lateralmente (van Meer, 1989). Vengono così definiti *lipid rafts* strutture dinamiche arricchite in colesterolo e sfingolipidi che si formano nel foglietto exoplasmico di

un doppio strato, in particolare quello della membrana plasmatica e del *trans Golgi network*; dal punto di vista della composizione proteica, sono particolarmente arricchiti nei LR proteine associate alla membrana con ancore glicosil-fosfatidilinositolo (GPI) (Simons and Ikonen, 1997). La coesione all'interno di un LR è dovuta alla interazione tra le lunghe catene alifatiche degli sfingolipidi e il colesterolo secondo il così detto "effetto ad ombrello" nel quale l'idrofobicità del colesterolo è protetta dall'ambiente acquoso del citosol in quanto schermata dalle grandi teste polari degli sfingolipidi (Huang and Feigenson, 1999).

Sono molte le funzioni che sono state attribuite ai LR. Essi sono coinvolti, per esempio, nel trasporto delle proteine ad ancora GPI (Brown, 1994; Mayor and Riezman, 2004); nelle cellule polarizzate, infatti, è stato visto come tali proteine sono fortemente associate ai LR e come tale interazione permetta un selettivo trasporto a livello apicale (Ikonen, 2001). Altra importante funzione rivestita dai LR è quella svolta nell'endocitosi sia clatrina- dipendente che clatrina-indipendente (Anderson et al., 1996; Subtil et al., 1999). Infine, un ruolo importante dei microdomini lipidici è quella svolta a livello del *signaling* intracellulare; è ormai opinione comune, infatti, che i LR costituiscano delle piattaforme all'interno delle membrane che funge da organizzatore del *signaling* (Pani and Singh, 2009; Simons and Toomre, 2000).

Studi più dettagliati sulla meccanicistica riguardante la formazione dei LR derivano da studi biofisici basati su membrane modello composte da due o tre tipi differenti di lipidi. A una temperatura fisiologica (de Almeida et al., 2003), una membrana modello subisce una transizione di stato e passa da una fase solida (S_o), con un'organizzazione ordinata dei propri lipidi, a una fase liquida (L_d), nella quale i lipidi si presentano in maniera disordinata. In presenza di colesterolo, tuttavia, si crea una seconda fase di transizione chiamata liquida-ordinata (L_o), più rigida e spessa, e caratterizzata cioè da lipidi mobili e disposti in maniera più ordinata rispetto a quelli della L_d , ma meno rispetto a quelli della fase solida S_o . La fase liquida L_d e la fase liquida-ordinata L_o possono coesistere in particolari condizioni, come ad esempio in vescicole unilamellari giganti, portando a una separazione di fase visibile al microscopio e dove possono rappresentare, rispettivamente, la regione non raft e la regione raft della membrana (Kaiser et al., 2009). Dal punto di vista biochimico, invece, i LR sono sempre stati identificati come porzioni della membrana capaci di resistere alla solubilizzazione a 4°C da parte di blandi detergenti non ionici quali il Triton X-100: per questa caratteristica tali regioni del doppio strato sono anche chiamate membrane resistenti ai detergenti (*detergent-resistant membranes*, DRM) (Edidin, 2003); DRM purificate con gradienti di flottazione sono state riportate essere costituite da vescicole della dimensione di 0,1-1 micrometro (Brown and Rose, 1992); tuttavia strutture di tali dimensioni non sono mai

state osservate in cellule viventi (Lindner and Naim, 2009). Perciò la equivalenza tra DRM e microdomini esistenti *in vivo* è oggi messo fortemente in dubbio.

Nonostante la mole di lavoro che è stato eseguito sui LR, l'argomento è oggetto di dibattito e ci sono ricercatori che addirittura dubitano se essi effettivamente esistano in membrane non perturbate (Lindner and Naim, 2009; Munro, 2003). Tuttavia, studi di imaging con tecniche biofisiche hanno confermato l'esistenza dei LR in vivo, anche se si sono rivelati essere di dimensioni submicrometriche, molto più piccoli quindi dei LR osservati in membrane modello (Pralle et al., 2000). Rimane irrisolta la domanda sul perché i LR hanno dimensioni così piccole nelle membrane cellulari quando in membrane modello sono notevolmente più estesi. Sono nate quindi altre ipotesi sulla formazione di microdomini di membrana che propongono non solo i lipidi come agente per la loro formazione (Douglass and Vale, 2005); il lavoro di Yathiraj e Weisshaar per esempio ha proposto che le proteine integrali di membrana possano impedire la completa separazione di fase, stabilizzando invece piccoli domini lipidici di diametro nell'ordine dei nanometri (Yethiraj and Weisshaar, 2007). In seguito è stato osservato come l'effetto sopra descritto è massimo per proteine che occupano un'area intorno a 10 volte quella occupata da una molecola di lipide, mentre si riduce notevolmente per proteine più grandi (che occupano un'area più di 20 volte superiore a quella occupata da un lipide) (Gomez et al., 2010). Un'altra osservazione interessante è emersa da uno studio di *imaging* su cellule deplete di colesterolo (Hao et al., 2001); gli autori hanno osservato che, contrariamente alle aspettative, la rimozione di colesterolo causava una coalescenza di microdomini submicroscopici in grossi LR; perciò hanno suggerito che *in vivo* il colesterolo stabilizzi i confini tra domini *raft* e non-*raft*, portando a una loro frammentazione in sottodomini estremamente piccoli (≈ 50 nm).

I microdomini discussi finora sono stati identificati e studiati a livello della membrana plasmatica, membrana in cui colesterolo e sfingolipidi sono abbondanti. Tuttavia, vi sono evidenze per l'esistenza di domini lipidici anche in stazioni precedenti della via secretoria, dove svolgerebbero un ruolo di smistamento di lipidi e proteine. E' stato per esempio osservato che il ceramide è in grado di formare domini molto ordinati in membrane modello anche in assenza di colesterolo (Castro et al., 2009); ciò ha portato all'idea dell'esistenza di LR non solo nella membrana plasmatica, coerentemente col fatto che il ceramide è maggiormente arricchito in altri doppi strati, quali quelli dell'ER. Studi in lievito, infatti, hanno mostrato come proteine con ancore GPI, che sembrano localizzarsi a livello dei LR in membrana plasmatica, in realtà vengano trasportate già a livello dell'ER- cis Golgi in vescicole COPII con una composizione lipidica particolare, suggerendo quindi un fenomeno di smistamento proteico basato su interazioni con i lipidi già a livello degli ERES (Muniz et

al., 2001); sempre a livello dell'ER, sono state identificate due proteine residenti dell'ER rinominate erlin-1 e erlin-2 che segregano nei DRM in seguito a trattamento con Triton e per questo proposte come componenti di putativi LR di ER (Browman et al., 2006). Dato che la composizione della membrana dell'ER è sensibilmente diversa da quella della membrana plasmatica e del *trans Golgi network*, è stato ipotizzato che esistano diverse tipologie di LR, differenti tra loro sia nella composizione lipidica e proteica, sia per quanto riguarda la loro dimensione.

Anche se gli studi sui LR nell'ER sono limitati, l'argomento è di grosso interesse, perché microdomini lipidici in questo organello potrebbero avere ruoli funzionali molto importanti. Oltre a un ruolo nella compartimentalizzazione di attività funzionali in sottodomini diversi, essi potrebbero giocare un ruolo nello smistamento di proteine neosintetizzate e nel loro trasporto al Golgi, una delle funzioni chiave dell'ER. Un possibile ruolo di microdomini lipidici nel trasporto di proteine di membrana dall'ER al Golgi è suggerito dagli studi condotti nel mio laboratorio sul ruolo del TMD nello smistamento di proteine di membrana a livello dell'ER. Questi studi sono descritti in dettaglio nella sezione successiva.

5. RUOLO DELLE INTERAZIONI PROTEINA-LIPIDE NELLO SMISTAMENTO DI PROTEINE DI MEMBRANA LUNGO LA VIA DI SECREZIONE

Le proteine che inseriscono il proprio dominio idrofobico nella membrana presentano una chiara preferenza per una particolare fase del doppio strato; in particolare, la maggior parte di esse, in presenza delle due fasi disordinata L_d e liquido-ordinata L_o , tenderanno a segregare nella fase L_d ; esistono tuttavia delle eccezioni; le proteine particolarmente arricchite nei LR, per esempio, tendono maggiormente ad interagire con lipidi della fase L_o (Brown, 2006): proteine diverse presentano quindi diversa affinità con i vari lipidi residenti in un doppio strato.

Queste interazioni sono state viste essere molto importanti anche nel trasporto lungo la via secretoria. Generalmente, infatti, riguardo al trasporto a livello dell'ER, proteine che devono lasciare l'organello presentano motivi di esporto che permettono loro di essere incorporate in vescicole COPII; proteine che devono rimanere nell'ER, al contrario, presentano segnali di ritenzione che ne impediscono il rilascio (vedi paragrafo ERES). In

talune proteine, tuttavia, il *sorting* è determinato da caratteristiche fisico-chimiche del dominio transmembrana piuttostochè da una sequenza segnale vera e propria. Nel nostro laboratorio ci siamo interessati a quest'ultimo aspetto, focalizzandoci in particolare nello studiare quale componente del transmembrana di una proteina integrale del doppio strato sia importante per determinare il suo destino lungo la via secretoria.

Già nel 1996, Pedrazzini et al. hanno osservato che allungando di 5 amminoacidi il TMD di un enzima normalmente residente nella membrana dell'ER, il citocromo b_5 (b_5), si determinava il suo trasporto a livello della membrana plasmatica (Pedrazzini et al., 1996). Per escludere alcun coinvolgimento della testa catalitica dell'enzima, nel lavoro di Bulbarelli et al. (2002) è stata sostituita la porzione citosolica del b_5 con la *green fluorescent protein* (GFP), generando quindi due costrutti chimerici che presentavano rispettivamente il TMD del b_5 *wild-type* e il TMD allungato; anche in questo caso, si è osservato che il costrutto con il TMD esteso veniva esportato alla membrana plasmatica, mentre quello *wild-type* veniva ritenuto nell'ER (Bulbarelli et al., 2002). In conclusione, quindi, si è osservato che modificazioni a livello del solo transmembrana di determinate proteine che non presentano segnali di ritenzione od esporto possono determinarne o impedirne l'uscita dall'ER. Tale *sorting* TMD-dipendente è stato osservato anche in altre stazioni della via secretoria, come a livello del Golgi, della membrana plasmatica e del *trans Golgi network* (Sharpe et al., 2010). Tale tipo di *sorting* è generalmente indipendente dalla sequenza primaria del TMD (Honsho et al., 1998), ma è fortemente correlato alle caratteristiche chimico-fisiche del dominio, quali lunghezza ed idrofobicità; TMD con aumentata idrofobicità e lunghezza, in particolare, si localizzano in stazioni sempre più distali della via secretoria (Karsten et al., 2004) (Bulbarelli et al., 2002; Bretscher and Munro, 1993), in concordanza alla crescente rigidità e spessore delle membrane degli organelli della via (Sprong et al., 2001; Sharpe et al., 2010).

Mentre gli studi da altri laboratori avevano fatto supporre che uno smistamento dipendente da interazioni TMD-lipidi avvenisse dal Golgi in poi e non tra ER e Golgi, le osservazioni sul citocromo b_5 descritte sopra hanno fatto supporre che già a livello dell'ER ci potesse essere uno smistamento dipendente dai lipidi. Ceppi et al. hanno studiato se il TMD esteso, più idrofobico oltre che più lungo di quello *wild-type*, interagisse con classi lipidiche diverse rispetto al *wild-type*; in un sistema modello di liposomi costituiti da fosfatidilcolina ma complementati con lipidi più rigidi quali fosfatidilserina oppure ceramide, si è osservato una maggiore affinità del TMD esteso del b_5 per tali lipidi rispetto alla sola fosfatidilcolina (lipide maggioritario dell'ER) (Ceppi et al., 2005); questo a dimostrazione che TMD più lunghi ed idrofobici si associano preferenzialmente con lipidi più rigidi tipici del Golgi e della membrana plasmatica, quali appunto rispettivamente ceramide e fosfatidilserina.

Nel lavoro di Ronchi et al., infine, si è voluto investigare gli stadi veramente precoci del traffico delle due proteine chimeriche, allo scopo di chiarire meglio cosa determini un destino così diverso. In particolare, è stato chiesto se lo smistamento tra le due proteine avveniva a livello degli ERES (TMD lungo reclutato, TMD *wild-type* escluso) oppure dopo l'uscita dall'ER (TMD *wild-type* recuperato in vescicle COPI, TMD esteso non recuperato). Attraverso tecniche di microiniezione combinate a blocchi di temperatura, si è osservato come le due proteine si distribuiscano in modo differente all'interno dell'ER: mentre il costrutto con il TMD *wild-type* si distribuisce uniformemente nell'ER ma è escluso dagli ERES, il costrutto con il TMD esteso è escluso dalle cisterne e si localizza unicamente nei tubuli prima di essere reclutato agli ERES ed esportata dall'ER (Ronchi et al., 2008).

In conclusione a questi studi, si può affermare che proteine transmembrana che non seguono la comune via segnale-dipendente per determinare la loro localizzazione lungo la via secretoria utilizzano un sistema TMD-dipendente basato su interazioni proteina-lipide; in particolare, TMD lunghi ed idrofobici determinano trasporto verso le membrane più rigide e spesse del Golgi e membrana plasmatica, mentre TMD corti e moderatamente idrofobici localizzano le proteine all'ER (Bulbarelli et al., 2002; Ceppi et al., 2005; Pedrazzini et al., 1996); quando non ancora esportato verso la membrana plasmatica, inoltre, si può osservare come proteine con TMD lunghi si localizzano principalmente nelle regioni ad alta curvatura dell'ER, è cioè i tubuli, mentre sono escluse da regioni non curve, e quindi dalle cisterne (Ronchi et al., 2008).

Ma quale potrebbe essere il meccanismo della segregazione TMD-dipendente che avviene all'interno dell'ER? L'aggiunta di soli 5 amminoacidi rende il core idrofobico della proteina b_5 con TMD esteso più lungo dello spessore del sottile doppio strato dell'ER (Sprong et al., 2001); ciò quindi crea un *mismatch* tra le due componenti che sfavorirebbe l'inserimento della proteina nella membrana dell'ER. Risultati ottenuti da esperimenti sia in vivo che in vitro tuttavia, hanno dimostrato che il b_5 con il TMD esteso si inserisce inizialmente nella membrana dell'ER (Pedrazzini et al., 1996; Pedrazzini et al., 2000; Ronchi et al., 2008), indicando che in qualche modo il *mismatch* viene risolto. Una ipotesi da verificare è che il TMD si associ preferenzialmente con lipidi più compatibili della maggioritaria fosfatidilcolina, e cioè con molecole più rigide e quindi più lunghe, creando a sua volta piccoli microdomini lipidici; secondo questa idea, i tubuli dell'ER e gli ERES offrirebbero un ambiente lipidico più adatto al TMD di 22 residui, permettendone poi l'esportazione in vescicole di trasporto COPII. Questa ipotesi è indirettamente supportata dai risultati ottenuti in Ceppi et al. (2005). Questi autori hanno analizzato mediante calorimetria differenziale l'interazione di TM con lipidi diversi in membrane artificiali. Con questo

approccio hanno osservato che il TMD esteso segrega in domini arricchiti in ceramide, fosfatidilserina o colesterolo (Ceppi et al., 2005). Tuttavia, l'interazione di TMD di diversa lunghezza con i lipidi nell'ambiente naturale dell'ER non è stata finora investigata.

SCOPO DELLA TESI

Il mio progetto di Dottorato si è focalizzato sulla caratterizzazione di due sottodomini dell'ER non studiati fino a ora: di questi, il primo si presenta in un contesto patologico (aggregati/inclusioni indotti da VAPB mutato), mentre ipotizziamo che il secondo (microdomini lipidici dove risiederebbero proteine con TMD *mismatched*) sia implicato nel fisiologico smistamento, TMD-dipendente, di proteine di membrana.

Aggregati/inclusioni indotte da VAPB mutato. Come descritto nell'Introduzione di questa tesi, VAPB è una proteina integrale della membrana dell'ER la cui funzione principale è quella di adattatore per proteine coinvolte nel trasporto di lipidi dall'ER ad altri organelli. Lavori precedenti hanno mostrato che una variante mutata, P56S VAPB è legata a una forma ad ereditarietà autosomica dominante di sclerosi laterale amiotrofica ad esordio tardivo, l'ALS8 (Chen et al., 2010; Nishimura et al., 2004). E' stato osservato che P56S VAPB forma inclusioni intracellulari quando sovraespressa in cellule in coltura; inoltre vi sono evidenze che nell'eterozigote la forma *wild-type* della proteina è sequestrata all'interno delle inclusioni (Teuling et al., 2007), con conseguente effetto dominante negativo del mutante patogenico. Tuttavia, poco è conosciuto sulla biogenesi, sulla natura e sul destino delle inclusioni, il cui rapporto con l'ER non era stato chiarito. Come accennato nella Introduzione, VAPB è una proteina *tail-anchored*, che è quindi obbligato a inserirsi post-traduzionalmente nella membrana dell'ER. Perciò era possibile che la proteina mutata formasse le inclusioni nel citosol, prima di inserirsi, oppure che le inclusioni fossero indotte dalla proteina inserita e che quindi coinvolgessero l'ER. Ovviamente, ciascuna di queste due situazioni è predetta avere conseguenze molto diverse sulla fisiologia cellulare. La prima parte del mio periodo di Dottorato è stato quindi volto allo studio della biogenesi delle inclusioni P56S VAPB e della loro relazione con l'ER.

Microdomini lipidici coinvolti nel sorting. Come spiegato nella Introduzione di questa tesi, lavori precedenti nel nostro laboratorio hanno dimostrato come proteine inserite nell'ER e destinate a essere trasportate alla membrana plasmatica con meccanismo TMD-dipendente, all'interno dell'ER sono escluse dalle cisterne e segregate nei tubuli e negli ERES (Ronchi et al., 2008); tali regioni potrebbero essere caratterizzate da una particolare composizione lipidica che meglio accomoderebbe il transmembrana esteso e quindi *mismatched*. Nel lavoro della mia tesi ho cercato di dimostrare direttamente la segregazione in microdomini lipidici di un TMD *mismatched*, analizzando quali, tra i lipidi della membrane dell'ER, si associano in modo diverso a TMD di lunghezza e idrofobicità diverse. Questo

problema è stato affrontato studiando il *cross-linking* delle nostre proteine modello con sonde lipidiche fotoattivabili.

MATERIALI E METODI

COSTRUZIONE DI PLASMIDI RICOMBINANTI

Tutti i costrutti utilizzati per questa tesi sono illustrati nella Fig.11. Per ottenere i costrutti sono state utilizzate metodologie standard descritte in (Ausubel et al., 1987).

pGEM4-b₅17ops, pGEM4-b₅22ops e pGEM4-b₅ops-TM_{syb}

I plasmidi pGEM4-b₅17ops e pGEM4-b₅22ops consistono in un cDNA codificante rispettivamente per il citocromo b₅ di coniglio oppure per un citocromo b₅ mutato, provvisto di un TMD allungato di 5 aminoacidi. Ambedue i cDNA terminano con un epitopo derivante dall'opsina (ops) che fornisce un sito di N-glicosilazione alla proteina espressa. Questi plasmidi (Costrutti 1 e 2 della Fig. 11) erano già disponibili in laboratorio (Pedrazzini et al., 2000). Il plasmide pGEM4-b₅ops-TM_{syb} (costrutto 3, Fig. 11) che codifica per una forma chimerica di b₅ops, in cui il TMD del b₅ è stato sostituito con quello della sinaptobrevina 2 (Syb) è stato descritto in un precedente lavoro (Brambillasca et al., 2006).

pGEM4-VAPBops (costrutto 4, Fig.11)

Il vettore pCAN-myc-VAPB (umano) (Costrutto 11, Fig. 11) è stato gentilmente donato dalla Dott.ssa Sima Lev (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel). Esso è stato amplificato per PCR allo scopo di introdurre siti di restrizione specifici che sono stati poi utilizzati per l'inserimento della sequenza codificante nel vettore di espressione in vitro pGEM4. I diversi primer usati sono descritti in Tab.1; per la generazione di pGEM4-VAPBops i primers utilizzati sono il n.1 e 2 di Tab.1.

Dopo aver purificato il frammento di PCR con il kit "PCR purification kit" (Qiagen), è stata compiuta una doppia digestione con gli enzimi KpnI e XbaI. Allo scopo di creare le estremità compatibili, anche il vettore d'espressione pGEM4 è stato digerito con gli stessi enzimi; esso è stato poi in seguito trattato con l'enzima fosfatasi alcalina allo scopo di rimuovere i gruppi fosfato dalle estremità al 5' del vettore. Il vettore defosforilato è stato quindi purificato da gel utilizzando il kit "Gel extraction kit" (Qiagen).

Il frammento e il vettore purificati sono stati sottoposti a una reazione di

ligazione, e la miscela di ligazione è stata utilizzata per trasformare batteri *E.coli* ceppo DH5á resi competenti precedentemente. Le colonie risultanti sono state sottoposte a uno *screening* con l'enzima XhoI per verificare se effettivamente l'inserito era stato aggiunto nel vettore. I cloni risultati positivi allo screening sono stati infine sequenziati dalla ditta MWG.

E' stata quindi creata una cassetta con la sequenza dei 19 amminoacidi N-terminali dell'opsina bovina (cassetta ops, oligo 3 e 4 Tab.1). I due oligonucleotidi non si allineano completamente tra loro: dell'oligonucleotide upper non sono allineabili i primi nucleotidi al 5', dell'oligonucleotide lower gli ultimi al 3'. Questo perché tali nucleotidi costituiscono le estremità appiccicose (per AgeI al 5' e per XbaI al 3') che sono complementari al taglio enzimatico che verrà effettuato al vettore nel quale la cassetta verrà inserita. I due oligonucleotidi sono stati uniti tra loro per formare la cassetta ops: una nmole di ciascun oligonucleotide veniva aggiunta in un volume finale di 20 µl di tampone STE (100 mM NaCl, 10 mM TrisHCl pH 8,2 mM EDTA pH 8); la miscela veniva fatta scaldare a 90°C per 3 minuti e lasciata raffreddare a temperatura ambiente.

Il vettore pGEM4-VAPB è stato digerito contemporaneamente con AgeI e XbaI, defosforilato e purificato. La miscela di ligazione tra il vettore e la cassetta ops (rapporto molare di 1:5) veniva usata per trasformare batteri DH5á competenti. Le colonie risultanti sono state sottoposte a *screening* con l'enzima XhoI per verificare l'effettivo inserimento della cassetta. I cloni positivi allo screening sono stati infine sequenziati.

Chimere pGEM4-VAPBops-TMb₅17 e pGEM4-b₅17ops-TMVAPB (Costrutti 5 e 6, Fig.11)

Per chiarire il ruolo del dominio transmembrana nell'inserimento di VAPB alla membrana dell'ER, sono stati creati due costrutti chimerici di VAPB e della proteina citocromo b₅, con i transmembrana vicendevolmente scambiati.

Sono state prodotte due diverse cassette, codificanti per il transmembrana di VAPB (TMVAPB, oligo n. 5 e 6 Tab.1) o per quello del b₅ (TMb₅, oligo n. 7 e 8 Tab.1).

Gli oligonucleotidi upper e lower di ciascuna cassetta sono stati quindi uniti come descritto per la cassetta ops. Il vettore pGEM4-b₅17ops è stato digerito con gli enzimi compatibili alla cassetta TMVAPB, mentre pGEM4-VAPBops con enzimi compatibili alla cassetta TMb₅. La ligazione e la trasformazione dei batteri DH5a sono stati eseguiti come descritto per i costrutti precedenti. Le colonie risultanti sono state sottoposte a *screening* con l'enzima *SpeI*, sito unico di restrizione presente in entrambe le

cassette, per verificare l'effettivo inserimento di quest'ultime. I cloni positivi allo screening sono stati infine sequenziati.

pGEM4-P56S-VAPBops (Costrutto 7, Fig.11)

pGEM4-VAPBops, precedentemente trasformato nel ceppo batterico di E.coli DAM negativo GM2163 e sequenziato, è stato utilizzato come template per una reazione di PCR nella quale sono stati utilizzati come upper primer lo stesso oligonucleotide utilizzato per amplificare la sequenza codificante di VAPB (oligo 1 Tab.1), con presente al 5' un sito di restrizione per *KpnI*, e come lower primer (oligo 9, Tab.1) un oligonucleotide che introduce la mutazione puntiforme 166 C>T (G>A nel lower primer, in grassetto); il primer presenta inoltre il sito di restrizione per l'enzima *ClaI*. Il frammento di PCR risultante è stato purificato e poi digerito contemporaneamente con gli stessi enzimi. Analogamente il plasmide pGEM4-VAPBops è stato digerito con *KpnI* e *ClaI*, quindi purificato e defosforilato. La ligazione e la trasformazione dei batteri DH5a sono stati eseguiti come descritto per i costrutti precedenti. I cloni positivi sono stati quindi sequenziati.

pGEM4-VAPBops-2G2Ains, pGEM4-VAPBops-2G2Aout e pGEM4-VAPBops-2G2Adm (costrutti 8, 9 e 10 Fig.11)

Come già anticipato nella Introduzione della Tesi, VAPB presenta due siti consenso per la dimerizzazione GxxxG, uno posizionato nel dominio *coiled-coil* subito a monte del TMD, e uno all'interno TMD. Si è quindi pensato di mutagenizzare uno oppure entrambi questi siti per vedere se la bassa efficienza di inserimento di VAPB fosse dovuta a una rapida oligomerizzazione della proteina una volta rilasciata dal ribosoma. Sono state compiute quindi delle mutagenizzazioni in situ (kit Stratagene) allo scopo di sostituire le glicine poste ai margini dei siti consenso per la dimerizzazione in alanine. Utilizzando il plasmide pGEM4-VAPBops (Fig.11 n. 4) sono stati creati tre nuovi costrutti: pGEM4-VAPBops-2G2Ains (mutagenizzato da GxxxG a AxxxA il sito di dimerizzazione interno al TMD, Fig.11 n.8, Tab.1 oligo n. 10 e 11), pGEM4-VAPBops-2G2Aout (mutagenizzato da GxxxG a AxxxA il sito di dimerizzazione esterno al TMD, Fig.11 n.9, Tab.1 oligo n. 12 e 13), pGEM4-VAPBops-2G2Adm (mutagenizzati entrambi i siti da GxxxG a AxxxA utilizzando come template pGEM4-VAPBops-2G2Ains e oligo mostrati in Tab.1 n. 12 e 13, Fig.11 n.10).

pCAN-myc-P56S-VAPB (Costrutto 12, Fig.11)

pCAN-myc-VAPB è stato utilizzato come template per una reazione di mutagenesi sito diretta (Stratagene); a tale scopo sono stati utilizzati un upper e un lower primer complementari tra loro e al template, ma con una unica sostituzione nucleotidica C>T (G>A per il lower primer) che creerà la mutazione puntiforme in posizione 166 del template (oligo 14 e 15, Tab.1).

pCDNA3-VAPBops e pCDNA3-P56S-VAPBops (costrutti 13 e 14, Fig.11)

pGEM4-VAPBops e pGEM4-P56S-VAPBops amplificati in batteri DAM negativi sono stati digeriti contemporaneamente con *KpnI* e *XbaI*, al fine di separare la loro sequenza codificante dal vettore pGEM4. I frammenti di restrizioni sono stati quindi purificati. Il vettore d'espressione in cellule di mammifero pCDNA3, amplificato anch'esso in batteri DAM negativi, è stato digerito contemporaneamente con gli stessi enzimi; esso è stato quindi purificato e defosforilato.

Sono state quindi fatte due reazioni di ligazione, una con pCDNA3 *KpnI-XbaI* e VAPBops, l'altra con lo stesso vettore e il frammento di restrizione P56S- VAPBops. Le miscele di reazione ottenute sono state utilizzate per trasformare batteri DH5. Alle colonie ottenute è stato fatto uno screening con l'enzima *StuI* per quanto riguarda il plasmide pCDNA3-VAPBops (che presenta un sito di restrizione all'interno del vettore e uno nell'inserto, con quindi generazione di un frammento di circa 1000bp nel caso di positività), e con l'enzima *BspEI* per pCDNA3-P56S-VAPBops (sito unico di restrizione nell'inserto).

pCAN-myc-P56S-VAPB-TMb₅17 e pCAN-myc-P56S-VAPB-2G2Adm (costrutti 15 e 16 Fig.11)

Per investigare il ruolo svolto dal TMD e dalle sequenze di dimerizzazione presenti in VAPB nella formazione delle inclusioni in vivo, sono stati creati i due costrutti pCAN-myc-P56S-VAPB-TMb₅17, dove il TMD di P56S-VAPB è stato sostituito con quello del b₅, e pCAN-myc-P56S-VAPB-2G2Adm, dove sono stati mutagenizzati entrambi i siti di dimerizzazione di P56S-VAPB. Sono stati creati due frammenti di PCR a partire dai template pGEM4-

VAPBops-TMb₅17 e pGEM4-VAPBops-2G2Adm allo scopo di eliminare in entrambi i casi l'epitopo ops. E' stato utilizzato un comune upper primer (oligo 16 Tab.1), posizionato all'interno dello MSP, combinato a lower primer specifici per i due costrutti template, e recanti in entrambi i casi un codone di stop prematuro che permettesse l'eliminazione dell'epitopo ops (oligo 17 Tab.1 per pCAN-myc-P56S-VAPB-TMb₅17 e oligo 18 Tab.1 per pCAN-myc-P56S-VAPB-2G2Adm); a monte del codone di stop, in entrambi i lower primer è stato inserito un sito di restrizione per *EcoRV* per lo screening dei cloni. I frammenti di PCR sono stati quindi inseriti all'interno del plasmide pCAN-myc-P56S-VAPB (n.12, Fig.11) precedentemente digerito con enzimi di restrizione compatibili. La positività dei cloni ottenuti è stata quindi verificata tramite digestione con *EcoRV*.

ESPERIMENTI RIGUARDANTI LA CARATTERIZZAZIONE DELLE INCLUSIONI GENERATE DA P56S-VAPB

La caratterizzazione delle inclusioni è stata eseguita con due approcci sperimentali: un approccio *cell-free*, nel quale è stato studiato la sintesi e inserimento in membrana di VAPB e di P56S-VAPB e un approccio in vivo, nel quale sono state studiate la generazione e le caratteristiche delle inclusioni generate in cellule trasfettate.

Purificazione di anticorpi monoclonali anti-opsina da terreni di coltura di ibridomi

Gli ibridomi secernenti anticorpi monoclonali anti-opsina (clone R2-15, ottenuto da Paul Hargrave, University of Florida) venivano coltivati in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) contenente 10% v/v di *fetal bovine serum* (FBS) scomplementato, 1% v/v di mix di antibiotici penicillina-streptomina e 1% v/v glutamina. Dopo averli seminati a una concentrazione di circa 3'900'000 cellule/ fiasca di 175 cm² e averli lasciati in coltura per 4 o 5 giorni in incubatore al 10% di CO₂, il medium di coltura veniva recuperato per centrifugazione a 800 g. Il surnatante ottenuto veniva poi centrifugato per 30 min a

2900g, per eliminare *debris* insolubili. Al surnatante finale è stato aggiunto 0.5 del proprio volume iniziale di una soluzione satura di ammonio solfato. La miscela è stata lasciata a 4°C per tutta la notte. Il giorno seguente, la miscela veniva centrifugata per 30 min a 2900g e il pellet veniva scartato; al surnatante veniva aggiunta nuovamente 0.5 del suo volume iniziale di ammonio solfato saturo. Dopo 6 ore a 4°C, la miscela veniva centrifugata nuovamente per 30 min a 2900g. Dopo eliminazione del surnatante, il pellet veniva risospeso con PBS, utilizzando 0.1 del volume del terreno di partenza. La soluzione viene trasferita in tubi di dialisi con *cut-off* di 12000-14000 Da. I tubi da dialisi erano preparati reidratandoli dapprima in acqua, quindi scaldandoli 5 minuti a 60°C in una soluzione con 1% di sodio bicarbonato; una volta sciacquate, venivano immerse in una soluzione 1mM EDTA e nuovamente sciacquate in acqua prima dell'uso. La dialisi veniva compiuta per la notte a 4°C contro 100 volumi di PBS. Il giorno seguente veniva aggiunto PBS fresco e la dialisi veniva continuata per altre 8 ore. La soluzione ottenuta veniva centrifugata per 15 min a 11700g per eliminare materiale insolubile. L'anticorpo veniva quindi quantificato attraverso un dosaggio proteico secondo Lowry (Lowry et al., 1951) e la sua specificità saggiata tramite western blot.

Preparazione di liposomi

Liposomi di fosfaditilcolina (da cervello bovino, acquistata da Avanti Polar Lipids) sono stati preparati per estrusione come descritto in (Brambillasca et al., 2005). 300µl di fosfaditilcolina a una concentrazione di 10mg/ml, risospesi in cloroformio, sono stati portati a secco con rotavapor. La soluzione di fosfaditilcolina conteneva 1µCi di L-3-fosfaditil[N-metil-3H]colina per poter quantificare il recupero di fosfolipidi. I lipidi essiccati sono stati quindi risospesi con *translocation buffer* (TB) 1X (250mM sorbitolo, 50mM Hepes pH 7.5, 70mM potassio acetato, 2,5mM magnesio acetato, 5mM K+/EGTA) addizionato di 4 mM di ditiotreitolo (DTT) e lasciati in agitazione per la notte. La mattina seguente, sono stati estrusi utilizzando filtri da 200 nm con un apparecchio per estrusione Avestin (McDonald and Still, 1992). I liposomi estrusi sono stati diluiti con due volumi di acqua e raccolti per centrifugazione (30 min a 193000 g nel rotore TLA100.3 della ultracentrifuga da banco Beckmann).

Preparazione di microsomi di fegato di ratto

Il fegato di un ratto maschio Sprague-Dawley (150-200 g di peso corporeo) veniva omogenizzato in un omogenizzatore tipo Potter con 2 volumi di Tampone di omogenizzazione (250 mM saccarosio, 50 mM TEA-CH₃COOH pH7.5, 50 mM KOAc, 6 mM

Mg(OAc)₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF). L'omogenato veniva centrifugato 8 minuti a 2400rpm (rotore SA-600 Sorvall) per fare sedimentare grossi componenti quali i nuclei e le componenti citoscheletriche; il surnatante veniva nuovamente centrifugato 10 minuti a 8000rpm, permettendo la sedimentazione dei mitocondri; infine il surnatante che risultava veniva ulteriormente centrifugato 10 minuti a 12500rpm per far sedimentare lisosomi, piccoli mitocondri e perossisomi. Il surnatante finale veniva aliquotato in tubi oakridge da 11 ml e centrifugato 30 minuti a 55000 rpm (rotore 70.1Ti Beckmann). I pellet sono stati raccolti e risospesi in tampone di risospensione (250 mM saccarosio, 50 mM TEA-CH₃COOH pH7.5, 1 mM DTT). La quota di proteine recuperata veniva quindi quantificata attraverso un dosaggio proteico secondo Lowry (Lowry et al., 1951).

Trascrizione e traduzione *in vitro*

La trascrizione *in vitro* di costrutti sotto il promotore SP6 (si veda la Fig. 11) veniva compiuta per un'ora a 37°C con reagenti Promega. Nella miscela di reazione vengono aggiunti 2 µl di DNA plasmidico a una concentrazione di 1 µg/µl, 0.2 µl di RNAsin, 0.2 µl di polimerasi SP6 e 7.6 µl di mix di trascrizione, per un volume totale di 10 µl. La mix di trascrizione era composta da: 16 µl di SP6 Buffer 5X (200 mM TrisHCl pH 7.5, 30 mM MgCl₂, 10 mM spermidina e 50 mM di NaCl), 8 µl di DTT 100 mM, 15.36 µl di ATP, UTP, CTP, GTP 2.5 mM ognuno e 1 µl di 40 mM di Cap analog 40 mM.

La reazione di traduzione *in vitro* veniva eseguita a 32°C per 60 minuti. Nella miscela erano presenti 1.7 µl della miscela di trascrizione appena descritta, 0.2 µl di RNAsin, 0.4 µl di mix di amminoacidi senza metionina, 1 µl di ³⁵Smetionina (10 µCi) e 7.2 µl di lisato di reticolocita di coniglio trattato con nucleasi (contenente 10mM creatina fosfato, 50 µg/µl creatina fosfochinasi, 2 mM DTT, 50 µg/ml di tRNA, 79 mM potassio acetato, 0.5 mM magnesio acetato, 0.02 mM emina); il volume finale di ciascuna reazione è di 10.5 µl. Tutti i reagenti utilizzati per la traduzione erano della ditta Promega, analogamente a quelli utilizzati per la trascrizione.

Saggio di traslocazione *in vitro*

Nel saggio di traslocazione post-traduzionale, dopo l'incubazione per la traduzione veniva aggiunto 0.1 del volume della reazione dell'inibitore della sintesi proteica cicloesimide, con una concentrazione finale di 0.3 mg/ml; quindi la miscela di traduzione veniva centrifugata a 126000g per 30 minuti a 4°C per far sedimentare i ribosomi ed eventuali membrane

contaminanti presenti nel lisato di reticolocita. Il surnatante generato da questa centrifugazione veniva utilizzato per la traslocazione.

La reazione di traslocazione era composta da tradotto (circa il 65% del volume di reazione), membrane (microsomi o liposomi con una concentrazione finale di circa 7 µg per 10 µl di reazione), TB 2X (500 mM sorbitolo, 100 mM Hepes pH 7.5, 140 mM potassio acetato, 5 mM magnesio acetato, 10 mM K⁺/EGTA) in un volume pari a quello delle membrane aggiunte, 4 mM DTT e TB1X per arrivare a un volume finale di 10 µl. La reazione veniva compiuta a 32°C per 60 minuti. L'avvenuta traslocazione dell'estremità C-terminale della proteina veniva verificata con il saggio di protezione da proteasi.

Saggio di protezione da proteasi

Questo é stato eseguito come descritto precedentemente (Brambillasca et al., 2006; Brambillasca et al., 2005). 1 µl di miscela di traslocazione veniva rimossa per l'analisi dei prodotti di traduzione non digeriti, quindi bollita per 2 minuti in 10 µl di *denaturing buffer* (DB, 20 mM Tris-HCl, 2% SDS, 1% β-mercaptoetanolo, 8.5% glicerolo, 0.1% blu di bromofenolo) 1X. La parte di miscela di traslocazione rimanente (9µl) veniva trattata con proteasi K. Veniva aggiunto al campione un ugual volume di proteasi K 0.5 mg/ml risospesa nel proprio tampone specifico (100 mM potassio acetato, 50 mM Hepes pH 7.5, 2 mM magnesio acetato, 250 mM saccarosio). Il controllo del corretto funzionamento della proteasi veniva compiuto aggiungendo a un campione 0.5% del detergente sodio desossicolato, il quale, solubilizzando le membrane, rendeva l'intera proteina esposta alla digestione da parte della proteasi.

Il saggio di protezione da proteasi veniva compiuto a 4°C per 30 min, durante i quali la proteasi degradava tutte le porzioni di proteina che sono esposte sul versante della membrana; la porzione di proteina traslocata invece non è accessibile alla proteasi e genera un frammento protetto (Fig.12). Dopo i 30 minuti, l'azione della proteasi K veniva inibita dall'aggiunta di 1.5 µg/10 µl dell'inibitore delle proteasi PMSF sciolto in DMSO. Dopo denaturazione a 100°C per 2-3 minuti in presenza di tampone di lisi (100mM TrisHCl pH 8.9, 1% SDS) e successivo raffreddamento, sono stati aggiunti 10 volumi di tampone di immunoprecipitazione (50 mM Hepes pH 7.5, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100), quindi 8,3 ml di anticorpo anti-opsina (1.2 µg/µl) e 30 µl di proteina G agarosio. La miscela veniva lasciata a 4°C sotto lenta agitazione per la notte. Il giorno seguente, l'immunoprecipitato veniva lavato dapprima con tampone di immunoprecipitazione, quindi con acqua. Ai campioni infine veniva aggiunto DB 2X e il campione veniva bollito per 2-3 minuti.

Gel elettroforesi e autoradiografia

I campioni denaturati venivano analizzati su gel di poliacrilammide allo 12.5% col sistema tris-tricina come descritto in (Brambillasca et al., 2005) (Brambillasca et al., 2006). Per visualizzare i prodotti radioattivi, i gel sono stati fissati, seccati e esposti su schermi per phosphoimager "Storm". Tutte le quantificazioni sono state effettuate con il phosphorimager Storm utilizzando il *software* "ImageQuant". L'efficienza di traslocazione attraverso i microsomi é stata stimata in base alla percentuale di prodotto glicosilato formato (Brambillasca et al., 2005) (Brambillasca et al., 2006). L'efficienza di traslocazione nei liposomi é stata valutata confrontando l'intensità del frammento protetto con quella ottenuta dai microsomi, la cui efficienza di traslocazione era stimata dalla glicosilazione ottenuta.

Colture cellulari, trasfezione e microiniezione

Le cellule CV1 o HeLa utilizzate per la trasfezione venivano coltivate con DMEM contenente 10% v/v di FBS, 1% v/v di mix di antibiotici penicillina-streptomomicina e 1% v/v glutammina a 37°C con 10% CO₂.

Un clone stabile di HeLa *Tet-Off* trasfettato con un costrutto esprime un costrutto GFP residente nella membrane dell'ER (GFP-b₅, (Sprocati et al., 2006)) è stato coltivato nelle stesse condizioni sopra descritte in presenza di 0.1 µg/ml doxiciclina, 0.1 mg/ml di G418, 200 µg/ml igromicina B, ed indotte a esprimere il transgene in terreno completo con *Tet-free* FBS (Clontech, Palo Alto, CA, USA) in assenza di doxiciclina per 3 o 4 giorni.

Le cellule sono state trasfettate con i plasmidi 11-16 illustrati in Fig. 11 utilizzando il metodo del calcio fosfato (Ausubel et al., 1987) oppure il reagente Fugene 6 (Roche).

Per la trasfezione con calcio fosfato, il precipitato di DNA veniva preparato aggiungendo goccia a goccia in agitazione a 250 µl di tampone fosfato HBS 2X (280 mM NaCl, 50 mM Hepes, 1.5 mM Na₂HPO₄), una miscela di 5µg DNA in 200 mM finale CaCl₂, per un volume totale di 500 µl. La miscela veniva lasciata per 20-30 minuti a temperatura ambiente per permettere al precipitato di formarsi. 250 µl del precipitato veniva quindi aggiunto goccia a goccia nei 2 ml di terreno che copriva le cellule da trasfettare precedentemente seminate in petri da 9.6 cm²; esse venivano quindi lasciate nell'incubatore al 5% di CO₂ per tutta la notte.

La trasfezione con Fugene6 è stata invece compiuta come descritto nel protocollo Roche.

La microiniezione nel nucleo di cellule CV1 di 200 ng/µl pCAN-myc-VAPB o pCAN-myc-P56S-VAPB è stata compiuta come precedentemente descritto (Ronchi et al., 2008).

Analisi della glicosilazione di costrutti espressi in vivo

Le cellule CV1 trasfettate con pCDNA-VAPBops e pCDNA3-P56S-VAPBops sono state raccolte e lisate allo scopo di raccogliere l'estratto cellulare da utilizzare per il saggio di glicosilazione con endoglicosidasi H (Endo H).

Dopo rimozione del terreno di coltura sono stati effettuati due lavaggi con PBS. Veniva quindi aggiunto per un volume totale di 1 ml/petri da 60 cm² tampone di lisi (2% SDS, 50 mM TrisHCl pH 6.8) caldo (80-90°C) contenente una miscela di inibitori delle proteasi (Bulbarelli et al., 1998). Il lisato veniva quindi raccolto in una provetta con l'aiuto di uno *scraper* e fatto bollire per 2-3 minuti.

Il preparato veniva congelato in azoto liquido e scongelato più volte per far rompere le molecole di DNA che causano una elevata viscosità della soluzione. L'ammontare di proteina recuperata veniva quindi quantificata col dosaggio proteico, metodo BCA (acido bocinconinico, Pierce). Per la digestione con Endo H, una ugual quantità di proteina per ciascun campione veniva portata a un volume finale di 70 µl con tampone di lisi. Al campione veniva aggiunto 7 µl di tampone di denaturazione (5% SDS, 400 mM DTT). Dopo ebollizione per 10 minuti, veniva aggiunto 7 µl di buffer G5 (50mM sodio citrato pH 5,5). Ciascun campione veniva poi diviso in due aliquote di ugual volume: a una viene aggiunto 1 µl di Endo H (NEB) e all'altra 1 µl di acqua, diventando così il controllo negativo della reazione enzimatica. Il campione veniva incubato per un'ora a 37°C, quindi bollito con DB2X ed analizzato tramite western blot.

Immunofluorescenza

Alle cellule cresciute su vetrino coprioggetto e trasfettate veniva rimosso il terreno di coltura e, dopo alcuni lavaggi con PBS, veniva aggiunto il fissativo paraformaldeide al 4% (in tampone fosfato 120 mM, pH 7.4) oppure 100% metanolo; le cellule venivano lasciate in fissativo per 20 minuti a 37°C oppure in ghiaccio per 5 minuti, rispettivamente. Venivano quindi compiuti alcuni lavaggi in PBS allo scopo di eliminare completamente il fissativo e i vetrini venivano incubati in camera umida per 30 minuti sopra una goccia di soluzione di bloccaggio GDB (0.1% gelatina, 0.3% Triton-X100, 20 mM tampone Na⁺ fosfato pH 7.4, 450 mM NaCl) o, nel caso dell'utilizzo degli anticorpi primari anti-Sec61β e TRAP, di PBS-SAP (0.1% saponina, 10% FBS, 50 µg/ml RNAsi in PBS). Successivamente i vetrini venivano incubati per due ore con l'anticorpo primario in soluzione di bloccaggio; gli anticorpi primari utilizzati sono indicati in Tab.2.

Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario i vetrini venivano lavati tre volte in

tampone HS (500 mM NaCl, 20 mM tampone fosfato) e incubati per un'ora con anticorpi secondari AlexaFluor (Invitrogen). Venivano quindi lavati per tre volte con il tampone HS, una volta con il tampone LS (150 mM NaCl, 10 mM tampone fosfato) e una volta in acqua distillata. I vetrini venivano quindi montati con mowiol su vetrini portaoggetti e osservati con i microscopi confocale Bio-Rad MRC 1024 con obiettivo Nikon X60 PlanApo (Nikon, Tokyo, Japan) e Zeiss LSM 510 Meta (X63 PlanApo).

Analisi di fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) e di fluorescence loss in photobleaching (FLIP)

Cloni stabili esprimenti GFP-b₅, piastrate su un vetrino coprioggetto grigliato sono state trasfettate con il costrutto pCAN-myc-P56S-VAPB con il metodo calcio-fosfato e dopo 24 ore sono state analizzate con il microscopio confocale Zeiss LSM 510 Meta (obiettivo X63 PlanApo) equipaggiato di un incubatore CO₂ termostato.

Per gli esperimenti di FRAP, un'area corrispondente a un putativo aggregato che risultava arricchito della proteina GFP-b₅ è stato oscurato con la linea 488nm del laser; il recupero di fluorescenza nella suddetta area è stata quindi osservata con la stessa linea laser a una intensità attenuata. Per la FLIP, invece, la stessa area anch'essa corrispondente a un putativo aggregato di P56S-VAPB è stata ripetutamente oscurato ogni 30 secondi, e le immagini sono state raccolte 10 secondi dopo ogni oscuramento.

Al termine delle acquisizioni le cellule venivano fissate con paraformaldeide come descritto nella sezione "Immunofluorescenza" ed esposte ad anticorpo anti-myc seguito da anticorpi secondari fluorescenti Alexa 568. Le cellule che erano state sottoposte a FRAP e FLIP, identificate grazie alla griglia del vetrino, venivano riesaminate per confermare che le aree oscurate negli esperimenti di imaging corrispondevano effettivamente a inclusioni di P56S-VAPB.

Microscopia elettronica

Cellule HeLa trasfettate con pCAN-myc-VAPB o pCAN-myc-P56S-VAPB (costrutti n. 11 e 12, Fig.11) sono state inizialmente fissate 30 minuti a temperatura ambiente in glutaraldeide 2% in tampone cacodilato 0,1 M pH 7,4 come monostrato, staccate per raschiamento, raccolte in una provetta eppendorf e centrifugate 10 minuti a 13'000g in modo da formare un pellet compatto. Successivamente il pellet di cellule è stato fissato con fissativo nuovo per 2 ore a temperatura ambiente e lavato (3 volte per 10 minuti) in tampone cacodilato 0,1

M in modo da eliminare le tracce di fissativo. E' stata quindi effettuata la post-fissazione lipidica incubando il pellet in tetrossido di osmio 2% finale in tampone cacodilato 0,1 M per 1 ora a temperatura ambiente. Il tetrossido di osmio è stato eliminato con 3 lavaggi da 10 minuti in tampone cacodilato 0,1 M e 5 minuti di lavaggio in acqua. Il pellet è stato successivamente contrastato con acetato di uranile 1% finale 45 minuti al buio, lavato velocemente per due volte in acqua e disidratato con passaggi sequenziali in etanolo a concentrazione crescente (70%, 80%, 90% e 100%) e 2 passaggi da 15 minuti in ossido di propilene. I campioni sono poi stati infiltrati per la notte in una soluzione contenente ossido di propilene e resina epossidica 1 : 1 ed inclusi in resina (EPON A ed EPON B in rapporto 1 : 1 e 2% di polimerizzatore). Infine la resina è stata fatta polimerizzare 24h in stufa a 60°C.

Le sezioni semi-fini (0,5 µm di spessore) sono state tagliate con lame di vetro all'ultramicrotomo Ultra-cut E (Reichert-Jung), colorate con Blu di Toluidina 0.1% e Blu di Metilene 0.1% in sodio fosfato 0,1 M ed osservate al microscopio ottico per verificare la presenza del campione nelle sezioni. Le sezioni fini sono state tagliate con la lama di diamante allo spessore di 65 nm, raccolte su griglie di rame (Cu 300 *mesh grids*) e contrastate con acetato di uranile saturo per 20 minuti al buio e citrato di piombo 1% per 7 minuti. I campioni così processati sono stati osservati al microscopio elettronico a trasmissione Philips CM10.

ANALISI DELLE INTERAZIONI PROTEINA-LIPIDI NELL'ER

In questa parte della tesi ho analizzato i rapporti tra i TMD e i lipidi dell'ER di due proteine con TMD di diversa lunghezza: b₅17ops e b₅22ops, di cui il secondo è normalmente trasportato in superficie mentre il primo è escluso dagli ERES dell'ER (si veda l'Introduzione della tesi). I due costrutti sono descritti in Fig. 11, n.1 e 2. L'approccio sperimentale è stato di introdurre ciascuno dei due costrutti, tradotti in vitro, in cellule permeabilizzate selettivamente nella membrana plasmatica e premarcate con sonde lipidiche fotoreattive. Dopo avere dato il tempo ai costrutti di entrare nelle cellule e di inserirsi nell'ER, le cellule sono state illuminate con una lampada UV per attivare le sonde, che vengono così "cross-linkate" a qualsiasi molecola nelle loro vicinanze. Dopo lisi e immunoprecipitazione con anticorpi anti-opsina, viene confrontato il grado di marcatura dei due costrutti. Eventuali differenze nel grado di marcatura ci informano che le due proteine stanno in un ambiente lipidico diverso.

Marcatura metabolica di cellule CV1

Sono state marcate cellule CV1 coltivate come descritto nella prima parte dei Metodi, seminate in fiasche da 75 cm² e portate al 40% di confluenza.

Marcatura con ³H-photo-fosfatidilcolina

400 µCi/fiasca di ³H-colina (85.5 Ci/mmol, Perkin Elmer) sciolta in etanolo è stata portata a secco per mezzo di un flusso leggero di azoto; l'essicato è stato quindi sciolto in DMEM senza colina contenente 10% v/v di FBS delipidato, 1% di mix di antibiotici penicillina-streptomina e 1% v/v glutammina. Al terreno addizionato di ³H-colina è stato quindi aggiunto acido 10-azi-stearico (10-ASA) 50 µM finale; il terreno è stato quindi aggiunto alle cellule precedentemente lavate con PBS e lasciato con le cellule per 18 ore a 37°C in incubatore al 10% CO₂. Il 10-ASA è un acido grasso modificato portante un gruppo "cross-linkante" attivabile dalla luce UV (Haberkant et al., 2008): all'interno delle cellule la combinazione di ³H-colina e 10-ASA porterà alla formazione di ³H-photo-fosfatidilcolina che verrà integrata nelle membrane cellulare fino ad equilibrarsi con la fosfatidilcolina non marcata pre-esistente.

Il 10-ASA è stato gentilmente fornito da Britta Brügger e Felix Wieland (Heidelberg University Biochemistry Center, Heidelberg, Germania).

Marcatura con ³H-photo-colesterolo

250 µCi/fiasca di ³H-photo-colesterolo in complesso con beta-metil-ciclodestrina è stato aggiunto a DMEM contenente 10% v/v di FBS delipidato, 1% di mix di antibiotici penicillina-streptomina e 1% v/v glutammina; questa miscela è stata quindi aggiunta alle cellule precedentemente lavate con PBS e lasciata per 18 ore a 37°C al 10% CO₂.

Permeabilizzazione della membrana plasmatica

Permeabilizzazione con digitonina

Una fiasca di cellule CV1 al 40% di confluenza è stata marcata con una delle miscele di terreno sopra descritte. Una volta terminata la marcatura metabolica, il terreno è stato rimosso e le cellule sono state lavate con PBS; le cellule sono state quindi esposte per 1-2-minuti a 1 ml di tripsina-EDTA (Sigma). Alla sospensione di cellule staccate, sono stati

quindi aggiunti 100 µg di inibitore della tripsina sciolto in acqua e le cellule sono state diluite a 4.5 ml di tampone KHM (110 mM potassio acetato, 20 mM Hepes KOH pH 7.2, 2 mM magnesio acetato); le cellule raccolte sono state riunite in una provetta da 50 ml e centrifugate a 1000g a 4°C per 3 minuti. Una volta eliminato il surnatante, il pellet cellulare è stato risospeso in 6 ml di tampone KHM; è stato quindi aggiunto il detergente digitonina, sciolto in DMSO (Calbiochem) a una concentrazione finale di 40 µg/ml e le cellule sono state incubate con questo detergente per 5 minuti in ghiaccio. Alle cellule sono stati quindi aggiunti 14 ml di KHM allo scopo di diluire la digitonina e il campione è stato subito centrifugato a 1000g a 4°C per 3 minuti. Il pellet di cellule è stato quindi risospeso in 1 ml di KHM. L'effettiva permeabilizzazione della membrana plasmatica delle cellule è stata saggiata attraverso la colorazione con Trypan Blue (Sigma); una volta verificata l'effettiva permeabilizzazione, le cellule semi-intatte sono state sedimentate con una veloce centrifugata a 10.000g a 4°C e quindi risospese in 50 µl di KHM. La torbidità delle cellule è stata quindi determinata mediante lettura a 600 nm in uno spettrofotometro (Hitachi).

Permeabilizzazione con streptolisina O (SLO)

Le cellule CV1 sono state marcate, lavate e risospese con tripsina come precedentemente descritto nel paragrafo precedente. Le cellule sono state quindi divise in aliquote da 1 mL alle quali veniva aggiunto una quantità crescente di SLO 0.1 mg/mL (0, 0.2, 0.6 e 1 µg di SLO). I campioni sono stati quindi miscelati per inversione e incubati per 5 minuti in ghiaccio allo scopo di permettere alla tossina di legarsi al colesterolo presente in membrana plasmatica. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state centrifugate brevemente a 10000g e quindi lavate due volte con KHM allo scopo di eliminare la SLO non legata. Al termine dei lavaggi le cellule sono state risospese nel volume di partenza (1 mL) e quindi incubate a 37°C per 20 minuti per permettere alla tossina di oligomerizzare e creare quindi pori nella membrana. L'effettiva permeabilizzazione della membrana plasmatica delle cellule è stata saggiata attraverso la colorazione con Trypan Blue (Sigma); una volta verificata l'effettiva permeabilizzazione, le cellule semi-intatte sono state sedimentate con una veloce centrifugata a 10.000g a 4°C e quindi risospese in 50 µl di KHM. La torbidità delle cellule è stata quindi determinata mediante lettura a 600 nm in uno spettrofotometro (Hitachi).

Trascrizione e traduzione in vitro di pGEM4 b₅17ops e pGEM4 b₅22ops

9µg di DNA codificante per b₅17ops e b₅22ops, entrambi precedentemente linearizzati con l'enzima *HindIII*, sono stati trascritti come descritto nella sezione "Esperimenti riguardanti la caratterizzazione degli OSER generati da P56S-VAPB". Come campione di controllo senza proteina, è stata effettuata una analoga reazione con aggiunta di sola acqua al posto del volume occupato dal DNA.

40 µl di trascritto b₅17ops, b₅22ops oppure 20 µl di trascritto di controllo senza DNA sono stati tradotti come spiegato nella prima parte della sezione Metodi, con le seguenti differenze: il lisato di reticulociti di coniglio (RRL) invece che da Promega è stata acquistata da Green Hectares, Wisconsin, USA. Il lisato veniva trattato con ribonucleasi micrococcica in presenza di calcio cloruro, per eliminare gli mRNA endogeni (Ausubel et al., 1987); dopo avere fermato l'azione dell'enzima mediante aggiunta di EGTA (1.86 mM), il RRL veniva addizionato di emina, aminoacidi, tRNA (Sigma) ed energia (Mix T2, (Chuck and Lingappa, 1992)). La reazione di traduzione veniva così composta: 40µL di trascritto, 114 µL di mix T2, 4µL di RNAsi inhibitor (Promega), 40µM finale di metionina (radioattiva o non), 42mM finale di potassio acetato e acqua RNAsi-free per portare a un volume finale di 200µL. La traduzione è stata quindi condotta per un'ora a 32°C. Alla fine dell'incubazione la sintesi proteica è stata bloccata con cicloesamide 0,3 mg/mL finale e i ribosomi sono stati eliminati per centrifugazione come descritto nella prima parte della sezione Metodi.

Traslocazione in cellule semi-intatte

Allo scopo di permettere alle proteine b₅17ops e b₅22ops di inserirsi nell'ER delle cellule semi-intatte, a 96 µl di tradotto non radioattivo preparato come appena descritto vengono aggiunte 0,4OD di cellule semi-intatte; per aumentare l'efficienza di traslocazione, alla reazione vengono inoltre aggiunti GTP e ATP 1 mM finali, 10 mM finale di creatina fosfato e 40 µg/ml finali di creatina fosfochinasi. La reazione di traslocazione viene quindi effettuata per un'ora a 32°C.

Alla reazione vengono quindi aggiunti 900 µl di KHM buffer e le cellule vengono centrifugate brevemente a 10000g: questo permette di eliminare il lisato in eccesso contenente la quota di proteina che non è riuscita ad entrare nelle cellule. Il pellet viene quindi risospeso in 400 µl di KHM e trasferito in vials di vetro.

Trattamento con luce UV

Per l'attivazione del cross-linkante fotoattivabile, le cellule vengono esposte a luce UV di potenza 350W con intervallo di lunghezza d'onda di 350-380nm (il cross-linkante si attiva alla lunghezza d'onda di 366nm) per 14 minuti. Durante l'irraggiamento, le cellule erano mantenute in un bagnetto a 32°C. Se non esposte alla luce UV, le cellule erano comunque mantenute a 32°C per tutta la durata dell'irraggiamento.

Lisi e immunoprecipitazione

Una volta terminato l'irraggiamento, il campione veniva trasferito in ghiaccio e ne veniva misurato il volume. Il 2,5% del volume totale veniva subito bollito con DB2X (si veda la sezione "Saggio di protezione da proteasi" per una definizione del DB); il 10% del volume, invece, veniva prelevato per compiere un'estrazione organica con lo scopo di quantificare la radioattività totale presente nei lipidi.

All'80% del restante campione veniva invece aggiunto uguale volume di Triton Buffer 2X (200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8, 2% Triton X-100); il campione veniva miscelato per inversione e lasciato ad incubare in ghiaccio per 5 minuti prima di essere centrifugato a 3000g per 10 minuti a 4°C. Al surnatante ottenuto veniva quindi aggiunta una soluzione per portare il campione a: 0,2% di gelatina, 5 µg/ml di anticorpi monoclonali anti-opsina (si veda la sezione "Saggio di protezione da proteasi") e 30 µl di proteina G agarosio (Invitrogen) risospesa con ugual volume di acqua. La miscela veniva lasciata a 4°C per la notte. Il giorno seguente, l'immunoprecipitato veniva lavato dapprima con PBS 0,5% Triton X-100, quindi con acqua. Ai campioni infine veniva aggiunto 15 ml tampone di caricamento DB 2X e il campione veniva bollito per 2-3 minuti.

Gel elettroforesi, acquisizione con Beta Imager, immunoblot e quantificazione

I campioni denaturati venivano analizzati su gel di poliacrilammide allo 12.5% col sistema tris-glicina come descritto in (Brambillasca et al., 2005) (Brambillasca et al., 2006). I gel sono stati quindi trasferiti su una membrana di PVDF (BioRad) a 160 mA per 1 ora e 30 minuti.

Per visualizzare i prodotti radioattivi, le membrane sono state prima seccate all'aria; per poter visualizzare gli *standard* di peso molecolare nella acquisizione autoradiografica, sopra ciascuna banda sono stati adsorbiti 200 dpm di un composto triziato. Le membrane

sono state quindi esposte allo scanner ad alta sensibilità per il trizio "Beta-Imager" e immagini relative alla radioattività emessa sono state acquisite dopo 24, 48 e 72 ore.

Una volta terminata l'esposizione con Beta-Imager, le membrane sono state bagnate con metanolo per essere successivamente ri-idratate con il tampone di bloccaggio utilizzato per l'immunocolorazione del blot. Dopo varie prove (si veda il capitolo Risultati, sezione "ottimizzazione delle condizioni di *western blotting*") è stato adottato il seguente protocollo per la rilevazione delle proteine b₅17ops e b₅22ops: bloccaggio in 3% albumina, 0.1% TWEEN in tampone TS1X (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl); incubazione con anticorpo primario anti-opsina (1:5000 effettiva), lavaggi tra primario e secondario e incubazione con anticorpo secondario (anti-topo coniugato all'enzima perossidasi 1: 75000 effettivo) in soluzione di bloccaggio; tre lavaggi con TS1X 0,3% TWEEN, tre lavaggi con TS1X 0,1% TWEEN e infine tre lavaggi con TS1X.

Il grado di associazione delle due proteine con un dato lipide è stata valutata confrontando il rapporto della proteina visualizzata tramite immunoblot con il corrispondente segnale di lipide radioattivo. Per escludere dall'analisi eventuale proteina non inserita nella membrana ER, è stata considerata solamente la forma glicosilata di ciascuna delle due proteine. L'avvenuta glicosilazione infatti dimostra inequivocabilmente che la proteina ha traslocato il suo C-terminale (che contiene il sito di glicosilazione) nel lume dell'ER e che quindi è integrata con disposizione transmembrana nel bilayer.

Trattamento alcalino con sodio carbonato

Per dimostrare l'effettiva traslocazione della proteina glicosilata nella membrana dell'ER, una volta terminata la traslocazione i campioni sono stati trattati con sodio carbonato allo scopo di dissociare proteine non propriamente inserite dalla membrana dell'ER.

0.04 OD di cellule CV1 semi-permeabilizzate con digitonina o SLO sono state incubate con 8 volumi di b₅17 tradotto in presenza di metionina radioattiva. A 20 µL di traslocazione è stato quindi aggiunto un ugual volume di sodio carbonato 0.2M e quindi altri 40 µL di sodio carbonato 0.1M per arrivare a un volume finale di 80 µL. Il campione è stato incubato per 30 minuti in ghiaccio; sono stati quindi prelevati e subito bolliti con DB 40 µL di campione (totale); i restanti 40 µL sono stati invece ultracentrifugati con ultracentrifuga Beckmann a 126000g a 4°C per 45 minuti. Al termine della centrifugazione è stato collezionato il supernatante, mentre il pellet ottenuto, contenente la frazione di membrana, è stato risospeso nello stesso volume del surnatante ottenuto. I campioni sono stati bolliti in DB, e quindi analizzati su gel di poliacrilammide allo 12.5% col sistema tris-glicina ed esposti ad autoradiografia.

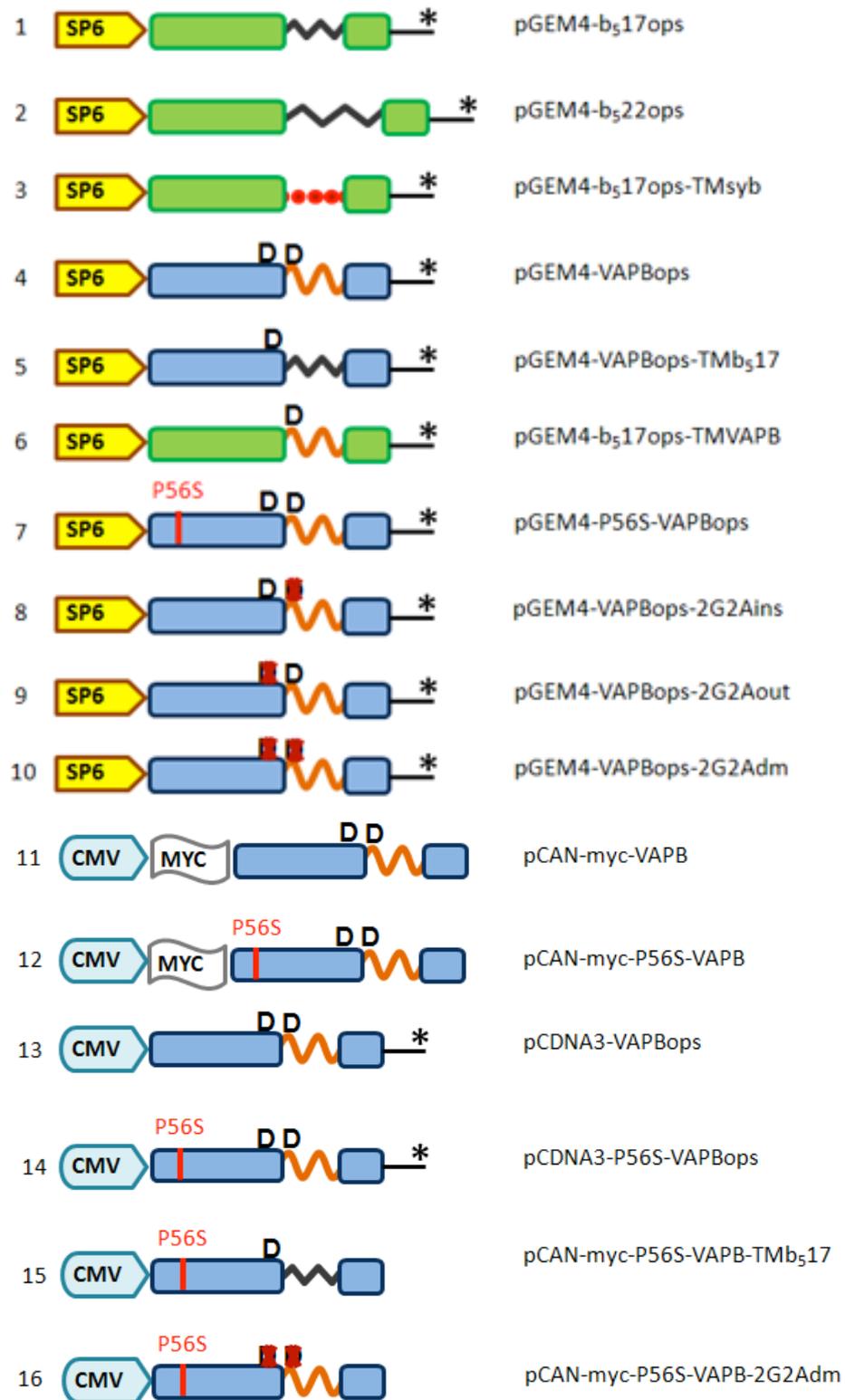


Fig. 11: Schematizzazione dei costrutti utilizzati nella Tesi; dal n.1 al n.10 sono stati utilizzati per esperimento in vitro, i rimanenti per esperimenti in vivo

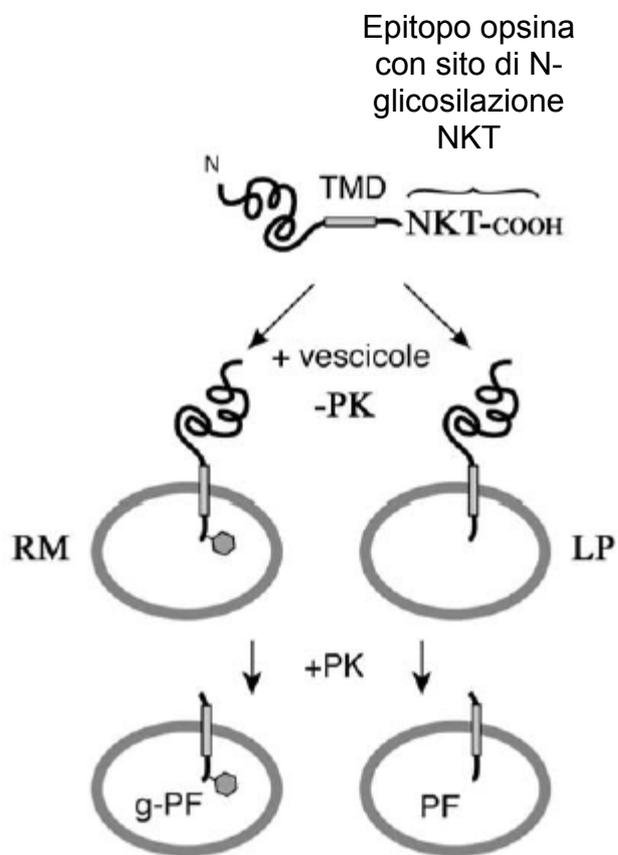


Fig.12: Schematizzazione del saggio di protezione da proteasi (Brambillasca et al., 2005)

Oligo	Sequenza	Commenti
1	CCG <u>GTA CCG</u> CAC CAT GGC GAA GGT GGA GCA G	Upper primer per generare pGEM4-VAPB <u>Sito KpnI</u>
2	GCT <u>CTA GAC</u> TAC <u>CGG TAC</u> ATG GCA ATC TTC CCA ATA	Lower primer per generare pGEM4-VAPB <u>Sito XbaI</u> <u>Sito AgeI</u> Codone di stop
3	CCG GTC CAT GAA CGG AAC AGA AGG ACC AAA CTT CTA CGT ACC ATT CAG CAA CAA AAC AGT AGA CTG AT	Upper oligo della cassetta ops
4	CTA GAT CAG TCT ACT GTT TTG TTGCTG AAT GGT ACG TAG AAG TTT GGT CCT TCT GTT CCG TTC ATG GA	Lower oligo della cassetta ops
5	TCG AGA CTC TTG <u>GCA CTA GTG</u> GTT TTG TTC TTT ACT GTT GGT GTA ATT ATG GGG TA	Upper oligo cassetta TMVAPB <u>Sito SpeI</u>
6	CCG GTA CCC CAT AAT TAC ACC AAC GAT AAA GAA CAA AAC <u>CAC TAG TGC</u> CAA GAG TC	Lower oligo cassetta TMVAPB <u>Sito SpeI</u>
7	CCT TAG CAC CCG GTG GTG GAC TAA CTG GGT TAT CCC TGC GAT CTC TGC <u>ACT AGT</u> TGT AGC GCT GAT GTA CAA GAT TGC CAT GTA	Upper oligo cassetta TMb ₅ <u>Sito SpeI</u>

8	CCG GTA CAT GGC AAT CTT GTA CAT CAG CGC TAC AAC TAG TGC AGA GAT CGC AGG GAT AAC CCA GTT AGT CCA CCA CCG GGT GCT AAG G	Lower oligo cassetta TMB ₅ <u>Sito SpeI</u>
9	GCA TCG AGT ATT CCG GAG TTG GAC CTC ACA CAG TAC C	Lower primer per generare pGEM4-P56S-VAPBops <u>Clal site</u> Mutazione
10	CCG GTA CAT GGC AAT CTT CGC AAT AAT TAC AGC AAC GAT AAA GAA C	Upper oligo per generare pGEM4- VAPBops- 2G2Ains Mutazioni
11	CCG GTA CAT GGC AAT CTT CGC AAT AAT TAC AGC AAC GAT AAA GAA C	Lower oligo per generare pGEM4- VAPBops- 2G2Ains Mutazioni
12	GCA TTA GCC CCA ACT GCG AAG GAA GAA GCC CTT AGC ACC CGG C	Upper oligo per generare pGEM4- VAPBops- 2G2Aout Mutazioni
13	GCC GGG TGC TAA GGG CTT CTT CTT TCG CAG TTG GGG CTA ATG	Lower oligo per generare pGEM4- VAPBops- 2G2Aout Mutazioni

14	GGT ACT GTG TGA GGT CCA ACA GCG GAA TCA TCG	Upper primer per introdurre la mutazione P56S in pCAN-myc- VAPB Mutazione
15	GCA TCG AGT ATT CCG GAG TTG GAC CTC ACA CAG TAC C	Lower primer per introdurre la mutazione P56S in pCAN-myc- VAPB <u>Sito ClaI</u> Mutazione
16	CCA ACA GCG GAA TCA <u>TCG ATG</u> CAG GG	Upper primer per creare pCAN-myc-P56S-VAPB- TMb ₅ e pCAN-myc-P56S- VAPB-2G2Adm <u>Sito ClaI</u>
17	TTT GGG <u>ATA TCC</u> CCT ACA AGG CAA TCT TGT ACA TCA GCG CTA C	Lower primer per creare pCAN-myc-P56S-VAPB- TMb ₅ <u>Eco RV site</u> Stop codon
18	TTG <u>GAT ATC</u> CAC TAC AAG GCA ATC TTC GCA ATA ATT ACA GC	Lower primer per creare pCAN-myc-P56S-VAPB- 2G2Adm <u>Eco RV site</u> Stop codon

Tabella 1: Sequenze degli oligonucleotidi utilizzati nella Tesi

Anticorpo	Provenienza	Informazioni aggiuntive
anti-opsin mAb	P. Hargrave, University of Florida	Clone R2-15 (Adamus et al., 1991)
anti-myc mAb	Santa Cruz	Clone 9E10
anti-TRAP rabbit polyclonal	R.S. Hegde (NIH)	(Snapp et al., 2003a)
anti-Sec61 β rabbit polyclonal	R.S. Hegde (NIH)	(Snapp et al., 2003a)
anti-Calnexin rabbit polyclonal	A. Helenius (ETH, Zuerich)	(Hammond and Helenius, 1995)
anti-Bap31 rabbit polyclonal	M. Tagaya (Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences)	(Wakana et al., 2008)
anti-PDI rabbit polyclonal	Stressgen	
anti- VAPB rabbit polyclonal	C.C. Hoogenraad (Erasmus Medical Center, Rotterdam)	(Teuling et al., 2007)
anti-GM130	A. De Matteis, Mario Negri Sud	
anti-TGN46	Stressgen	
anti-TDP43	Sigma	
Lyso-tracker	Invitrogen	

Tabella 2: Lista degli anticorpi primari utilizzati

RISULTATI

DOMINI DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO IN PATOLOGIA: CARATTERIZZAZIONE DELLE INCLUSIONI GENERATE DA P56S-VAPB

VAPB *wild-type* segue la via assistita di traslocazione post-traduzionale

VAPB è una proteina transmembrana dell'ER appartenente alla classe delle proteine tail-anchored, e cioè di proteine integrali di tipo II (C-terminale luminale e N-terminale citosolico (Alberts et al., 2008)) con la caratteristica di integrarsi nella membrana dell'ER in maniera strettamente post-traduzionale; la loro sequenza di indirizzamento all'ER, costituita dal loro stesso transmembrana, è infatti molto vicina al C-terminale e viene quindi esposta al citosol solo quando il ribosoma è ormai disassemblato, perdendo di fatto l'opportunità di legare la particella di riconoscimento del segnale (SRP) e di seguire quindi la via co-traduzionale di traslocazione nell'ER (Borgese et al., 2003a) (Borgese et al., 2003b) (Borgese et al., 2007). Lavori precedenti nel nostro laboratorio hanno inoltre dimostrato come le proteine tail-anchored possono seguire due vie diverse di traslocazione post-traduzionale: una via non assistita e una via assistita. La via assistita è definita dalla richiesta energetica (ossia ATP) e la richiesta di chaperone citosolici e componenti proteici della membrana dell'ER per l'inserimento/indirizzamento alla proteina tail-anchored. Invece, proteine tail-anchored non assistite possono inserirsi spontaneamente in liposomi costituiti da solo lipidi e non richiedono alcuna chaperone in questo processo (Colombo et al., 2009). Il principale fattore che determina quale via una tail-anchored debba seguire è l'idrofobicità del suo dominio transmembrana, E' stato dimostrato in particolare come proteine con una moderata idrofobicità del transmembrana (quali ad esempio il citocromo b₅) siano in grado di inserirsi nell'ER senza richiesta di energia e senza ausilio di alcuna componente transmembrana dell'ER; tali proteine sono in grado di traslocare non solo in microsomi (vescicole derivanti dall'ER, MR), ma anche in liposomi (vescicole di soli lipidi, LP). Proteine

con transmembrana più idrofobici come la sinaptobrevina, al contrario, per inserirsi nell'ER necessitano sia di ATP che di almeno un componente proteico transmembrana: tali proteine, quindi, non sono in grado di inserirsi nei liposomi e seguono la cosiddetta via assistita (Brambillasca et al., 2005) (Brambillasca et al., 2006). Recentemente è stato caratterizzato una ATPasi citosolica (TRC40 in mammifero/GET3 in lievito) dedicato alla cattura delle tail-anchored assistite e alla loro consegna alla membrana ER (Stefanovic and Hegde, 2007) (Favaloro et al., 2008). Questo spiega almeno in parte la richiesta di l'ATP per l'inserimento di questa classe di proteine tail-anchored.

Per meglio caratterizzare la biogenesi di VAPB, abbiamo quindi deciso in prima istanza di meglio chiarire in che modo questa tail-anchored si inserisce nella membrana dell'ER, cercando in particolare di definire quale delle due vie sopra descritte esso segua. Abbiamo quindi eseguito traslocazioni in vitro in microsomi e liposomi applicando il saggio di protezione da proteasi precedentemente descritto nella sezione "Materiali e metodi", e confrontando il comportamento della proteina VAPB *wild-type* con quello del b₅17ops, proteina nota seguire la via non assistita, e con quello di una chimera chiamata b517ops-TM_{syb} nella quale è stato scambiato il TMD della proteina b₅ con quello della proteina sinaptobrevina, nota per seguire al contrario una traslocazione assistita. I risultati di questo esperimento sono mostrati in Fig. 13.

Dato che tutte e tre le proteine sono state modificate aggiungendo al C-terminale l'epitopo ops che contiene un sito consenso per la N-glicosilazione (Fig. 11, n.4,1 e 3 rispettivamente), l'avvenuta inserzione nei microsomi può essere facilmente osservata per la comparsa di una banda glicosilata a più alto peso molecolare (indicata con *) sia per i campioni incubati con le membrane e non sottoposti al saggio di protezione (pannelli superiori, -PK), sia per i frammenti protetti ottenuti dopo digestione con proteasi (pannelli inferiori +PK, corsie 2, 5 e 8 di Fig. 13A). Nei pannelli +PK, in particolare, il frammento protetto nelle corsie menzionate è rappresentato da due bande: quella a più alto peso molecolare (*, circa 10kDa) corrispondente alla quota di proteina traslocata che è stata effettivamente glicosilata, e quella a più basso peso molecolare di circa 5 kDa (+ PK, ○) corrispondente invece alla quota che, seppur traslocata, non è stata glicosilata. Come atteso, la traslocazione nei liposomi dà invece origine a una sola banda di frammento protetto (pannelli +PK, corsie 3, 6 e 9, simbolo ○). Come atteso, nei campioni di controllo senza membrane non è stata osservata alcuna banda dopo esposizione a proteasi K (corsie 1, 4, 7): l'assenza delle membrane rende infatti accessibile all'azione della proteasi K la proteina intera che viene quindi completamente degradata.

Per dimostrare che il frammento protetto viene generato da un effetto protettivo delle membrane e non da una parziale inattivazione della proteasi in presenza di vescicole, nella Fig. 14 le tre proteine sono state traslocate in presenza di microsomi ed esposte alla digestione senza o in presenza del detergente sodio desossicolato. L'incubazione in microsomi e la successiva digestione con proteasi K genera i due frammenti protetti già osservati in Fig. 13A (Fig. 14, pannello +PK, corsie 1, 3 e 5, * per il glicosilato, ○ per il non glicosilato); quando invece insieme alla proteasi viene aggiunto il detergente sodio desossicolato, in grado di solubilizzare le membrane, non viene più recuperato alcun frammento protetto (Fig. 14, pannello +PK, corsie 2, 4 e 6).

Come mostrato in Fig. 13A e nel grafico di Fig. 13B, il comportamento di traslocazione di VAPB risulta essere più simile a quello del b_5 17ops-TMSyb: esso infatti si inserisce nei microsomi, ma al contrario trasloca molto inefficientemente nei liposomi; b_5 17, invece, si inserisce con uguale efficienza sia in microsomi che in liposomi, come atteso.

L'efficienza di traslocazione relativa di VAPB, tuttavia, se confrontata con le due proteine controllo b_5 17ops e b_5 17ops-TMSyb, risulta essere molto bassa (Fig. 13B). Mi sono quindi chiesta se tale inefficienza sia dovuta al TMD di VAPB o alla propria porzione citosolica; sono state quindi generate due chimere nelle quali i transmembrana delle due proteine sono stati vicendevolmente scambiati, dando origine quindi a b_5 17ops-TMVAPB e VAPBops-TM b_5 17 (Fig. 11 n. 6 e 5), e sono stati osservati i comportamenti delle due proteine chimeriche per quanto riguarda la traslocazione in microsomi, in confronto con le due proteine originali VAPB e citocromo b_5 17.

Come può essere osservato in Fig. 15, la sostituzione del TMD del citocromo b_5 con quello di VAPB causa una forte diminuzione della traslocazione della chimera in confronto al b_5 *wild-type* (Fig. 15, pannello +PK, confronto tra corsia 4 e 2, simbolo * per il frammento protetto glicosilato, ○ per il non glicosilato); in particolare, l'efficienza di traslocazione cala drammaticamente dal 69% del b_5 all'11% della chimera.

Al contrario, sostituire il TMD di VAPB con quello del b_5 migliora drasticamente l'efficienza di traslocazione di VAPB, passando dal 19% di VAPB *wild-type* al 69% della chimera (Fig. 15, pannello +PK, confronto tra corsia 8 e 6, simbolo * per il frammento protetto glicosilato, ○ per il non glicosilato).

Come riportato nell'Introduzione della Tesi, VAPB presenta due sequenze di dimerizzazione del tipo GxxxG, una subito a monte del TMD e un'altra all'interno di esso. Mi sono chiesta se la bassa efficienza di inserzione nell'ER di VAPB sia dovuta a una rapida dimerizzazione o oligomerizzazione della proteina una volta rilasciata dal ribosoma; se questo si avverasse, il risultato sarebbe quello di avere alla fine della traduzione una minore quota di proteina pronta ad inserirsi nelle membrane e di conseguenza una minor efficienza

di integrazione della proteina se confrontata alle proteine modello b₅17 e b₅17-TM_{syb}. Ho quindi deciso di mutagenizzare una o entrambe le sequenze di dimerizzazione di VAPB ed ho quindi analizzato il comportamento dei tre mutanti (VAPBops-2G2A_{ins}, VAPBops-2G2A_{out}, VAPBops-2G2A_{adm}, rispettivamente costrutti n. 8, 9 e 10 di Fig. 11) in confronto a VAPBops *wild-type* nell'inserimento post-traduzionale in microsomi. Come mostrato e quantificato in Fig. 16, la mutagenesi delle sequenze di dimerizzazione in VAPB non migliora l'efficienza di traslocazione della proteina (Fig. 16, +PK, confronta corsie 4, 6 e 8 con corsia 2).

Nel loro insieme, i risultati illustrati nelle Fig. 13-16 dimostrano che VAPB si inserisce post-traduzionalmente nella membrana dell'ER, seguendo la via assistita, seppur con bassa efficienza; la bassa efficienza è dovuta alle caratteristiche del TMD ma non a una dimero-oligomerizzazione della proteina previo inserimento.

VAPB *wild-type* e mutato si inseriscono con uguale efficienza nell'ER

La forma mutata di VAPB più conosciuta, P56S-VAPB, causa una forma particolare di sclerosi laterale amiotrofica a eredità familiare, l'ALS-8. Precedenti studi riportano che l'espressione di P56S-VAPB provoca la formazione di aggregati dovuti al fatto che la mutazione P56S in VAPB (costituita da una sostituzione amminoacidica da prolina in serina in posizione 56) impedisce una corretta localizzazione della proteina (Nishimura et al., 2004). Mi sono quindi chiesta se tale mutazione possa alterare il comportamento di VAPB nell'inserimento nell'ER. Perciò ho eseguito traslocazioni in vitro di P56S-VAPBops (Fig. 11 n.7) in microsomi o liposomi, applicando il saggio di protezione da proteasi, e confrontando il suo inserimento con quello della proteina *wild-type*. Come illustrato in Fig. 17A, P56S-VAPB non presenta differenze rispetto al *wild-type* nell'inserimento post-traduzionale nell'ER (Fig. 17A); la proteina, infatti, si inserisce con la stessa bassa efficienza nei microsomi (Fig. 17A, pannello +PK, confronto tra corsia 5 e 2, simbolo * per il frammento protetto glicosilato, ○ per il non glicosilato), e non è in grado di inserirsi efficientemente nei liposomi (Fig. 17A, pannello +PK, confronto tra corsia 6 e 3, simbolo ○ per il non glicosilato).

Per verificare se anche in vivo la proteina mutata si inserisce nell'ER, cellule trasfettate con VAPBops e P56S-VAPBops regolati da un promotore specifico per cellule di mammifero (Fig. 11 n. 13 e 14) sono state lisate e lo stato di glicosilazione delle due proteine è stato saggiato mediante digestione con EndoH. I campioni (digeriti oppure *mock-digeriti*) sono stati quindi analizzati per *western blot*. Come mostrato in Fig. 17B, sia

VAPBops che la sua forma mutata risultano completamente glicosilati nelle cellule (Fig. 17B, corsie 1 e 3, * per il glicosilato); questo viene dimostrato dal fatto che, una volta aggiunta EndoH, si osserva uno spostamento di corsa nel gel, a testimonianza di un effettivo taglio del glicano (Fig. 17B, corsie 2 e 4).

P56S-VAPB in vivo forma inclusioni arricchite in alcuni componenti dell'ER, ma che escludono marcatori di altri compartimenti

Mentre VAPB mutato sembra inserirsi e comportarsi come il *wild type* in vitro, quando overespresso in cellule, P56S-VAPB forma delle grosse inclusioni perinucleari (Fig. 18, colonna centrale). Ho quindi compiuto una caratterizzazione morfologica di tale inclusioni allo scopo di chiarire da quale organello esse derivassero; molti lavori avevano infatti escluso *marker* dell'ER nelle inclusioni (Kanekura et al., 2006) (Nishimura et al., 2004) (Teuling et al., 2007), mentre un solo lavoro aveva riportato la colocalizzazione con il *marker* luminale calreticulina (Prosser et al., 2008). Per chiarire queste incongruenze, ho espresso in cellule HeLa P56S-VAPB contenente un epitopo *myc* all'ammino-terminale e ho analizzato tramite microscopia confocale una batteria di *marker* dell'ER allo scopo di chiarirne il rapporto con le inclusioni di P56S-VAPB (Fig. 18). La subunità del traslocone Sec61 β sembra escluso dalle inclusioni (Fig. 18, prima fila), mentre una proteina accessoria del traslocone, TRAP, sembra essere leggermente colocalizzante con le inclusioni (Fig. 18, seconda fila), così come lo chaperone calnexina (Fig. 18, terza fila). Più chiaro è invece l'arricchimento nelle inclusioni della proteina luminale PDI (Fig. 18, ultima fila) e di Bap31, una proteina transmembrana dell'ER il cui putativo ruolo è quello di sensore per il folding delle proteine transmembrana ((Wakana et al., 2008), Fig. 18, quarta fila).

Allo scopo di analizzare la relazione che intercorre tra le inclusioni di P56S-VAPB con gli altri organelli cellulari, sono state compiute analisi di colocalizzazione tra gli aggregati e l'apparato di Golgi, TDP43 e i compartimenti acidi (Fig. 19); a differenza di quanto effettuato in Fig. 18 e in Fig. 19B, dove si mostrano immagini di singoli piani di cellule, in Fig. 19A sono mostrati proiezioni di stack compiuti allo scopo di analizzare le interazioni tra le inclusioni e i *marker* cellulari per tutta l'estensione della cellula. Come mostrato nel pannello a sinistra della Fig. 19A l'apparato di Golgi (rappresentato dai *marker* del cis-Golgi GM130 in falso colore blu, e TGN46, marker del trans-Golgi in falso colore verde) nelle cellule trasfettate con P56S-VAPB (in falso colore rosso) risulta parzialmente disgregato e si distribuisce in

prossimità dell'aggregato; tuttavia, non è riscontrabile alcuna associazione preferenziale della inclusione con il cis- o il trans-Golgi.

TDP43, mostrato nel pannello a destra della Fig. 19A in falso colore verde, è una proteina che lega l'RNA che è stata osservata mis-localizzare dal nucleo al citoplasma in alcune malattie neurodegenerative, tra cui alcune forme di ALS (Vance et al., 2009). Ci siamo chiesti quindi se le inclusioni di P56S-VAPB inducano tale mis-localizzazione, chiaro indice di sofferenza cellulare; in cellule overesprimenti la proteina mutata, tuttavia, tale fenomeno non è riscontrato (Fig. 19A, pannello a destra). Neanche i compartimenti acidofili della cellula quali lisosomi ed endosomi tardivi, osservati in Fig. 19B per mezzo di un colorante acidofilo (mostrato nel pannello a sinistra e nel pannello del merge in falso colore verde), sembrano avere alcuna relazione con le inclusioni (Fig. 19B, in falso colore rosso, pannello centrale).

Presi insieme, questi dati suggeriscono che le inclusioni formate da P56S-VAPB originino da o formino un sub-compartimento dell'ER.

Il TMD e le sequenze di dimerizzazione non influenzano la formazione delle inclusioni

Dato che risultati in vitro (vedi Fig. 15) suggerivano che il TMD influenzasse in qualche modo la capacità di inserimento di VAPB nell'ER, ci siamo chiesti quale potesse essere il ruolo del TMD e delle sequenze di dimerizzazione nella formazione delle inclusioni di P56S-VAPB in vivo. Sono stati quindi creati i costrutti P56S-VAPB-TMb₅17, nel quale il TMD di VAPB è stato sostituito con quello del b₅17, e P56S-VAPB-2G2Adm, nel quale sono stati mutagenizzati entrambe le sequenze di dimerizzazione di VAPB (Fig. 20). Tuttavia, le inclusioni generate da questi due mutanti sono del tutto simili a quelle generate da P56S-VAPB col proprio TMD (Fig. 18 e 19), a indicare che la natura del TMD è ininfluente sul processo di aggregazione.

Le inclusioni di P56S-VAPB sono in continuità con l'ER

Per determinare se le inclusioni di P56S-VAPB sono continue con il resto dell'ER ho deciso di compiere esperimenti di FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) e FLIP (*Fluorescence Loss In Photobleaching*) in cellule HeLa che esprimono stabilmente una proteina fluorescente transmembrana dell'ER (GFP-b5tail, (Sprocati et al., 2006)), che

permette quindi di visualizzare tutto l'ER, e trasfettate con P56S-VAPB. Come schematizzato in Fig. 21A, se le inclusioni di P56S-VAPB sono continue con l'ER, la proteina GFP-b5tail sarà libera di diffondervi.

Negli esperimenti di FRAP, è stato deciso di spegnere il segnale fluorescente di GFP-b5tail in corrispondenza di un'area dove la proteina risultava arricchita, e dove quindi si poteva localizzare anche una putativa inclusione di P56S-VAPB. Dopo aver analizzato il recupero della fluorescenza nell'area di interesse, le cellule sono state fissate ed è stata eseguita una immunofluorescenza utilizzando un anticorpo primario che riconosce VAPB; questa operazione permette di confermare che l'area oscurata corrisponda effettivamente con un'inclusione di P56S-VAPB (Fig. 21B, ultimo pannello a destra). Il recupero di fluorescenza di GFP-b5tail, dovuta alla diffusione nell'area oscurata della proteina dalle zone circostanti, è mostrata in Fig. 21B (da sinistra a destra: primo pannello 10 secondi prima dell'oscuramento; secondo pannello area oscurata; terzo pannello 110 secondi dopo l'oscuramento) e il decorso temporale del recupero è quantificato in Fig. 21C; la velocità di recupero della fluorescenza è molto rapida e il recupero è quasi completo dopo solo 60 secondi dall'oscuramento, ad indicare che GFP-b5tail non è immobilizzata all'interno delle inclusioni ma che è invece liberamente diffusibile al loro interno.

Per dimostrare la continuità delle inclusioni P56S-VAPB con tutto l'ER della cellula, ho eseguito esperimenti di FLIP (Fig. 21D): continuando a oscurare il segnale di GFP-b5tail nella stessa area corrispondente a un putativo aggregato P56S-VAPB, infatti, ho osservato come nel tempo tutto il segnale della proteina fluorescente viene perso; questo dato indica che tutte le molecole di GFP-b5tail circostanti sono libere di diffondere nell'inclusione di P56S-VAPB, confermando quindi la continuità di tali strutture con l'ER.

Le inclusioni di P56S-VAPB si organizzano molto rapidamente

Per cercare di chiarire in che modo e con quale scansione temporale le inclusioni si formano, ho deciso di microiniettare il cDNA codificante per VAPB *wild-type* e mutato nel nucleo di cellule CV1 e di osservare la localizzazione delle due proteine nei primissimi stadi della loro espressione. Come si può osservare nei pannelli superiori della Fig. 22, la proteina *wild-type* risulta espressa anche solo dopo due ore dalla microiniezione e, come atteso, si distribuisce diffusamente nelle maglie dell'ER (Fig. 22, prima riga). Tale distribuzione non cambia a tempi successivi. Anche P56S-VAPB è già espresso nelle cellule dopo solo 2 ore dall'introduzione del cDNA (Fig. 22, seconda riga, primo pannello) ma, a differenza della forma selvatica, esso è già distribuito in piccoli assembramenti che vanno ad ingrandirsi nel tempo; a 4 ore dalla microiniezione (Fig. 22, seconda riga, pannello centrale) si può infatti

osservare come le inclusioni risultino più grosse ed inoltre inizino a localizzarsi perinuclearmente. Dopo 6 ore (Fig. 22, seconda riga, ultimo pannello), infine, è possibile osservare il classico aggregato perinucleare identico a quello che si ottiene in seguito alla trasfezione (vedi Fig. 18 e 19).

Le inclusioni di P56S-VAPB rappresentano una nuova forma di OSER

Per caratterizzare le inclusioni di P56S-VAPB anche a livello ultrastrutturale, è stata compiuta microscopia elettronica convenzionale (Fig. 23, pannelli A-E) e immunocolorazione su crio-sezioni (Fig. 23, pannello F) su cellule HeLa trasfettate transientemente con il cDNA codificante la forma *wild-type* o mutata di VAPB. Al contrario di quanto accade per la proteina non mutata (Fig. 23, pannello A), l'ultrastruttura dell'ER nelle cellule dove P56S-VAPB è overespresso risulta fortemente alterata (Fig. 23, pannello B), con strutture elettron-dense perinucleari riconducibili alle inclusioni che la proteina forma (Fig. 23, pannelli B-E). Se osservate a ingrandimento maggiore, le inclusioni di P56S-VAPB sono costituite da coppie di cisterne intervallate da uno strato elettron-denso di citosol di circa 30nm di spessore (Fig. 23, pannelli D ed E). Le strutture appaiono in continuità con il citosol circostante (Fig. 23, pannello C, frecce) e in alcuni casi le cisterne costituenti tali strutture appaiono ricoperte da ribosomi, a testimoniare la loro origine di ER (Fig. 23, pannello C, teste di freccia). A conferma di quanto già osservato tramite immunofluorescenza, l'immunocolorazione con oro colloidale dimostra come P56S-VAPB è arricchito esclusivamente nelle inclusioni (Fig. 23, pannello F), mentre rimane escluso nel resto dell'ER che non presenta alterazioni morfologiche di rilievo (vedi Fig. 18, 20 e 21).

DOMINI DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO IN FISIOLOGIA: MICROSOMINI LIPIDICI COINVOLTI NEL SORTING DI PROTEINE TRANSMEMBRANA DELL'ER

Approccio sperimentale

Come già introdotto nello Scopo della tesi, ci siamo prefissati di investigare il *sorting* delle proteine transmembrana trasportate alla membrana plasmatica con un meccanismo TMD-dipendente (Ronchi et al., 2008). Poichè queste proteine presentano un trasmembrana più lungo di quello delle proteine residenti transmembrana, si può pensare che nell'ER soffrano di un *mismatch* con lo spessore del doppio strato fosfolipidico. La proteina modello scelta per lo studio del *sorting* alla membrana plasmatica TMD-dipendente è il citocromo b_5 con due sue varianti: la forma *wild-type* (da ora in poi chiamata b_517 , dove 17 indica il numero degli amminoacidi costituenti il TM) residente nell'ER, e una forma dove il TMD è stato allungato di 5 amminoacidi (b_522) causandone l'esporto alla membrana plasmatica (Pedrazzini et al., 1996).

Lo spessore delle membrane cellulari è determinato dalla composizione lipidica di quest'ultimo: nell'ER, per esempio, il lipide maggioritario è la fosfatidilcolina, mentre sono meno rappresentati lipidi caratterizzati da una maggiore rigidità e che quindi causano un generale inspessimento della membrana quali gli sfingolipidi; tuttavia quest'ultimi si arricchiscono nei doppi strati più distali della via secretoria, quali quelli del Golgi e della membrana plasmatica (van Meer et al., 2008). Si ritiene che proteine transmembrana quali b_522 vengano trasportate alla membrana plasmatica con un meccanismo TMD-dipendente appunto perché questo tipo di doppio strato presenta una membrana più rigida e spessa dove, al contrario di come accade nell'ER, il TMD di queste proteine non è causa di *mismatch* con il doppio strato (vedi discussione di (Ronchi et al., 2008)). Dato il fatto però che proteine trasportate alla membrana plasmatica con un meccanismo TMD-dipendente si inseriscono comunque dapprima nella membrana dell'ER (Bulbarelli et al., 2002; Pedrazzini et al., 1996; Ronchi et al., 2008), ci siamo chiesti se è possibile che b_522 si concentri per un fenomeno di *partitioning* in un ambiente lipidico più adatto ad accomodare il proprio TMD; questo potrebbe tradursi quindi in una maggiore associazione di b_522 a specie lipidiche minoritarie dell'ER ma con struttura più rigida rispetto alla maggior parte della fosfatidilcolina dell'ER.

Abbiamo deciso di affrontare il problema sopra descritto con un approccio di tipo biochimico, e studiando cioè il *crosslinking* delle nostre due proteine modello, b₅17 e b₅22, con sonde lipidiche radiomarcate fotoattivabili. L'approccio sperimentale scelto è schematizzato in Fig. 24.

Le cellule sono marcate con la sonda lipidica radiomarcata e fotoattivabile per i tempi indicati nei Materiali e metodi (Fig. 24, 1); le cellule vengono quindi semi-permeabilizzate con la tossina SLO o il detergente blando digitonina allo scopo di permeabilizzare solo la membrana plasmatica (Fig. 24, 2). Una volta semi-permeabilizzate, alle cellule viene aggiunta una miscela di traduzione contenente rispettivamente b₅17 o b₅22 e le proteine vengono lasciate traslocare per 1 ora a 32 °C, tempo necessario per l'inserimento nella membrana dell'ER (Brambillasca et al., 2006; Brambillasca et al., 2005) (Fig. 24, 3). Come per i costrutti utilizzati nel saggio di protezione da proteasi, anche b₅17 e b₅22 presentano al loro C-terminale un epitopo ops recante un sito consenso per la N-glicosilazione: in questo modo sarà molto facile riconoscere la quota di proteina che si è effettivamente integrata nella membrana dell'ER (Fig. 24, 4, * indica la glicosilazione) dalla porzione di tradotto che invece non è riuscito ad associarsi. Le cellule vengono quindi esposte alla luce UV, evento che permette al crosslinkante di attivarsi; il crosslinkante, una volta attivato, legherà covalentemente la sonda lipidica radiomarcata a tutte le componenti che sono nel suo immediato intorno (Fig. 24, 4). Le cellule vengono quindi raccolte per sedimentazione, con eliminazione della maggior parte delle proteine citosoliche contribuite dal lisato di reticolociti; vengono quindi lisate con un tampone contenente il detergente Triton X-100, che permette di recuperare una frazione solubile priva di nuclei (Fig. 24, 5). Il surnatante viene infine immunoprecipitato utilizzando anticorpi contro l'epitopo opsina di b₅17ops e b₅22ops (Fig. 24, 6).

Time course di marcatura con ³H-photo-fosfatidilcolina

Come primo lipide da saggiare, ho utilizzato una forma fotoattivabile della fosfatidilcolina (PtdCho). A questo scopo, ho utilizzato un acido stearico modificato a portare il gruppo fotoattivabile *azi* in posizione 10 (Haberkant et al., 2008), il 10-*azi*-acido stearico (10-ASA). Questa sonda viene somministrata alle cellule in concomitanza con la ³H-colina, di modo che all'interno delle cellule si ha la sintesi di fosfatidil-³H-colina contenente la sonda fotoattivabile (Haberkant et al., 2008).

Allo scopo di determinare quale fosse la durata ideale per marcare le cellule con la sonda radioattiva fotoattivabile ³H-photo-fosfatidilcolina, è stato deciso di compiere un esperimento di *time course* nel quale veniva misurata la radioattività totale incorporata da cellule marcate

con la sonda per diversi tempi. Cellule CV1 seminate in petri da 35 mm di diametro in modo tale da ottenere una confluenza finale dell'80% al momento della lisi, sono state lavate per due volte con PBS e quindi marcate con 1.5 mL di un terreno DMEM senza colina addizionato di siero delipidato contenente 20 $\mu\text{Ci/mL}$ di ^3H -colina e 50 μM finale di 10-ASA. I tempi di marcatura scelti sono stati i seguenti: 0, 3, 6, 9, 18 e 24 ore dall'aggiunta del terreno marcato. Una volta terminato il tempo di incubazione previsto, le cellule sono state nuovamente lavate con PBS, staccate per raschiamento in un volume finale di 1 mL di PBS. 50 μL del volume è stato prelevato per compiere un'estrazione organica dei lipidi la cui radioattività è stata quantificata con l'apparecchio Beta-counter (Perkin Elmer modello TRI-CARB 2100TR); il restante volume è stato centrifugato brevemente a 10000g, risospeso in 300 μL di tampone di lisi (100mM TrisHCl pH 8.9, 1% SDS) e quindi bollito. Uguale volume per ciascun campione è stato corso su un gel di acrilamide e quindi colorato con Coomassie per quantificare le proteine totali. I segnali radioattivi risultati con la conta al Beta-counter sono stati quindi normalizzati per la quantità di proteina totale quantificata e riportati in un grafico (Fig. 25A). La marcatura di ^3H -colina cresce linearmente fino a un picco massimo di 18 ore, oltre le quali raggiunge un *plateau*. È stata quindi scelta una marcatura di 18 ore per ottimizzare l'incorporazione della sonda radioattiva.

Per analizzare quale frazione della ^3H -colina recuperata nella fase organica è contenuta nella PtdCho, abbiamo condotto un'analisi TLC della fase organica, in collaborazione con il gruppo del Prof. Massimo Masserini (Università di Milano Bicocca). Come mostrato in Fig. 25B, dopo 18 h di marcatura, la radioattività è presente quasi esclusivamente in una banda corrispondente alla PtdCho.

Semi-permeabilizzazione con SLO o digitonina

Allo scopo di trovare le migliori condizioni di semi-permeabilizzazione, cellule CV1 sono state esposte a quantità crescenti (0.2, 0.6, 1 $\mu\text{g/mL}$) di SLO o 40 $\mu\text{g/mL}$ finali di digitonina (indicata in figura con la dicitura DIG) seguendo i protocolli descritti nei Materiali e metodi. Le cellule sono state quindi incubate con un tradotto marcato con ^{35}S metionina di b₅17ops per 1 ora a 32°C. Circa l'8% del volume di traduzione è stato bollito con uguale volume di DB2x e i campioni analizzati tramite SDS-PAGE seguito da autoradiografia per rilevare il segnale radioattivo emesso da b₅17ops. Più specificamente, la comparsa di una banda corrispondente al b₅17 glicosilato (*) è indice di ingresso del tradotto nelle cellule e del successivo inserimento nell'ER.

Com'è osservabile nell'autoradiografia della Fig. 26, in assenza di fattori permeabilizzanti una quota scarsissima di b₅17 è glicosilata (Fig. 26, pannello A, corsia 1, ○

per il non glicosilato), probabilmente a causa della presenza di qualche cellula rotta nella preparazione. Per quanto riguarda la semi-permeabilizzazione con SLO, all'aumentare della quantità di tossina aggiunta si osserva anche un crescente incremento della glicosilazione di b₅17, a testimonianza di una effettiva permeabilizzazione dose-dipendente (Fig. 26A, confronta corsie 2-4, * per il glicosilato, ○ per il non glicosilato). La permeabilizzazione con digitonina, tuttavia, è risultata maggiormente efficiente (Fig. 26A, corsia 5, * per il glicosilato, ○ per il non glicosilato), con una efficienza di glicosilazione pari al 42% (Fig. 26B). Abbiamo quindi deciso di scegliere la digitonina alla concentrazione finale di 40µg/mL come agente per la semi-permeabilizzazione.

Per confermare che la quota di b₅17ops glicosilata fosse effettivamente integrata nella membrana dell'ER, abbiamo trattato le cellule con sodio carbonato; il trattamento con soluzione alcaline permette infatti il distacco di proteine associate perifericamente al doppio strato fosfolipidico (Gilmore and Blobel, 1985). Una volta compiuta la traslocazione, alle cellule è stato aggiunto sodio carbonato (concentrazione finale 0.1 M). Dopo 30 minuti di incubazione in ghiaccio, un campione corrispondente a metà del volume totale è stato direttamente bollito (campioni totali, T, Fig. 27A, corsie 1 e 4), mentre la restante metà è stata ultracentrifugata a 170000g per 45 min; è stato quindi recuperato il surnatante (S, Fig. 27A, corsie 2 e 5), mentre il pellet ottenuto è stato risospeso nello stesso volume del surnatante (P, Fig. 27A, corsie 3 e 6). Il segnale radioattivo emesso dalla proteina b₅17ops è stato quindi quantificato e la sua distribuzione tra le frazioni è riportata nel grafico mostrato in Fig. 27B. In assenza di digitonina (Fig. 27A, corsie 1-3), come atteso, e in accordo con quanto mostrato in Fig. 26, non si ha internalizzazione della proteina e quindi si osserva un bassissimo livello di glicosilazione, come la maggior parte di proteina non glicosilata (Fig. 27A, °) è presente nel surnatante (Fig. 27A, corsia 2), come atteso per una proteina non integrata; la poca quota di proteina non glicosilata presente nel pellet potrebbe essere dovuta a proteina integrata ma non glicosilata, ma è più probabilmente dovuta ad una associazione aspecifica di b₅17 con la membrana plasmatica delle cellule (Fig. 27A, corsia 3). Invece la bassa quota di proteina glicosilata è recuperata interamente nel pellet, a indicare che rappresenta proteina integrata nel doppio strato fosfolipidico. Quando viene aggiunta digitonina, si osserva un notevole aumento della forma glicosilata (si veda anche Fig. 26), e di nuovo la quota glicosilata della proteina dopo ultracentrifugazione (Fig. 27A, confronto tra corsie 5 e 6) viene recuperata unicamente nel pellet di membrane, a testimonianza di un'integrazione nella membrana dell'ER (Fig. 27, pannelli A e B).

Presi insieme, questi dati indicano come, dopo permeabilizzazione selettiva della membrana plasmatica, la proteina b₅17 riesce ad entrare nella cellula ed ad inserirsi nella membrane dell'ER. Tuttavia, data l'incertezza sullo stato di integrazione della forma non

glicosilata, abbiamo deciso di considerare nelle nostre analisi di cross-linking solamente la forma glicosilata.

Ottimizzazione delle condizioni di *Western Blotting*

Dato che gli spettri di radioattività del trizio (^3H), utilizzato per marcare le sonde lipidiche, e la ^{35}S -metionina, comunemente usata per marcare le proteine in vitro, sono in parte sovrapposti, negli esperimenti il cui schema è riportato in Fig. 24 si è deciso di tradurre le due proteine b₅17 e b₅22 senza alcun aminoacido radioattivo e quindi di rilevarne i segnali tramite *western blot* utilizzando l'anticorpo anti-opsina. Al fine di osservare quale fosse l'efficienza di riconoscimento dell'anticorpo in *western blot*, si è deciso di tradurre le due proteine in presenza di ^{35}S -metionina, di traslocarle in microsomi e quindi di trasferire i campioni su membrana PVDF. I segnali radioattivi emessi sono stati quindi rilevati per autoradiografia per quantificare la quantità esatta di proteina presente nei vari campioni; sulla stessa membrana è stata quindi poi eseguita una immunocolorazione con l'anticorpo anti-opsina utilizzando diverse combinazioni di latte e/o di albumina da siero bovino (BSA) in presenza del detergente TWEEN alla concentrazione finale dello 0,1%; i vari campioni sono stati quindi analizzati per chemiluminescenza. È stato quindi infine confrontato il segnale radioattivo (che fornisce un indice reale della quantità di proteina presente) con quello ottenuto per chemiluminescenza, allo scopo di trovare la condizione di immunocolorazione che meglio riflettesse i segnali osservati con l'autoradiografia.

Riguardo i segnali emessi nelle autoradiografie delle membrane (Fig. 28, pannello A, pannello ^{35}S), analogamente a quanto osservato negli esperimenti precedenti di traslocazione in vitro (vedi Fig. 13-17), in assenza di microsomi (corsie 1, 3, 5, 7, 9, 11) si osserva solo una banda corrispondente alla proteina non glicosilata (indicata con °); quando i microsomi vengono aggiunti, al contrario, si osserva una seconda banda corrispondente alla proteina glicosilata (Fig. 28A, pannello ^{35}S , corsie 2, 4, 6, 8, 10 e 12, indicata con *). Analizzando i *western blot* corrispondenti (Fig. 28A, pannello WB), sorprendentemente si possono apprezzare forti differenze del segnale ottenuto in confronto alla rispettiva autoradiografia.

Confrontando i segnali rivelati dall'anticorpo rispetto a quelli della metionina radioattiva, si nota che in tutte le condizioni la forma glicosilata è sfavorita dalla immunocolorazione rispetto alle sue reali concentrazioni rivelate dalla autoradiografia. Inoltre, l'anticorpo non riconosce con la stessa efficienza le due proteine. La condizione maggiormente sfavorevole sembra essere quella nella quale viene utilizzato il latte al 5 % come bloccante (Fig. 28A, confronta corsie 1-4 tra pannello WB e ^{35}S), dove si osserva una

efficienza di legame dell'anticorpo alla proteina b_5 17 molto ridotta rispetto a b_5 22 (confronta corsie 1 e 2 con 3 e 4 nei pannelli WB e ^{35}S). L'efficienza di legame dell'anti-opsina migliora notevolmente e la differenza tra il legame alle due proteine diminuisce se viene utilizzata la BSA al 3% come bloccante, seppur con discrepanze tra i segnali radioattivi e quelli ottenuti con la chemiluminescenza (Fig. 28A, corsie 5-8; vedi anche pannello B per le quantificazioni).

Nell'ultima membrana (Fig. 28A, corsie 9-12) è stata adottata una combinazione mista tra latte e BSA; si è deciso infatti di utilizzare nel *blotting* una concentrazione di BSA inferiore (1% rispetto al 3% della membrana precedente), allo scopo di favorire il più possibile il legame dell'anti-opsina al proprio epitopo. Un bloccaggio altrettanto blando, tuttavia, avrebbe fornito un eccessivo legame aspecifico dell'anticorpo alla membrana; si è deciso perciò fare una pre-incubazione col latte al 5% nel bloccaggio e successivamente BSA all'1%. Anche in quest'ultimo caso, l'anticorpo anti-opsina si lega con maggior efficienza alle due proteine, in confronto alla prima membrana (Fig. 28A, pannello WB, corsie 9-12 in confronto a 1-4).

Dato che nell'esperimento di *crosslinking* verrà preso in considerazione unicamente la quota di b_5 glicosilata, in quanto sicuramente integrata nella membrana dell'ER, ho analizzato quantitativamente i risultati di Fig. 28A solamente per le forme glicosilate, confrontando il rapporto tra b_5 17ops e b_5 22ops glicosilate ottenuto mediante autoradiografia e immunoblotting (Fig. 28, pannello B). Dal grafico si può apprezzare come in tutti i casi tale rapporto è maggiore in autoradiografia che in blotting, indicando che l'anticorpo riconosce meglio la proteina col transmembrana allungato. Questo risultato è sorprendente, poiché l'epitopo non è all'interno del transmembrana. Inoltre, abbiamo avuto lo stesso problema anche con anticorpi che legano il dominio catalitico N-terminale del b_5 (risultati non mostrati).

In base ai risultati della Fig. 28, si è scelto di adottare la BSA 3% come condizione di *blotting*, in quanto è quella che meglio riproduce il rapporto osservato in autoradiografia tra b_5 17ops e b_5 22ops; allo scopo di correggere per la minor efficienza di legame dell'anticorpo alla forma glicosilata del b_5 17, tuttavia, si è calcolato di applicare d'ora in avanti un fattore correttivo di 1.7 ai segnali di chemiluminescenza del b_5 17.

Crosslinking di b₅17ops e b₅22ops con ³H-foto-fosfatidilcolina

Come già descritto in Fig.24, l'esperimento prevede di confrontare la diversa associazione delle due proteine b₅17ops (proteina residente dell'ER) e b₅22ops (proteina esportata in membrana plasmatica in una via TMD-dipendente (Ronchi et al., 2008)) con le diverse specie lipidiche dell'ER. A questo scopo, sono state utilizzate sonde lipidiche triziate e portanti inoltre un gruppo, e cioè un anello diazirinico (Thiele et al., 2000), attivabile dalla luce UV (Haberkant et al., 2008): una volta attivato, esso legherà il lipide-sonda a ciò che ha nel suo più immediato intorno; per mezzo di una immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-opsina, in particolare, sarà possibile isolare i binomi proteina b₅-sonda lipidica uniti tra loro covalentemente.

Nel caso della fosfatidilcolina come sonda, cellule CV1 sono state marcate con ³H-colina e l'acido grasso 10-foto-ASA per 18 ore, in modo tale che i due composti, una volta internalizzati, si combinassero per formare la sonda lipidica ³H-foto-fosfatidilcolina (vedi Materiali e Metodi e Fig. 25 per l'internalizzazione della ³H-colina). Il 10-foto-ASA è un acido grasso recante un gruppo diazirinico fotoattivabile in posizione 10 dello scheletro di una, oppure entrambe, catene carboniose del lipide (vedi Fig. 29). Una volta marcate, le cellule sono state semi-permeabilizzate con il blando detergente digitonina (vedi Materiali e Metodi e Fig. 26 per la permeabilizzazione); una volta determinata la loro torbidità tramite spettrofotometro, a 0.4 OD di cellule sono state aggiunti 8 volumi di tradotto b₅17ops, b₅22ops oppure solo lisato come controllo senza proteina. E' stato quindi eventualmente attivata la sonda tramite esposizione alla luce UV e i campioni sono stati quindi lisati e immunoprecipitati con anticorpi anti-opsina.

Per controllare l'efficacia della irradiazione, una piccola aliquota di ciascun campione (Totali, Fig. 30, primo pannello in alto) è stata prelevata ed analizzata mediante SDS-PAGE e autoradiografia; come mostrato in Fig. 30, primo pannello, solo quando i campioni sono stati esposti alla luce UV (corsie 3, 5 e 7) si osserva segnale radioattivo, indice dell'associazione del lipide a diverse proteine/lipidi; quando i campioni non sono esposti alla luce UV, al contrario, non vi è alcun legame covalente indotto dalla irradiazione (corsie 4 e 6). Inoltre, il *pattern* delle bande radioattive non differisce per i campioni non esposti alla proteina tradotta in vitro (corsia 3) rispetto a quello ottenuto quando b₅17ops e b₅22ops erano presenti, come era da aspettarsi, poiché la proteina introdotta rappresenta ovviamente una minima quota delle proteine dell'ER presenti nel campione di cellule.

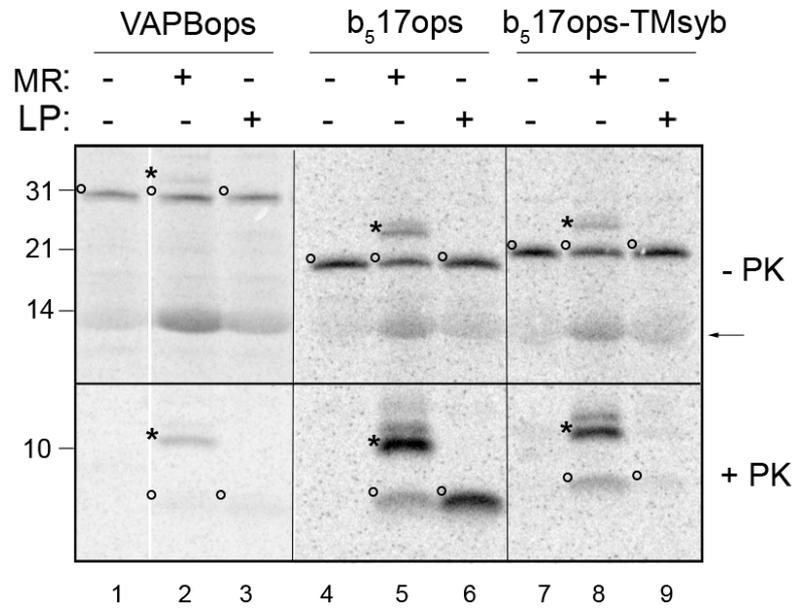
Diverso è il risultato ottenuto dopo immunoprecipitazione (Fig. 30, secondo e terzo pannello). E' evidente che in assenza di aggiunta di tradotto in vitro (corsia 3) nessun

segnale è stato ottenuto né con la sonda radioattiva (secondo pannello; le due bande segnate ‡ sono contaminanti aspecifici) né per immunocolorazione (terzo pannello).

Invece, quando le cellule vengono incubate con b₅17ops ed solo quando esposte agli UV, l'autoradiografia rileva la presenza di lipide-sonda in corrispondenza del peso molecolare della proteina b₅17 (Fig. 30, pannello centrale, corsia 5 rispetto a corsia 4); il *western blotting* compiuto successivamente conferma la presenza della proteina b₅17 in corrispondenza del peso molecolare atteso (Fig. 30, pannello in basso, corsia 4 e 5, * per il glicosilato, ° per il non glicosilato). Analogamente, l'incubazione delle cellule con b₅22ops porta allo stesso risultato (Fig. 30, pannelli centrale e in basso, corsie 6 e 7); il segnale radioattivo rilevato per autoradiografia, tuttavia, è notevolmente inferiore se confrontato a quello del b₅17 (Fig. 30, pannello centrale, corsia 7 rispetto a 5).

Come già spiegato in precedenza, nella quantificazione è stata presa in considerazione unicamente la forma glicosilata delle due proteine (Fig. 30, *), in quanto solo questo stato è indice di corretta e completa integrazione nella membrana dell'ER (vedi anche Fig. 27). Sono state quindi calcolate, per mezzo del *software* ImageJ, la radioattività emessa dal lipide sonda in corrispondenza della forma glicosilata delle due proteine (Fig. 30, pannello centrale, corsie 5 e 7, *) e il segnale di chemiluminescenza ottenuto nel medesimo punto (Fig. 30, pannello in basso, corsie 5 e 7, *); è stato corretto il segnale di b₅17ops ottenuto per *western blot* per il fattore correttivo di 1,7 (vedi Fig. 28) e sono stati quindi calcolati i rapporti lipide/proteina sia per b₅17ops che per b₅22ops. Come è visibile dal grafico in Fig. 31, si osserva una chiara e statisticamente significativa differenza di associazione delle due proteine al fosfolipide fosfatidilcolina; in particolare, ponendo l'associazione di b₅17 al 100%, il legame di b₅22 a tale lipide sembra sfavorito di circa il 50%.

A



B

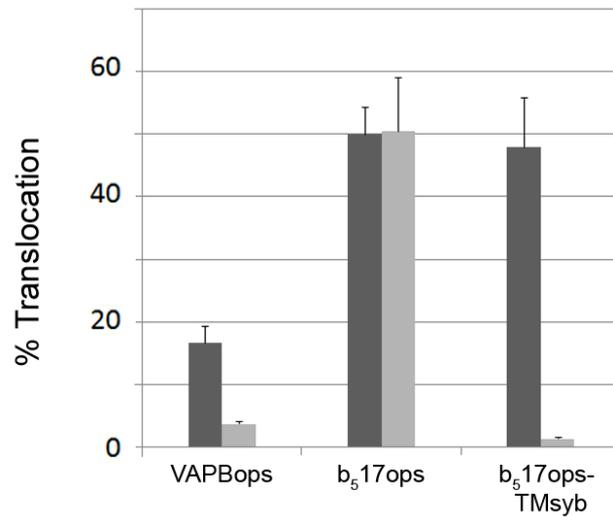


Fig. 13: Traslocazione post-traduzionale di VAPBops in microsomi e liposomi. (A) VAPBops, b₅17ops e b₅17ops-TMSyb sono state tradotte in vitro in presenza di ³⁵S-metionina e quindi incubate con MR (corsie 2, 5 e 8) o LP (corsie 3, 6 e 9) per un'ora. Come controllo, sono state anche compiute traslocazioni in assenza di membrane (corsie 1, 4 e 7). Dopo la traslocazione, una piccola aliquota di reazione viene direttamente analizzata per SDS-PAGE (pannello -PK), mentre il resto della reazione viene incubato con PK e i frammenti protetti eventualmente generati immunoprecipitati con anticorpi anti-opsina (pannello +PK). In tutte le figure dei gel, in entrambi i pannelli, * indica la forma glicosilata e o indica la forma non glicosilata della proteina o del frammento protetto. La freccia a destra indica radioattività aspecifica associata alle globine del lisato usato in traduzione; i numeri a sinistra indicano la posizione e la grandezza (kDa) dei pesi molecolari. (B) Grafico riportante le efficienze di traslocazione riferite alla Fig. 13 e calcolate come descritto in (Brambillasca et al., 2005); l'istogramma grigio scuro indica la traslocazione nei MR, l'istogramma in grigio chiaro quella nei LP. Le barre indicano ± errore standard (n=3).

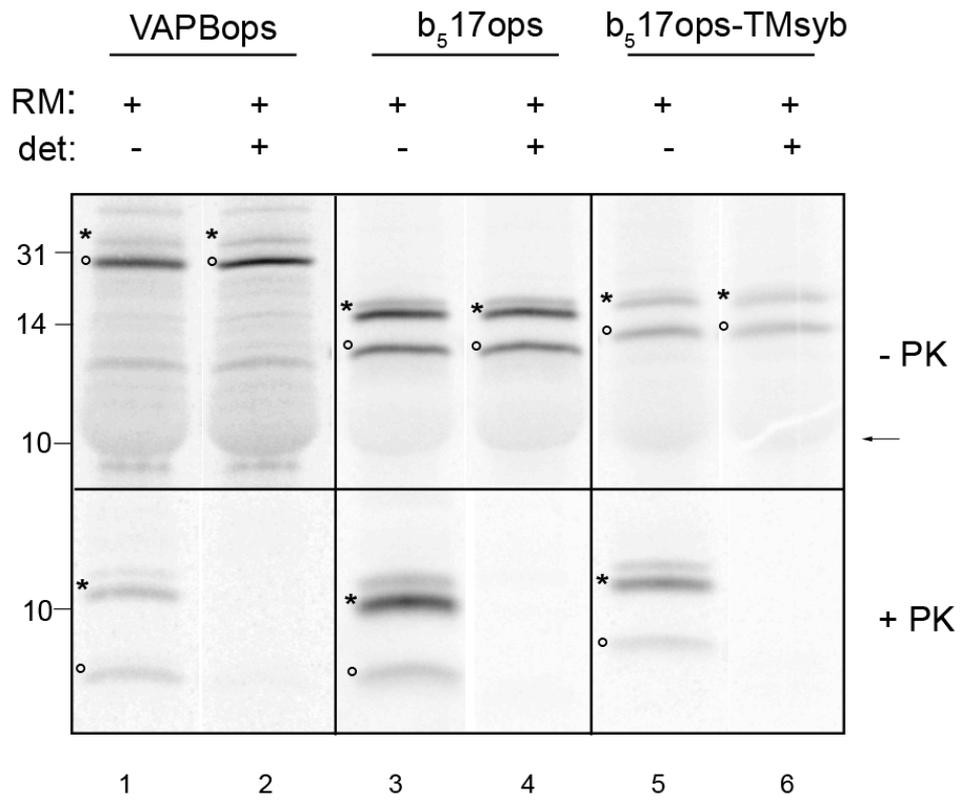


Fig. 14: Traslocazioni di VAPBops, b₅17ops e b₅17ops-TM_{syb} in MR con o senza l'aggiunta di detergente durante la digestione con proteasi. Le proteine indicate sono state tradotte in vitro, traslocate in presenza di MR e quindi analizzate con il saggio di protezione da proteasi in assenza (corsie 1, 3 e 5) o in presenza (corsie 2, 4 e 6) di detergente durante la digestione con PK. I simboli hanno lo stesso significato che in Fig. 13.

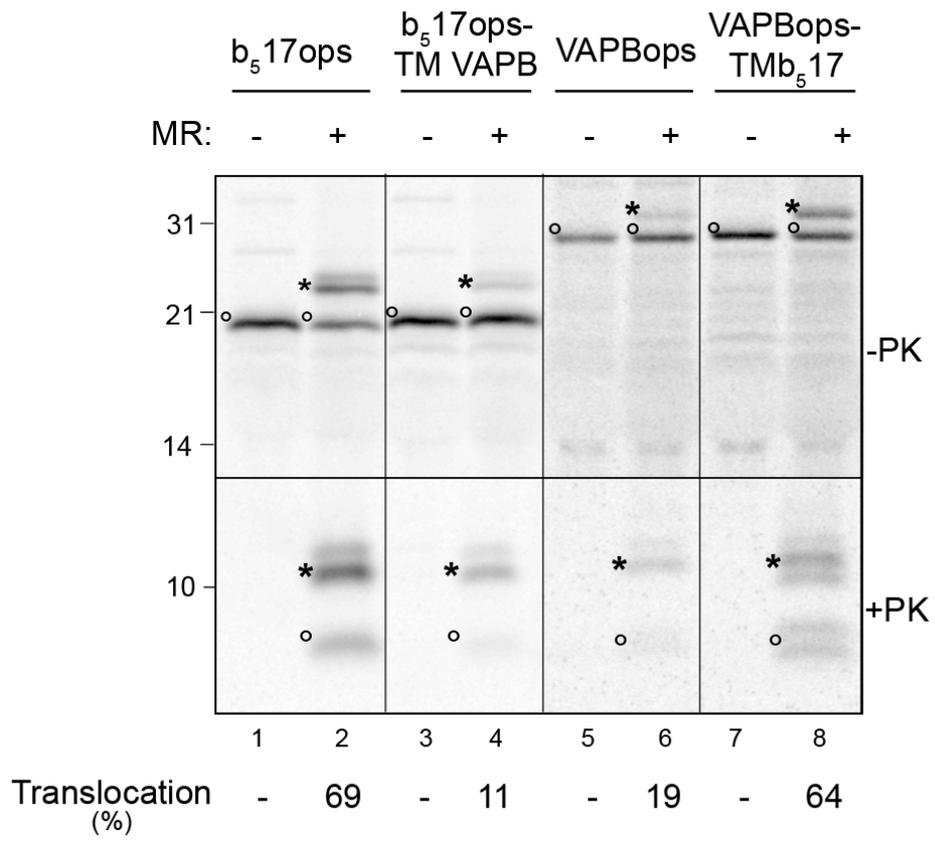


Fig. 15: Traslocazione in MR delle chimere b_517ops -TMVAPB e VAPBops-TMb₅17 in confronto alle proteine *wild type* VAPBops e b_517ops . Le proteine indicate sono state tradotte in vitro, traslocate in presenza di MR (corsie 2, 4, 6 e 8) e quindi analizzate con il saggio di protezione da protasi come descritto in Fig. 13. Le efficienze di traslocazione sono riportate sotto ogni rispettiva corsia.

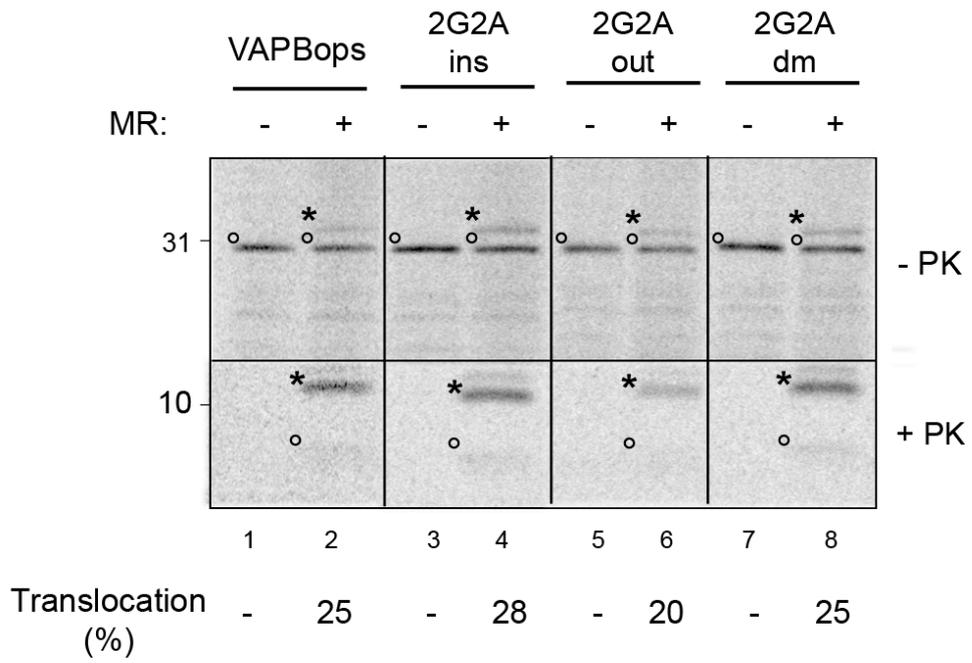


Fig. 16: Traslocazione in MR delle chimere VAPBops-2G2Ains, VAPBops-2G2Aout e VAPBops-2G2Adm in confronto alla proteina VAPBops. Le proteine indicate sono state tradotte in vitro, traslocate in presenza di MR (corsie 2, 4, 6 e 8) e quindi analizzate con il saggio di protezione da protasi come descritto in Fig. 13. Le efficienze di traslocazione sono riportate sotto ogni rispettiva corsia.

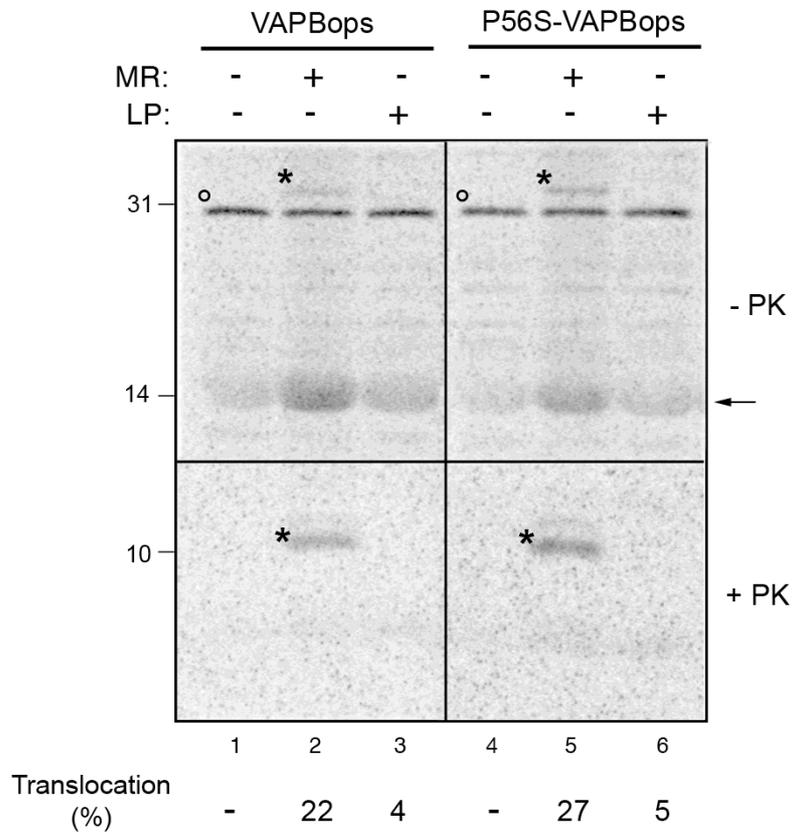
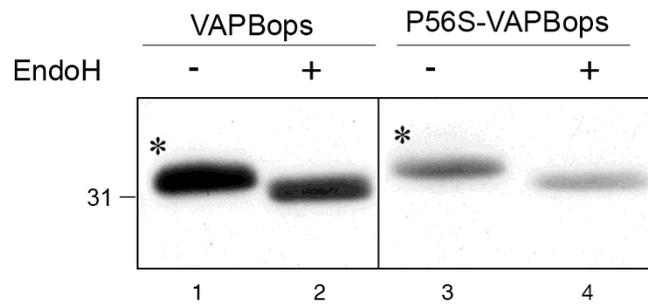
A**B**

Fig. 17: (A) Inserizione di P56S-VAPBops in MR e LP in confronto alla proteina VAPBops. Le proteine indicate sono state tradotte in vitro, traslocate in presenza di MR (corsie 2 e 5) o LP (corsie 3 e 6) e quindi analizzate con il saggio di protezione da protasi come descritto in Fig. 13. Le efficienze di traslocazione sono riportate sotto ogni rispettiva corsia. (B) Saggio di glicosilazione in lisati di cellule esprimenti rispettivamente VAPBops e P56S-VAPBops. I lisati sono stati trattati con EndoH (corsie 2 e 4) oppure *mock*-trattati (corsie 1 e 3); * indica la forma glicosilata della proteina.

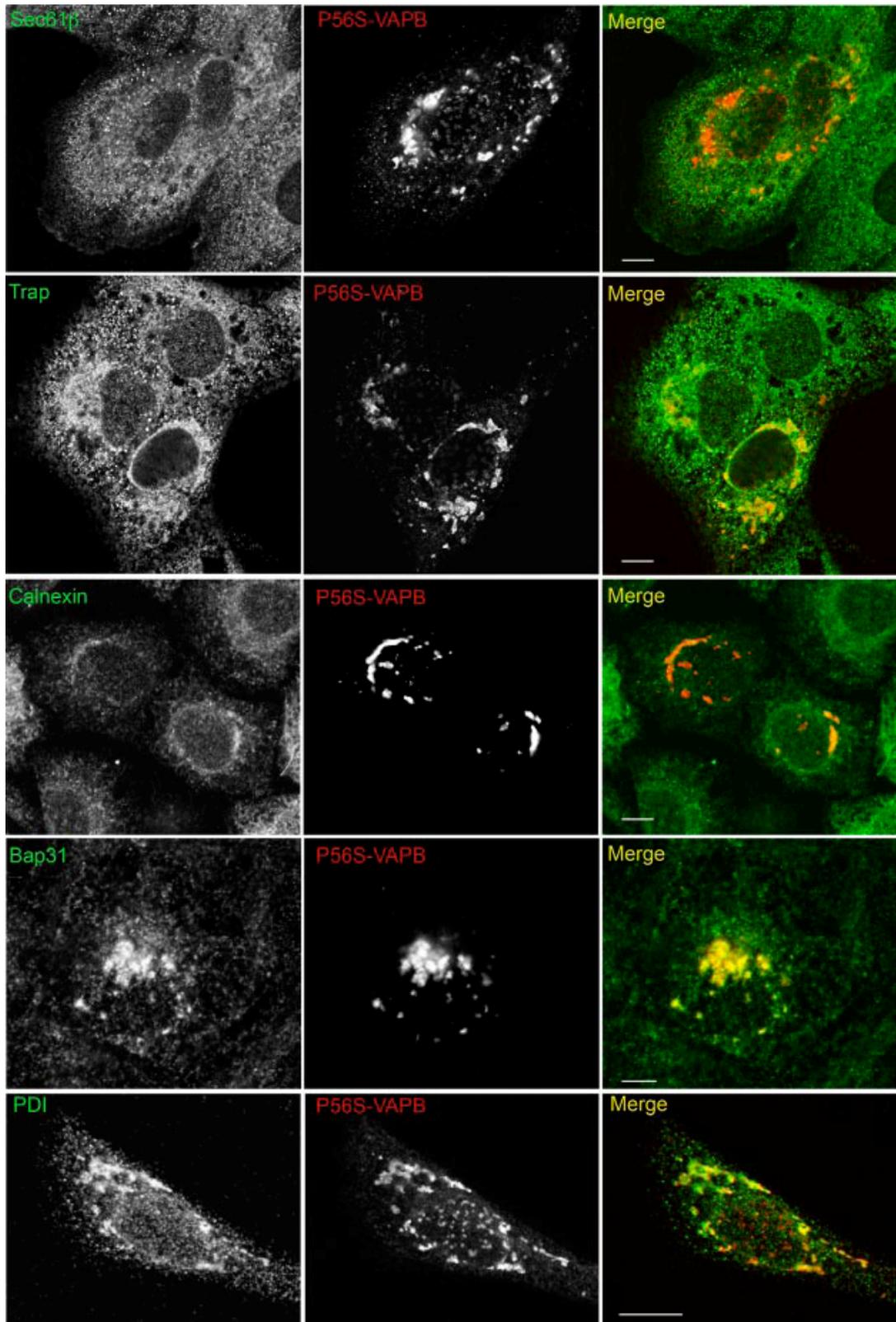
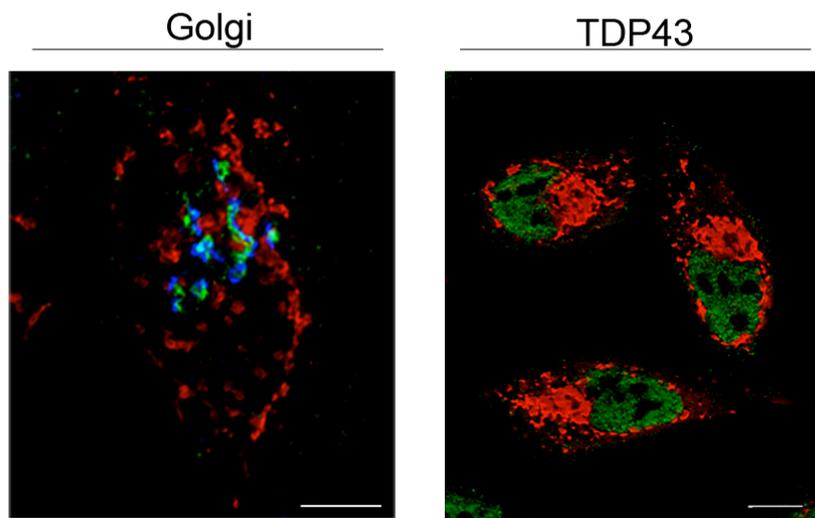


Fig. 18: Le inclusioni di P56S-VAPB contengono alcuni marcatori dell'ER. Cellule HeLa sono state trasfettate con myc-P56S-VAPB e fissate dopo 24 ore. I pannelli nella colonna a sinistra (in falso colore verde nella colonna del *merge*) rappresentano i diversi marcatori dell'ER utilizzati nello studio; la colonna centrale (falso colore rosso nella colonna del *merge*) è rappresentata l'immuno-colorazione per P56S-VAPB; la sovrapposizione delle immagini delle due colonne sopra citate è riportata nella colonna a destra (colonna di *merge*). Sono mostrate singole sezioni confocali. Barra:10 μm .

A



B

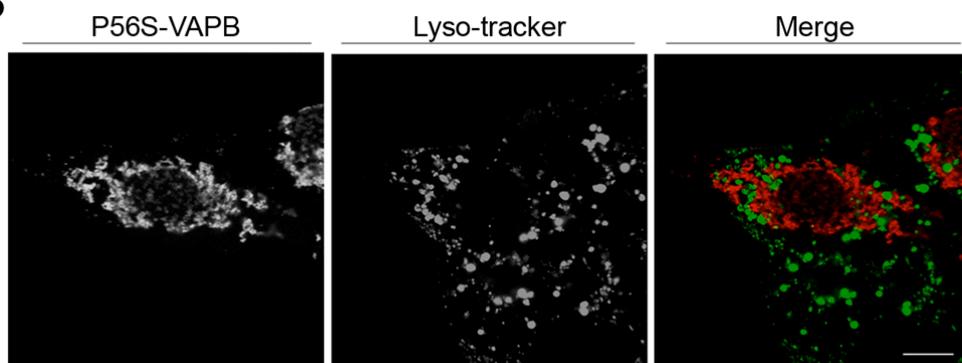
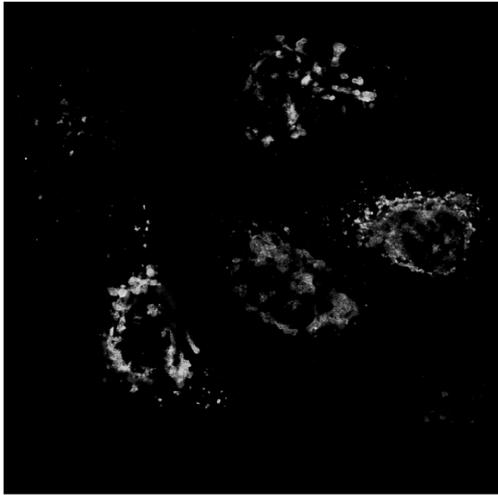


Fig. 19: Le inclusioni di P56S-VAPB non sono presenti in altri organelli oltre l'ER. (A) Proiezioni di stack formati da una serie di sezioni confocali sequenziali di cellule HeLa esprimenti P56S-VAPB. In entrambi le immagini, P56S-VAPB è illustrato in falso colore rosso; nello stack a sinistra, oltre alle inclusioni sono mostrate una immuno-colorazione per il marcatore del cis-Golgi GM130 (in blu) e una per il marcatore del trans-Golgi TGN46 (in verde); nello stack a destra, invece, le cellule sono state immuno-colorate con il marcatore TDP43 (in verde). (B) Cellule HeLa esprimenti P56S-VAPB sono state colorate con il colorante vitale *lyso-tracker* (Invitrogen, in verde), e quindi fissate e immuno-colorate per P56S-VAPB (in rosso). Ogni singolo falso colore è dapprima mostrato in scala di grigio e il merge dei due canali è mostrato nel pannello di destra. Barre: 10 μ m.

P56S-VAPB-TMb₅17



P56S-VAPB-2G2Adm

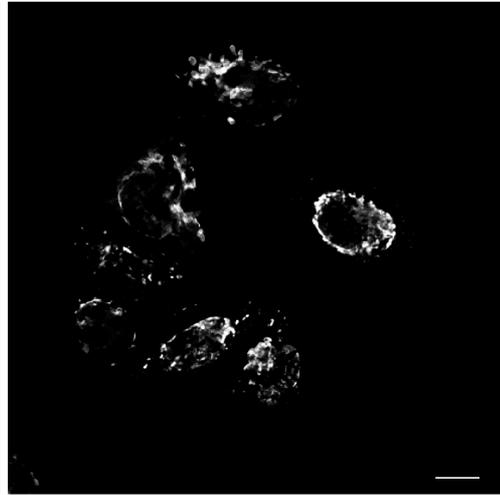


Fig. 20: Espressione di P56S-VAPB-TMb₅17 e di P56S-VAPB-2G2Adm in cellule. Cellule HeLa sono state trasfettate con i costrutti indicati per 24 ore, fissate ed immuno-colorate per VAPB. Barra: 10 μ m.

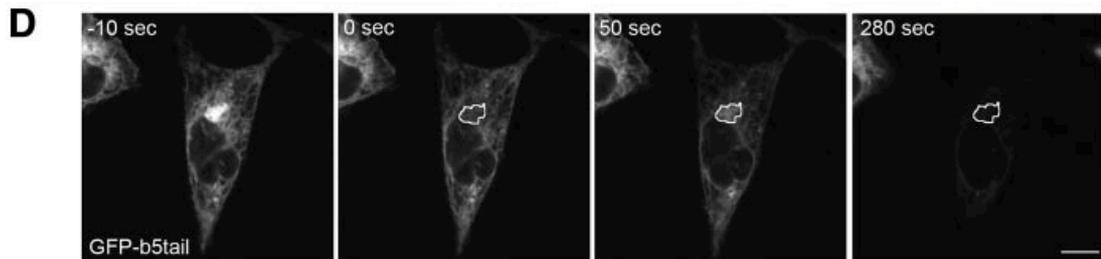
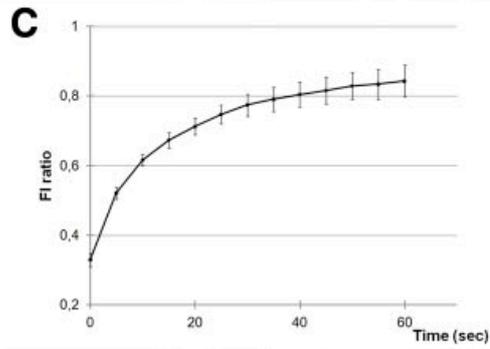
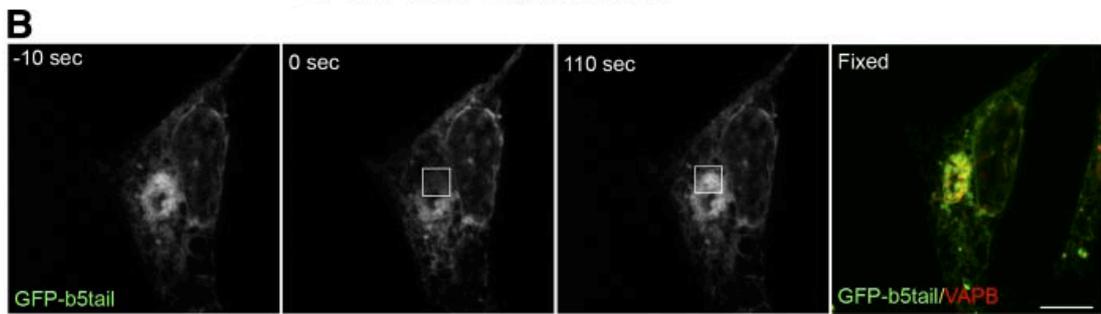
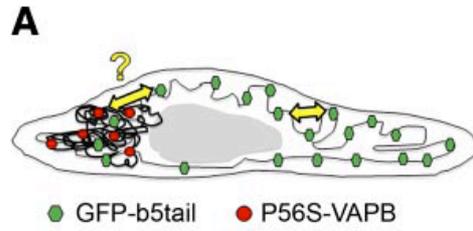


Fig. 21: Esperimenti di FRAP e FLIP sulle inclusioni di P56S-VAPB. (A) Schematizzazione dell'esperimento di FRAP mostrato nel pannello B; l'esperimento consiste nel verificare se una proteina residente dell'ER (GFP-b5tail, in verde) è in grado di diffondere nelle inclusioni di P56S-VAPB (mostrate in rosso). (B) Esperimento di FRAP; i primi tre pannelli in scala di grigio mostrano la fluorescenza emessa dalla proteina GFP-b5tail 10 secondi prima dell'oscuramento (primo pannello), al momento dell'oscuramento dell'area scelta (delimitata da un quadrato, secondo pannello) e 110 secondi dopo l'oscuramento mostrato nel pannello precedente (terzo pannello); l'ultimo pannello mostra il *merge* tra la fluorescenza emessa da GFP-b5tail (in falso colore verde) e P56S-VAPB (in falso colore rosso). (C) Grafico mostrante l'andamento del recupero di fluorescenza nell'area oscurata (vedi B, secondo pannello) nel tempo; le barre indicano \pm errore standard (n=4). (D) Esperimento di FLIP; tutti i pannelli mostrano in scala di grigio la fluorescenza emessa da GFP-b5tail 10 secondi prima dell'oscuramento dell'area scelta (primo pannello), al momento dell'oscuramento (area circondata in bianco, secondo pannello), 50 e 280 secondi dal momento del primo oscuramento (rispettivamente terzo ed ultimo pannello). Barre: 10 μ m.

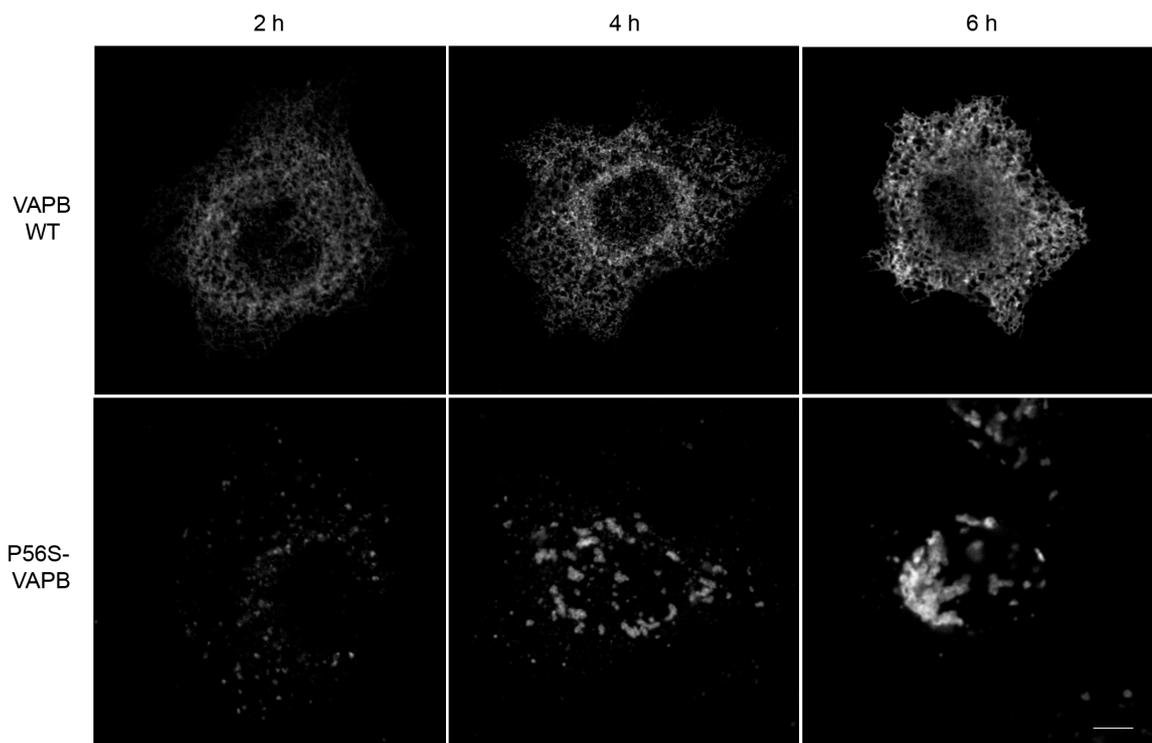


Fig. 22: P56S-VAPB si organizza in *cluster* molto rapidamente. Cellule CV1 sono state microiniettate con il cDNA codificante per VAPB *wild type* (prima riga) e P56S (seconda riga); le cellule sono state fissate a diversi tempi dalla microiniezione (2 ore, prima colonna, 4 ore, seconda colonna e 6 ore, terza colonna) ed immuno-colorate per VAPB. Barra:10 μ m.

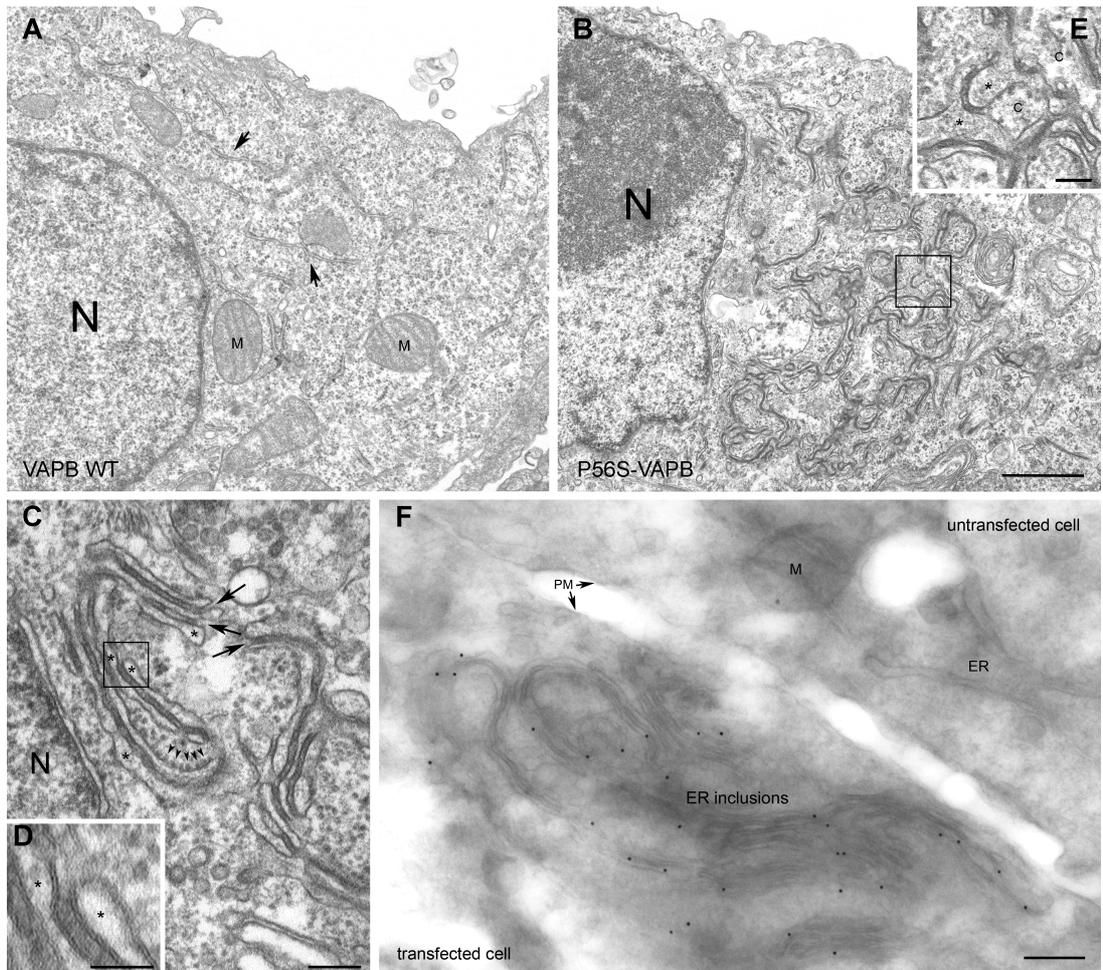


Fig. 23: Microscopia elettronica su cellule overesprimenti VAPB *wild type* (pannello A) e P56S (pannelli B-F). (A) analisi ultrastrutturale di cellule overesprimenti VAPB *wild type* (le frecce indicano le cisterne dell'ER; M, mitocondri, N, nucleo). (B) analisi ultrastrutturale di cellule overesprimenti P56S-VAPB (ingrandimento dell'area circondata dal quadrato mostrato nel pannello E). (C) analisi a maggior ingrandimento delle inclusioni formate da P56S-VAPB (con * è indicato il lume dell'ER, con le frecce i punti di continuità di tali strutture con il citosol, con teste di freccia i ribosomi). (D) Ingrandimento dell'area circondata da un quadrato nel pannello C. (E) Ingrandimento dell'area mostrata nel pannello B (circondata da un quadrato); * indica il lume dell'ER, C, citosol. (F) Immunocolorazione con oro colloidale su criosezioni; PM, membrana plasmatica. Barre: pannello A-B: 1 μ m; pannello C-F: 100 nm.

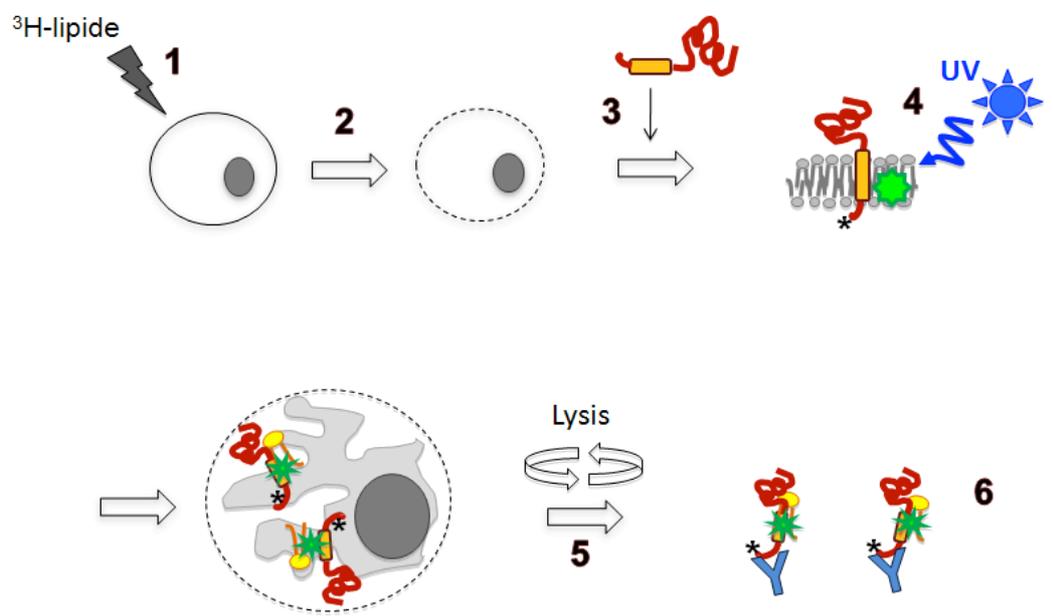
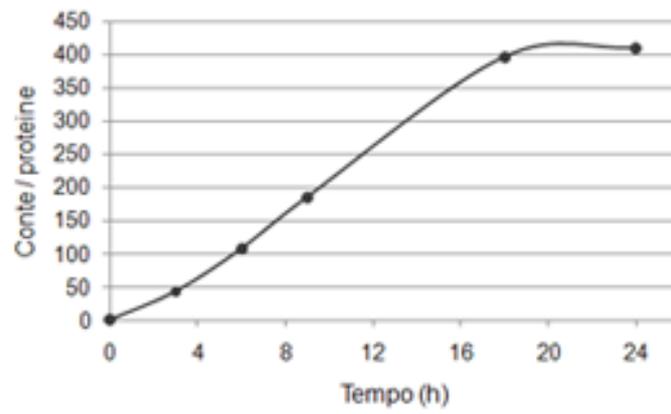


Fig. 24: Schematizzazione dell'approccio sperimentale scelto per la sezione "Domini del reticolo endoplasmatico in fisiologia: microsomini lipidici coinvolti nel *sorting* di proteine transmembrana dell'ER".

A



B

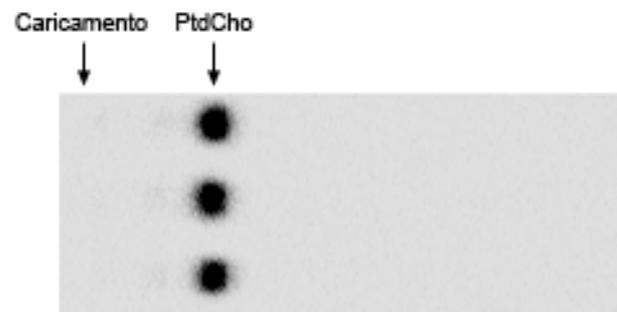
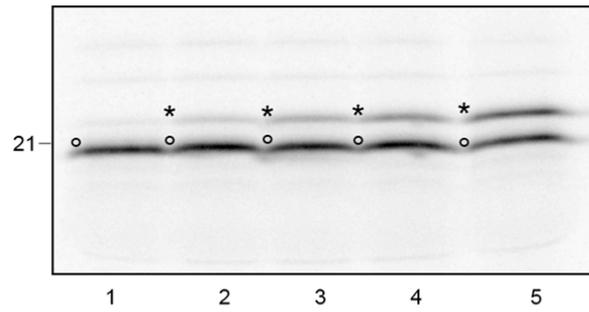


Fig. 25: Analisi dell'incorporazione di ^3H -colina in cellule CV1. (A) Cellule CV1 sono state marcate con ^3H -colina per 0, 3, 6, 9, 18 e 24 ore e quindi lisate; una piccola aliquota di lisato è stato subito analizzata per SDS-PAGE per calcolarne il contenuto proteico, mentre un'altra è stata analizzata con β counter per misurarne la radioattività emessa; nel grafico è riportato l'andamento di incorporazione di ^3H -colina in cellule espresso come rapporto tra radioattività emessa e contenuto proteico del rispettivo lisato cellulare. (B) Analisi TLC dopo 18 ore di incorporazione di ^3H -colina. La prima freccia a sinistra indica il punto in cui l'estratto organico è stato caricato, la seconda il peso molecolare corrispondente alla PtdCho.

A

SLO (µg/mL)	-	0,2	0,6	1	-
DIG (µg/mL)	-	-	-	-	40



B

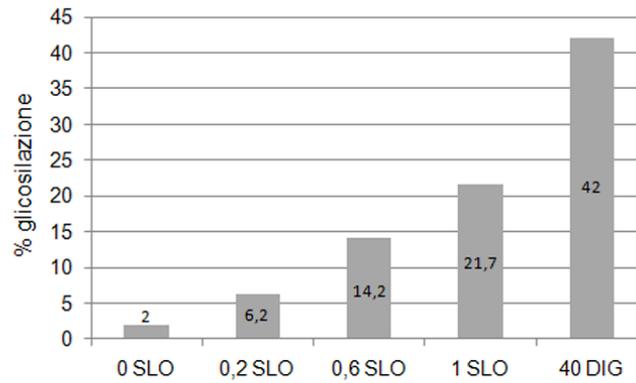
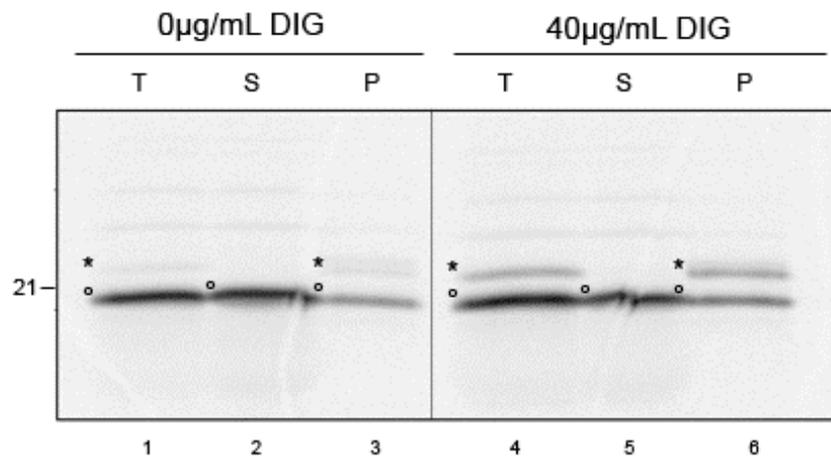


Fig. 26: Saggio di permeabilizzazione di cellule CV1 con streptolisina O e digitonina. (A) Cellule CV1 sono state trattate con SLO (corsie 2-4) o digitonina (corsia 5) come spiegato nella sezione "Materiali e Metodi" e nelle concentrazioni finali riportate in figura; come controllo, in una reazione non è stato aggiunto alcun agente permeabilizzante (corsia 1). Le cellule semi-permeabilizzate sono state quindi incubate con lisato contenete tradotto radiomarcato per b₅17ops e analizzate tramite autoradiografia. * indica la forma glicosilata e con ○ la forma non glicosilata della proteina. (B) Grafico riportante le percentuali dell'efficienza di inserimento della proteina b₅17ops nelle diverse condizioni di semi-permeabilizzazione (espresse in µg/mL). Viene considerato come integrato nella membrana dell'ER unicamente la componente di proteina che è risultata glicosilata (* nel pannello A).

A



B

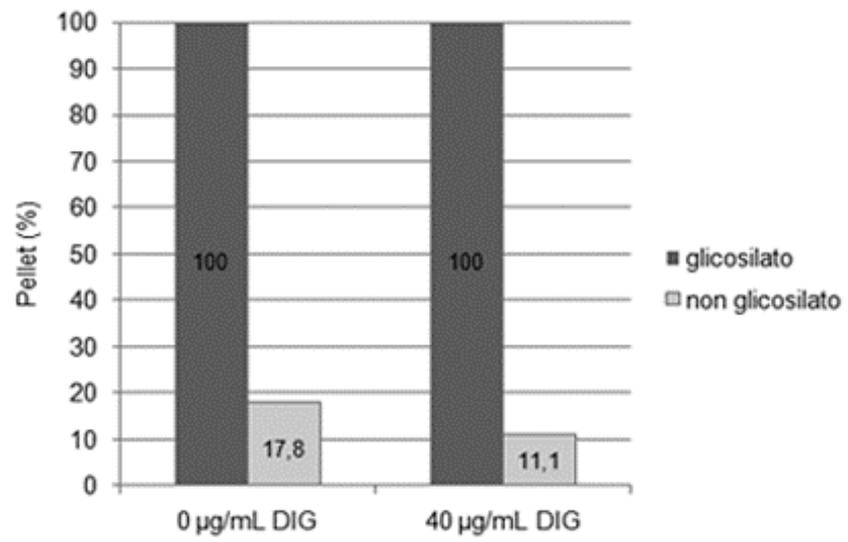
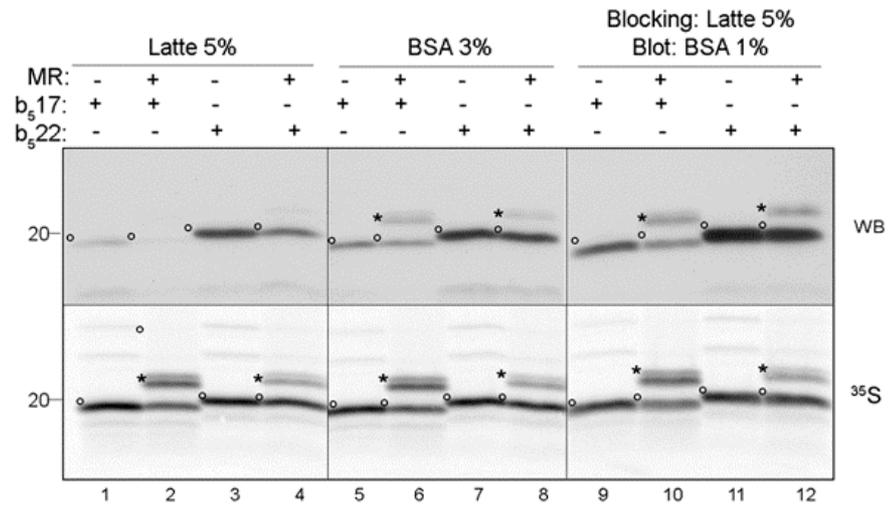


Fig. 27: Estrazione alcalina con sodio carbonato. (A) Cellule CV1 sono state semi-permeabilizzate con la concentrazione di DIG riportata in figura; alle cellule è stato quindi aggiunto tradotto radiomarcato per b₅17ops e lasciato traslocare per un'ora. Alle reazioni è stato quindi aggiunto sodio carbonato 0,1 M finale; un'aliquota è stata subito analizzata per SDS-PAGE (T, corsie 1 e 4), mentre il restante è stato ultracentrifugato e diviso in surnatante (S, corsie 2 e 5) e pellet (P, corsie 3 e 6). * indica la forma glicosilata e ○ la forma non glicosilata della proteina. (B) Grafico riportante le efficienze di integrazione della proteina b₅17ops glicosilata o no nei pellet; all'interno del grafico sono indicate le relative percentuali.

A



B

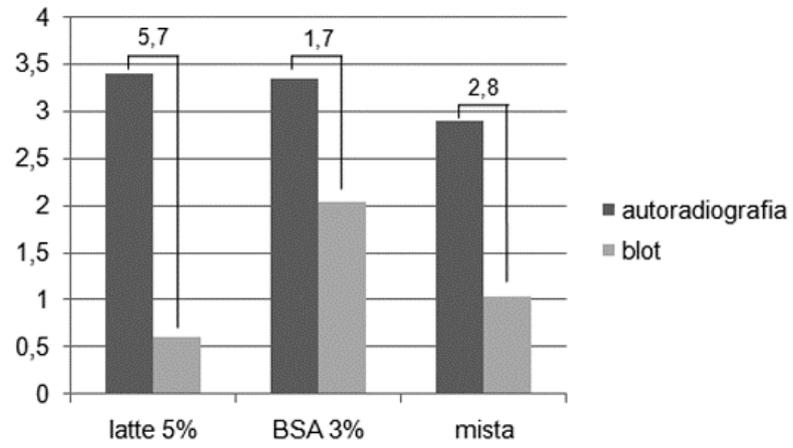


Fig. 28: Confronto tra i segnali di autoradiografia e chemiluminescenza emessa di b₅17 e b₅22 tradotti in presenza di sonda radioattiva. (A) b₅17ops e b₅22ops sono stati tradotti in presenza di ³⁵S-metionina e trasferiti su membrana PVDF. Sono stati rilevati quindi i segnali di radioattività emessi (pannello ³⁵S) prima di compiere un *western blot* anti-opsina sulle medesime membrane (pannello WB), nelle condizioni indicate; è stato quindi analizzato il segnale ottenuto per *western blot* tramite una reazione di chemiluminescenza. (B) Grafico mostrante i rapporti tra b₅17 e b₅22 glicosilati nelle diverse condizioni di blotting in confronto al rapporto ottenuto per autoradiografia. All'interno del grafico sono indicati i rapporti tra segnale di autoradiografia / segnali di chemiluminescenza ottenuti

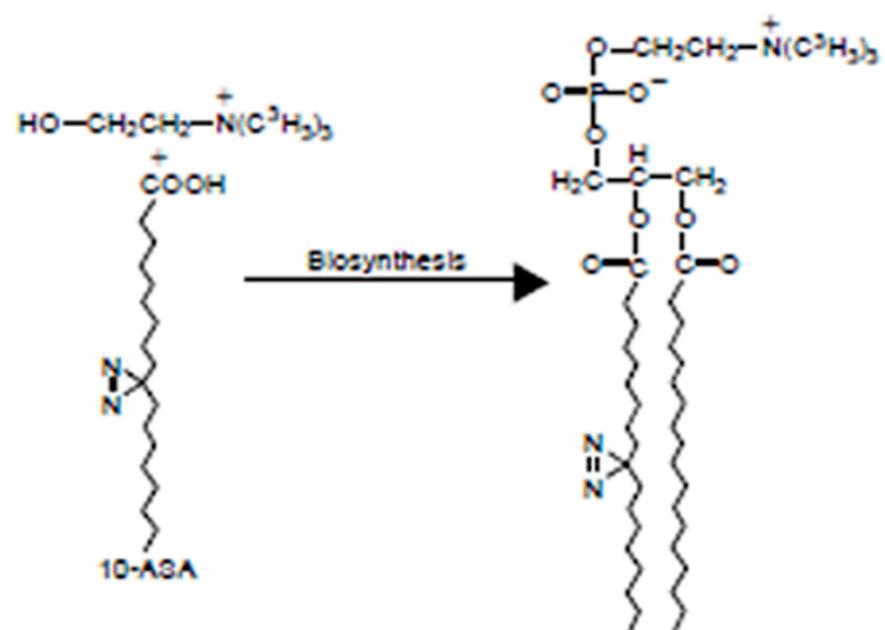


Fig. 29: Lipide fotoattivabile 3H-foto-fosfatidilcolina. Via biosintetica di 3H-foto-fosfatidilcolina da 3H-colina e acido 10-foto-azi-stearico (10-foto-ASA). La localizzazione del gruppi diazirinico alla posizione 2 dello scheletro carbonioso del glicerolo è ipotetico; è infatti anche possibile la localizzazione in posizione 1 oppure in 1 e 2 (Thiele et al., 2000).

UV: - - + - + - +
 b₅17ops: in - - + + - -
 b₅22ops: - in - - - + +

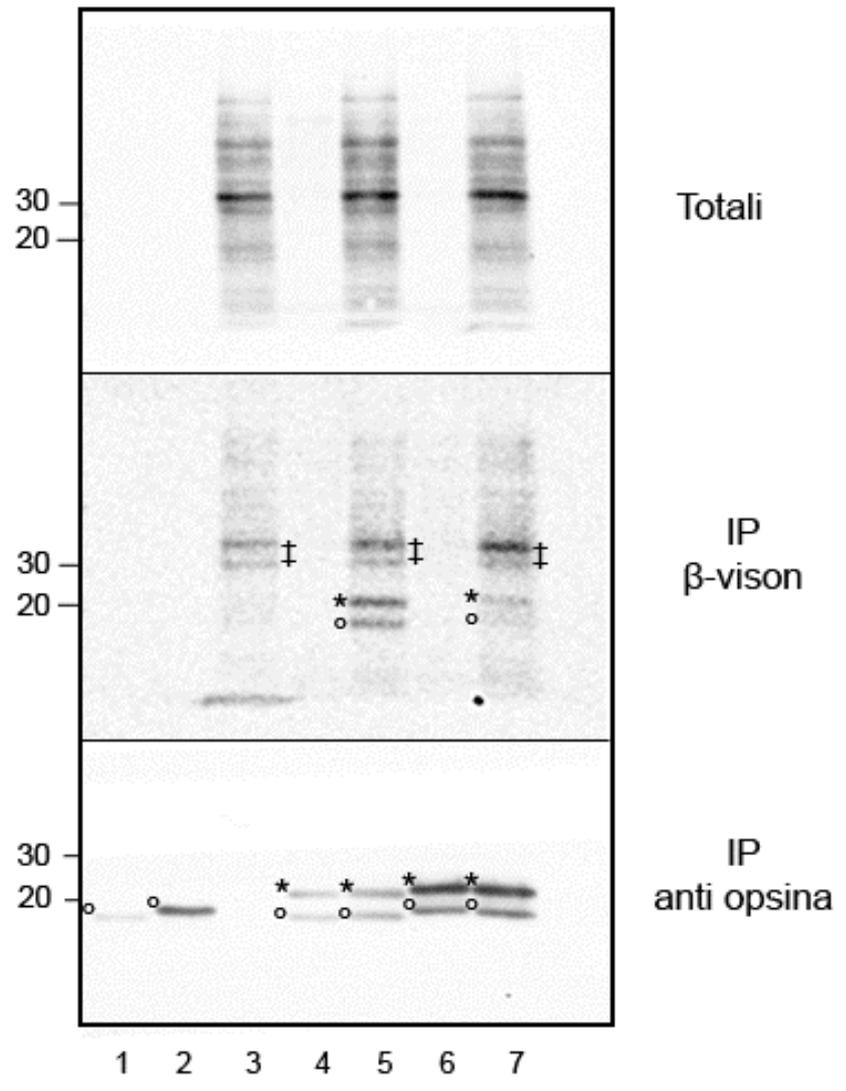


Fig. 30: Esperimento di *crosslinking* di b₅17ops e b₅22ops con la sonda ³H-fosfatidilcolina. Cellule CV1 sono state marcate con ³H-colina e 10-photo-ASA per 18 ore e quindi semi-permeabilizzate con digitonina 40 µg/mL. Alle cellule è stato quindi aggiunto tradotto contenete b517ops (corsie 4 e 5), b522ops (corsie 6 e 7) oppure, come controllo senza proteina, lisato tradotto senza alcun mRNA (corsia 3). Come ulteriore controllo, un'aliquota di tradotto per b517ops e b522ops pari a un decimo del volume di quello aggiunto in presenza di cellule è stato traslocato in assenza di cellule (corsie 1 e 2). La traslocazione nelle cellule è stata condotta per un'ora. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state centrifugate brevemente allo scopo di eliminare il tradotto in eccesso ed eventualmente esposte alla luce UV a 32°C per 14 min (corsie 3, 5 e 7); se non esposte all'UV, le cellule sono state mantenute a 32°C al buio per il tempo dell'irraggiamento. Il 2,5% del volume delle reazioni è stato quindi analizzato subito per SDS-PAGE (Totali, primo pannello in alto), al 10% del volume è stata compiuta un'estrazione organica allo scopo di controllare l'incorporazione di ³H-colina, e il restante volume è stato immunoprecipitato con anticorpi anti-opsina. Gli immunoprecipitati sono stati quindi analizzati per SDS-PAGE e trasferiti su membrana PVDF. E' stato dapprima rilevato il segnale emesso dalla ³H-colina per mezzo dell'apparecchio β-vision (IP β-vision, pannello centrale), e sulla stessa membrana è stato successivamente compiuto un *western blot* con anticorpi anti-opsina (IP anti-opsina, pannello in basso). * indica la forma glicosilata e ○ la forma non glicosilata della proteina; ‡ indica un aspecifico di immunoprecipitazione.

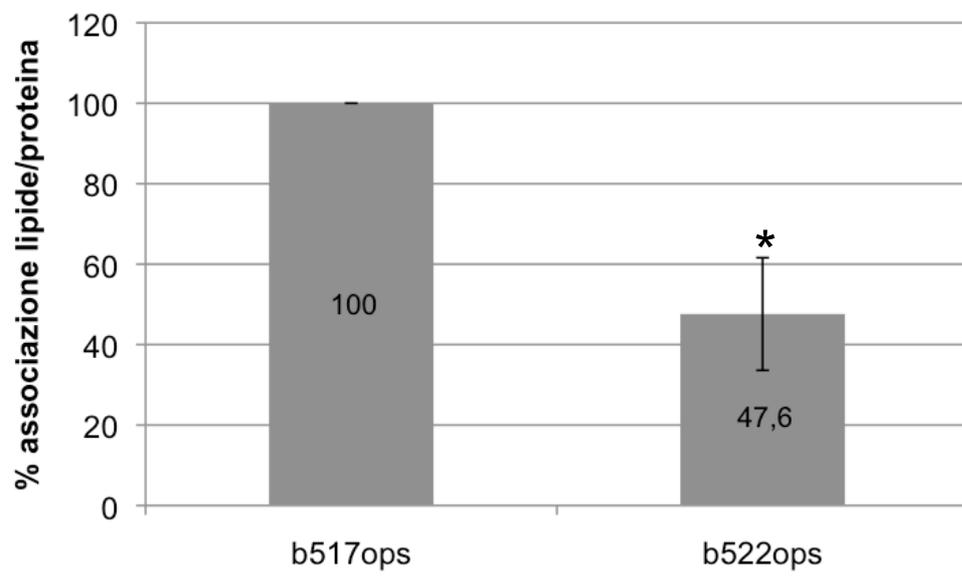


Fig. 31: Grafico rappresentante l'efficienza di associazione tra la sonda ^3H -fosfatidilcolina e b_517ops oppure b_522ops . Sono stati quantificati i segnali di ^3H -colina coincidenti alla forma glicosilata delle due proteine e i segnali di chemiluminescenza in corrispondenti. E' stato quindi calcolato il rapporto segnale di ^3H -colina/segnale di chemiluminescenza per le due proteine e i valori ottenuti riportati nel grafico. Le barre indicano \pm l'errore standard (n=3).

DISCUSSIONE

La polivalenza funzionale dell'ER si rispecchia nella sua complessità strutturale. Sono molto studiati, ma spesso non completamente compresi, svariati sottodomini dell'ER dedicati a una particolare funzione, come la degradazione delle proteine, il contatto con membrane di organelli circostanti, l'indirizzamento di proteine cargo verso stazioni successive della via di secrezione (si veda l'Introduzione di questa tesi). In questa Tesi ho compiuto indagini su due domini, finora poco studiati, dell'ER: uno, morfologicamente riconoscibile, che si crea in seguito all'espressione di una proteina patogena; l'altro, che presumibilmente consiste in un insieme di microdomini lipidici, non risolvibili con la microscopia ottica, che all'interno dell'ER hanno probabilmente importanti funzioni nella fisiologia del trasporto lungo la via di secrezione. Discuterò in successione queste due parti del mio lavoro di tesi.

DOMINI DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO IN PATOLOGIA: CARATTERIZZAZIONE DELLE INCLUSIONI GENERATE DA P56S-VAPB

La forma mutata della proteina VAPB, P56S-VAPB, è associata all'insorgenza di una forma particolare di ALS familiare, l'ALS8. Studi precedenti hanno riportato come la overespressione di VAPB mutata in cellule anche di origine non motoneuronale causi la formazione di inclusioni intracellulari (Kanekura et al., 2006; Nishimura et al., 2004; Teuling et al., 2007); tali inclusioni sono in grado di sequestrare VAPB *wild-type* endogeno e, in minor grado, VAPA (Teuling et al., 2007); quest'ultima osservazione potrebbe spiegare la modalità dominante della trasmissione del gene mutato. Tuttavia, al momento in cui ho iniziato questo studio, non era chiaro se le inclusioni di VAPB fossero simili a quelle di altre proteine neurotossiche. Infatti, tali inclusioni erano state interpretate in modo diverso da diversi autori: come aggregati citosolici senza alcun rapporto con i compartimenti della via di secrezione (Kanekura et al., 2006; Nishimura et al., 2004; Teuling et al., 2007), come *cluster* di tubuli (Teuling et al., 2007), o come un sottodominio dell'ER (Prosser et al., 2008). Per aumentare la nostra comprensione dei meccanismi patogenici di P56S-VAPB, ho caratterizzato la natura e l'origine delle inclusioni che esso genera.

La mutazione P56S non influenza l'abilità di VAPB nell'inserimento nella membrana dell'ER

VAPB è una proteina transmembrana dell'ER appartenente alla classe delle proteine tail-anchored, e caratterizzata quindi dal fatto di inserirsi nella membrana solo dopo essere completamente tradotta nel citoplasma. Abbiamo perciò considerato la possibilità che la proteina mutata neosintetizzata aggregasse nel citosol e non avesse quindi la possibilità di inserirsi nella membrana bersaglio. Esistono almeno due vie di inserimento delle proteine tail-anchored nell'ER: una prima via, tipica di proteine con TMD moderatamente idrofobici, chiamata non assistita, in quanto non è richiesta alcuna proteina dell'ER nell'inserimento, ed al contrario una via assistita, tipica di proteine con TMD maggiormente idrofobici, dove è necessario almeno un componente della membrana dell'ER per l'inserimento (Borgese et al., 2009). Gli esperimenti riportati in questa tesi dimostrano che sia la proteina *wild-type* che quella mutata si inseriscono nell'ER seguendo la via assistita, come poteva essere predetto dal livello di idrofobicità del loro TMD (Brambillasca et al., 2006). Meno attesa è stata la bassa efficienza di integrazione nell'ER di ambedue le forme di VAPB in confronto alle due proteine di riferimento utilizzate in questo studio (*b₅17* e *b₅17-TM_{syb}*). I miei risultati dimostrano che tale inefficienza è probabilmente riconducibile alle caratteristiche del TMD della proteina: la semplice sostituzione del TMD di VAPB con quello della proteina *b₅17* infatti incrementa considerevolmente l'efficienza di inserzione. Al momento, non sappiamo quale caratteristica del TMD di VAPB determina la sua bassa efficienza di inserzione: la mutagenizzazione delle sue due sequenze di dimerizzazione non ha avuto effetto e quindi la causa è da ricercare in qualche altra caratteristica del TMD. Inoltre non sappiamo se la bassa efficienza di inserzione osservata in vitro rifletta anche una cinetica lenta in vivo. Comunque, in cellule transfettate allo *steady state*, VAPB *wild-type* ha una distribuzione indistinguibile da quella di altre proteine dell'ER, e si localizza all'ER a tempi brevi dopo la microiniezione del cDNA che lo codifica. Anche esperimenti con una variante di VAPB con presente un sito di N-glicosilazione al C-terminale hanno confermato che sia la forma *wild-type* che quella P56S vengono correttamente glicosilate e quindi inserite nell'ER.

La conclusione importante derivante da questi esperimenti di inserimento in vitro è che la mutazione P56S non ha nessun effetto sull'abilità della proteina VAPB di inserirsi nella membrana dell'ER. Questo risultato è in accordo con la conclusione che le inclusioni di P56S-VAPB sono da interpretare come sottodomini dell'ER, come verrà discusso qui di seguito.

Natura delle inclusioni intracellulari create da VAPB mutato

Avendo dimostrato che P56S-VAPB si inserisce normalmente nell'ER, ci aspettavamo di vederlo distribuito omogeneamente nella membrana di questo organello a tempi brevi dopo la sua espressione in vivo. Invece, esperimenti di microiniezione hanno dimostrato che dal momento in cui la proteina diventa rilevabile, essa è già in piccoli *cluster*, che poi si organizzano in grosse inclusioni perinucleari. Tramite analisi di microscopia confocale è stata anche osservata una eterogeneità di colocalizzazione degli aggregati con diversi marcatori dell'ER, che può spiegare le differenti conclusioni cui sono giunti autori diversi riguardo la relazione delle inclusioni con l'ER. L'appartenenza delle inclusioni al reticolo è stata poi confermata mediante analisi FRAP e FLIP. Questi esperimenti in vivo escludono l'ipotesi che le inclusioni possano originarsi in un primo momento dall'ER, per poi distaccarsene in un secondo momento.

Per caratterizzare ulteriormente le inclusioni, abbiamo eseguito analisi ultrastrutturali. Queste hanno dimostrato che i domini di P56S-VAPB formano una struttura descrivibile come nuovo tipo di OSER (Snapp et al., 2003), costituito da coppie di cisterne dalla superficie liscia, intervallate da uno strato elettrondenso di citosol di circa 30 nm. Non è ancora noto se tale addensamento sia semplicemente dovuto alla associazione in trans di proteine VAPB presenti sulle facce citoplasmatiche delle cisterne accoppiate, oppure se siano presenti altre proteine che interagiscono fisiologicamente con VAP per mezzo del dominio FFAT, quali CERT o OSBP.

Gli OSER indotti dall'espressione di P56S-VAPB si differenziano dagli OSER precedentemente osservati (Borgese et al., 2006) per una serie di caratteristiche peculiari. Prima di tutto, gli altri OSER sono costituiti da multi-strati di cisterne impilate, membrane cubiche o strutture esagonali, mentre gli OSER di P56S-VAPB sono formati da un numero limitato di elementi; perciò questi OSER contengono una cospicua frazione di membrana libera (cioè non accoppiata a una cisterna parallela); è quindi possibile che la diffusione di GFP-b5tail osservata per FRAP e FLIP fosse limitata alla faccia libera di queste strutture. In secondo luogo, gli OSER classici originano generalmente dalla membrana nucleare, mentre non ci sono dati consistenti di relazione tra gli OSER di P56S-VAPB e il nucleo; al contrario, gli esperimenti di microiniezione (Fig. 22) mostrano come tali inclusioni originino dalla fusione a livello perinucleari di *cluster* originati nella periferia cellulare. Infine, la proteina inducente gli OSER classici è libera di diffondere dagli OSER all'ER circostante, mentre nelle sue inclusioni P56S-VAPB non solo è immobile (Teuling et al., 2007), ma risulta concentrato unicamente nella struttura che genera.

La maggiore parte delle differenze sopra citate tra gli OSER classici e quelli indotti da P56S-VAPB possono essere ascritte alla natura delle interazioni intermolecolari delle proteine inducenti gli OSER: gli OSER classici sono creati da interazioni proteina-proteina deboli e transienti in trans tra i domini citosolici delle proteine inducenti, che rimangono solubili in detergente; invece, P56S-VAPB forma aggregati forti e insolubili in detergenti ((Kanekura et al., 2006; Teuling et al., 2007); risultato confermato da me e non mostrato nella tesi), tramite interazioni omofile tra le porzioni citosoliche della proteina mutata. Queste forti interazioni potrebbero causare il sequestro irreversibile della totalità della proteina mutata nelle inclusioni, con conseguenza di legare tra di loro, con un meccanismo a cerniera, cisterne di ER adiacenti. Sarà interessante verificare se altre proteine dell'ER che tendono ad aggregare con le stesse modalità di P56S-VAPB inducono la formazione di OSER simili.

Relazione tra le strutture formate da P56S-VAPB con altre inclusioni formate da proteine tossiche

La presenza di inclusioni intracellulari è la caratteristica peculiare di molte patologie neurodegenerative causate da proteine prone all'aggregazione (Taylor et al., 2002). Questi aggregati sono localizzati generalmente nel citoplasma, ma possono essere formati nel nucleo così come nel lume dell'ER, dove prendono il nome di corpi di Russel (Kopito and Sitia, 2000). Per quanto ne siamo a conoscenza, le strutture generate da VAPB mutata descritte in questa Tesi rappresentano il primo esempio di corpi d'inclusione che coinvolgono la faccia citosolica dell'ER, con un conseguente rimodellamento dell'intero organello.

Dato la dualistica natura citosol/ER delle inclusioni di P56S-VAPB, non è escluso che esse possano interferire con la fisiologia di entrambi i compartimenti intracellulari. Tuttavia, come tali strutture possano essere riconducibili ad altre inclusioni descritte in altre malattie neurodegenerative e come esse possano inficiare le funzionalità dell'ER non è ancora noto.

Le inclusioni citosoliche sono generalmente arricchite in proteine ubiquitinate. Nel caso di quelle formate da P56S-VAPB, tuttavia, studi di immunofluorescenza escludono alcun arricchimento di ubiquitina (Teuling et al., 2007), ma studi di biochimica hanno mostrato un'aumentata poli-ubiquitinazione della proteina mutata in confronto alla *wild-type* (Kanekura et al., 2006). Allo stesso modo, risultati contrastanti sono stati pubblicati in merito alla ipotesi che le inclusioni di VAPB mutato possano compromettere il trasporto proteico dall'ER (Teuling et al., 2007) (Prosser et al., 2008).

Studi futuri atti all'investigazione degli effetti di questi nuovi OSER sulla funzionalità motoneuronali saranno utili per chiarire il ruolo di P56S-VAPB nella patogenesi di questa grave malattia.

DOMINI DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO IN FISIOLOGIA: MICRODOMINI LIPIDICI COINVOLTI NEL *SORTING* DI PROTEINE TRANSMEMBRANA DELL'ER

Gli studi condotti precedentemente nel mio laboratorio hanno dimostrato un fenomeno di *sorting* all'interno dell'ER indipendente dalle classiche sequenze di *sorting* che normalmente mediano il trasporto grazie a interazioni con specifici recettori. Il *sorting* studiato nel mio laboratorio dipende invece solamente da caratteristiche chimico-fisiche del TMD delle proteine in studio e suggerisce che semplici principi di auto-organizzazione contribuiscano allo smistamento di proteine lungo la via di secrezione (Pedrazzini et al., 1996) (Bulbarelli et al., 2002) (Ronchi et al., 2008).

Il mio lavoro parte dalle osservazioni di Ronchi et al. sul comportamento di una variante della proteina integrale di membrana dell'ER b₅17, b₅22. A causa del suo TMD esteso di 5 aminoacidi rispetto alla forma *wild-type*, questa proteina è esportata dall'ER alla membrana plasmatica. Ronchi et al. hanno osservato che immediatamente dopo l'inserimento nell'ER, la proteina segrega nei tubuli e negli ERES rimanendo esclusa, al contrario, dalle cisterne.

Considerazioni sulla lunghezza di un' α -elica di 17 o di 22 residui, e sullo spessore della membrana dell'ER hanno portato alla conclusione che la lunghezza del TMD di b₅22 eccede lo spessore del doppio strato dell'ER, mentre quello del b₅ *wild-type* (TMD di 17 aminoacidi) avrebbe una lunghezza corrispondente alla membrana ER. Questa corrispondenza permetterebbe alla proteina di distribuirsi omogeneamente nella membrana e di rimanervi residente. Invece il b₅22, a causa del *mismatch* creato, si distribuirebbe in maniera non omogenea all'interno dell'ER, per essere poi trasportata in membrane con spessori più compatibili, quali quelle del trans-Golgi e della membrana plasmatica (Ronchi et al., 2008) (vedi schema Fig. 32A).

Ma come potrebbe il “*mismatch*” idrofobico spiegare la segregazione di b₅22 nei tubuli e negli ERES? Nonostante tale *mismatch*, è dimostrato che la proteina b₅22 si inserisce di fatto nella membrana dell’ER (Pedrazzini et al., 1996) (Bulbarelli et al., 2002) (Ronchi et al., 2008), a testimonianza che la membrana di quest’ultimo è in grado di adattarsi per accogliere il TMD allungato; sono state avanzate quindi due ipotesi che potessero spiegare tale accomodamento. Nella prima è stato ipotizzato che le code dei lipidi costituenti la membrana subiscano un effetto di *stretching* allo scopo di aumentare di fatto lo spessore del doppio strato (Fig. 32B, immagine a sinistra); altra ipotesi è che la proteina b₅22 stessa si inclini fino a trovare l’angolazione adatta per inserire tutto il suo TMD nella membrana (Fig. 32B, immagine a destra). Tali ipotesi hanno però il punto a sfavore di essere energeticamente sfavorevoli, e sarebbero le uniche due valide se si prendesse in esame una membrana modello, costituita quindi unicamente da una miscela omogenea di un solo lipide. Dato che, invece, la membrana dell’ER è costituita da più tipi diversi di lipidi, e che inoltre in essa sono inserite anche proteine integrali, è logico pensare che un transmembrana “*mismatched*” si ripartisca in zone dove il *mismatch* è minore (vedi Fig. 33). Per esempio, b₅22 potrebbe associarsi preferenzialmente a lipidi dalla struttura più rigida, quali il ceramide o il colesterolo, capaci quindi di creare un microdominio che porta ad un aumento localizzato dello spessore della membrana dell’ER; in questo particolare microambiente, quindi, b₅22 sarebbe in grado di accomodare completamente il proprio TMD (Fig. 33A). Secondo un’altra ipotesi, b₅22 si inserirebbe preferenzialmente in zone dell’ER particolarmente curve, quali i tubuli, la cui curvatura è generata sia da proteine a cuneo (quali reticoloni e Dpn1), sia da lipidi a forma conica (Shibata et al., 2009; Voeltz et al., 2002); in questo caso l’effetto di inclinazione della proteina descritto in Fig. 32B sarebbe minimizzato, con conseguente diminuzione di dispendio energetico.

Studi precedenti nel nostro laboratorio avevano dimostrato come la proteina b₅22, se inserita all’interno di vescicole artificiali miste costituite da palmotoil-oleil-fosfatidilcolina (POPC) e da un lipide con struttura più rigida, segregasse preferenzialmente nei domini creati da quest’ultimi, al contrario di quanto accade per la proteina b₅17 wild-type (Ceppi et al., 2005). In questo studio, tuttavia, gli esperimenti erano stati compiuti in un sistema modello. Nel lavoro della mia tesi ho voluto estendere l’indagine di Ceppi et al. a una situazione più fisiologica, indagando l’ambiente lipidico delle due proteine b₅17 e b₅22 all’interno dell’ER. A questo scopo, ho messo a punto l’approccio sperimentale descritto in Fig. 24. Tramite questo tipo di esperimento, infatti, le due proteine b₅17 e b₅22 vengono inserite direttamente nell’ER di cellule permeabilizzate; in questo caso, quindi, la membrana è rappresentata da tutte le specie lipidiche presenti nell’ER nel giusto rapporto molare;

tramite il processo di permeabilizzazione, inoltre, tutto il citosol esce dalla cellula (dimostrato tramite il saggio enzimatico dell'LDH, risultato non mostrato), e con esso tutte le componenti COPII per l'esporto di b₅22: ci troviamo quindi nella condizione ideale di poter analizzare le due proteine quando ancora entrambe presenti nel vero ER cellulare.

Una volta messo a punto l'approccio sperimentale, ci siamo chiesti prima di tutto quale rapporto intercorresse tra le due proteine b₅17 e b₅22 e la fosfatidilcolina, lipide maggioritario nella membrana dell'ER ((van Meer et al., 2008)). Molto sorprendentemente, ho trovato che la proteina b₅22 si associa con tale lipide con il 50% di efficienza rispetto a b₅17. Non ci aspettavamo questo risultato in quanto si ritiene che la PtdCho sia distribuita omogeneamente in tutto il l'ER. Il mio risultati suggerisce invece che il b₅-22 si concentri in microdomini impoveriti in PtdCho e quindi arricchiti in qualche altro lipide. Ceppi et al. hanno dimostrato una preferenza di b₅22 per domini arricchiti in ceramide e fosfatidilserina; perciò è nostra intenzione indagare l'interazione di b₅22 con questi due lipidi nel sistema di cellule semi-permeabilizzate.

Un'altra spiegazione per la ridotta accessibilità di b₅22 alla PtdCho è che più proteine b₅22 si oligomerizzano tra loro, diminuendo di fatto il numero di proteine a disposizione al legame con la PtdCho; il tipo di approccio sperimentale scelto non può direttamente escludere questa ipotesi. Tuttavia, se futuri esperimenti dimostreranno una preferenziale associazione di b₅22 con altre sonde lipidiche rispetto a b₅17, l'eventualità dell'oligomerizzazione potrà essere esclusa. E' anche da ricordare che esperimenti di FRAP compiuti su b₅17 e b₅22 non hanno dimostrato alcuna differenza nella loro mobilità nella membrana, a suggerire che le due proteine sono presenti come singola entità oppure in oligomeri di dimensione equivalente (Ronchi et al., 2008). In accordo con questi dati, anche l'analisi mediante centrifugazione su gradiente di saccarosio ha mostrato che le due proteine si comportano come monomeri (Ronchi et al., 2008). Perciò ritengo più probabile che la minore accessibilità di b₅22 alla PtdCho sia dovuta a una sua ripartizione in microdomini lipidici arricchiti in qualche altro lipide. Non sappiamo ovviamente se questi microdomini pre-esistono, oppure se si organizzano attorno al TMD "*mismatched*".

Considerando l'osservazione di Ronchi et al. riguardo la preferenziale distribuzione di b₅22 nei tubuli dell'ER e negli ERES, il mio risultato potrebbe suggerire che lipidi diversi dalla PtdCho, a cui b₅22 potrebbe associarsi preferenzialmente, siano maggiormente rappresentati in queste zone caratterizzate da alta curvatura. Per gli ERES, questa non è un'ipotesi da escludere: infatti, per le proteine ad ancora GPI è stata dimostrata un'associazione preferenziale a lipidi rigidi come il ceramide, e questa associazione è

necessaria per il loro accumulo all'ERES e quindi per loro trasporto lungo la via di secrezione (Muniz et al., 2001). Inoltre, vi sono evidenze che le vescicole COPII che gemmano dagli ERES sono arricchite in fosfatidilserina (Sturbois-Balcerzak et al., 1999) e fosfatidilinositolo-4-fosfato (Blumental-Perry et al., 2006). Per quanto riguarda i tubuli dell'ER, la situazione è meno chiara. Si ritiene che tubuli e cisterne rappresentino rispettivamente porzioni lisce e rugose dell'ER ((Shibata et al., 2006); tuttavia non vi sono studi recenti di caratterizzazione della composizione lipidica di questi due domini dell'ER e studi precedenti non hanno rilevato differenze grossolane nella composizione lipidica di frazioni di microsomi rugosi e lisci (Colbeau et al., 1971).

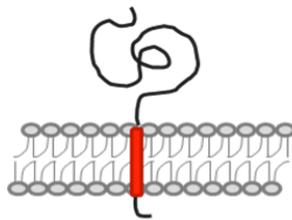
Per conciliare le osservazioni morfologiche di Ronchi et al. con le mie osservazioni biochimiche è anche possibile un'altra spiegazione: è verosimile che ambedue i fattori, curvatura e microdomini lipidici determinino la distribuzione di b5-22 all'interno dell'ER. b522 potrebbe avere una preferenza per zone dotate di curvatura e all'interno di queste ripartirsi in microdomini impoveriti di PtdCho. Quale sia la natura di questi domini e come la curvatura influenzi la ripartizione di un TMD "*mismatched*" sono argomenti che spero di affrontare in un prossimo futuro.

CONCLUSIONI

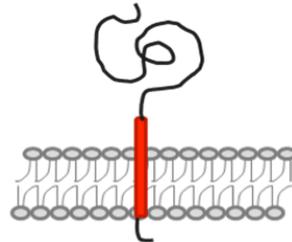
In conclusione, il mio lavoro di tesi illustra come l'ER sia capace di cambiare la propria organizzazione in risposta a condizioni mutate, come l'espressione di una proteina incline all'aggregazione (P56S-VAPB), e come gestisca la presenza di proteine di membrana con TM di lunghezza non adatta alla maggior parte del "bilayer" lipidico che costituisce la sua membrana. Lavori futuri saranno dedicati ad una maggior caratterizzazione di questi due subdomini dell'ER, allo scopo di dare luce al meccanismo eziopatologico di P56S-VAPB da un lato e sulla funzione del *partitioning* lipidico dell'ER dall'altro, e di meglio comprendere la loro importanza rispettivamente nella patologia dell'ALS e nella fisiologia cellulare.

A

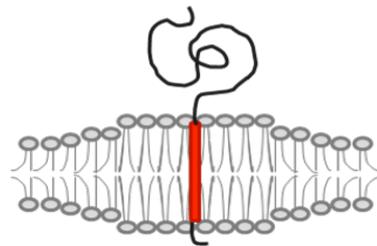
b₅17: nessun *mismatch*



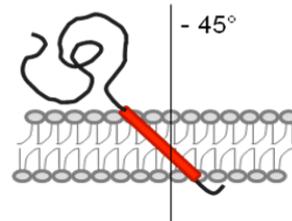
b₅22: *mismatch*



B



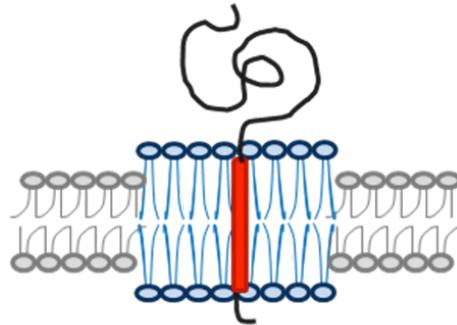
stretching delle code lipidiche



tilting della proteina

Fig. 32: Illustrazione del concetto di *mismatch* idrofobico. (A) Se il TM di b₅17 è compatibile con lo spessore di un dato doppio strato, quello di b₅22 avrà una lunghezza non corrispondente. (B) Il *mismatch* di b₅22 potrebbe essere risolto mediante stiramento (*stretching*) delle code dei lipidi, aumentando di fatto lo spessore della membrana (a sinistra), o mediante inclinazione della proteina (*tilting*) per accomodare al meglio il suo TMD (a destra), oppure ancora mediante oligomerizzazione della proteina per diminuire i punti di contatto con il bilayer lipidico (non mostrato in figura). Si veda Killian et al. per una discussione di questi fenomeni (Killian, 1998).

A



B

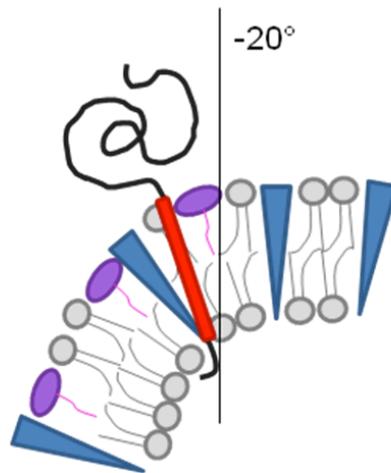


Fig. 33: Rappresentazione schematica di due ipotesi che spiegano la segregazione di b_522 in sottodomini dell'ER. (A) Dato che l'ER è costituito da diversi tipi di lipidi, b_522 potrebbe associarsi preferibilmente a lipidi con struttura più rigida (mostrati in blu) che sono in grado di creare un inspessimento localizzato del doppio strato. (B) b_522 si distribuirebbe preferenzialmente in zone dell'ER a più alta curvatura, quali i tubuli; tale curvatura può essere generata dalla presenza di lipidi a forma conica (mostrati in viola) o da proteine integrali a forma di cuneo (mostrati in blu)

Ringrazio Nica e tutto il laboratorio.

Ringrazio la Dott.ssa Maura Francolini e il Dott. Matteo Fossati per l'analisi di microscopia elettronica degli OSER di P56S-VAPB.

Ringrazio il Prof. Felix Wieland e la Dott.ssa Britta Brügger per averci fornito la sonda lipidica radiomarcata ^3H -foto-10-ASA, e il Prof. Massimo Masserini e la Dott.ssa Emanuela Cazzaniga per il contributo nell'analisi autoradiografica delle sonde lipidiche; un ulteriore ringraziamento a loro anche per le discussioni molto utili sui risultati che ho per adesso ottenuto.

BIBLIOGRAFIA

- Adamus, G., A. Arendt, and P.A. Hargrave. 1991. Genetic control of antibody response to bovin rhodopsin in mice: epitope mapping of rhodopsin structure. *J. Neuroimmunol.* 34:89-97.
- Aebi, M., R. Bernasconi, S. Clerc, and M. Molinari. 2010. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci.* 35:74-82.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2008. *Molecular Biology of the Cell*, Fifth Edition. Garland Science, New York.
- Allan, V.J., and R.D. Vale. 1991. Cell cycle control of microtubule-based membrane transport and tubule formation in vitro. *J Cell Biol.* 113:347-59.
- Amarilio, R., S. Ramachandran, H. Sabanay, and S. Lev. 2005. Differential regulation of endoplasmic reticulum structure through VAP-Nir protein interaction. *J. Biol. Chem.* 280:5934-5944.
- Anderson, D.J., and M.W. Hetzer. 2008. kusu. *J Cell Biol.* 182:911-24.
- Anderson, H.A., Y. Chen, and L.C. Norkin. 1996. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell.* 7:1825-34.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc.
- Bannykh, S.I., T. Rowe, and W.E. Balch. 1996. The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J Cell Biol.* 135:19-35.
- Barlowe, C. 2003. Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol.* 13:295-300.
- Baumann, O., and B. Walz. 2001. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol.* 205:149-214.
- Benyamini, P., P. Webster, and D.I. Meyer. 2009. Knockdown of p180 eliminates the terminal differentiation of a secretory cell line. *Mol Biol Cell.* 20:732-44.
- Bevis, B.J., A.T. Hammond, C.A. Reinke, and B.S. Glick. 2002. De novo formation of transitional ER sites and Golgi structures in *Pichia pastoris*. *Nat Cell Biol.* 4:750-6.
- Bola, B., and V. Allan. 2009. How and why does the endoplasmic reticulum move? *Biochem Soc Trans.* 37:961-5.
- Bonifacino, J.S., and B.S. Glick. 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell.* 116:153-66.

- Bootman, M.D., O.H. Petersen, and A. Verkhratsky. 2002. The endoplasmic reticulum is a focal point for co-ordination of cellular activity. *Cell Calcium*. 32:231-4.
- Borgese, N., S. Brambillasca, and S. Colombo. 2007. How tails guide tail-anchored proteins to their destinations. *Curr Opin Cell Biol*. 19:368-75.
- Borgese, N., S. Brambillasca, M. Righi, and S. Colombo. 2009. Membrane insertion of tail-anchored proteins. *in Protein Transport into the Endoplasmic Reticulum*. Zimmermann R, editor:pp. 91-101.
- Borgese, N., S. Brambillasca, P. Soffientini, M. Yabal, and M. Makarow. 2003a. Biogenesis of tail-anchored proteins. *Biochem. Soc. Trans*. 31:1238-1242.
- Borgese, N., S. Colombo, and E. Pedrazzini. 2003b. The tale of tail-anchored proteins: coming from the cytosol and looking for a membrane. *J. Cell Biol*. 161:1013-1019.
- Borgese, N., M. Francolini, and E. Snapp. 2006. Endoplasmic reticulum architecture: structures in flux. *Curr Opin Cell Biol*. 18:358-64.
- Brambillasca, S., M. Yabal, M. Makarow, and N. Borgese. 2006. Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers. *J Cell Biol*. 175:767-77.
- Brambillasca, S., M. Yabal, P. Soffientini, S. Stefanovic, M. Makarow, R.S. Hegde, and N. Borgese. 2005. Transmembrane topogenesis of a tail-anchored protein is modulated by membrane lipid composition. *Embo J*. 24:2533-42.
- Bretscher, M.S., and S. Munro. 1993. Cholesterol and the Golgi Apparatus. *Science*. 261:1280-1281.
- Browman, D.T., M.E. Resek, L.D. Zajchowski, and S.M. Robbins. 2006. Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipid-raft-like domains of the ER. *J Cell Sci*. 119:3149-60.
- Brown, D. 1994. GPI-anchored proteins and detergent-resistant membrane domains. *Braz J Med Biol Res*. 27:309-15.
- Brown, D.A. 2006. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)*. 21:430-9.
- Brown, D.A., and J.K. Rose. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*. 68:533-544.
- Bulbarelli, A., T. Sprocati, M. Barberi, E. Pedrazzini, and N. Borgese. 2002. Trafficking of Tail-anchored Proteins: Transport from the Endoplasmic Reticulum to the Plasma Membrane and Sorting between Surface Domains in Polarised Epithelial Cells. *J. Cell Sci*. 115:1689-1702.
- Bulbarelli, A., A. Valentini, M. De Silvestris, M.D. Cappellini, and N. Borgese. 1998. An erythroid-specific transcript generates the soluble form of NADH-cytochrome b5 reductase in humans. *BLOOD*. 92:310-319.

- Campelo, F., H.T. McMahon, and M.M. Kozlov. 2008. The hydrophobic insertion mechanism of membrane curvature generation by proteins. *Biophys J.* 95:2325-39.
- Castro, B.M., L.C. Silva, A. Fedorov, R.F. de Almeida, and M. Prieto. 2009. Cholesterol-rich fluid membranes solubilize ceramide domains: implications for the structure and dynamics of mammalian intracellular and plasma membranes. *J Biol Chem.* 284:22978-87.
- Ceppi, P., S. Colombo, M. Francolini, F. Raimondo, N. Borgese, and M. Masserini. 2005. Two tail-anchored protein variants, differing in transmembrane domain length and intracellular sorting, interact differently with lipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:16269-74.
- Chen, H.J., G. Anagnostou, A. Chai, J. Withers, A. Morris, J. Adhikaree, G. Pennetta, and J.S. de Belleruche. 2010. Characterisation of the properties of a novel mutation in VAPB in familial ALS. *J Biol Chem.*
- Chuck, S.L., and V.R. Lingappa. 1992. Pause transfer: a topogenic sequence in apolipoprotein B mediates stopping and restarting of translocation. *Cell.* 68:9-21.
- Colombo, S.F., R. Longhi, and N. Borgese. 2009. The role of cytosolic proteins in the insertion of tail-anchored proteins into phospholipid bilayers. *J Cell Sci.* 122:2383-92.
- Csordas, G., C. Renken, P. Varnai, L. Walter, D. Weaver, K.F. Buttler, T. Balla, C.A. Mannella, and G. Hajnoczky. 2006. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol.* 174:915-21.
- Cui, Z., J.E. Vance, M.H. Chen, D.R. Voelker, and D.E. Vance. 1993. Cloning and expression of a novel phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. A specific biochemical and cytological marker for a unique membrane fraction in rat liver. *J Biol Chem.* 268:16655-63.
- Dancourt, J., and C. Barlowe. 2010. Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu Rev Biochem.* 79:777-802.
- D'Angelo, G., M. Vicinanza, and M.A. De Matteis. 2008. Lipid-transfer proteins in biosynthetic pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 20:360-70.
- Daum, G., and J.E. Vance. 1997. Import of lipids into mitochondria. *Prog Lipid Res.* 36:103-30.
- de Almeida, R.F., A. Fedorov, and M. Prieto. 2003. Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys J.* 85:2406-16.
- de Brito, O.M., and L. Scorrano. 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature.* 456:605-10.

- de Brito, O.M., and L. Scorrano. 2010. An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *Embo J.* 29:2715-23.
- Dickson, K.M., J.J.M. Bergeron, I. Shames, J. Colby, D.T. Nguyen, E. Chevet, D.Y. Thomas, and G.J. Snipes. 2002. Association of calnexin with mutant peripheral myelin protein-22 ex vivo: a basis for "gain-of-function" ER diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:9852-9857.
- Douglass, A.D., and R.D. Vale. 2005. Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell.* 121:937-50.
- Dreger, C.K., A.R. Konig, H. Spring, P. Lichter, and H. Herrmann. 2002. Investigation of nuclear architecture with a domain-presenting expression system. *J Struct Biol.* 140:100-15.
- Dreier, L., and T.A. Rapoport. 2000. In vitro formation of the endoplasmic reticulum occurs independently of microtubules by a controlled fusion reaction. *J Cell Biol.* 148:883-98.
- Edidin, M. 2003. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 32:257-83.
- Eggeling, C., C. Ringemann, R. Medda, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, S. Polyakova, V.N. Belov, B. Hein, C. von Middendorff, A. Schonle, and S.W. Hell. 2009. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature.* 457:1159-62.
- Ellgaard, L., and A. Helenius. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:181-91.
- Favaloro, V., M. Spasic, B. Schwappach, and B. Dobberstein. 2008. Distinct targeting pathways for the membrane insertion of tail-anchored (TA) proteins. *J Cell Sci.* 121:1832-40.
- Fromme, J.C., and R. Schekman. 2005. COPII-coated vesicles: flexible enough for large cargo? *Curr Opin Cell Biol.* 17:345-52.
- Frost, A., R. Perera, A. Roux, K. Spasov, O. Destaing, E.H. Egelman, P. De Camilli, and V.M. Unger. 2008. Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains. *Cell.* 132:807-17.
- Gilmore, R., and G. Blobel. 1985. Translocation of secretory proteins across the microsomal membrane occurs through an environment accessible to aqueous perturbants. *Cell.* 42:497-505.
- Giorgi, C., D. De Stefani, A. Bononi, R. Rizzuto, and P. Pinton. 2009. Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol.* 41:1817-27.

- Gomez, J., F. Sagues, and R. Reigada. 2010. Effect of integral proteins in the phase stability of a lipid bilayer: application to raft formation in cell membranes. *J Chem Phys.* 132:135104.
- Haberkant, P., O. Schmitt, F.X. Contreras, C. Thiele, K. Hanada, H. Sprong, C. Reinhard, F.T. Wieland, and B. Brugger. 2008. Protein-sphingolipid interactions within cellular membranes. *J Lipid Res.* 49:251-62.
- Hammond, A.T., and B.S. Glick. 2000. Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells. *Mol Biol Cell.* 11:3013-30.
- Hammond, C., and A. Helenius. 1995. Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 7:523-9.
- Hanada, K., K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, M. Kawano, M. Fukasawa, and M. Nishijima. 2003. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature.* 426:803-809.
- Hao, M., S. Mukherjee, and F.R. Maxfield. 2001. Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:13072-7.
- Holmer, L., and H.J. Worman. 2001. Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting. *Cell Mol Life Sci.* 58:1741-7.
- Holthuis, J.C., and T.P. Levine. 2005. Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:209-20.
- Honsho, M., J.-y. Mitoma, and A. Ito. 1998. Retention of cytochrome b(5) in the Endoplasmic Reticulum is transmembrane and luminal domain-dependent. *J. Biol. Chem.* 273:20860-20866.
- Hoseki, J., R. Ushioda, and K. Nagata. Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biochem.* 147:19-25.
- Hu, J., Y. Shibata, C. Voss, T. Shemesh, Z. Li, M. Coughlin, M.M. Kozlov, T.A. Rapoport, and W.A. Prinz. 2008. Membrane proteins of the endoplasmic reticulum induce high-curvature tubules. *Science.* 319:1247-50.
- Huang, J., and G.W. Feigenson. 1999. A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys J.* 76:2142-57.
- Ikonen, E. 2001. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol.* 13:470-7.
- Kagiwada, S., K. Hosaka, M. Murata, J. Nikawa, and A. Takatsuki. 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* SCS2 gene product, a homolog of a synaptobrevin-associated protein, is an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum and is required for inositol metabolism. *J Bacteriol.* 180:1700-8.

- Kaiser, H.J., D. Lingwood, I. Levental, J.L. Sampaio, L. Kalvodova, L. Rajendran, and K. Simons. 2009. Order of lipid phases in model and plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:16645-50.
- Kanekura, K., I. Nishimoto, S. Aiso, and M. Matsuoka. 2006. Characterization of amyotrophic lateral sclerosis-linked P56S mutation of vesicle-associated membrane protein-associated protein B (VAPB/ALS8). *J Biol Chem*. 281:30223-33.
- Karsten, V., R.S. Hegde, A.P. Sinai, M. Yang, and K.A. Joiner. 2004. Transmembrane Domain Modulates Sorting of Membrane Proteins in *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem*. 279:26052-26057.
- Kawano, M., K. Kumagai, M. Nishijima, and K. Hanada. 2006. Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J Biol Chem*. 281:30279-88.
- Kirchhausen, T. 2000. Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1:187-98.
- Kornmann, B., E. Currie, S.R. Collins, M. Schuldiner, J. Nunnari, J.S. Weissman, and P. Walter. 2009. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*. 325:477-81.
- Kornmann, B., and P. Walter. 2010. ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J Cell Sci*. 123:1389-93.
- Kosinski, M., K. McDonald, J. Schwartz, I. Yamamoto, and D. Greenstein. 2005. *C. elegans* sperm bud vesicles to deliver a meiotic maturation signal to distant oocytes. *Development*. 132:3357-69.
- Kuehn, M.J., J.M. Herrmann, and R. Schekman. 1998. COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature*. 391:187-90.
- Ladinsky, M.S., D.N. Mastrorarde, J.R. McIntosh, K.E. Howell, and L.A. Staehelin. 1999. Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *J Cell Biol*. 144:1135-49.
- Lee, C., and L.B. Chen. 1988. Dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cells. *Cell*. 54:37-46.
- Lee, C., and J. Goldberg. 2010. Structure of coatamer cage proteins and the relationship among COPI, COPII, and clathrin vesicle coats. *Cell*. 142:123-32.
- Lee, M.C., E.A. Miller, J. Goldberg, L. Orci, and R. Schekman. 2004. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20:87-123.
- Lev, S. 2010. Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*.
- Levine, T., and C. Rabouille. 2005. Endoplasmic reticulum: one continuous network compartmentalized by extrinsic cues. *Curr Opin Cell Biol*. 17:362-8.

- Lewis, M.J., and H.R.B. Pelham. 1990. A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature*. 348:162-163.
- Lindner, R., and H.Y. Naim. 2009. Domains in biological membranes. *Exp Cell Res*. 315:2871-8.
- Loewen, C.J., A. Roy, and T.P. Levine. 2003. A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *Embo J*. 22:2025-2035.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193:265-275.
- Mannella, C.A., K. Buttle, B.K. Rath, and M. Marko. 1998. Electron microscopic tomography of rat-liver mitochondria and their interaction with the endoplasmic reticulum. *Biofactors*. 8:225-8.
- Margittai, E., and G. Banhegyi. 2010. Oxidative folding in the endoplasmic reticulum: towards a multiple oxidant hypothesis? *FEBS Lett*. 584:2995-8.
- Mayor, S., and H. Riezman. 2004. Sorting GPI-anchored proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:110-20.
- McDonald, D.Q., and W.C. Still. 1992. AMBER* torsional parameters for the peptide backbone. *Tetrahedron Lett*. 33:7743-7746.
- McMahon, H.T., and J.L. Gallop. 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*. 438:590-6.
- Miller, E.A., T.H. Beilharz, S. Hamamoto, L. Orci, and R. Schekman. 2003. Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell*. 114:497-509.
- Mitne-Neto, M., C.R. Ramos, D.C. Pimenta, J.S. Luz, A.L. Nishimura, F.A. Gonzales, C.C. Oliveira, and M. Zatz. 2007. A mutation in human VAP-B--MSP domain, present in ALS patients, affects the interaction with other cellular proteins. *Protein Expr Purif*. 55:139-46.
- Mizuno, M., and S.J. Singer. 1993. A soluble secretory protein is first concentrated in the endoplasmic reticulum before transfer to the Golgi apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:5732-5736.
- Muniz, M., P. Morsomme, and H. Riezman. 2001. Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell*. 104:313-20.
- Munro, S. 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*. 115:377-88.
- Murshid, A., and J.F. Presley. 2004. ER-to-Golgi transport and cytoskeletal interactions in animal cells. *Cell Mol Life Sci*. 61:133-45.

- Nikawa, J., A. Murakami, E. Esumi, and K. Hosaka. 1995. Cloning and sequence of the SCS2 gene, which can suppress the defect of INO1 expression in an inositol auxotrophic mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem (Tokyo)*. 118:39-45.
- Nikonov, A.V., and G. Kreibich. 2003. Organization of translocon complexes in ER membranes. *Biochem Soc Trans*. 31:1253-6.
- Nishimura, A.L., M. Mitne-Neto, H.C.A. Silva, A. Richieri-Costa, S. Middleton, D. Cascio, F. Kok, J.R.M. Oliveira, T. Gillingwater, J. Webb, P. Skehel, and M. Zatz. 2004. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* 75:822-831.
- Nishimura, N., and W.E. Balch. 1997. A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science*. 277:556-558.
- Nufer, O., S. Gulbrandsen, M. Degen, F. Kappeler, J.P. Paccaud, K. Tani, and H.P. Hauri. 2002. Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export. *J Cell Sci*. 115:619-28.
- Okiyoneda, T., K. Harada, M. Takeya, K. Yamahira, I. Wada, T. Shuto, M.A. Suico, Y. Hashimoto, and H. Kai. 2004. Delta F508 CFTR pool in the endoplasmic reticulum is increased by calnexin overexpression. *Mol Biol Cell*. 15:563-74.
- Orci, L., M. Ravazzola, P. Meda, C. Holcomb, H.P. Moore, L. Hicke, and R. Schekman. 1991. Mammalian Sec23p homologue is restricted to the endoplasmic reticulum transitional cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:8611-5.
- Osman, C., M. Haag, C. Potting, J. Rodenfels, P.V. Dip, F.T. Wieland, B. Brugger, B. Westermann, and T. Langer. 2009. The genetic interactome of prohibitins: coordinated control of cardiolipin and phosphatidylethanolamine by conserved regulators in mitochondria. *J Cell Biol*. 184:583-96.
- Otte, S., and C. Barlowe. 2002. The Erv41p-Erv46p complex: multiple export signals are required in trans for COPII-dependent transport from the ER. *Embo J*. 21:6095-104.
- Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*. 189:347-358.
- Pani, B., and B.B. Singh. 2009. Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. *Cell Calcium*. 45:625-33.
- Park, S.H., and C. Blackstone. 2010. Further assembly required: construction and dynamics of the endoplasmic reticulum network. *EMBO Rep*. 11:515-21.
- Pedrazzini, E., A. Villa, and N. Borgese. 1996. A mutant cytochrome b₅ with a lengthened membrane anchor escapes from the endoplasmic reticulum and reaches the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:4207-4212.

- Pedrazzini, E., A. Villa, R. Longhi, A. Bulbarelli, and N. Borgese. 2000. Mechanism of residence of cytochrome b(5), a tail-anchored protein, in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 148:899-914.
- Pralle, A., P. Keller, E.L. Florin, K. Simons, and J.K. Horber. 2000. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 148:997-1008.
- Prinz, W.A., L. Grzyb, M. Veenhuis, J.A. Kahana, and P.A. Silver. 2000. Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 150:461-474.
- Prosser, D.C., D. Tran, P.Y. Gougeon, C. Verly, and J.K. Ngsee. 2008. FFAT rescues VAPA-mediated inhibition of ER-to-Golgi transport and VAPB-mediated ER aggregation. *J Cell Sci.* 121:3052-61.
- Rapizzi, E., P. Pinton, G. Szabadkai, M.R. Wieckowski, G. Vandecasteele, G. Baird, R.A. Tuft, K.E. Fogarty, and R. Rizzuto. 2002. Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria. *J Cell Biol.* 159:613-24.
- Rizzuto, R., M. Brini, M. Murgia, and T. Pozzan. 1993. Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science.* 262:744-7.
- Robertson, J.D. 1960. The molecular structure and contact relationships of cell membranes. *Prog Biophys Mol Biol.* 10:343-418.
- Ronchi, P., S. Colombo, M. Francolini, and N. Borgese. 2008. Transmembrane domain-dependent partitioning of membrane proteins within the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 181:105-18.
- Rossi, D., V. Barone, E. Giacomello, V. Cusimano, and V. Sorrentino. 2008. The sarcoplasmic reticulum: an organized patchwork of specialized domains. *Traffic.* 9:1044-9.
- Russ, W.P., and D.M. Engelman. 2000. The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol.* 296:911-9.
- Russell, C., and S.M. Stagg. 2010. New insights into the structural mechanisms of the COPII coat. *Traffic.* 11:303-10.
- Sabatini, D.D., Y. Tashiro, and G.E. Palade. 1966. On the attachment of ribosomes to microsomal membranes. *J Mol Biol.* 19:503-24.
- Schekman, R., and L. Orci. 1996. Coat Proteins and Vesicle Budding. *Science (Wash. DC).* 271:1526-1533.
- Sharpe, H.J., T.J. Stevens, and S. Munro. 2010. A comprehensive comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties. *Cell.* 142:158-69.

- Shibata, Y., J. Hu, M.M. Kozlov, and T.A. Rapoport. 2009. Mechanisms shaping the membranes of cellular organelles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 25:329-54.
- Shibata, Y., G.K. Voeltz, and T.A. Rapoport. 2006. Rough sheets and smooth tubules. *Cell.* 126:435-9.
- Shibata, Y., C. Voss, J.M. Rist, J. Hu, T.A. Rapoport, W.A. Prinz, and G.K. Voeltz. 2008. The reticulum and DP1/Yop1p proteins form immobile oligomers in the tubular endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 283:18892-904.
- Shindiapina, P., and C. Barlowe. 2010. Requirements for transitional endoplasmic reticulum site structure and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 21:1530-45.
- Shnyder, S.D., and M.J. Hubbard. 2002. ERp29 is a ubiquitous resident of the endoplasmic reticulum with a distinct role in secretory protein production. *J Histochem Cytochem.* 50:557-66.
- Short, B., A. Haas, and F.A. Barr. 2005. Golgins and GTPases, giving identity and structure to the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta.* 1744:383-95.
- Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387:569-572.
- Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 1:31-39.
- Singer, S.J., and G.L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175:720-31.
- Skehel, P.A., K.C. Martin, E.R. Kandel, and D. Bartsch. 1995. A VAMP-binding protein from *Aplysia* required for neurotransmitter release. *Science.* 269:1580-3.
- Snapp, E.L., N. Altan, and J. Lippincott-Schwartz. 2003a. Measuring protein mobility by photobleaching GFP chimeras in living cells. *In Current Protocols in Cell Biology.* J.S. Bonifacino, M. Dasso, J.B. Harford, J. Lippincott-Schwartz, and K.M. Yamada, editors. John Wiley. 21.1.1 - 21.1.24.
- Snapp, E.L., R.S. Hegde, M. Francolini, F. Lombardo, S. Colombo, E. Pedrazzini, N. Borgese, and J. Lippincott-Schwartz. 2003b. Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J. Cell Biol.* 163:257-269.
- Soullam, B., and H.J. Worman. 1995. Signals and structural features involved in integral membrane protein targeting to the inner nuclear membrane. *J Cell Biol.* 130:15-27.
- Sprocati, T., P. Ronchi, A. Raimondi, M. Francolini, and N. Borgese. 2006. Dynamic and reversible restructuring of the endoplasmic reticulum induced by PDMP in cultured cells. *J. Cell Sci.* 119:3249-3260.
- Sprong, H., P. van der Sluijs, and G. van Meer. 2001. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 2:504-513.

- Staehelin, L.A. 1997. The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J.* 11:1151-65.
- Stagg, S.M., C. Gurkan, D.M. Fowler, P. LaPointe, T.R. Foss, C.S. Potter, B. Carragher, and W.E. Balch. 2006. Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature.* 439:234-8.
- Stefanovic, S., and R.S. Hegde. 2007. Identification of a targeting factor for post-translational membrane protein insertion into the ER. *Cell.* 128:1147-1159.
- Subtil, A., I. Gaidarov, K. Kobylarz, M.A. Lampson, J.H. Keen, and T.E. McGraw. 1999. Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:6775-80.
- Szabadkai, G., K. Bianchi, P. Varnai, D. De Stefani, M.R. Wieckowski, D. Cavagna, A.I. Nagy, T. Balla, and R. Rizzuto. 2006. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol.* 175:901-11.
- Terasaki, M., L.B. Chen, and K. Fujiwara. 1986. Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J Cell Biol.* 103:1557-68.
- Teuling, E., S. Ahmed, E. Haasdijk, J. Demmers, M.O. Steinmetz, A. Akhmanova, D. Jaarsma, and C.C. Hoogenraad. 2007. Motor neuron disease-associated mutant vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) B recruits wild-type VAPs into endoplasmic reticulum-derived tubular aggregates. *J Neurosci.* 27:9801-15.
- Thiele, C., M.J. Hannah, F. Fahrenholz, and W.B. Huttner. 2000. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol.* 2:42-9.
- Townsend, F.M., D.W. Wilson, and H.R.B. Pelham. 1993. Mutational analysis of the human KDEL receptor: distinct structural requirements for Golgi retention, ligand binding and retrograde transport. *EMBO Journal.* 12:2821-2829.
- van Meer, G. 1989. Lipid traffic in animal cells. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5:247-275.
- van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:112-24.
- Vance, C., B. Rogelj, T. Hortobagyi, K.J. De Vos, A.L. Nishimura, J. Sreedharan, X. Hu, B. Smith, D. Ruddy, P. Wright, J. Ganesalingam, K.L. Williams, V. Tripathi, S. Al-Saraj, A. Al-Chalabi, P.N. Leigh, I.P. Blair, G. Nicholson, J. de Belleruche, J.M. Gallo, C.C. Miller, and C.E. Shaw. 2009. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science.* 323:1208-11.
- Vembar, S.S., and J.L. Brodsky. 2008. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:944-57.

- Voeltz, G.K., W.A. Prinz, Y. Shibata, J.M. Rist, and T.A. Rapoport. 2006. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell*. 124:573-86.
- Voeltz, G.K., M.M. Rolls, and T.A. Rapoport. 2002. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep*. 3:944-50.
- Vogel, F., E. Hartmann, D. Gorlich, and T.A. Rapoport. 1990. Segregation of the signal sequence receptor protein in the rough endoplasmic reticulum membrane. *Eur J Cell Biol*. 53:197-202.
- Wakana, Y., S. Takai, K. Nakajima, K. Tani, A. Yamamoto, P. Watson, D.J. Stephens, H.P. Hauri, and M. Tagaya. 2008. Bap31 is an itinerant protein that moves between the peripheral endoplasmic reticulum (ER) and a juxtannuclear compartment related to ER-associated Degradation. *Mol Biol Cell*. 19:1825-36.
- Weissman, J.T., H. Plutner, and W.E. Balch. 2001. The mammalian guanine nucleotide exchange factor mSec12 is essential for activation of the Sar1 GTPase directing endoplasmic reticulum export. *Traffic*. 2:465-75.
- Weitzmann, A., C. Baldes, J. Dudek, and R. Zimmermann. 2007. The heat shock protein 70 molecular chaperone network in the pancreatic endoplasmic reticulum - a quantitative approach. *Febs J*. 274:5175-87.
- Wendeler, M.W., J.P. Paccaud, and H.P. Hauri. 2007. Role of Sec24 isoforms in selective export of membrane proteins from the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep*. 8:258-64.
- Wieland, F.T., M.L. Gleason, T.A. Serafini, and J.E. Rothman. 1987. The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell*. 50:289-300.
- Yethiraj, A., and J.C. Weisshaar. 2007. Why are lipid rafts not observed in vivo? *Biophys J*. 93:3113-9.
- Zimmerberg, J., and M.M. Kozlov. 2006. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:9-19.
- Blumental-Perry, A., C.J. Haney, K.M. Weixel, S.C. Watkins, O.A. Weisz, and M. Aridor. 2006. Phosphatidylinositol 4-phosphate formation at ER exit sites regulates ER export. *Dev Cell*. 11:671-82.
- Borgese, N., S. Brambillasca, M. Righi, and S. Colombo. 2009. Membrane insertion of tail-anchored proteins. *in Protein Transport into the Endoplasmic Reticulum. Zimmermann R, editor:pp.* 91-101.
- Borgese, N., M. Francolini, and E. Snapp. 2006. Endoplasmic reticulum architecture: structures in flux. *Curr Opin Cell Biol*. 18:358-64.
- Brambillasca, S., M. Yabal, M. Makarow, and N. Borgese. 2006. Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers. *J Cell Biol*. 175:767-77.

- Bulbarelli, A., T. Sprocati, M. Barberi, E. Pedrazzini, and N. Borgese. 2002. Trafficking of Tail-anchored Proteins: Transport from the Endoplasmic Reticulum to the Plasma Membrane and Sorting between Surface Domains in Polarised Epithelial Cells. *J. Cell Sci.* 115:1689-1702.
- Ceppi, P., S. Colombo, M. Francolini, F. Raimondo, N. Borgese, and M. Masserini. 2005. Two tail-anchored protein variants, differing in transmembrane domain length and intracellular sorting, interact differently with lipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:16269-74.
- Colbeau, A., J. Nachbaur, and P.M. Vignais. 1971. Enzyme characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochem. Biophys. Acta.* 249:462-492.
- Kanekura, K., I. Nishimoto, S. Aiso, and M. Matsuoka. 2006. Characterization of amyotrophic lateral sclerosis-linked P56S mutation of vesicle-associated membrane protein-associated protein B (VAPB/ALS8). *J Biol Chem.* 281:30223-33.
- Killian, J.A. 1998. Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1376:401-15.
- Kopito, R.R., and R. Sitia. 2000. Aggresomes and Russell bodies. Symptoms of cellular indigestion? *EMBO Rep.* 1:225-231.
- Muniz, M., P. Morsomme, and H. Riezman. 2001. Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell.* 104:313-20.
- Nishimura, A.L., M. Mitne-Neto, H.C.A. Silva, A. Richieri-Costa, S. Middleton, D. Cascio, F. Kok, J.R.M. Oliveira, T. Gillingwater, J. Webb, P. Skehel, and M. Zatz. 2004. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* 75:822-831.
- Pedrazzini, E., A. Villa, and N. Borgese. 1996. A mutant cytochrome b₅ with a lengthened membrane anchor escapes from the endoplasmic reticulum and reaches the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:4207-4212.
- Prosser, D.C., D. Tran, P.Y. Gougeon, C. Verly, and J.K. Ngsee. 2008. FFAT rescues VAPA-mediated inhibition of ER-to-Golgi transport and VAPB-mediated ER aggregation. *J Cell Sci.* 121:3052-61.
- Ronchi, P., S. Colombo, M. Francolini, and N. Borgese. 2008. Transmembrane domain-dependent partitioning of membrane proteins within the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 181:105-18.
- Shibata, Y., J. Hu, M.M. Kozlov, and T.A. Rapoport. 2009. Mechanisms shaping the membranes of cellular organelles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 25:329-54.

- Shibata, Y., G.K. Voeltz, and T.A. Rapoport. 2006. Rough sheets and smooth tubules. *Cell*. 126:435-9.
- Snapp, E.L., R.S. Hegde, M. Francolini, F. Lombardo, S. Colombo, E. Pedrazzini, N. Borgese, and J. Lippincott-Schwartz. 2003. Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J. Cell Biol.* 163:257-269.
- Sturbois-Balcerzak, B., P. Vincent, L. Maneta-Peyret, M. Duvert, B. Satiat-Jeunemaitre, C. Cassagne, and P. Moreau. 1999. ATP-dependent formation of phosphatidylserine-rich vesicles from the endoplasmic reticulum of leek cells. *Plant Physiology*. 120:245-256.
- Taylor, J.P., J. Hardy, and K.H. Fischbeck. 2002. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*. 296:1991-5.
- Teuling, E., S. Ahmed, E. Haasdijk, J. Demmers, M.O. Steinmetz, A. Akhmanova, D. Jaarsma, and C.C. Hoogenraad. 2007. Motor neuron disease-associated mutant vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) B recruits wild-type VAPs into endoplasmic reticulum-derived tubular aggregates. *J Neurosci*. 27:9801-15.
- van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:112-24.
- Voeltz, G.K., M.M. Rolls, and T.A. Rapoport. 2002. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep*. 3:944-50.