



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOLOGIA

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE BIO-09

CICLO XXVI

Tesi di Dottorato di Ricerca

Aspetti funzionali dell'interazione tra 4.1R e ICIn

Dottorando: Dott. Davide Antonio Civello

Matricola: R09089

Tutor: Prof. Giuliano Meyer

Dipartimento di Bioscienze

Coordinatore: Prof. Michele Mazzanti

Anno Accademico 2012/2013

INDICE

1. RIASSUNTO	p.5
2. INTRODUZIONE	p.8
2.1. La proteina ICln	p.9
2.1.1. Struttura ICln	p.14
2.1.2. Funzioni di ICln	p.14
2.1.3. Interazioni con altre proteine	p.19
2.2. La proteina 4.1	p.22
2.2.1. Struttura della proteina 4.1	p.24
2.2.2. Funzioni della proteina 4.1	p.32
3. SCOPO DEL LAVORO	p.36
4. MATERIALI E METODI	p.39
4.1. Colture cellulari	p.39
4.2. Produzione di batteri competenti	p.40
4.3. Trasformazione batterica	p.41
4.4. Miniprep	p.42
4.5. Maxiprep	p.43
4.6. Dosaggio acidi nucleici	p.44
4.7. Transfezione	p.45

4.8. FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)	p.47
4.9. Elettroforesi del DNA	p.50
4.10. Purificazione dei prodotti di PCR	p.51
4.11. Estrazione proteine totali	p.52
4.11.2. Estrazione proteine nucleari e citosoliche	p.52
4.11.3. Estrazione proteine totali di membrana	p.54
4.12. Dosaggio proteico	p.56
4.13. Co-immunoprecipitazione	p.56
4.14. Western blot	p.58
4.14.2 Trasferimento	p.59
4.14.3. Blocco e incubazione con anticorpo primario e secondario	p.60
4.14.4. Sviluppo	p.61
4.14.5 Stripping	p.61
4.14.6. Colorazione Amido Black di membrana PVDF	p.62
4.15. Conte cellulari e curve di crescita	p.63
4.16. Esperimenti di patch-clamp	p.64
4.17. Esperimenti di localizzazione 4.1R in membrana in seguito a swelling	p.66
4.18. Analisi statistiche	p.67
5. RISULTATI	p.68
5.1. ICIn interagisce con YFP-4.1R ⁸⁰ e YFP-4.1R ¹³⁵ in cellule HEK	p.68

5.2. Lo shock ipotonico determina un aumento dell'attivazione dell'IClswell in cellule over-espresse con 4.1R ⁸⁰ (ma non con 4.1R ¹³⁵)	p.72
5.3. Dopo esposizione a ipotonia in cellule HEK la quantità di 4.1R in membrana diminuisce, l'interazione tra 4.1R ⁸⁰ -ICln aumenta	p.74
5.4. L'over-espressione di ICln in cellule HEK mima gli effetti dello shock ipotonico sulla localizzazione di 4.1R in membrana	p.75
5.5. ICln promuove il distacco di 4.1R dalla membrana plasmatica interferendo con l'interazione tra 4.1R-actina	p.76
5.6. L'over-espressione di ICln antagonizza lo spreading cellulare e l'emissione di filopodi promossa dall'over-espressione di 4.1R ¹³⁵	p.77
5.7. L'effetto sulla proliferazione da parte di 4.1R ⁸⁰ su cellule HEK è influenzato dalla co-espressione di ICln	p.79
6. DISCUSSIONE	p.81
6.1. ICln interagisce con 4.1R ⁸⁰ /4.1R ¹³⁵ in cellule HEK	p.82
6.2. Shock ipotonico: 4.1R ⁸⁰ attiva IClswell in cellule HEK	p.85
6.3. Stress ipotonico: Interazione tra 4.1R ⁸⁰ -ICln in cellule HEK	p.87
6.4. Interazione tra 4.1R-actina-ICln	p.88
6.5. Morfologia cellulare: 4.1R ¹³⁵ -ICln	p.89
6.6. Proliferazione cellulare: 4.1R ⁸⁰ -ICln	p.91
6.7. Conclusione	p.92
7.FIGURE	p.93
8. BIBLIOGRAFIA	p.107

1. RIASSUNTO

ICln è una proteina di 209 aminoacidi clonata nel 1992. Componente fondamentale del proteoma cellulare, è una proteina altamente conservata, ubiquitariamente espressa e il suo knock-out è letale. ICln è stata inizialmente associata alla formazione della corrente IClswell, corrente di cloruro attivata in seguito a stress ipo-osmotico e fondamentale per i meccanismi omeostatici di regolazione del volume cellulare. In questi meccanismi, ICln gioca un ruolo di primo piano; infatti è stato dimostrato che anche batteri esprimenti ICln diventano altamente tolleranti a stress di natura ipo-osmotica, mentre l'inibizione della sua espressione provoca una diminuzione dell'IClswell. Nonostante risulti evidente l'importanza di ICln nella attivazione e nella regolazione della corrente, non è ancora chiaro il ruolo molecolare della proteina. In questo senso, l'impossibilità di effettuare un knock-out della proteina risulta essere un ostacolo per la sua caratterizzazione. ICln non è però coinvolta solo nei meccanismi di regolazione omeostatica del volume. Nel corso degli anni, parallelamente ad esperimenti che ne descrivevano i diversi e numerosi partner molecolari, sono state proposte nuove e più ampie funzioni per ICln, riguardanti la regolazione dello splicing e della proliferazione cellulare, della stabilità di membrana e delle interazioni cellulari. Fra le varie proteine in grado di legare con ICln, di particolare importanza sono le interazioni con le proteine citoscheletriche actina, miosina e la proteina 4.1. Quest'ultima è una proteina strutturale, multifunzionale, inizialmente individuata nei globuli rossi e associata alla regolazione della plasticità e

resistenza della membrana cellulare. Anche per 4.1, nel corso degli anni, sono state individuati numerosi partner molecolari e numerose funzioni. Inoltre, in aggiunta alla proteina 4.1 inizialmente identificata negli eritrociti, sono state poi individuate varie isoforme presenti in molteplici organi e tessuti. Nel laboratorio dove ho svolto la tesi, in particolare, sono state studiate le due principali isoforme della 4.1 eritrocitica (4.1R): una isoforma ad alto peso molecolare, 4.1R¹³⁵ di 135 kDa, e una isoforma a basso peso molecolare, 4.1R⁸⁰ di 80 kDa. Queste due isoforme sono originate dall'utilizzo di due diversi siti di inizio trascrizione e differiscono fra loro unicamente per la presenza o assenza delle regione N-terminale U1, di 209 aminoacidi. In precedenti esperimenti di FRET, coimmunoprecipitazione e western blot si è osservato che le due isoforme sono in grado di interagire con ICln. In particolare i risultati ottenuti sembrano suggerire che tale interazione è in grado di influenzare la localizzazione subcellulare della 4.1R a livello della membrana. Considerando che sia ICln che la proteina 4.1R svolgono funzioni fondamentali a livello di questo distretto subcellulare, scopo del mio lavoro è stato quello di approfondire alcuni aspetti funzionali legati all'interazione fra le due proteine. Si è quindi cercato inizialmente di approfondire l'effetto che svolgono vicendevolmente sulla localizzazione, anche in condizioni d'ipotonia. Inoltre, considerando che la localizzazione di una proteina è dovuta alla sua interazione col citoscheletro e che il citoscheletro di actina, fra l'altro, è fondamentale per l'attivazione dell'IClswell, abbiamo effettuato esperimenti volti a studiare l'effetto di ICln sul legame fra actina e 4.1R. Parallelamente agli esperimenti di localizzazione, abbiamo poi effettuato anche test di proliferazione, esperimenti di patch-clamp ed esperimenti di morfologia cellulare (Correlative Light-Scanning Electron Microscopy) volti ad analizzare il significato funzionale dell'interazione fra ICln e 4.1R, per quanto riguarda la crescita cellulare, il numero di filopodi/area cellulare e l'attivazione e regolazione della corrente IClswell. I risultati ottenuti hanno confermato un effetto di ICln sulla localizzazione e sulla funzione delle due isoforme analizzate di 4.1R. In particolare l'over-espressione di ICln è in grado di determinare anche una variazione di localizzazione a livello della membrana di 4.1R, che si accompagna (per lo meno nel caso della 4.1R¹³⁵) ad una

diminuzione della sua interazione con l'actina. È emerso quindi un quadro complesso di interazioni proteiche che vedono coinvolte ICln, 4.1R e il citoscheletro. Tali interazioni, però, non riguardano solo la modulazione della localizzazione subcellulare delle proteine in esame. Infatti gli esperimenti volti ad analizzarne il significato funzionale hanno mostrato come 4.1R sia in grado di interagire con ICln per modulare l'attivazione dell'ICIswell e che entrambe possono regolare la proliferazione e la morfologia cellulare. Un dato interessante che è emerso è stato che le due isoforme di 4.1R non mostrano le medesime funzioni. Già in letteratura è riportato come tali isoforme sono presenti in maniera differente nel corso dello sviluppo degli eritrociti, a testimoniare una differenza nelle funzioni. Negli esperimenti da noi effettuati si è osservato che 4.1R¹³⁵ e 4.1R⁸⁰ modulano in maniera differente sia la proliferazione che la morfologia cellulare che l'attivazione dell'ICIswell. È possibile quindi immaginare come i meccanismi di splicing possano regolare l'espressione delle diverse isoforme di 4.1R in base alle necessità della cellula.

In conclusione è possibile affermare che ICln, interagendo con 4.1R, è in grado di regolarne la funzione. L'interazione porta, infatti, a una rispettiva variazione della localizzazione e alla modulazione di funzioni come l'attivazione della corrente ICIswell, la proliferazione e la morfologia cellulare, con effetti diversi per le due isoforme di 4.1R studiate.

2. INTRODUZIONE

2.1. La proteina ICln

ICln è una proteina multifunzionale clonata per la prima volta nel 1992 (Paulmichl et al.1992) dalle cellule epiteliali MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), e fortemente conservata lungo la scala evolutiva. Essa è ubiquitariamente espressa in tutte le cellule ed è fondamentale per la loro sopravvivenza. Infatti, il knockout di ICln è letale in stadi molto precoci dello sviluppo embriologico sia in topo che in nematode (Pu et al., 2000) indicando che ICln ha un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi cellulare (Fürst et al., 2005). Il promotore di ICln è privo di TATA box e mostra un'attività altamente costitutiva, caratteristiche tipiche di un gene house-keeping (Ritter et al., 2002). La proteina ICln è codificata dal gene CLNS (Chloride Channel Nucleotide Sensitive) ed in particolare nel genoma umano sono presenti due geni CLNS denominati CLNS1A e CLNS1B (Gschwentner et al., 1999). Il gene CLNS1A è localizzato sul cromosoma 11 in posizione q13.5-14.1 è il gene che codifica per la proteina ICln umana ed è costituito da 6 esoni e 5 introni (Schwaez et al., 1997), mentre il gene CLNS1B è privo d'introni, è localizzato sul cromosoma 6 ed è molto probabilmente uno pseudogene (Nagl et al., 1998).

2.1.1. Struttura di ICln

L'isoforma canina di ICln è formata da 235 amminoacidi prevalentemente

acidi (pk=3.8) e con un peso molecolare predetto sulla base della sequenza primaria di 26.5 kDa. Tuttavia, in elettroforesi su gel di poliacrilammide, condotta in condizioni denaturanti, la proteina migra con una massa apparente di circa 37 kDa. Una simile discrepanza non è dovuta a modificazioni post-traduzionali, dal momento che ICln delle cellule eucariotiche, ICln espressa in batterio ed ICln sintetizzata in vitro in lisato di reticolociti di coniglio migrano alla medesima altezza (Buyse et al., 1996; Fürst et al., 2000). È plausibile che il ritardo elettroforetico sia dovuto alla forte acidità della proteina. All'interno della sequenza aminoacidica di ICln sono state individuate tre regioni acide denominate Acidic Domains (AD1, AD2, AD3) ed è stato ipotizzato che siano potenziali siti d'interazione proteina-proteina (Fürst et al., 2006). AD1 è localizzato all'interno del lungo e mobile loop che connette i foglietti $\beta 6$ e $\beta 7$ del PH-domain di ICln in MDCK e contiene un sito (Ser93) di fosforilazione per la proteina chinasi PKGII (Fürst et al., 2006). AD2 è posizionato subito dietro il cappuccio ad α -elica del PH-domain di ICln ed è coinvolto nell'interazione con il fattore di processamento dell'RNA, LSm4 (Fürst et al., 2005). AD3 è localizzato a livello dell'estremità C-terminale di ICln e media il legame con PRMT5, un enzima che metila simmetricamente le proteine Sm ed in particolare LSm4 (Emma et al., 1998).

```

GLGTGTLYIAESRLSWLDGSGLGFSLEYPT 60
ISLHAVSRDLNAYPREHLYVMVNAKFGEEES 90
      AD1
KESVAEEEDSDDDVEPIAEFRFVPSDKSAL 120
      AD2
EAMFTAMCECQALHPDPEDEDSDDYDGEEY 150
DVEAHEQGQGDIPTFYTYEEGLSHLTAEGQ 180
ATLERLEGMLSQSVSSQYNMAGVRTEDSTR 210
      AD3
DYEDGMEVDTTPTVAGQFEDADVDH 235

```

Fig. 1. Struttura primaria di ICln in cellule MDCK. In giallo sono evidenziati tre Acidic Domains (AD1, AD2, AD3) e in azzurro la sequenza GXGXX, potenziale sito d'interazione con i nucleotidi (Paulmichl et al., 1992)

Mediante esperimenti di mutagenesi è stato possibile identificare nella sequenza aminoacidica di ICln un potenziale sito di legame per i nucleotidi

costituito da tre residui di glicina alternati ad altri amminoacidi (GxGxGx, regione che si estende dall'amminoacido 49 all'amminoacido 53 dell'isoforma canina. Si veda la fig. 3) che sulla base del modello 3D proposto per ICln in membrana si trova in prossimità dell'apertura esterna del canale (Paulmichl et al., 1992).

2.1.1.1. Struttura terziaria

La proteina ICln è coinvolta in un processo fondamentale per la sopravvivenza cellulare che si attiva in risposta al rigonfiamento cellulare e prende il nome di Decremento Regolatorio del Volume (RVD) (Krapivinsky et al., 1994). È stato ipotizzato che ICln sia uno dei regolatori della corrente IC_{swell}, che si attiva durante l'RVD (Paulmichl et al., 1996). In accordo con questa ipotesi, tramite "computer modelling" e sulla base della sua sequenza aminoacidica, è stato proposto nel 1992 un modello tridimensionale per la proteina ICln inserita in membrana costituita da un foglietto β composto di quattro putativi filamenti β antiparalleli (Paulmichl et al., 1992). Secondo quest'ipotesi, si potrebbe formare un omodimero composto da due molecole di ICln (Fig.2), le quali, apponendo i rispettivi foglietti β uno contro l'altro, darebbero luogo ad un canale che attraversa il bilayer lipidico. In base a questo modello sia l'estremità C-terminale sia quella N-terminale si affacciano sul lato citoplasmatico.

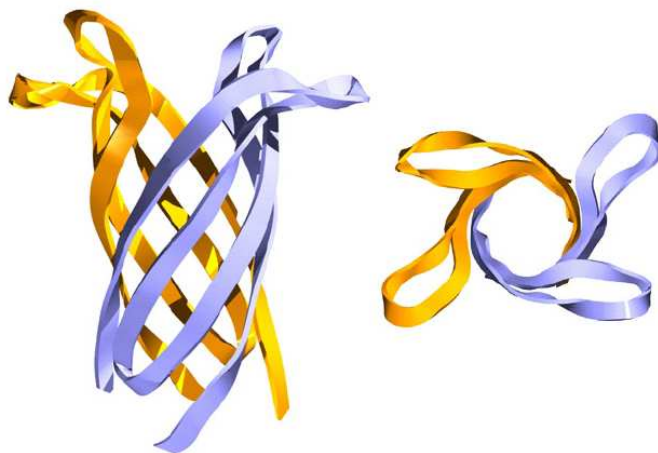


Fig. 2. Visualizzazione laterale e dall'alto dell'ipotetico omodimero di ICln. Le catene delle due molecole sono distinte per colore

Il modello appena descritto non è ancora stato validato tramite esperimenti di cristallografia o Risonanza Magnetica Nucleare (NMR). Tuttavia tramite esperimenti di NMR è stato possibile risolvere la struttura tridimensionale dei primi 159 aminoacidi della forma idrosolubile citosolica di ICln MDCK, dato comunque di estremo interesse visto che la proteina in condizioni di riposo ha una localizzazione prevalentemente citoplasmatica e solo una piccola frazione è associata alla membrana plasmatica (Krapivinsky et al., 1994). La proteina completa di ICln MDCK ha la tendenza a degradarsi in pochi giorni a temperatura ambiente rendendo problematico effettuare esperimenti di NMR. La delezione degli ultimi 76 aminoacidi dell'estremità C-terminale di ICln porta alla formazione di una proteina tronca (ICln159) che, al contrario, è molto stabile permettendo quindi di effettuare esperimenti di NMR senza andare incontro a fenomeni di proteolisi (Fürst et al., 2005). Tali esperimenti condotti sulla forma solubile di ICln159 hanno rivelato che la parte N-terminale di ICln è organizzata in un PH-domain (Pleckstrin Homology) coinvolto nel legame di altre proteine e/o con i fosfatidilinositoli (Fürst et al., 2005; Scheldlbauer et al., 2003).

2.1.1.2. Domini PH

Il dominio PH è un modulo di 100-120 residui aminoacidici appartenente a diverse proteine, tra cui anche ICln. È stato descritto per la prima volta nel 1993 da Haslam (Haslam et al., 1993; Mayer et al., 1993) come un motivo che si ripete due volte nella plecstrina, una proteina solubile presente solo in cellule ematopoietiche, dove è una delle proteine più abbondanti ($\cong 1\%$ delle proteine totali) e costituisce il principale substrato della protein chinasi C. I domini PH sono stati evidenziati in centinaia di proteine coinvolte nel traffico vescicolare, nel riarrangiamento del citoscheletro e nella trasduzione del segnale in cellula (Lemmon et al., 2002), come le fosfolipasi, le proteine regolate dalle GTPasi, le proteine chinasi, le proteine citoscheletriche e le proteine oncogeniche, dal lievito ai mammiferi.

Il sequenziamento del genoma umano ha mostrato 252 proteine umane diverse contenenti almeno un PH-domain, rendendolo così l'undicesimo dominio più comune nell'uomo (Lemmon et al., 2002). Grazie all'utilizzo della

cristallografia e della NMR, la struttura di questi domini PH è stata risolta e oggi si conoscono almeno 13 differenti tipi di struttura (Yoon et al., 1994). I PH-domain sono una grande famiglia di domini proteici che sono omologhi per struttura ma con sequenza non molto conservata. Infatti i PH domain tollerano grandi inserzioni senza alcun effetto sulla struttura del core centrale suggerendo così che, in questi casi, nel determinare la funzione di una proteina è più importante la struttura tridimensionale piuttosto che la sequenza aminoacidica (Lemmon et al., 2001). La struttura classica del dominio PH presenta un core centrale formato da sette filamenti β , organizzati in due foglietti antiparalleli affacciati l'uno contro l'altro a formare uno stretto barile, seguiti da un' α -elica C-terminale che si accosta all'estremità superiore del barile, in posizione trasversale rispetto ad esso. Un foglietto è formato da quattro β -strands (β 1- β 4), l'altro solo da tre (β 5- β 7). A due angoli i foglietti sono molto vicini tra loro, mentre agli altri due angoli i due foglietti sono alla massima distanza. Il dominio PH classico mostra inoltre una caratteristica polarizzazione elettrostatica.

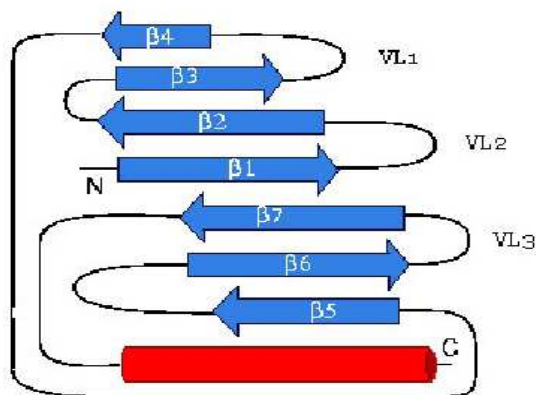


Fig. 3. Topologia dei domini PH. Si possono osservare anche tre Variable Loops (VL)

La parte inferiore è delimitata dai loops β 1/ β 2, β 3/ β 4 e β 6/ β 7, denominati "Variable Loops", rispettivamente VL1, VL2 e VL3, i quali sono di lunghezza variabile a seconda della proteina ed in alcuni casi possono contenere strutture secondarie o addirittura interi domini (Blomberg et al., 1997) e sono putativi siti di legame per interazioni proteina-proteina (Lemmon et al., 2002).

2.1.1.3. Il dominio PH di ICln

La topologia di ICln159, determinata attraverso NMR, corrisponde ad un PH-domain (Fürst et al., 2005; Schedlbauer 2003). Il dominio PH di ICln condivide la medesima struttura dei PH-domains canonici: un barile composto di filamenti β e sovrastato da un' α -elica trasversale.

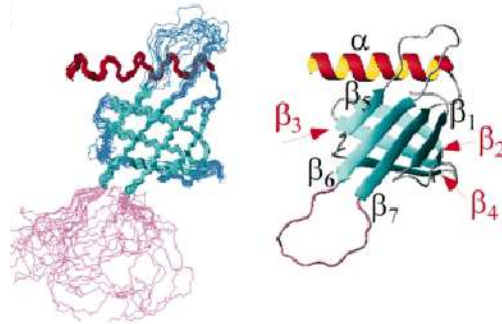


Fig. 4. Struttura NMR di ICln159 solubile in acqua. a) sovrapposizione di 15 strutture finali di ICln con relativa rappresentazione a "ribbon plot"; il loop tra β_6 e β_7 è in colore magenta, i β -sheets sono in ciano, e l' α -elica è in rosso.

Il loop tra β_5/β_6 e il loop tra β_6/β_7 sono molto mobili e non formano strutture secondarie definite (Fürst et al., 2005; Schedlbauer et al., 2005)

Il PH-domain di ICln mostra proprietà insolite come l'assenza della polarizzazione elettrostatica della superficie che caratterizza il dominio PH classico. Infatti, ICln è caratterizzata da una carica negativa molto forte lungo la superficie (Schedlbauer et al., 2005).

La sequenza del dominio PH di ICln contiene diversi putativi siti di fosforilazione per PKC, PKA, PKGII ed attraverso esperimenti di mutagenesi si è visto che il residuo target principale di queste tre proteine è Ser-45 localizzata a livello del β_3 -strand del dominio PH (Schedlbauer et al., 2005).

2.1.1.4. Funzioni dei domini PH

Per i pochi domini PH di cui è stata dimostrata la funzione, si sa che alcuni di essi sono responsabili della traslocazione di proteine presso la membrana tramite associazione diretta con specifici fosfoinositidi (Lemmon et al., 2000) come il PtdIns (3, 4, 5) e il PtdIns (4, 5). Tuttavia questa potrebbe non essere l'unica funzione poiché solo una piccola frazione dei domini PH, circa il 10%, mostra tale proprietà. Nel restante 90% l'affinità verso i fosfoinositidi è bassa

e meno specifica, suggerendo così la possibilità che, per lo meno in alcuni casi, questo dominio metta in atto strategie mirate ad aumentare l'affinità verso i fosfoinositidi, ad esempio tramite la formazione di oligomeri, oppure che realizzi interazioni con altri ligandi, proteici o meno (Lemmon et al., 2000). Una seconda funzione che sembra essere comune a questo tipo di domini è di mediare le interazioni proteina-proteina, che giustifica la loro presenza in proteine coinvolte in vie di signaling (Hemmings et al., 1993; Baltimore et al., 1993). Il PH domain è inoltre presente in molte proteine legate al citoscheletro, tra cui la β -spectrina e le 4.1 (Saarikangas et al., 2010).

2.1.2. Funzioni di ICln

2.1.2.1. Regolazione del volume cellulare

L'abilità della regolazione del volume cellulare è un processo fisiologico fondamentale delle cellule, altamente conservato nel corso dell'evoluzione ed essenziale per la sopravvivenza delle cellule in condizioni metaboliche e ambientali variabili (Ritter et al., 2003). Le cellule devono infatti variare il loro volume per eseguire funzioni specifiche come la divisione cellulare, la migrazione o la segregazione (Lang et al., 1998a). In condizioni fisiologiche la maggior parte delle cellule dei vertebrati si trova in condizioni d'isotonia con l'ambiente extracellulare; tuttavia esistono alcuni tipi di cellule che sono fisiologicamente esposte a stress osmotico, come le cellule dell'epitelio intestinale, le cellule della medulla renale e gli enterociti quando attraversano i vasa recta. Inoltre variazioni del volume cellulare in seguito ad anisotonia tra ambiente intracellulare ed extracellulare intervengono in numero di aspetti della fisiologia cellulare come i processi metabolici, in relazione all'uptake attivo di soluti quali zuccheri o aminoacidi, a carico delle cellule ghiandolari ed in relazione a secrezione di fluido o elettroliti; la risposta cellulare all'azione ormonale, i trasporti epiteliali, la migrazione cellulare, la proliferazione cellulare e l'apoptosi. Quindi i meccanismi di regolazione del volume sono coinvolti in varie funzioni cellulari e l'alterazione di questi meccanismi può portare a severe disfunzioni. I cambiamenti dell'equilibrio osmotico tra il compartimento intracellulare ed extracellulare creano gradienti di pressione osmotica e idrostatica, cui segue un movimento rapido diffusivo di acqua

attraverso le membrane cellulari (Fürst et al., 2005). Infatti la membrana plasmatica delle cellule animali è, di norma, permeabile all'acqua e dotata di bassa rigidità (Lang et al., 1998). In particolare, l'ipotonicità dell'ambiente extracellulare provoca un flusso d'acqua diretto verso l'interno della cellula che porta al rigonfiamento cellulare, al contrario l'ipertonicità dell'ambiente extracellulare porta ad un raggrinzimento cellulare dovuto alla fuoriuscita di acqua dalla cellula. La necessità per la cellula di attivare tempestivamente meccanismi che ripristinino il normale volume cellulare quando essa viene esposta a stress osmotico deriva dal fatto che variazioni del volume cellulare determinano effetti come la distorsione e distensione della membrana plasmatica, perdita dei microvilli nelle cellule villate, riarrangiamenti del citoscheletro di actina (Hoffman et al., 2009), alterazione dello stato d'idratazione delle macromolecole cellulari, compattamento della cromatina, alterazione del volume dei compartimenti intracellulari che alterano le normali funzioni della cellula (Fürst et al., 2002). Inoltre vanno ad influenzare numerosi processi, fra cui i trasporti ionici, il metabolismo, l'espressione genica e la proliferazione cellulare (Lang et al., 1998). Se tali alterazioni non vengono controbilanciate possono danneggiare la cellula e addirittura condurre alla morte cellulare. Le cellule hanno quindi sviluppato strategie per contrastare queste perturbazioni (Fürst et al., 2002). I meccanismi che ristabiliscono il volume cellulare dopo il rigonfiamento (swelling) o il raggrinzimento (shrinkage) sono denominati rispettivamente RVD (Regulatory Volume Decrease) ed RVI (Regulatory Volume Increase).

2.1.2.2. RVD

Il meccanismo che permette alla cellula di contrastare il rigonfiamento provocato dal flusso passivo d'acqua verso l'interno della cellula in seguito a stress iposmotico è chiamato Decremento Regolatorio del Volume, RVD. Durante l'RVD si attivano diversi meccanismi che portano all'estrusione di ioni dalla cellula che per osmosi sono seguiti dall'acqua favorendo il recupero del volume iniziale. Tra questi meccanismi quello di maggior rilevanza è rappresentato da canali per il Cl⁻ denominati RVDC (Regulatory Volume Decrease Related Channels), responsabili della corrente chiamata IC_{swell}.

Esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell hanno mostrato che la corrente IClswell, mediata da questi canali, possiede le seguenti caratteristiche:

- rettificazione uscente (Okada, 1997);
- veloce cinetica di attivazione (<1ms) (Lang et al., 1998);
- lenta inattivazione tempo dipendente a potenziali di +40 mV o superiori (Ackerman et al., 1994). Anche l'entità dell'inattivazione è variabile a seconda del tipo cellulare e può inoltre essere modulata da differenti fattori quali: il pH e la presenza di cationi bivalenti nel mezzo extracellulare. È stato proposto che, a livello di singolo canale, questa inattivazione sia dovuta ad un progressivo decremento nel numero di canali attivi (Okada et al., 1997);
- Ca²⁺ indipendenza;
- indipendenza dal voltaggio (Lang et al., 1998);
- selettività prevalentemente anionica (SCN⁻>I⁻>Br⁻>Cl⁻>F⁻>Gluconato) (Hoffmann et al., 2009);
- inibizione ad opera dei comuni bloccanti di canali anionici (SITS, NPPB, DIDS), ma anche tramite nucleotidi (cAMP, cGMP, ATP) (Tsumura et al., 1996) ed analoghi nucleosidici (AZT e acyclovir), che inibiscono in modo voltaggio indipendente la IClswell (Meyer & Korbmacher, 1996; Gschwentner et al., 1995);
- la possibilità di consentire il passaggio di osmoliti, anioni organici: esistono prove sostanziali che questo canale medi il trasporto di aminoacidi, quali taurina, glutammato, glutammina e glicina (Jackson & Strange, 1993; Jackson et al., 1995).

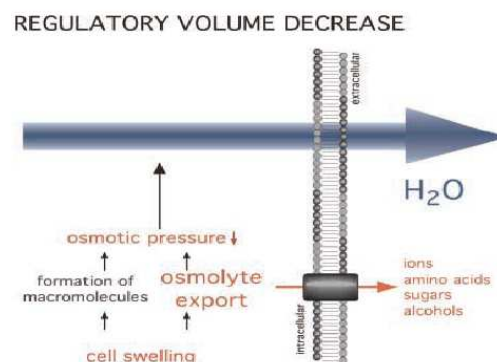


Fig. 5. Meccanismi molecolari coinvolti nel RVD (Decremento Regolativo del Volume), volti alla diminuzione della pressione osmotica per controbilanciare l'afflusso di acqua diretto verso la cellula e causante lo "swelling" o rigonfiamento

2.1.2.3. RVDC e ICln

Una delle principali funzioni associate ad ICln è quella della regolazione del volume cellulare. In seguito ad esperimenti di over-espressione di ICln in oociti di *Xenopus Laevis* in cui si è riscontrato che essa induce una corrente di Cl⁻ rettificante uscente sensibile a nucleotidi con caratteristiche biofisiche molto simili alla corrente IClswell (Paulmichl et al., 1992) suggerendo che ICln sia il candidato molecolare di tale corrente. Inoltre l'over-espressione di ICln in fibroblasti NIH3T3, in cellule SF9 e in cellule MDCK porta ad una attivazione più rapida e ad un'aumentata ampiezza della IClswell durante stress ipotonico, mentre un KO funzionale di pICln (ottenuto utilizzando oligodesossinucleotidi antisense diretti contro mRNA di ICln o anticorpi monoclonali α -ICln) mostra l'effetto opposto sia sull'attivazione che sulla densità della corrente IClswell (Krapivinsky et al., 1994; Gschwentner et al., 1995). L'over-espressione di ICln in *E.coli* rende i batteri tolleranti all'ipotonicità e questo effetto può essere revertito da nucleotidi extracellulari (Ritter et al., 2003). Inoltre è stato identificato un possibile sito di legame per nucleotidi nel secondo β -foglietto di ciascun monomero di ICln. Questo sito mostra una bassa omologia con sequenze note leganti nucleotidi (Saraste et al., 1992) tuttavia la sua localizzazione all'interno di ICln media l'inibizione della corrente anionica associata ad ICln da parte di nucleotidi extracellulari (Paulmichl et al., 1992). La mutazione di tale sito correla con una mancata inibizione della corrente in presenza di nucleotidi extracellulari.

Tuttavia nonostante si sia tentato d'identificare ICln come una componente integrale del canale di cloruro diverse evidenze sono in contrasto con tale ipotesi: in cellule di mammifero in condizioni isotoniche ICln è prevalentemente distribuita nel citosol in forma solubile (circa 80%), il 15% si trova a livello nucleare, mentre solo una piccola frazione, 5%, è localizzata nella membrana plasmatica (Krapivinsky et al., 1994; Emma et al., 1998; Mush et al., 1998). Condizioni di stress ipotonico possono portare, tuttavia, alla traslocazione reversibile di ICln dal citoplasma verso la membrana, come è stato osservato con esperimenti di Western Blot e di FRET (Mush et al., 1998; Ritter et al., 2003). Sembra essere di fondamentale importanza la durata dello stress iposmotico perché l'esposizione di cellule endoteliali di

glioma C6 e EAhy 926 ad una soluzione ipotonica solo per pochi minuti non si traduce in una redistribuzione significativa di ICln (Emma et al., 1998; Buyse et al., 1996). Rimettendo le cellule in soluzione isotonica la proteina ICln torna a localizzarsi nel citoplasma (Mush et al., 1998). La localizzazione intracellulare della proteina è un fatto apparentemente poco conciliabile con il prototipo delle proteine canale negli eucarioti ed ha portato dunque all'ipotesi che ICln sia un regolatore della IClswell (Gschwentner et al., 1999). Quindi sebbene molti studi supportino il legame tra l'espressione di ICln e l'attivazione della corrente uscente di cloruro in seguito a rigonfiamento cellulare, la natura di questo legame non è tuttora chiara.

2.1.2.4. Altre funzioni di ICln

Il pattern d'interazioni proteiche di ICln suggerisce che la proteina, oltre al ruolo di regolazione del volume cellulare, svolga altre funzioni, non direttamente legate alla permeazione degli ioni.

In particolare ICln è coinvolta:

- nella regolazione della morfologia cellulare (Krapivinsky et al., 1998);
- nell'attivazione piastrinica (Larkin et al., 2004);
- nell'angiogenesi (Li et al., 2004);
- nel processamento dell'RNA (Pu et al., 1999).

Una funzione di ICln ben documentata è il suo ruolo nello splicing dell'RNA.

Nel citosol ICln forma due complessi: un complesso 6S che è costituito da ICln ed eterodimeri Sm, D1, D2, D3, B/B1, E, F, G ed un complesso più grande 20S composto da ICln, metiltransferasi PRMT5, MEP-50 e proteine Sm che è chiamato metilosoma (Fürst et al., 2005). L'ipotesi attuale è che il ruolo di ICln sia di sequestrare le proteine Sm neosintetizzate e dirigerle verso il metilosoma che a sua volta metila proteine Sm (Friesen et al., 2001; Friesen et al., 2002; Gilbreth et al., 1998). La proteina PRMT5 lega il dominio acido AD3 all'estremità C-terminale di ICln mentre LSm4 lega il dominio acido AD2 situato immediatamente dopo l' α -elica del dominio PH di ICln (Fürst et al., 2005). La funzione del metilosoma è di modificare, dimetilando, specifiche arginine del dominio GC (ricco in glicine e arginine) di diverse proteine Sm ed in particolare LSm e tale modificazione indirizza queste proteine verso il

complesso SMN (Survival of Motor Neuron) che completa il loro assemblamento nel core dei USnRNP (Friesen et al., 2002). Ciascun SnRNP contiene un core conservato costituito da un anRNA (U1, U2, U4 o U5) e un anello di sette membri di Sm proteine (B, D1, D2, D3, E, F, G). Il core di snRNP si assembla nel citoplasma e successivamente snRNP maturi vengono importati nel nucleo dove agiscono nello splicing del pre-mRNA (Friesen et al., 2002).

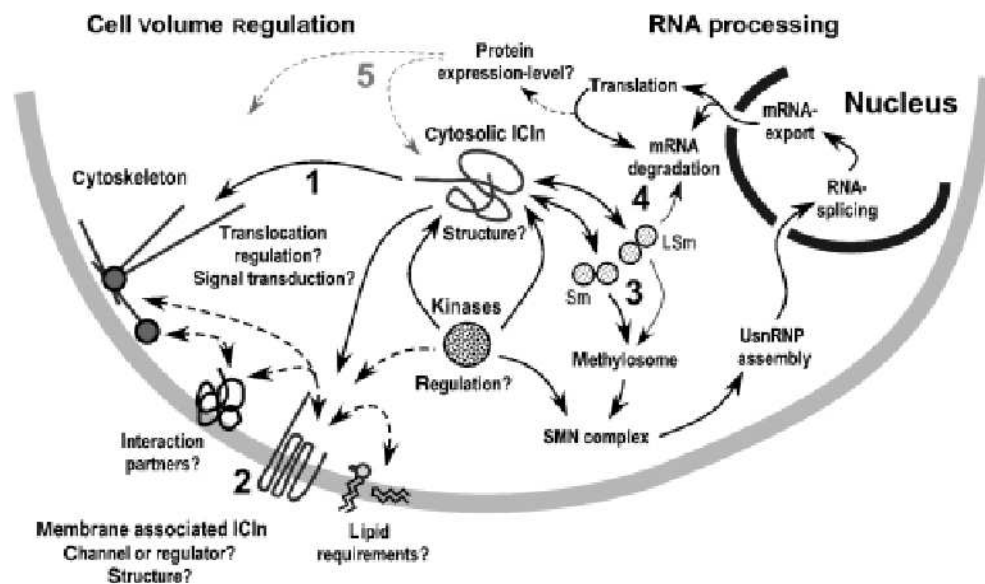


Fig. 6. Funzioni di ICln proposte. 1) l'interazione con il citoscheletro durante la regolazione del volume cellulare può essere coinvolta nella trasduzione del segnale, nella traslocazione di ICln verso la membrana cellulare o nella regolazione di un canale ionico; 2) canale ionico o regolatore di un canale ionico; 3) coordinazione dell'assemblaggio di piccole ribonucleoproteine ricche di uridina mediante il complesso survival of motor neurons (SMN) sequestrando e dirigendo le proteine Sm o LSm al metilosome; 4) potenziale funzione nella degradazione dell'mRNA; 5) ICln può indirettamente regolare i livelli di espressione dell'mRNA o della proteina tramite i pathways 3) e 4). (Tratto da Fürst et al., 2006)

2.1.3. Interazioni di ICln con altre proteine

Poiché ICln si trova al centro di una complessa rete d'interazioni proteiche (Fürst et al., 2006), è di grande interesse identificare e caratterizzare le molecole con cui essa interagisce e comprendere come tali legami potrebbero regolare il suo ruolo sia nel citosol, sia a livello della membrana cellulare.

Vediamo di seguito le varie proteine con cui si è vista interagire, che qui sono state raggruppate in base alla funzione.

2.1.3.1. Proteine coinvolte nello splicing dell'mRNA

È stata scoperta la presenza di ICln nel metilosoma, un insieme funzionale di proteine deputato alla metilazione di alcune proteine dello spliceosoma, il complesso di proteine ed RNA il cui compito è partecipare al processo di splicing dell'RNA messaggero (mRNA), cioè alla rimozione degli introni dal pre-mRNA a formare l'mRNA maturo (Friesen et al., 2001; Meister et al., 2001; Friesen et al., 2002).

- MEP50 (methylosome protein 50). È una proteina di 50 kDa che contiene sei domini WD ripetuti e che fa parte del metilosoma insieme ad ICln, JBP1 e proteine Sm (Meister et al., 2001). MEP50 interagisce direttamente con la proteina JBP1 attraverso i WD repeats che contiene ed interagisce con le proteine dello spliceosoma SmB, SmD2, SmD3, SmE posizionandole in maniera appropriata per essere metilate da JBP1. L'interazione di MEP50 con ICln al contrario è indiretta (Friesen et al., 2002). La struttura delle proteine che contengono domini WD ripetuti presenta un β -propeller che crea una piattaforma stabile permettendo la simultanea interazione con molteplici proteine (Dreyfuss et al., 2002).

- JBP1. Inizialmente tale proteina era stata descritta come IBP72 (ICln Binding Protein, PM=72 kDa) ma poi rinominata JBP1 (Janus Binding Protein 1) o PRMT5 (Protein arginine Methyltransferase 5), omologa della proteina Skb1 di lievito (Krapivinsky et al., 1999), la quale lega le PAK-like chinasi ed è implicata nella regolazione della morfologia e del ciclo cellulare (Gilbreth et al., 1998). È una proteina arginina metiltransferasi ed in particolare JBP1 è una PRMT di tipo II che dimetila in maniera simmetrica i domini ricchi di arginina e di glicina (RG domains) delle proteine SmD1 e SmD3. Si è visto che il legame di JBP1 con ICln è mediato dall'Acidic Domain 3 (Krapivinsky et al., 1999; Emma et al., 1998).

- Proteine Sm. In diverse occasioni sono state evidenziate interazioni di ICln con proteine Sm, in particolar modo con SmD1, SmD2, SmD3, SmB/B', SmX5, SmE, SmG (Friesen et al., 2001; Figeys et al., 2001; Schmarda et al., 2001).

Recentemente attraverso immunoprecipitazione è stato scoperto che anche LSm4, una proteina coinvolta nello splicing e nella degradazione dell'mRNA, è in grado di interagire con una forma tronca di ICln (ICln159) (Fürst et al., 2005).

2.1.3.2. Proteine del citoscheletro

ICln interagisce con proteine del citoscheletro come actina, la proteina eritrocitaria 4.1, l'isoforma non muscolare della catena leggera della miosina suggerendo che ICln possa essere coinvolta nel rimodellamento del citoscheletro indotto dall'ipotonia (Fürst et al., 2002). Alcune di queste proteine possono anche essere responsabili della traslocazione ed ancoraggio in prossimità della membrana plasmatica di ICln durante stress iposmotico (Fürst et al., 2002).

- Miosina: è stata individuata attraverso immunoprecipitazione l'associazione di ICln con una proteina di 17 kDa. Analisi di microsequenziamento hanno rivelato che p17 è l'isoforma non muscolare della catena leggera della miosina la cui funzione non è ancora del tutto chiara (Emma et al., 1998). Il legame tra le due proteine non risulta mediato da nessuno dei tre Acidic Domains di ICln di ratto (Emma et al., 1998).

- Actina: inizialmente l'actina è stata identificata mediante esperimenti di immunoblotting e di immunoprecipitazione (Krapiwinsky et al., 1994). La possibilità di un'interazione tra ICln e l'actina è stata confermata tramite saggi di doppio ibrido (Schwartz et al., 1997) e di elettroforesi bidimensionale (Li et al., 1999), con cui è stato provato un legame con l'F-actina. L'interazione è stata confermata con esperimenti di immunoprecipitazione in cellule renali CD8 (Tamma et al., 2006).

- 4.1R: a seguito di esperimenti di doppio ibrido, la parte C-terminale di ICln umana (AA 103-237) risulta in grado di legare l'isoforma eritroide della proteina 4.1 (4.1R), anche detta Banda 4.1, sugli amminoacidi 162-280, corrispondenti a parte del dominio FERM (Tang et al., 1998). Di recente è stato inoltre riportato che ICln è capace anche di legare altri membri della famiglia delle 4.1: la 4.1B e presumibilmente anche la 4.1G e la 4.1N (Calinisan et al., 2006).

2.1.3.3. Proteine di membrana: le integrine

Le integrine sono molecole eterotrimeriche di adesione cellulare composte da subunità α e β , attraverso cui mediano l'adesione cellula-cellula e cellula-matrice e coordinano i segnali bidirezionali che attraversano la membrana plasmatica. Recentemente è stato dimostrato un coinvolgimento delle integrine nella regolazione dell'osmosi e dei movimenti degli ioni attraverso le membrane cellulari, in particolare controllano il flusso del calcio, del potassio e del cloro sia direttamente (Davis et al., 2002; Haussinger et al., 2003) sia indirettamente (Ritter et al., 2003; Browe et al., 2003; McPhee et al., 1998; Shakibaei et al., 2003; Vom et al., 2003). La più studiata è l'integrina α IIb β 3, specifica per le piastrine, ed è stata utilizzata come modello per studiare l'attivazione delle integrine e per la ricerca di eventuali ligandi target di tali proteine (Larkin et al., 2004) tra cui è compresa anche ICIn. I ligandi legano le integrine preferibilmente nella loro configurazione attivata ed in particolare l'attivazione di α IIb β 3 in risposta alla stimolazione cellulare richiede un cambiamento conformazionale all'estremità extracellulare dell'integrina (Moran et al., 2004). Acyclovir, un agente antivirale, che è un inibitore farmacologico specifico di ICIn con minimi effetti sugli altri flussi di cloruro, inibisce selettivamente l'attivazione delle integrine ed anche l'aggregazione piastrinica suggerendo un ruolo rilevante di ICIn eventi di attivazione delle piastrine (Larkin et al., 2004).

2.2. La proteina 4.1

I quattro membri della famiglia delle proteine adattatrici 4.1 sono espressi in numerosi tessuti, inclusi molti epitelii e rivestono un importante ruolo in diversi processi come soppressione tumorale, regolazione della progressione del ciclo cellulare, nel mantenimento dell'architettura e della polarità della cellula e nel controllo della proliferazione cellulare (Diakowski et L., 2006). La prima proteina della famiglia ad essere individuata è stata la proteina 4.1R, una proteina strutturale multifunzionale di 80 kDa, individuata inizialmente a livello della membrana plasmatica degli eritrociti umani, dove stabilizza la morfologia eritrocitaria e regola proprietà meccaniche della membrana come deformabilità e stabilità, attraverso interazioni con spectrina, actina,

glicoforina C e p55 (Diakowski et al., 2006). Oltre alla proteina prototipo 4.1R, per la quale sono generate un gran numero di varianti con regolazione tessuto-specifica e sviluppo-specifica (Conboy et al., 1993), fanno parte della famiglia altre tre proteine denominate 4.1G (General), 4.1N (Neurons), 4.1B (Brain) (Hoover et al., 2000). Nell'uomo sono stati individuati quattro geni che codificano per le quattro distinte isoforme della proteina 4.1, che prendono il nome dal tessuto in cui sono state isolate. Questi geni sono altamente complessi: sono localizzati su differenti cromosomi e presentano diversi patterns di espressione (Kim et al., 1998; Parra et al., 1998; Peters et al., 1998), contengono diversi esoni e possiedono più di un sito di inizio per la trascrizione; l'mRNA subisce quindi splicing alternativo generando delle varianti che differiscono per la presenza o meno di alcuni domini e che hanno peso variabile (ciò è dovuto, molto probabilmente, anche a modificazioni post-traduzionali quali glicosilazione e fosforilazione).

4.1R è espressa soprattutto nei tessuti emopoietici, polmone, rene, fegato, sistema olfattivo e nel cervello: nel lobo caudato e occipitale, nel putamen ed è stata identificata in modo specifico nelle cellule granulari del cervelletto e nel giro dentato. Questa proteina è localizzata a principalmente livello nucleare e della membrana plasmatica (Conboy et al., 1987; Walensky et al., 1998; Salomao et al., 2008).

4.1G è presente in quasi tutti i tessuti dell'organismo ma in particolare è altamente espressa nel cervello, soprattutto in neuroni ippocampali. Si trova espressa anche nel cuore, placenta, muscolatura scheletrica, polmoni, rene, pancreas e gonadi (Parra et al., 1998). A differenza delle altre tre varianti non sembra espressa nel rene (Parra et al., 1998).

4.1N è l'omologo neuronale di p4.1R con la quale mostra un'identità del 46%, è espressa in quasi tutti i neuroni centrali e periferici di mammifero ed è localizzata a livello delle sinapsi. (Diakowski et al., 2006). Essa regola la plasticità della membrana neuronale attraverso interazioni con spectrina-actina, canali integrali di membrana, recettori e guanilato chinasi di membrana (Ramez et al., 2003). È debolmente espressa anche a livello di polmoni, placenta, muscolo scheletrico, pancreas, retina, cuore e rene (Walensky et al., 1999).

4.1B è stata individuata in popolazioni neuronali nel cervello di topo e specialmente in cellule di Purkinje della corteccia cerebellare, in cellule piramidali della regione ippocampale e nel bulbo olfattivo (Parra et al., 2000). Inoltre è stata individuata nel cuore, polmoni, timo, fegato, pancreas, rene, intestino e testicoli. Questa proteina è localizzata a livello della membrana plasmatica in regioni di contatto cellula-cellula (Parra et al., 2000).

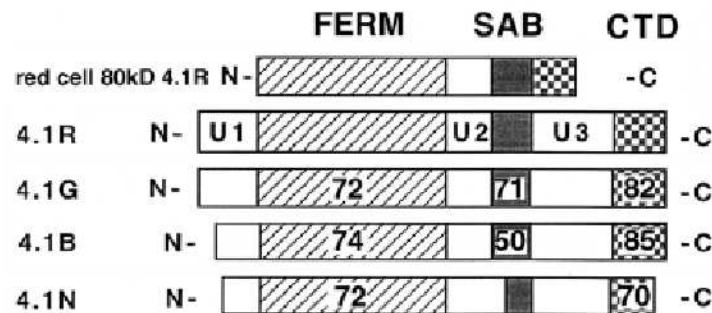


Fig. 7. Organizzazione dei domini delle proteine 4.1. L'allineamento delle proteine 4.1 mostra la presenza di tre domini conservati (FERM, SAB e CTD), indicati con sfumature di grigio e di tre regioni uniche (U1, U2, U3), indicate dai riquadri bianchi. I numeri riportati nei riquadri si riferiscono alla percentuale di identità dei domini conservati delle proteine 4.1G, 4.1B e 4.1N con i corrispondenti domini della 4.1R. La rappresentazione della 4.1R mostra una sola regione U3 che è espressa unicamente nei tessuti epiteliali. Si può notare che il dominio SAB non è conservato nella 4.1N (Calinisan et al., 2006)

2.2.1. Struttura della proteina 4.1

Le isoforme che costituiscono la famiglia di proteine 4.1 sono formate da quattro domini strutturali conservati tra le diverse isoforme: all'N-terminale presentano un dominio FERM (four.1-ezrin-radixin-moesin) di 30 kDa, che media il legame con molte altre proteine, tale dominio è considerato il dominio "firma" della famiglia; un dominio idrofilico di 16 kDa che possiede un sito di fosforilazione da parte della PKC; un dominio SAB (spectrin/actin binding domain) di 10 kDa, presente nei geni per 4.1 di tutti i vertebrati (Hoover et al., 2000) e un dominio di 22-24 kDa al C-terminale (CTD).

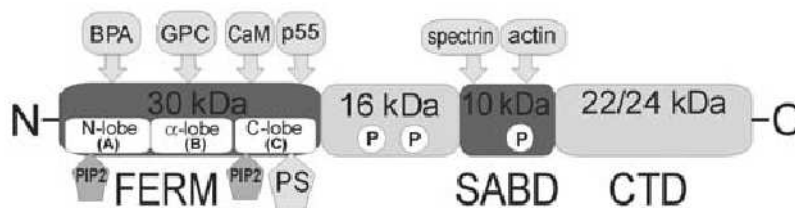


Fig. 8. Schema della struttura delle proteine 4.1. I diversi domini sono evidenziati: CTD carboxyl terminal domain; FERM 4.1-ezrin-radixin-moesin domain, SABD spectrin-actin-binding domain. Sono inoltre evidenziate le proteine che interagiscono con la proteina 4.1 (Diakowski et al., 2006).

Nell'approfondire le funzioni dei diversi domini farò riferimento soprattutto alla proteina 4.1R, che oltre a rappresentare il prototipo per la famiglia è anche quella che è stata oggetto di studio durante il mio internato.

2.2.1.1. Il dominio FERM

Il dominio FERM è il dominio N-terminale di 30 kDa, è codificato dagli esoni 4-12 del gene per la 4.1R ed è responsabile del legame della proteina 4.1R ad altre proteine di membrana come banda 3, glicoforina C (Takakuwa et al., 2000) e CD44 (Nunomura et al., 1997). Interagisce anche con p55 ed altri membri della famiglia di proteine che contengono un dominio PDZ (Chishti et al., 1998), calmodulina (Husain et al., 1985) e con ICln (Tang et al., 1998).

Il FERM presenta anche un sito di legame per tubulina che contiene una sequenza ricca di leucine (Luque et al., 2003) e la tubulina lega questo dominio in cellule non eritroidi (Huang et al., 2004). L'analisi della struttura cristallografica del dominio FERM ha rivelato la presenza di tre lobi chiamati lobo N, lobo α e lobo C, che assumono una conformazione a trifoglio, ognuno dei quali contiene una distinta regione responsabile dello specifico legame con diverse proteine di membrana (Han et al., 2000). Il lobo N, così chiamato perché è il lobo più vicino all'estremità N-terminale, contiene il sito di legame per la proteina banda 3 ed è formato da due foglietti β double-stranded collegati da un α -elica; i foglietti β avvolgono parzialmente l' α -elica (Han et al., 2000). In particolare la sequenza LEEDY codificata dall'esone 5 è il sito di legame per le sequenze IRRRY e LRRRY presenti nel dominio citoplasmatico di

banda 3 (Takakuva et al., 2001). Il lobo α è così chiamato perché è formato da quattro α -eliche organizzate come uno stretto pacchetto e contiene la regione di legame per glicoforina C (Edwards et al., 2001). Il lobo C (C-terminale) è costituito da due foglietti β e un α -elica, una struttura tipica dei domini PH (Diakowski et al., 2006), e presenta i siti di legame per p55 e calmodulina (CaM). Attraverso questi siti di legame il dominio FERM contribuisce alla formazione del complesso ternario 4.1R-glicoforina C-p55. Il lobo C presenta anche siti di legame per fosfolipidi di membrana ed in particolare con fosfatidilserine (PS) (Edwards et al., 2001) e l'associazione con PS impedisce l'interazione di 4.1 con le proteine di membrana (Takakuva et al., 2001). I PS riconoscono un motivo Y233KRS di 4.1R codificato dall'esone 10 (An et al., 2001). Sempre attraverso il lobo C del dominio FERM 4.1R lega PIP2 e tale interazione induce un cambiamento conformazionale del dominio che aumenta l'affinità di legame di 4.1R con la proteina glicoforina C (An et al., 2006). L'interazione con PIP2 gioca un ruolo importante per l'associazione di 4.1R con la membrana plasmatica. Nella regione centrale del dominio FERM, vicino al punto in cui i tre lobi si congiungono, sono presenti due siti di legame di natura idrofobica per calmodulina (CaM), separati da una distanza che va da 7 a 16 AA, un sito Ca^{2+} -sensibile ed un sito Ca^{2+} -insensibile (Han et al., 2000). Il sito di legame per CaM Ca^{2+} -insensibile è localizzato nell' α -elica del lobo C, mentre il sito di legame per CaM Ca^{2+} -sensibile si trova nella regione che congiunge il lobo C e il lobo α (Han et al., 2000). Un aumento dei livelli di Ca^{2+} aumenta il legame di CaM al sito Ca^{2+} -sensibile di 4.1R, modificando la disposizione/conformazione dei tre lobi e causando di conseguenza un indebolimento del legame della proteina 4.1 ad altre proteine partners. Il legame costitutivo di CaM è un modo di generare una risposta estremamente rapida ai cambiamenti delle concentrazioni di Ca^{2+} intracellulari permettendo alterazioni reversibili della morfologia cellulare pur mantenendo l'integrità strutturale degli eritrociti (Han et al., 2000). Ad esempio in presenza di Ca^{2+} la calmodulina riduce l'affinità della proteina 4.1R per il complesso actina-spectrina e questo fa diminuire la stabilità meccanica della membrana (Nunomura et al., 2006). Inoltre analisi cinetiche di binding hanno rivelato che l'interazione di 4.1R con p55 aumenta l'affinità

di legame di p55 per GPC. Mentre il legame di CaM in maniera Ca^{2+} -sensibile a 4.1R diminuisce l'affinità di legame di 4.1R sia per p55 che per GPC, confermando che il complesso ternario possa essere alla base di riorganizzazioni dinamiche della membrana (Nunomura et al., 2006).

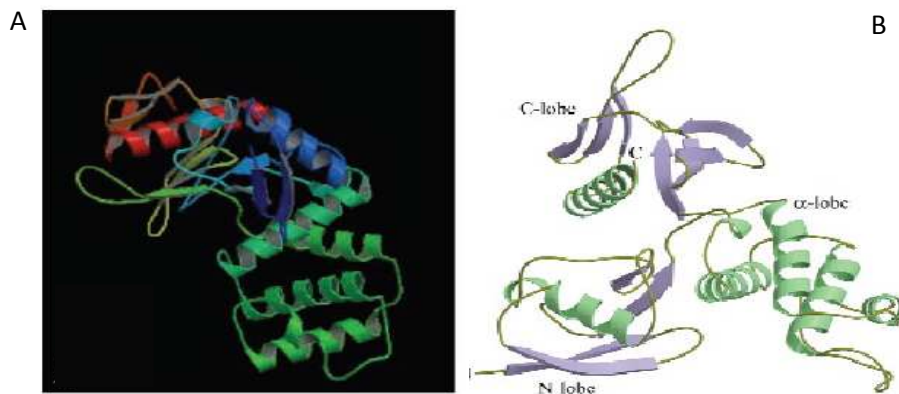


Fig. 9. A: immagine cristallografica del dominio FERM (Diakowski et al., 2006). B: diagramma di Ribbon in cui in verde sono evidenziate le α -eliche, in blu i β -sheets e in giallo i loop (Han et al., 2000) è possibile inoltre distinguere i tre lobi (N-lobe, α -lobe e C-lobe).

2.2.1.2. Il dominio di 16KDa

Il dominio di 16 kDa (regione U2) separa il dominio FERM dal successivo dominio SAB, non presenta nessuna attività di legame nota ma contiene due residui di serina, Ser312 e Ser331, che possono essere fosforilati da PKA e PKC (Diakowski et al., 2006). Questo suggerisce che il dominio di 16 kDa regoli l'interazione di 4.1R con banda 3, glicoforina C, spectrina e actina (Manno et al., 2005).

2.2.1.3. Il dominio SABD

Il dominio SABD è un dominio di 10 kDa codificato dagli esoni 13, 16 e 17 del gene per la 4.1R. Tale dominio media l'interazione con spectrina e actina (Correas et al., 1986), inoltre lega U2AF35 e la subunità α dell'importina- α , una proteina necessaria per l'import della proteina 4.1R nel nucleo (Gascard et al., 1999; Luque 2003). Il dominio SABD contiene residui come Ser467 e Tyr418 che possono essere fosforilati da diverse chinasi (Hoover et al., 2000).

La sequenza consenso minima che è necessaria per l'interazione con spectrina e actina è una sequenza di 21 aminoacidi costituita da residui di Lys407 Glu427 codificata dall'esone 16 (Diakowski et al., 2006). La formazione del complesso ternario composto da 4.1R, spectrina e actina regola la resistenza meccanica e l'elasticità della membrana degli eritrociti (Conboy et al. 1998). La struttura primaria di questo dominio è altamente conservata in molti vertebrati indicando quindi che anche la sua funzione sia altamente conservata, ad eccezione della 4.1N che presenta un SABD differente che non lega la spectrina e l'actina (Gimm et al., 2002).

2.2.1.4. Il dominio CTD

Il dominio CTD, di 22/24 kDa, è codificato dagli esoni 18-21 della 4.1R; i 2 kDa di differenza tra la proteina 4.1Ra e 4.1Rb sono il risultato di una conversione di asparagina Asp502 in Asn502 che avviene durante l'invecchiamento degli eritrociti (Inaba et al., 1992). Di conseguenza cambia la mobilità delle due isoforme di 4.1R in gel di SDS ed esse possono essere distinte. Il dominio CTD non è stabile e viene rapidamente processato in un frammento di 15 kDa dalla chimotripsina (Scott et al., 2001). Questo frammento più piccolo è maggiormente stabile ed è composto da 5-6 foglietti β e un' α -elica. Mutazioni che terminano la proteina prima del CTD sono recessive letali embrionali, evidenziando funzioni essenziali per questo dominio (Chishti et al., 1998). Tale dominio interagisce con diverse proteine fra cui recettori di membrana e tight junction proteins, come occludina, zonula occludens-1 e zonula occludens-2 (Mattagajasingh et al., 2000). Il dominio CTD sembra essere importante per mediare il ruolo di 4.1R nella regolazione della divisione cellulare attraverso l'interazione con i centrosomi e il fuso mitotico. Infatti, la proteina nucleare NuMA associata all'apparato mitotico lega un motivo di tre residui di valina presente nel CTD di 4.1R (Calinisan et al., 2006). Inoltre in eritrociti il dominio CTD può legare il polipeptide eIF3-p44 che è una subunità del complesso eIF3 (Eukaryotic Translation Factor 3) suggerendo un possibile ruolo di 4.1R come anello di congiunzione tra citoscheletro e apparato traduzionale (Tang et al., 2000). Oltre ai quattro domini altamente conservati, le proteine appartenenti a questa famiglia

contengono le regioni U1, U2 e U3, disseminate tra i domini conservati, che agiscono da modulatori delle interazioni mediate dalla proteina 4.1 attraverso i domini conservati e possono conferire specifiche funzioni a ciascuna proteina 4.1.

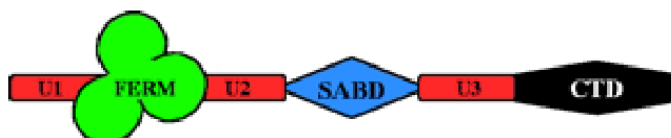
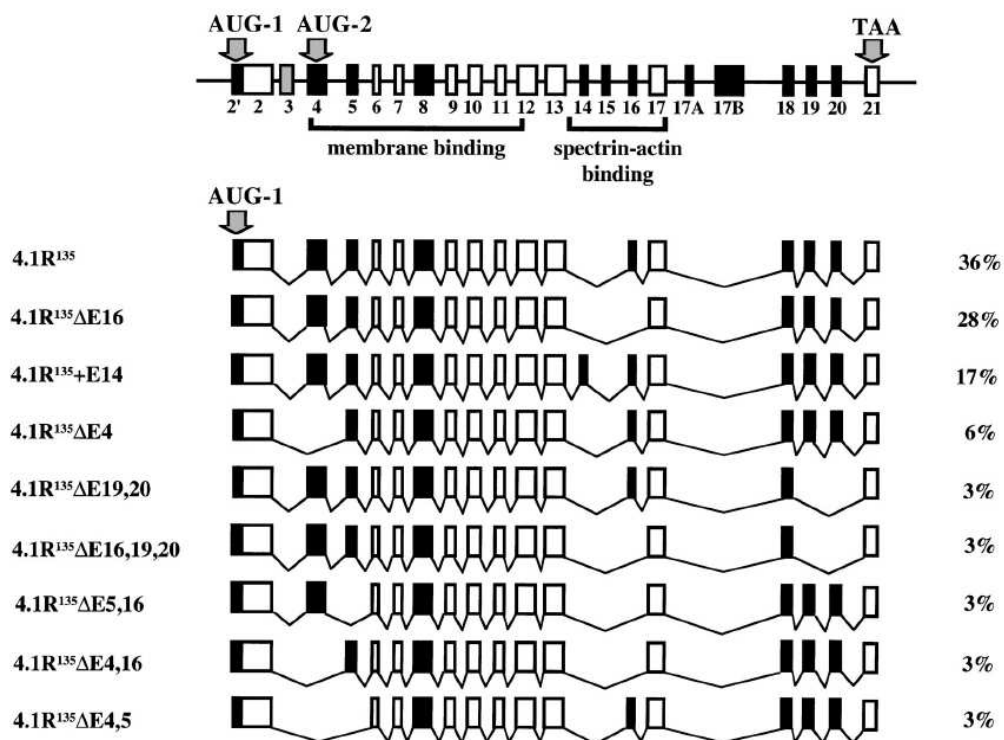


Fig. 10. Schema della struttura delle proteine 4.1. I diversi domini sono evidenziati

È stato dimostrato che la regione unica U1 (non presente in tutte le isoforme di 4.1R) modula la traslocazione nel nucleo della proteina 4.1R (Luque et al., 1999). Questa regione inoltre interagisce con la proteina calmodulina in maniera strettamente calcio-dipendente e con le proteine associate al centrosoma (Gascard et al., 2006). La regione unica U1 presenta inoltre un sito di fosforilazione per la chinasi ciclina dipendente cdc2 il cui livello di fosforilazione varia durante il ciclo cellulare (Calinisan et al., 2006). La presenza o meno della regione U1 permette di dividere le proteine 4.1R in due sotto gruppi: isoforme ad alto peso molecolare e isoforme a basso peso. Per quanto riguarda le regioni uniche U2 e U3, non sono ancora stati identificati i partners di legame. La regione unica U2 contiene un residuo chiave di serina che rappresenta il substrato primario per la proteina chinasi C (PKC) fosforilazione dipendente (Calinisan et al., 2006). La fosforilazione di tale serina porta ad una diminuzione dell'interazione di 4.1R con la proteina transmembrana glicoforina C e con spectrina e actina (Gascard et al., 2006). Data la conservazione di questo residuo di serina e dei circostanti aminoacidi in tutte le proteine 4.1, è ipotizzato che la fosforilazione dipendente da PKC giochi un ruolo chiave nella regolazione della funzione di 4.1G, 4.1N e 4.1B e 4.1R. Nel corso degli anni sono state identificate numerose isoforme, 7 isoforme principali più 11 varianti, della proteina 4.1R, espresse sia in eritrociti che in cellule non eritrocitarie (Parra et al., 1998). Queste isoforme variano nelle dimensioni e mostrano differenze strutturali e funzionali

notevoli, e spesso più isoforme sono espresse all'interno di uno stesso tipo cellulare. La grande eterogeneità delle isoforme di 4.1 (Fig. 11) è generata dal complesso splicing alternativo del pre-mRNA di 4.1, dall'uso differente di due siti d'inizio per la traduzione e da modificazioni post-traduzionali delle proteine 4.1 (Conboy et al., 1998). In particolare l'utilizzo di due siti alternativi "splice acceptor" all'estremità 5' dell'esone 2 genera due popolazioni di RNA di 4.1R: una che include un AUG a monte (AUG-1) e codifica per isoforme di 4.1R ad alto peso molecolare (135 KD) e un'altra che salta AUG-1 e codifica 4.1R a partire da un AUG a valle (AUG-2) situato nell'esone 4 che genera isoforme a basso peso molecolare (80 KD) (Gascard et al., 1998). In pratica le isoforme ad alto o basso peso molecolare differiscono per la presenza o meno della regione U1 all'estremità N-terminale (Luque et al., 1999).



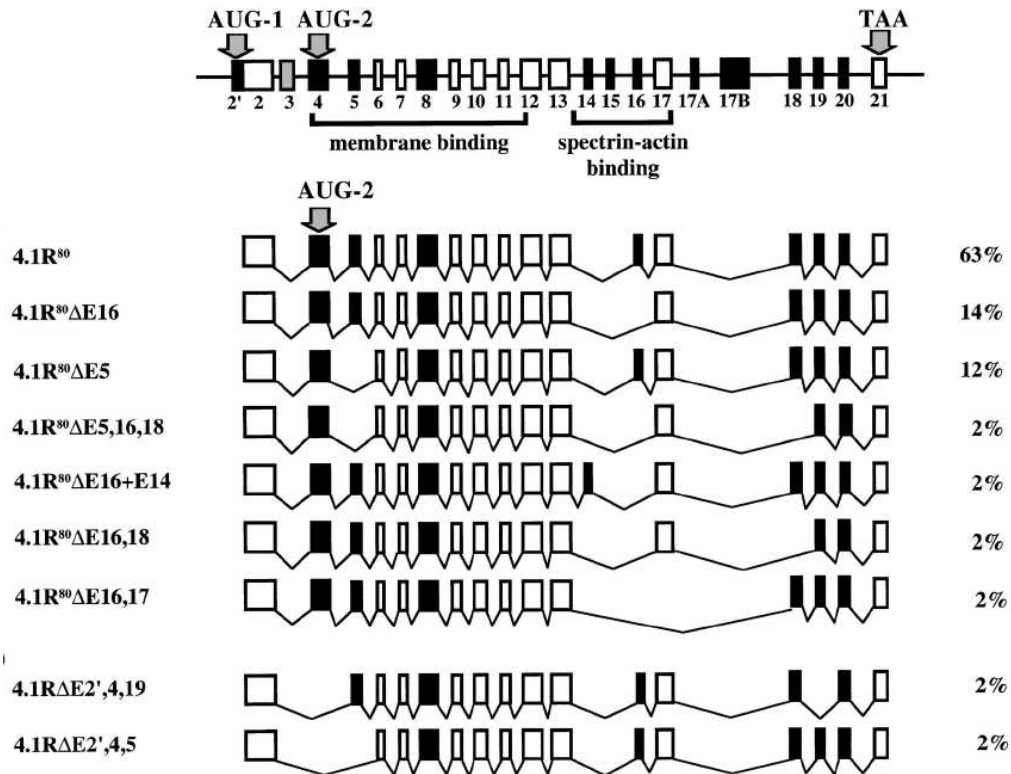


Fig. 11. Sono mostrate alcune delle isoforme esistenti di 4.1R. In figura A è riportata l'organizzazione in esoni del gene umano per la 4.1R delle isoforme prodotte dal sito di inizio trasduzione AUG-1 (isoforme lunghe). All'inizio della figura è rappresentata l'mRNA della 4.1R con gli esoni alternativi, gli esoni costitutivi e gli esoni non codificati. I due siti di inizio trasduzione AUG1 e AUG2 sono situati all'esone 2 e all'esone 4 rispettivamente. In B sono rappresentate le isoforme mancanti dell'AUG-1, quindi le isoforme corte (Gascard et al., 1998)

Delle sette isoforme di p4.1R isolate, quattro localizzano principalmente a livello nucleare mentre le altre tre nel citoplasma. Attraverso un'analisi comparativa della composizione in esoni unita all'analisi della distribuzione intracellulare delle diverse isoforme, è emerso che per la localizzazione nucleare delle diverse isoforme di 4.1R è necessaria la presenza di una regione basica conservata, KKKRER, chiamata "core region" che viene codificata dall'esone 16 (Gascard et al., 1999). Infatti, attraverso immunofluorescenza si è visto che 4.1R135 localizza nel citoplasma e nel nucleo ad esclusione dei centrioli. Al contrario 4.1R135 E16 è prevalentemente espressa nel citoplasma con nessun segnale nucleare (Luque et al., 1999). Studi successivi hanno dimostrato che la presenza del

motivo KKKRER è necessaria ma non sufficiente per la localizzazione nucleare di p4.1R. Proteine grandi come 4.1R non possono diffondere liberamente nel nucleo ma sono trasportate attraverso i pori nucleari da proteine shuttle specializzate che legano specifici domini delle proteine da trasportare chiamati Segnali di Localizzazione Nucleare, NLS (Görlich et al., 1998). In particolare il cluster KKKRER è stato identificato come un putativo dominio NLS e mutazioni nella sua sequenza comportano l'esclusione nucleare di 4.1R (Luque et al., 1998). L'esone 5 invece codifica per sequenze che bloccano l'ingresso nel nucleo e derivano così isoforme di 4.1R che sono prevalentemente citoplasmatiche. In particolare l'esone 5 codifica per una sequenza idrofobica ricca di leucine (L26LKRVCEHLNLL) che è molto simile alle sequenze Nuclear Export Signals (NESs). In caso di simultanea espressione degli esoni 5 e 16 l'effetto di targeting nucleare dell'esone 16 è dominante sull'effetto inibitorio dovuto all'espressione dell'esone 5 (Luque et al., 2000).

2.2.2. Funzioni della proteina 4.1

La proteina 4.1R è una componente strutturale essenziale dello scheletro sub-membranario degli eritrociti circolanti perché partecipa sia ad interazioni orizzontali all'interno del network di proteine citoscheletriche (come spectrina, actina, adducina, tropomiosina, tropomodulina, dematina e p55) sia ad interazioni verticali, connettendo le proteine citoscheletriche alle proteine integrali di membrana (Pinder et al., 1993). La regione N-terminale di 4.1R interagisce attraverso il dominio FERM con tre proteine integrali di membrana principali: glicoforina C, banda 3 e CD44. Il dominio SABD a valle interagisce con spectrina e actina ed è fondamentale per la formazione del complesso ternario costituito da 4.1R-spectrina-actina che regola la deformabilità e la resistenza meccanica della membrana (Schischmanoff et al., 1995). Interazioni dinamiche tra queste proteine consentono quindi la circolazione degli eritrociti anche nei capillari sanguigni più stretti perché essi possono deformare reversibilmente la loro morfologia classica a disco biconcavo senza però frammentarsi.

L'affinità di p4.1R con proteine di membrana è regolata dall'interazione con

Calmodulina che può legare sia siti di legame Ca^{2+} -dipendenti che Ca^{2+} -indipendenti (Nunomura et al., 2000). In presenza di Ca^{2+} la calmodulina riduce l'affinità della p4.1R con il complesso spectrina-actina e con banda 3 diminuendo la stabilità della membrana (Nunomura et al., 2006). Allo stesso modo, la fosforilazione di p4.1R riduce la sua capacità d'interagire con la spectrina e quindi di formare il complesso ternario 4.1R-spectrina-actina, inducendo la dissociazione di glicoforina C dal citoscheletro submembranario. L'effetto finale di questo processo è un maggiore rilassamento del citoscheletro e della flessibilità della membrana (Manno et al., 2005). La p4.1R può essere fosforilata da una grande varietà di chinasi sia in vivo che in vitro, fra cui caseina chinasi, tirosina chinasi, PKA e PKC (Pinder et al., 1995; Horne et al., 1990). Inoltre attraverso il dominio FERM p4.1 interagisce direttamente con fosfolipidi di membrana ed in particolare con fosfatidilserine (PS) e l'associazione con PS impedisce l'interazione di 4.1R con le proteine di membrana (Takakuva et al., 2001). Sempre attraverso il dominio FERM 4.1R lega PIP2 e tale interazione induce un cambiamento conformazionale del dominio che aumenta l'affinità di 4.1R con la proteina glicoforina C (An et al., 2006). Il ruolo chiave della proteina 4.1 nell'architettura e nella funzionalità della membrana è dimostrato dall'osservazione che una drammatica riduzione o una totale perdita dell'espressione di tale proteina porta ad un concomitante decremento nel livello d'espressione di proteine transmembrana e proteine associate alla membrana che normalmente interagiscono con la proteina 4.1. Topi knockout per 4.1R mostrano eritrociti con morfologia anomala, minor stabilità di membrana dovuta alla riduzione dei livelli di glicoforina C e p55 in membrana e ridotta espressione di altre proteine citoscheletriche come spectrina e anchirina. Questo suggerisce che la perdita di p4.1R comprometta l'assemblamento del citoscheletro sottomembranario nei progenitori eritroidi (Shi et al., 1999). Quindi ci sono due funzioni separate per 4.1R: stabilizzazione meccanica della membrana e targeting delle proteine di membrana. Inoltre topi mancanti della 4.1R presentano difetti neurocomportamentali tipici di disfunzioni cerebrali, riguardanti l'equilibrio, la coordinazione e la memoria, dimostrando l'importanza di questa isoforma in alcune regioni del cervello, nel giro dentato dell'ippocampo e nelle cellule

granulari del cervelletto, dove c'è una forte espressione dell'mRNA di tale proteina. (Walensky et al., 1999). Analisi genetiche hanno evidenziato che mutazioni a carico della proteina 4.1R sono alla base di diverse forme di Ellissocitosi Ereditaria (HE), una patologia genetica ereditaria che si manifesta clinicamente come un'anemia emolitica causata dalla perdita della normale morfologia discoidale dei globuli rossi (Conboy et al., 1993). In una forma di HE con una specifica delezione del dominio SABD, i difetti eritrocitari sono identici a quelli causati da una completa assenza della proteina 4.1 (Conboy et al., 1990; Marchesi et al., 1990), a dimostrazione dell'importanza del dominio SABD per una corretta funzione della 4.1 negli eritrociti. In un'altra famiglia di HE, invece, la mancanza di uno specifico sito di binding del dominio FERM non provoca sintomi correlati alla mancanza della 4.1, indicando che questo sito non è di fondamentale importanza per la funzione della 4.1R, che potrebbe, altrimenti, essere svolta da paraloghi della 4.1 in tessuti non eritroidi (Jons et al., 1992; Conboy et al., 1993). All'inizio si pensava che i membri della famiglia delle proteine 4.1 avessero esclusivamente un ruolo strutturale nelle cellule, mentre oggi vi è una forte evidenza del loro coinvolgimento in altre funzioni cellulari tra cui:

- partecipano al mantenimento della polarità della cellula (Lamb et al., 1998);
- intervengono nel controllo della divisione cellulare (Correas et al., 1991; Perez-Ferreiro et al., 2004) in quanto partecipano alla formazione del fuso mitotico e dei poli del fuso interagendo con i microtubuli mitotici (Huang et al., 2004);
- intervengono nel mantenimento del volume cellulare in risposta a stress osmotico (Tang et al., 1998);
- hanno un ruolo importante nella proliferazione (Jiang et al., 2005);
- intervengono nella morfogenesi cellulare e nella regolazione di alcuni fattori di trascrizione nel nucleo, dal momento che intervengono nelle maggiori vie di trasduzione del segnale (Scoles et al., 1998).
- sembra che la proteina 4.1R, così come altri membri della stessa superfamiglia (in particolare la 4.1B), rivesta anche un importante ruolo nella soppressione dei tumori e nella regolazione della proliferazione cellulare (Gutman et al., 2000; Robb et al., 2003; Kuns et al., 2005).

Sembra inoltre che le varie isoforme di 4.1 espresse in eritroblasti possano contribuire in maniera significativa alla funzione e all'architettura nucleare e centrosomale (Brittin et al., 2006). Le 4.1 R giocano un ruolo molto importante per il centrosoma in quanto contribuiscono al mantenimento dell'organizzazione radiale dei microtubuli (Perez-Ferreiro et al., 2004). Sebbene la 4.1R sia localizzata nella membrana delle cellule nucleate e degli eritrociti anucleati, molte cellule che possiedono un nucleo presentano appunto una localizzazione nucleare di questa proteina (Tange et al., 2000). Proteine che interagiscono con 4.1R e che possiedono una localizzazione principalmente extranucleare, in particolare l'actina, sono state viste anche nel nucleo e questo porta ad ipotizzare che 4.1R possa prendere parte all'organizzazione dell'architettura nucleare (Han et al., 2000). Una delle funzioni nucleari di questa proteina potrebbe dipendere dalla sua capacità di legare fattori di splicing e regolare così il processamento dell'RNA (Lallena et al., 1998; De Carcer et al., 1995; Krauss et al., 1997); un altro studio indica che la proteina 4.1 regola la formazione del fuso mitotico (Mattagajasingh et al., 1999): il dominio C-terminale della 4.1R lega la proteina NuMA, che forma un complesso molecolare con la dineina, essenziale per la formazione del fuso mitotico. L'overespressione della 4.1R causa, però, un'errata localizzazione della proteina NuMA e, di conseguenza, morte cellulare. La proteina 4.1R, perciò, è importante non solo a livello della membrana per l'organizzazione del citoscheletro, ma anche nel nucleo.

3. SCOPO DEL LAVORO

ICln e le proteine appartenenti alla famiglia delle 4.1 sono proteine coinvolte in numerose funzioni cellulari. Per ICln inizialmente si pensava ad un ruolo riguardante prettamente la regolazione del volume cellulare, attraverso l'attivazione e la modulazione della corrente IClswell attivata in seguito a stress di natura ipo-osmotica. Infatti, nonostante non sia ancora stata chiaramente definita la natura molecolare di ICln, è evidente come questa proteina giochi un ruolo fondamentale nei processi omeostatici racchiusi sotto il nome di RVD (Regulatory Volume Decrease). Nel corso degli anni, parallelamente ad esperimenti che analizzavano le diverse e numerose proteine in grado di interagire con ICln, si è cominciato a proporre per ICln altre possibili funzioni, non strettamente riguardanti la regolazione del volume cellulare: il processamento dell'RNA e meccanismi angiogenetici attraverso le interazioni con proteine coinvolte nello splicing (Pu et al., 1999; Friesen et al., 2001; Meister et al., 2001; Friesen et al., 2002; Li et al., 2004); la regolazione della morfologia cellulare e del citoscheletro, sulla base di interazioni con l'actina, la miosina e la 4.1 (Krapivinsky et al., 1994; Emma et al., 1998; Tang & Tang, 1998); la regolazione delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare, ad esempio riguardante i meccanismi di aggregazione delle piastrine, attraverso l'interazione con proteine come le integrine (Larkin et al., 2004). Il quadro delle possibili interazioni di ICln si è rivelato talmente complesso, da arrivare a proporre per la proteina il ruolo di "connector hub": una componente chiave nelle interazioni proteiche riguardanti i più disparati ambiti molecolari.

Anche le proteine 4.1, capostipite delle quali è l'isoforma tipica eritroide 4.1R, sono state inizialmente associate semplicemente alla regolazione della struttura e della integrità della membrana plasmatica dei globuli rossi. Analogamente alla proteina ICln, anche per le 4.1 si sono poi individuate numerose ulteriori funzioni, alcune delle quali dipendono fortemente dalla interazione con vari partner molecolari. In particolare le 4.1 formano complessi multimolecolari con altre proteine strutturali e proteine coinvolte nelle vie di signaling (Bennet & Baines, 2001; Perez-Ferreiro et al., 2004; Calinisan et al., 2006; Diakowsky et al., 2006; Chen et al., 2011). Scopo del mio lavoro è stato quello di analizzare le conseguenze dell'interazione tra queste due interessanti componenti del proteoma cellulare, sia in termini di localizzazione, che in termini di aspetti funzionali. In particolare è stata utilizzata l'isoforma R della proteina 4.1, la 4.1R, in quanto rappresenta il prototipo della famiglia ed è la prima per la quale sia stata descritta una interazione con la proteina ICln (Tang & Tang, 1998). In particolare, in studi precedentemente svolti nel laboratorio dove ho svolto la tesi, sono state analizzate due isoforme di 4.1R, ad alto e a basso peso molecolare: la 4.1R¹³⁵ e la 4.1R⁸⁰, identiche se non per la presenza o meno della regione N-terminale U1 di 209 aminoacidi. Questi esperimenti hanno evidenziato come entrambe le isoforme interagiscano con ICln. Tale interazione è stata dimostrata, in vivo, attraverso esperimenti di FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) usando la tecnica dell'Acceptor photobleaching e attraverso esperimenti di coimmunoprecipitazione (Figura 1 e 2) (Bazzini et al., 2008). L'interazione, per lo meno per l'isoforma 4.1R⁸⁰, sembra aumentare in condizioni di ipo-osmolarità. Un ulteriore dato di estremo interesse emerso negli studi precedenti è che le due proteine sembrano influenzare reciprocamente la localizzazione subcellulare. In particolare l'over-espressione di ICln induce una delocalizzazione di 4.1R dalla membrana (Figura 4 e 5). Partendo da questi dati, scopo del mio lavoro è stato quello di approfondire l'effetto di ICln sulla localizzazione di 4.1R. Considerando poi che la localizzazione e la funzione delle due proteine è dipendente dalle interazioni con il citoscheletro cellulare, sono stati effettuati esperimenti volti ad analizzare i possibili effetti di ICln sul legame fra 4.1R e l'actina.

Un secondo aspetto di cui mi sono occupato, considerando l'interessante ruolo svolto dalle due proteine all'interno della cellula, ha riguardato le conseguenze funzionali di tale interazione. In particolare ci siamo focalizzati su tre aspetti: la regolazione del volume, la morfologia cellulare e la proliferazione cellulare. Per quanto riguarda il primo punto, sono stati effettuati esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell per osservare gli effetti dell'over-espressione delle isoforme di 4.1R e di ICln sulla corrente ICIs_{well} (e quindi conseguentemente sui meccanismi di RVD). Per quanto riguarda la morfologia cellulare, abbiamo sviluppato un protocollo di Correlative Light Scanning Electron Microscopy (CLEM) per analizzare se l'overespressione delle diverse isoforme di 4.1R e di ICln potessero influenzare la morfologia della cellula (numero di filopodi e area cellulare). Per quanto riguarda la proliferazione cellulare, considerando che sia le 4.1 che ICln sono state correlate alla regolazione della proliferazione (Tran et al., 1999; Gutmann et al., 2000; Perry et al., 2000; Huang et al., 2001; Li et al., 2004), abbiamo effettuato test per osservare se e come l'interazione fra le diverse isoforme di 4.1R e ICln possa andare a modificare i livelli di crescita cellulari.

4. MATERIALI E METODI

4.1. Colture cellulari

Gli esperimenti sono stati condotti su cellule HEK 293 Phoenix (Human Epithelial Kidney). Le cellule sono state fatte crescere a 37 °C, in presenza di 5% CO₂ in un terreno minimo MEM (Minimum Essential Medium, M5650, Sigma) complementato con l'aggiunta di siero bovino fetale (FBS, 14-801F, Lonza) al 10%, di L-glutamina 2 mM, penicillina 280 mM streptomycina 144 mM e 1 mM di acido piruvico. Le cellule sono seminate in piastre petri e successivamente sottoposte ad eventuali passaggi di tripsinizzazione. Lavorando sotto cappa a flusso laminare in condizioni di sterilità, una volta raggiunto l'80-90% di confluenza si preleva il terreno dalle piastre petri e le cellule vengono lavate con PBS (Phosphate Buffered Saline) al fine di rimuovere il terreno residuo per evitare l'inibizione dell'azione della tripsina da parte delle proteine contenute nel siero. Una volta rimosso il PBS, viene aggiunto PBS contenente 0.05% tripsina-EDTA si lascia agire l'enzima per qualche minuto (in incubazione a 37 °C), fino a quando le cellule non si staccano dal fondo della piastra. Per bloccare l'effetto della tripsina si aggiunge un volume opportuno (variabile in base al volume delle petri in cui le cellule sono coltivate) di terreno. Le cellule vengono poi seminate nuovamente in altre piastre di volume variabile a seconda del tipo di esperimento da condurre.

Composizione del terreno:

Minimun Essential Medium (M5650 Sigma)	435 ml
FBS10%	50 ml
L-glutammina 200 mM	5 ml
Penicillina 100 U/ml Streptomicina 0.1 mg/ml	5 ml
Acido piruvico 100 mM	5 ml

Composizione del PBS 1X:

NaCl	136.89 mM
KCl	2.69 mM
Na ₂ HPO ₄	3.21 mM
KH ₂ PO ₄	1.47 mM
NaOH	1 mM
pH	7.4

4.2 Produzione di batteri competenti

Per procedere con la trasformazione batterica è stato necessario rendere i batteri in grado di assumere il plasmide.

- sono stati versati 5 ml di terreno di coltura liquido LB in una Falcon a cui successivamente sono stati aggiunti i batteri XL1Blue, conservati a -80°C, grattandoli con un'ansa sterile dal glicerolato;
- la Falcon è stata poi incubata a 37°C overnight;
- il giorno successivo sono stati prelevati 2 ml di coltura che sono stati aggiunti a 200 ml di terreno LB; la coltura è stata fatta crescere fino ad ottenere una densità ottica pari a circa 0.7;
- i batteri sono trasferiti in provette sterili da centrifuga, lasciati in ghiaccio 30 minuti e poi centrifugati a 3000 rpm con rotore swing out per 15 minuti a 4°C. Il sovrinatante viene eliminato e il pellet risospeso delicatamente in 2 ml (per 200 ml di coltura di partenza) di buffer RF1 freddo. Sono stati poi raccolti

gli 8 ml totali in una provetta sterile da centrifuga da 15 ml, lasciati in ghiaccio per 30 minuti e centrifugati a 3000 g per 10 minuti a 4° C e risospesi in 2 ml di buffer RF2.

Sono state quindi aliquotate frazioni da 100 µl in eppendorf sterili, immediatamente congelate in azoto liquido e tenute a -80° C fino al momento della trasformazione.

Soluzioni (sterilizzata per filtrazione):

	RF1	RF2
RbCl	0.1 M	10 mM
Acetato di potassio KOAc	60M	-
CaCl ₂	10M	75 mM
Glicerolo	15% (v/v)	15% (v/v)
MOPS	-	10mM
pH	pH 5.8 con acido acetico	pH 6.8 con NaOH

4.3 Trasformazione batterica

La trasformazione batterica consiste nell'inserire DNA esogeno in cellule riceventi. Affinché ciò avvenga occorre rendere competenti i batteri. Nel corso del mio stage ho utilizzato batteri precedentemente resi competenti con la tecnica del calcio cloruro e tenuti congelati a -80° C (per preservare la competenza) fino al momento della trasformazione.

Protocollo della trasformazione: un'aliquota da 100 µl di batteri competenti XL1-Blue è stata rimossa dal freezer e messa immediatamente in ghiaccio per 5 minuti. Una volta accertato che le cellule fossero scongelate si procede con l'aggiunta di 1 µl di DNA plasmidico alle cellule; si può miscelare delicatamente utilizzando il puntale. L'eppendorf viene lasciata in ghiaccio per 15 minuti. In seguito si sottopongono i batteri ad uno shock termico portandoli da 4° C a 42° C per 45 secondi e infine lasciati per 2 minuti in ghiaccio.

Vengono aggiunti 250 µl di LB addizionato con glucosio 20 mM e si lasciano riposare i batteri a 37° C per circa 60 minuti, in modo tale che i batteri che

hanno acquisito il DNA plasmidico abbiano il tempo di produrre l'enzima necessario per distruggere la kanamicina del terreno. Infine vengono piastrati su una piastra petri di LB agar contenente l'antibiotico per la selezione dei cloni trasformati con DNA plasmidico. Dopo aver atteso che il liquido fosse completamente assorbito, si procedeva a invertire la piastra ed a incubare overnight a 37 °C.

4.4 Miniprep

Dopo l'incubazione si prelevano dalla piastra i cloni con uno stuzzicadenti sterile e si inoculano in 2 ml di terreno liquido LB contenente kanamicina 30 g/ml. Le colture vengono lasciate a 37 °C, in agitazione, per circa 16 ore. Si procede quindi con l'estrazione plasmidica, secondo il seguente protocollo:

Si prelevano 1.5 ml da ogni tubo di microbiologia e si mettono in una eppendorf da 2 ml. Si centrifuga per 10 minuti a 10000 rpm. Il surnatante viene scartato.

Viene risospeso il pellet in 100 µl di soluzione I fredda e viene tenuto 5 minuti a temperatura ambiente.

Si aggiungono 200 µl di soluzione II, la cui funzione è quella di portare alla lisi cellulare e alla denaturazione controllata di proteine e DNA genomico. Si mescola delicatamente per inversione e si lascia agire per 5 minuti a temperatura ambiente

Si aggiungono 150 µl di soluzione III, la cui funzione è quella di far precipitare le proteine e neutralizzare il pH acido della soluzione II, interrompendo quindi la reazione di denaturazione. Si mescola delicatamente e si lascia agire 5 minuti in ghiaccio. Si centrifuga per 15 minuti a 13000 rpm.

Si trasferiscono 400 µl di surnatante, che dovrebbe contenere il plasmide, in una nuova eppendorf.

Il DNA plasmidico viene precipitato in etanolo. Si aggiunge 1 ml di etanolo 100% e si vortexa. Il DNA in etanolo viene quindi posto per 20 minuti a -80 °C, per facilitare la sua precipitazione.

Si centrifuga per 30 minuti a 13000 rpm; e il surnatante viene eliminato. Si

lava il pellet con 750 µl di etanolo 70% freddo. Si centrifuga per 5 minuti a 13000 rpm.

Si lascia asciugare il pellet per 10 minuti ed infine si risospende in 20 µl di H₂O milliQ.

Al termine dell'estrazione, i DNA plasmidici sono stati controllati tramite analisi di restrizione e corsa su gel di agarosio.

Miscela di digestione:

- Plasmide
- Enzima di restrizione
- Buffer specifico per l'enzima utilizzato
- Sample buffer
- H₂O MilliQ

Soluzione 1	Soluzione 2	Soluzione 3
50 mM glucosio	0.2N NaOH	3 M KOAc
25mM Tris pH 8	0.1% SDS	1.5% acido acetico glaciale
10mM EDTA	-	pH 4.8

4.5 Maxiprep

Per amplificare i plasmidi d'interesse (YFP-N e YFP-C) siamo partiti inoculando un singolo clone di una piastra contenente batteri trasformati col plasmide d'interesse in 1 ml di terreno LB addizionato dell'antibiotico kanamicina 30 g/ml.

Il pre-inoculo è stato fatto crescere per 7/8 ore a 37 °C in agitazione e quindi diluito in 250 ml di LB+ antibiotico e fatto crescere overnight a 37 °C con agitazione. La mattina le cellule batteriche sono state raccolte in un provetto da 250 ml e centrifugate a 3500 xg, 45 minuti a 4 °C. Si è proceduti all'estrazione del DNA plasmidico utilizzando il kit della Nucleobond.

Protocollo:

il pellet contenuto nei provettoni viene risospeso in 12 ml di buffer S1 freddo.

Si aggiungono 12 ml di buffer S2 a temperatura ambiente e si agita con

cautela il provettone 6-8 volte. Si aspettano poi 5 minuti a temperatura ambiente.

Si aggiungono 12 ml di buffer S3 freddo, è il buffer di neutralizzazione: riporta il PH neutro e rinatura. Si agita nuovamente il provettone 6-8 volte e poi si aspettano 5 minuti in ghiaccio. Il lisato viene chiarificato per filtrazione su carta e applicato alla colonna contenente resina Norgen (per legare gli acidi nucleici), pre-equilibrata con 6 ml di buffer N2.

Si procede lavando la colonna con 18 ml di Buffer N3. L'operazione viene ripetuta una seconda volta.

Il DNA plasmidico viene eluito con 15 ml di Buffer N5.

Per far precipitare il DNA si aggiungono 10 ml di isopropanolo e si agita utilizzando un vortex.

Si procede a centrifugare con un'ultracentrifuga a 15000xg per 30 minuti a 4°C.

Il DNA eluito è lavato con etanolo al 70% a 4°C, per eliminare residui di sale e in seguito centrifugato a 12000 rpm per 10 minuti a 4°C.

Una volta che il DNA si è asciugato, si procede a risospendere in 200 µl di H₂O milliQ. Tutti i buffer sono forniti dal produttore del kit.

Il DNA plasmidico estratto, è stato quindi dosato con uno spettrofotometro, controllato tramite analisi di restrizione e mandato a sequenziare (servizio sequenziamento esterno Cogentech, Campus IFOM-IEO).

4.6 Dosaggio acidi nucleici

Si usa una cuvetta di quarzo (trasparente agli UV), che viene riempita con 350 µl di TE: (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5. Viene effettuata una prima lettura allo spettrofotometro del solo TE per fare il bianco: il valore letto verrà sottratto dalla lettura fatta in presenza del DNA. Successivamente ai 350 µl di TE si aggiungono 5 µl di plasmide direttamente in provetta, si rimescola e si misura il valore di assorbanza a cui verrà sottratto quello del bianco. La lettura viene effettuata a due diverse lunghezze d'onda: 260 nm (per il DNA) e 280 nm (per misurare la concentrazione delle proteine). Il rapporto tra le letture

alle due diverse lunghezze d'onda ci dà un indice della qualità della preparazione del DNA. Una preparazione ottimale di DNA plasmidico deve avere un rapporto di circa 1.9. Il calcolo viene effettuato sapendo che, per un cammino ottico pari ad 1 cm, una soluzione acquosa di DNA a pH 7-7.5 ad una concentrazione di 50 ng/μl ha un'assorbanza pari a 1. La formula utilizzata è la seguente:

$$[\text{DNA}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = A_{260} \times 0.05 (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times 350/5$$

4.7 Transfezione

La transfezione consiste nel trasferimento di molecole di DNA esogeno in cellule riceventi. Il DNA, una volta transfettato, viene mantenuto per un limitato periodo di tempo come DNA extra-cromosomiale e il prodotto della sua espressione si mantiene stabile per un determinato periodo, in genere due o tre giorni (transfezione transiente). Per la transfezione è stato utilizzato il metodo del PEI (polietilenimina), una molecola carrier nel cui scheletro sono presenti gruppi amminici facilmente protonabili. A pH neutro essa è dotata di un'elevata carica cationica, che permette di legare il DNA (carico negativamente a causa dei gruppi fosfato) con alta efficienza; questo consente al DNA di entrare per endocitosi in cellula grazie al legame con i proteoglicani cellulari. Inoltre il PEI garantisce che i complessi formati non vengano poi degradati dalla cellula.

Il giorno della transfezione (il giorno successivo alla semina delle cellule) vengono preparate due diverse miscele A e B: la prima composta da DNA e NaCl 150 mM (tamponato con HEPES 10mM, pH 7, 4) e la seconda contenente PEI (jetPEI, Euroclone) e NaCl 150 mM, Hepes 10 mM, pH 7. Dopo aver lasciato a temperatura ambiente per 5 minuti, il contenuto delle due Eppendorf è unito, mescolato e lasciato a temperatura ambiente per 15 minuti. Al termine, la miscela di transfezione è stata aggiunta goccia a goccia in ciascuna piastra. A distanza di 7-8 ore dalla transfezione, il terreno è stato sostituito con terreno completo fresco.

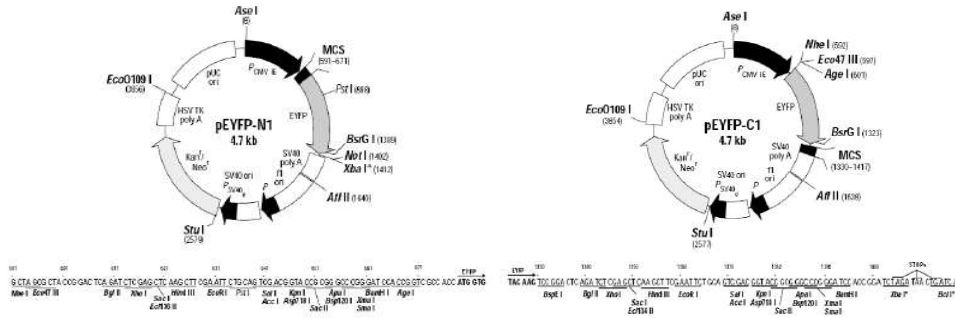


Fig. 12. Mappe del vettore pEYFP-N1 e pEYFP-C1 in cui è evidenziato: 1- il multiple cloning site (MCS) che contiene diversi siti di restrizione unici del vettore e rappresenta il punto in cui viene inserito il cDNA; 2- l'EYFP sequenza codificante per la proteina fluorescente localizzata in 3' rispetto all'MCS per pEYFP-N1 e in 5' rispetto al MCS per pEYFP-C1; 3- l'origine di replicazione SV40 e un gene che conferisce resistenza alla neomicina (Neor) per la selezione (usando il G418) delle cellule transfettate stabilmente. Un promotore batterico a monte (P) conferisce resistenza alla kanamicina (Kanr) in E. Coli. Il vettore fornisce anche un'origine di replicazione pUC19 per la propagazione in E.Coli e un'origine f1 per la produzione di DNA a singola elica

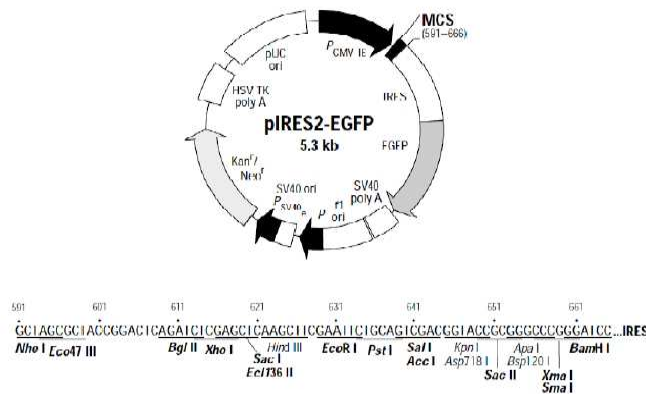


Fig. 13. Mappa del vettore pIRES2-EGFP in cui è evidenziato: 1- il multiple cloning site (MCS) che contiene diversi siti di restrizione unici del vettore e rappresenta il punto in cui viene inserito il cDNA; 2- la sequenza IRES (Internal Ribosome Entry Site) tra il MCS e la regione EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) corrispondente alla regione codificante per la proteina GFP. Questo permette alle cellule di produrre da un singolo mRNA bicistronico la proteina d'interesse (ICln) e la proteina GFP come proteine separate; 3- l'origine di replicazione SV40 e un gene che conferisce resistenza alla neomicina (Neor) per la selezione (usando il G418) delle cellule transfettate stabilmente. Un promotore batterico a monte (P) conferisce resistenza alla kanamicina (Kanr) in E. Coli. Il vettore fornisce anche un'origine di replicazione pUC per la propagazione in E.Coli e un'origine f1 per la produzione di DNA a singola elica

Composizione delle mix (transfezione in piastre da 3 cm):

Mix A		
DNA (0.5 µg/µl)	NaCl 150 mM + Hepes 10mM, pH 7.4	Volume totale Mix A
4 µl (2 µg)	46 µl	50 µl
Mix B		
PEI	NaCl 150 mM + Hepes 10 mM, pH 7	Volume totale Mix B
4 µl	46 µl	50 µl
Mix totale		
Volume Mix Totale		100µl

Composizione delle mix (transfezione in piastre da 10 cm):

Mix A		
DNA (0.5 µg/µl)	NaCl 150 mM + Hepes 10mM, pH 7.4	Volume totale Mix A
30 µl (15 µg)	220 µl	250 µl
Mix B		
PEI	NaCl 150 mM + Hepes 10 mM, pH 7	Volume totale Mix B
30 µl	220 µl	250 µl
Mix totale		
Volume Mix Totale		500µl

4.8. FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

Il FRET è una tecnologia che può fornire informazioni sulle interazioni proteina-proteina.

La tecnica del FRET è basata sul trasferimento di energia tra due fluorofori che sono detti donatore e accettore. Tale processo si verifica quando il fluoroforo donatore, eccitato da luce ad una lunghezza d'onda appropriata

trasferisce parte dell'energia al fluoroforo accettore attraverso un'interazione di tipo dipolo-dipolo. Una delle condizioni fondamentali affinché ci sia FRET è che i due fluorofori siano a distanza di pochi nanometri (non oltre 10 nm).

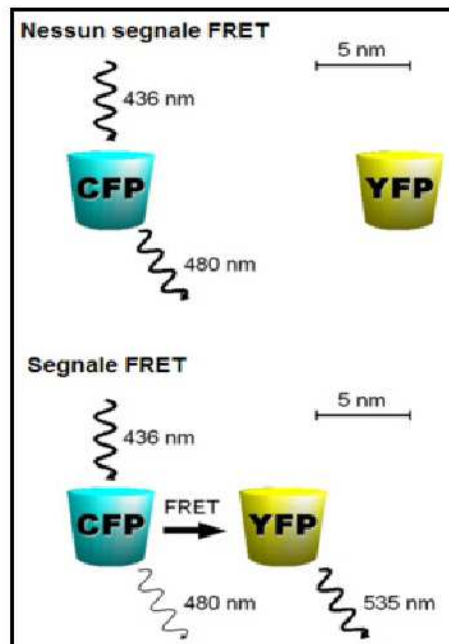


Fig. 14. Modello schematico della FRET. Nel pannello superiore della figura il donatore (in azzurro) viene eccitato ma la distanza dall'accettore (in giallo) non consente il passaggio di energia tra le due molecole. Nel pannello inferiore il donatore viene eccitato ed emette energia che riesce ad eccitare l'accettore grazie alla stretta vicinanza tra i due fluorofori.

Per generare FRET, accettore e donatore devono avere specifiche caratteristiche. Una di queste è che lo spettro d'emissione del donatore abbia sufficiente sovrapposizione con lo spettro di eccitazione dell'accettore.

I due fluorofori da noi utilizzati nell'esperimento sono due proteine derivate dalla GFP (Green Fluorescence Protein). Noi abbiamo utilizzato come donatore una variante blu, CFP (Cyan Fluorescence Protein) e come accettore una variante gialla, YFP (Yellow Fluorescence Protein). CFP/YFP è la coppia di fluorofori più utilizzata nel FRET per studiare le interazioni proteina-proteina. Per studiare l'interazione tra due proteine, donatore e accettore vengono fusi all'estremità delle proteine d'interesse e le rispettive proteine di fusione vengono over-esprese in cellula. Le sequenze proteiche d'interesse possono

essere inserite o all'estremità amino-terminale o all'estremità carbossi-terminale delle proteine fluorescenti. Solo se le due proteine interagiranno direttamente, donatore e accettore si troveranno sufficientemente vicini da permettere il trasferimento di energia e generare un segnale di FRET. Nel nostro esperimento la proteina ICln è stata coniugata al donatore CFP (fornitoci da Prof. Hannes Università di Salisburgo) mentre la proteina 4.1 è stata coniugata all'accettore YFP.

4.8.1 Tecnica dell'Acceptor Photobleaching

Una delle tecniche per misurare l'efficienza del FRET è la "acceptor photobleaching" (Kenworthy AK, 2001). Il metodo si basa sul seguente principio: l'energia trasferita dal donatore all'accettore è ridotta o eliminata quando l'accettore è sottoposto a "bleaching", ovvero alla distruzione delle molecole dell'accettore, eccitando con un laser a potenza massima per un tempo opportuno.

Questo metodo prevede pertanto tre fasi:

- Acquisizione dell'immagine del donatore
- Photobleaching dell'accettore
- Nuova acquisizione dell'immagine del donatore

Il FRET viene poi calcolato utilizzando il software Image J sulla base della variazione d'intensità di fluorescenza del donatore secondo la seguente formula:

$$\text{FRET Eff} = \frac{D_{\text{post}} - D_{\text{pre}}}{D_{\text{post}}}$$

Dove per D_{post} s'intende l'intensità di fluorescenza del donatore (CFP) dopo l'"acceptor photobleaching" e per D_{pre} l'intensità di fluorescenza di CFP prima dell'"acceptor photobleaching" nell'area sottoposta a photobleaching.

Per intensità di fluorescenza s'intende la somma delle intensità di fluorescenza dei singoli pixel nella regione sottoposta a bleaching. Sono stati considerati per il calcolo solo quei pixels che, sia nell'immagine del donatore che nell'immagine dell'accettore, superano una certa soglia d'intensità di fluorescenza (20 su 255). Nel nostro esperimento per l'acquisizione dell'immagine del donatore è stato usato il microscopio confocale Leica TCS SP2 AOBS dotato di laser Argon. Per l'eccitazione del donatore è stata

utilizzata la linea a 458 nm, mentre per l'eccitazione e il photobleaching dell'accettore è stata utilizzata la linea a 514 nm. Le rispettive finestre di emissione sono state impostate in modo da minimizzare il cross-talk tra i canali CFP e YFP, rispettivamente a 465-505 nm e 525-600 nm. Le immagini sono state acquisite a zoom 2 e alla risoluzione di 512x512 (line average 2, 8 bit), posizionando il fuoco in un piano centrale sull'asse z della cellula. Per il photobleaching, dopo aver posto lo zoom a 10X e portato la risoluzione a 1024x1024, sono state effettuate 3 diverse scansioni con il laser al 100% di potenza. Per gli esperimenti di FRET, la sera prima della trasfezione le cellule sono state piastrate in una petri da 3, 5 cm di diametro con il fondo in vetro, a una concentrazione di circa $1,5 \times 10^5$ cellule/ml (2 ml per petri).

Gli esperimenti di FRET sono stati effettuati a 24 ore dalla trasfezione delle cellule HEK-293. Le cellule, tenute in terreno MEM, sono state lavate con la soluzione isotonica e tenute in questa stessa soluzione per almeno 5 minuti prima di procedere all'acquisizione delle immagini. Per ogni petri, dopo avere acquisito le immagini necessarie su più cellule in isotonica, la soluzione è stata cambiata con una ipotonica, in cui le cellule sono rimaste per 10 minuti, prima di procedere alle acquisizioni delle immagini su nuove cellule.

4.9. Elettroforesi del DNA

- Preparazione gel all' 1% (w/v): alla fine della reazione di PCR è stata eseguita la corsa elettroforetica su gel di agarosio per tutte le miscele. Il gel è stato preparato sciogliendo 0.4 g di agarosio in polvere in 40 ml di tampone TAE (Tris Acetato EDTA) 0.5X. Dopo aver scaldato la miscela nel microonde, finché l'agarosio non è sciolto completamente, vengono aggiunti circa 0.3 µl di bromuro d'etidio 10 µg/µl. La miscela viene versata in un'opportuna vaschetta, viene inserito il pettine per i pozzetti e si attendono circa 30 minuti per la solidificazione.

- Preparazione campione: al DNA viene aggiunto un appropriato volume di Loading dye 6X in modo che la sua concentrazione finale nella miscela sia 1X. Nei pozzetti del gel sono caricati 6 µl di miscela (5 µl DNA + 1 µl Loadyng dye)

e 8 µl di marker di corsa DNA ladder 1kb oppure 15 µl di mass ruler DNA ladder mix (Fermentas) per la quantificazione del peso molecolare e della quantità del campione. Il gel viene ricoperto di TAE 0.5X e sottoposto ad un voltaggio costante di 100 V per circa 20 minuti. Terminata la corsa si osserva il gel al transilluminatore a raggi UV.

- Loading dye 6X:

0, 2% Blu di bromofenolo,

0, 2% xilene cyanol FF,

60% glicerolo,

60 mM EDTA

- TAE 1X:

40 mM Tris base

20 mM sodio acetato

1 mM EDTA

Il tampone è stato portato a pH 8 con acido acetico.

4.10. Purificazione dei prodotti di PCR

È stato utilizzato il “PCR purification kit” della Qiagen per purificare i frammenti di DNA dalla PCR.

Protocollo:

- vengono aggiunti 5 volumi di Buffer PB (contenuto nel kit) per ogni volume del campione di PCR e si mescola con cura;

- la miscela viene caricata con una pipetta in una spin column QIAquick e centrifugata per 1 minuto a 13000 rpm. Il flowthrough è eliminato e la colonnina viene rimessa nel tubo;

- vengono aggiunti 0, 75 ml di Buffer PE (contenuto nel kit) alla colonna e si procede a centrifugazione per 1 minuto;

- il flowthrough è eliminato ed è ripetuta una seconda centrifugazione per 1 minuto. La spin column è quindi inserita in un'epENDORF pulita da 1.5 ml;

- per eluire il DNA, sono aggiunti 30 µl di acqua milliQ nel centro della colonna QIAquick. Viene quindi atteso un minuto e in seguito essa viene sottoposta a centrifugazione per 1 minuto.

4.11. Estrazione proteine totali

4.11.1. Estrazione proteine totali

A 24 ore dalla transfezione:

- si toglie il terreno dalla piastra petri da 3 cm;
- si effettua un lavaggio con 1 ml di PBS 1X;
- si aggiunge 1 ml di PBS 1X;
- le cellule vengono staccate utilizzando uno scraper e poi raccolte in Eppendorf;
- la Eppendorf viene centrifugata per 10 minuti a 230 g a 4 °C;
- il sovrnatante viene eliminato.

Il pellet di cellule viene lisato in 70 µl di Buffer di Lisi (addizionato di inibitori delle proteasi).

Successivamente si procede ad un ciclo di congelamento in azoto liquido e scongelamento, per favorire la lisi delle cellule, seguito da una centrifugata per 5 minuti a 4500 g a 4 °C per eliminare i debris cellulari. Dal sovrnatante così ottenuto vengono prelevati 5 µl che serviranno per i dosaggi proteici. Il resto viene conservato a -80 °C fino al momento dell'utilizzo.

Composizione del buffer di lisi:

Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
NP40	1%
pH	7

4.11.2. Estrazione proteine nucleari e citosoliche

A 24h dalla transfezione si effettua un lavaggio in PBS 1X della Petri da 10. Successivamente si aggiunge 1 ml di PBS, le cellule vengono staccate utilizzando uno scraper e poi raccolte in Eppendorf.

- Si centrifuga a 230 g a 4 °C per 10 minuti;
- il sovrnatante viene eliminato e il pellet di cellule viene risospeso in 200 µl di Sucrose Buffer con NP-40;
- si incuba in ghiaccio per 5 minuti per lisare le cellule;
- si effettua una centrifugata a 1500 g per 5 minuti per pellettare i nuclei;
- si trasferisce il sovrnatante (frazione citoplasmatica) in una nuova Eppendorf. Dal sovrnatante così ottenuto vengono prelevati 5 µl che serviranno per i dosaggi delle proteine citoplasmatiche. Il resto viene conservato a -80 °C fino al momento dell'utilizzo; Il pellet (frazione nucleare) invece viene risospeso delicatamente in 1 ml di Sucrose Buffer senza NP-40;
- si effettua poi una centrifugata per pellettare i nuclei a 1500 g per 5 minuti e si elimina il sovrnatante;
- si risospendono i nuclei in 50 µl di Low Salt Buffer e poi si aggiungono 10 µl di High Salt Buffer e si agita delicatamente;
- si continua ad aggiungere 10 µl di High Salt Buffer fino al raggiungimento del volume totale (50 µl) oppure fino a quando i nuclei iniziano a rompersi e la viscosità del campione aumenta.

I campioni vengono poi incubati su una piattaforma rotante a 4 °C per 20 minuti e successivamente centrifugati a 13000 g per 15 minuti. Il sovrnatante è la frazione solubile nucleare, viene prelevato e trasferito in una nuova Eppendorf. Dal sovrnatante così ottenuto vengono prelevati 5 µl che serviranno per i dosaggi proteici. Il resto viene conservato a -80 °C fino al momento dell'utilizzo.

Composizione del Sucrose Buffer With NP-40:

Sucrose Buffer W/O NP-40	1 ml
NP-40 (igepal)	5 µl

Composizione del Sucrose Buffer W/O NP-40:

Sucrose	1 M	3.2 ml
CaCl ₂	0.1 M	300 µl
MgAc	1 M	20 µl
EDTA	250 mM	4 µl
DTT	100 mM	100 µl

PMSF	100 mM	50 µl
H ₂ O	-	6.326 ml

Composizione del Low salt Buffer:

HEPES pH 7.9	1 M	200 µl
Glicerolo	-	2.5 ml
MgCl ₂	1M	15 µl
KCl	1M	200 µl
EDTA	250 mM	8 µl
DTT	100 mM	100 µl
PMSF	100 mM	50 µl
H ₂ O	-	6.927 ml

Composizione dell'High Salt Buffer:

HEPES pH 7.9	1 M	200 µl
Glicerolo	-	2.5 ml
MgCl ₂	1M	15 µl
KCl	3M	2.67 ml
EDTA	250 mM	8 µl
DTT	100 mM	100 µl
PMSF	100 mM	50 µl
H ₂ O	-	4.375 ml

4.11.3. Estrazione proteine totali di membrana

- A 24h dalla transfezione si effettua un lavaggio in PBS 1X della Petri da 10.
 - successivamente si aggiunge 1 ml di PBS, le cellule vengono staccate utilizzando uno scraper e poi raccolte in Eppendorf;
 - si centrifuga a 1000g per 10 minuti a 4 °C;
 - si trasferisce il sovrnatante (frazione citoplasmatica) in una nuova Eppendorf.
- Dal sovrnatante così ottenuto vengono prelevati 5 µl che serviranno per i dosaggi delle proteine citoplasmatiche. Il resto viene conservato a -80 °C fino al momento dell'utilizzo; il pellet (frazione di membrana) invece viene risospeso delicatamente in 500 µl di Buffer Fosfato (addizionato con inibitori

delle proteasi).

- Successivamente si procede a tre cicli di congelamento in azoto liquido e scongelamento e con una siringa da insulina si siringa il campione 30-40 volte, per favorire la lisi delle cellule;
- si aggiunge 1 ml di soluzione di saccarosio in ciascun campione;
- si centrifuga a 1000g per 10 minuti a 4 °C. Al termine della centrifugata si raccoglie il sovrnatante lo si trasferisce in una nuova eppendorf e si elimina il pellet;
- il sovrnatante viene centrifugato a 1000g per 30 minuti a 4 °C ;
- il pellet che si è formato viene lavato risospingendolo per 2 volte in 1ml di PBS, mescolando bene per inversione e infine centrifugando a 1000g per 10 minuti a 4 °C;
- si elimina il sovrnatante e si rioso spende il pellet in Buffer di lisi (addizionato di inibitori delle proteasi);

Dal sovrnatante così ottenuto vengono prelevati 5 µl che serviranno per i dosaggi proteici. Il resto viene conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

Soluzioni Buffer Fosfato:

NaH ₂ PO ₄	8.3 mM
NaH ₂ PO ₄	11.6 mM

pH=7.3

Soluzione di saccarosio:

0.5M di Saccarosio in 0.02M Tris Buffer pH=7.3

Composizione del Buffer di Lisi:

Tris-HCl	20 mM
NaCl	150mM
EDTA	1 mM
NP-40	1%
pH	7

4.12. Dosaggio proteico

Per misurare la concentrazione delle proteine viene utilizzato il metodo di Bradford (1979). Tale sistema consiste nell'impiego di un colorante costituito da una soluzione acida di Comassie Brilliant Blue G-250 (Sigma) contenuto in un reattivo formato da acido fosforico ed etanolo (Biorad Protein Assay kit). Il colorante anionico si lega alle proteine causando una variazione di colore che è possibile rilevare attraverso una variazione di assorbanza quantificabile a 595 nm. Per il dosaggio servono 1 ml di reattivo diluito 1:5 in cui viene aggiunto il campione. Il dosaggio delle proteine viene misurato allo spettrofotometro; per risalire dal valore di assorbanza alla concentrazione, è necessario allestire una retta di taratura, servendosi di diluizioni seriali di albumina da siero bovino a concentrazioni note. La quantificazione dei campioni avviene leggendo l'assorbanza a $\lambda=595$ nm. Dopo essere risalita alla concentrazione proteica è possibile preparare i campioni per effettuare la corsa elettroforetica.

4.13. Co-immunoprecipitazione

Per effettuare gli esperimenti di co-immunoprecipitazione abbiamo co-transfettato per ogni caso d'interesse tre petri da 10:

pFLAG human ICln	pEYFP-N1 4.1R RII	
	pEYFP-C1 4.1R RII	
pFLAG BAP	pEYFP-N1 4.1R RII	controllo
	pEYFP-C1 4.1R RII	controllo

A 24h dalla transfezione si effettua un lavaggio in PBS 1X delle Petri da 10. Successivamente si aggiunge 1 ml di PBS, le cellule vengono staccate utilizzando uno scraper e poi raccolte in Falcon.

- Si centrifuga a 1000g per 10 minuti a 4 °C;
- si elimina il sovrantante e il pellet viene risospeso (per 3 petri da 10) in 3 ml di Buffer di lisi (addizionato con inibitori delle proteasi);

- successivamente si procede a congelare in azoto liquido e scongelare per favorire la lisi delle cellule;
- si centrifuga a 1000g per 5 minuti a 4 °C per eliminare i debris.;
- successivamente si aliquota il sovrnatante in Eppendorf;
- i lisati vengono dosati con metodo Bradford.

Si utilizza una resina, l' α -FLAG M2 Affinity Gel (Sigma), costituita da anticorpi monoclonali α -FLAG coniugati ad agarosio. La resina viene preparata seguendo le istruzioni del produttore. Si usano 100 μ l totali di resina che vengono centrifugati a 5000 rpm per 5 minuti per eliminare il sovrnatante (glicerolo). Prima di procedere la resina viene avvinata con il buffer di lisi e nuovamente pellettata e separata dal surnatante; quindi viene aggiunta ad un volume di campione corrispondente a 5 mg di proteine totali, secondo il dosaggio ottenuto col metodo Bradford, e viene lasciata in incubazione a 4 °C per 2 ore. Al termine dell'incubazione la resina viene nuovamente centrifugata a 1000 g per 5 minuti per separare il Flow-through (contenente tutte le proteine non legate alla resina) dalla resina stessa. Questa viene poi lavata due volte con wash buffer e nuovamente separata per centrifugazione. Successivamente la resina viene trasferita in colonnine (Biorad) che trattengono la resina ma lasciano passare la soluzione. La resina viene quindi lavata ulteriormente con 500 μ l di wash buffer per 4 volte, si procede quindi con un ultimo lavaggio con PBS e infine vengono fatte quattro eluizioni sequenziali con 40 μ l di Flag peptide 130 μ g/ml.

Buffer di lisi:

Tris HCl	25 mM
NaCl	150 mM
Glicerolo	10%
Triton X100	0.5%

Buffer di lavaggio:

Tris HCl	25 mM
NaCl	150 mM
Glicerolo	10%
Triton X100	0.1%

4.14. Western blot

4.14.1. Elettroforesi SDS PAGE

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAA) viene condotta in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), utilizzando un metodo di tipo discontinuo, così chiamato per le differenze di concentrazione e di pH esistenti tra running gel e stacking gel. La corsa viene effettuata in presenza di sodiododecilsolfato (SDS) e di β -mercaptoetanolo. L'SDS è un detergente anionico in grado di legarsi alle proteine, provocandone la denaturazione. In queste condizioni le proteine assumono una carica negativa che consente loro di migrare verso il polo positivo, pertanto la separazione avviene solo in funzione del peso molecolare. I gel di poliacrilammide per l'SDS-PAGE sono formati da due fasi distinte: il "running" gel, che permette la separazione delle proteine sulla base del loro peso molecolare, e lo "stacking" gel, che impacca le proteine sul fronte di corsa. Nei Western Blot relativi ai livelli di espressione totale di ICIn sono caricati 10 μ g di proteine per campione, mentre negli esperimenti relativi alla separazione nucleo citosol per i campioni dei nuclei vengono caricati 20 μ g, mentre per il citosol 10 μ g. Prima di caricare i campioni, ai preparati è aggiunto Sample Buffer 4X in modo da risultare in concentrazione finale 1X. I campioni sono immediatamente denaturati attraverso bollitura per 3 minuti, quindi centrifugati per pochi secondi ad alta velocità e caricati nei pozzetti del gel. I campioni e il marker (Page ruler Prestained Protein Ladder, Fermentas, SMO671) sono fatti correre in un gel per elettroforesi SDS-PAGE (13% acrilammide). La corsa è effettuata a voltaggio costante di 120 V.

Soluzioni:

Sample Buffer 4X	Buffer corsa 1X
Tris-HCl pH 6.8 240 mM	Tris-base 25 mM
SDS 8% (w/v)	Glicina 200 mM
Glicerolo 40% (w/v)	SDS 0.1%
Blue di bromo fenolo 0.008% (w/v) pH 8.3	
β -mercaptoetanolo 2, 5% (w/v)	

	Stacking gel 4%	Running gel 13%
Miscela di acrilamide bisacrilamide (30% e 0.8%)	0.87 ml	6.5 ml
H ₂ O bi-distillata	4.07 ml	4.52 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.67 ml	-
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	-	3.75 ml
10% SDS	66.7 µl	150 µl
10% APS	33.3 µl	75 µl
Temed	6.7 µl	7.5 µl
Volume Finale	6.72 ml	15 ml

4.14.2. Trasferimento

Al termine della corsa elettroforetica si elimina lo Stacking Gel e si trasferiscono le proteine del Running Gel su una membrana di PVDF (polyvinylidene fluoride) per mezzo di un elettroblotter. Si pre-equilibrano nel Buffer di Trasferimento la membrana pretrattata (45 secondi in metanolo, lavate in acqua per due minuti), il gel, due fogli di carta da filtro 3M e due spugnette. La membrana viene poi posta a contatto con il gel. Membrana e gel vengono messi tra i due fogli di carta da filtro e il tutto poi posizionato tra le due spugnette (verificando la mancanza di bolle d'aria che potrebbero compromettere il trasferimento). Dopo aver immerso il tutto nel Buffer di Trasferimento, il trasferimento avviene tra due elettrodi di platino (con membrana rivolta all'anodo), con voltaggio di 80V per 120 minuti a 4°C. Al termine del trasferimento, il gel è colorato con Blue di Comassie R-205 (Sigma) 0, 4% per 20 minuti e poi decolorato per 2 ore con acido acetico al 10% in agitazione rotante per controllare l'esito della corsa. La membrana invece viene sciacquata in TBST (Tween 0.1%) per eliminare i residui di buffer di trasferimento.

Composizione del Buffer di Trasferimento:

Metanolo	10%
Tris-base	48 mM
Glicina	39 mM

4.14.3. Blocco e incubazione con anticorpo primario e secondario

La membrana è messa a contatto con una soluzione di bloccaggio TBST addizionato a polvere di latte 5% per un'ora a temperatura ambiente o overnight a 4° C (a seconda della proteina) in agitazione in modo di andare a saturare i siti aspecifici della membrana cui potrebbe andare a legarsi l'anticorpo. Successivamente la membrana è incubata con l'anticorpo primario specifico diluito in TBST e polvere di latte 5%. Al termine la membrana incubata con anti-ICln viene lavata con TBST addizionato a polvere di latte al 5% per tre volte 10 minuti, mentre le membrane incubate con anti-GAPDH, anti-Laminina, anti-4.1, anti-Na⁺ K⁺ ATPasi, anti GFP, anti Flag e anti-caderina vengono lavate con TBST. La membrana viene quindi incubata in agitazione orbitante un'ora con una soluzione 1:20000/10000 dell'anticorpo secondario corrispondente coniugato a perossidasi di rafano (HRP), diluito in TBST addizionato con polvere di latte al 5%. Infine si susseguono tre lavaggi da 10 minuti e due da 5 ciascuno in TBST.

Combinazione proteina-blocco-anticorpo primario-anticorpo secondario:

Proteina	Blocco	Anticorpo Primario	Anticorpo Secondario
ICln	1 h RT milk 5% TBS-T	Anti-ICln (1:1000) O/N 4° C	Anti-rabbit (1:20000) (Pierce)
4.1	1 h RT milk 5% TBS-T	Anti-4.1R (1:1000) O/N 4° C (Santa Cruz)	Anti-goat (1:10000)
GFP	1 h RT milk 5% TBS-T	Anti-GFP (1:1000) O/N 4° C	Anti-rabbit (1:20000) (Pierce)
Laminina	1 h RT milk 5% TBS-T	Anti-Laminina (1:1000) O/N 4° C (Santa Cruz)	Anti-rabbit (1:20000) (Pierce)
Flag	O/N 4° C milk 5% TBS-T	Anti-Flag (1:2000) 1h RT (Sigma)	Anti-mouse (1:10000) (Pierce)
Caderina	1 h RT milk 5% TBS-T	Anti-Caderina O/N 4° C (1:1000)	Anti-rabbit (1:20000) (Pierce)

Na ⁺ /K ⁺ ATPasi	O/N 4 °C milk 5% TBS-T	Anti-Na ⁺ /K ⁺ ATPasi 1h RT (1:20000) (Millipore)	Anti-mouse (1:20000) (Pierce)
GAPDH	1h RT milk 5% TBS-T	Anti-GAPDH (1:1000)	Anti-mouse (1:10000) (Pierce)

Composizione TBS-T:

Tris-HCl	15 mM
NaCl	150 mM
Tween	0.1%
pH 8.8	

4.14.4. Sviluppo

Il kit utilizzato per lo sviluppo è il kit per chemiluminescenza Immobilon della Millipore. La membrana viene ricoperta per circa 3 minuti con una soluzione contenente Luminol, un substrato della perossidasi che, quando viene ossidato in presenza di H₂O₂ e in condizioni alcaline, passa ad uno stato eccitato. Il decadimento dello stato eccitato allo stato fondamentale avviene per un'emissione di luce che, in seguito a brevi esposizioni (fino a 1 ora circa), può impressionare un film per autoradiografia sensibile alla luce blu.

4.14.5 Stripping

Dopo lo sviluppo le membrane incubate con un anticorpo prima di essere incubate nuovamente con un anticorpo primario devono essere strippate per eliminare i residui di anticorpo legato alla membrana.

- Si effettua un lavaggio veloce (1 minuto) in acqua di soluzione;
- si lava per 1 minuto con soluzione di Stripping;
- si lava con soluzione di Stripping per 40 minuti;
- si effettuano due lavaggi da 5 minuti in acqua da soluzione;
- si equilibra la membrana in TBST 0.1%.

Si effettua uno sviluppo di controllo per verificare che tutto l'anticorpo non sia più legato. La membrana viene messa a contatto con una soluzione di bloccaggio TBST addizionato a polvere di latte 5% per un'ora, a temperatura

ambiente e in agitazione, poi si prosegue l'incubazione della membrana con anticorpo primario e secondario specifici.

Soluzione di Stripping:

Glicina	0.05 M
SDS	1%
pH2.2 - 2.3 (con HCl)	

4.14.6. Colorazione Amido Black di membrane in PVDF

Al termine del Western Blot le membrane vengono messe a colorare con una soluzione di Amido Black staining solution (Biorad) in agitazione per tre minuti. Successivamente vengono lavate velocemente con H₂O di soluzione, poi vengono messe in contatto con la soluzione Destain solution per 3 minuti sempre in agitazione per decolorare. La membrana è fatta asciugare all'aria per qualche minuto.

Amido Black staining solution:

Metanolo	45%
Acido acetico	10%
H ₂ O	45%

Con aggiunta di 0.1% di Amido Black (Biorad)

Destain solution:

Metanolo	90%
Acido acetico	2%
H ₂ O	8%

4.15. Conte cellulari e curve di crescita

Il giorno della transfezione, le cellule sono contate mediante emocitometro (Camera di Burkner) e poi seminate in piastre Multiwell da 96 pozzetti, in modo da ottenere una concentrazione cellulare di partenza nota, pari a $2 \cdot 10^4$ cellule in ogni pozzetto da 200 μ l. Ad ogni conta (alle 24-48-72 h) viene eseguito il seguente protocollo:

- sostituire il terreno di ogni pozzetto con 100 μ l di terreno + MTT (90 μ l di terreno preriscaldato + 10 μ l MTT 5 μ g/ml diluito in PBS 1X);
- preparare la soluzione di MTT fresca, stagiolata e tenerla a 4°C fino al momento dell'utilizzo;
- incubare per 2-3 ore (a 37°C, con CO₂ 5%). Sostituire il terreno + MTT con 260 μ l di buffer di lisi (DMSO + buffer glicina), stando attenti a non prelevare anche i precipitati formati. Spipettare fino al completo scioglimento dei precipitati;
- mettere il contenuto del pozzetto in cuvette da 250 μ l. Tramite spettrofotometro leggere il valore di assorbanza a 570 nm (entro 30 minuti dal prelievo); leggere anche il valore di assorbanza a 630 nm per il background.

Per ogni condizione analizzata, ad ogni tempo sono stati misurati quattro valori di assorbanza, per tre serie sperimentali indipendenti. Ogni serie sperimentale è stata ripetuta tre volte, in momenti differenti. In ogni seduta sperimentale, tutte le condizioni prese in esame (4.1R⁸⁰ + CFP / 4.1R⁸⁰ + ICIn / 4.1R¹³⁵ + CFP / 4.1R¹³⁵ + ICIn) sono state analizzate contemporaneamente, ognuna ripetuta in tre serie indipendenti fra loro. Parallelamente al test di proliferazione con MTT assay, sono stati seminati altri pozzetti di piastre Multiwell da 96 con cellule provenienti dalla stessa mix di cellule transfettate. Ad ogni tempo sperimentale le cellule sono state contate mediante microscopio a epifluorescenza, dopo colorazione dei nuclei con DAPI (Gain Factor = 8; Index = 3; DAPI = 80 ms).

Composizione del Buffer di Lisi:

DMSO	90%	
Sorensen's glycine buffer	10%	
	Glicina	0.1 M
	NaCl	0.1 M

Il DMSO 100% è unito a Sorensen's glycine buffer (pH 10.5 con NaOH 0.1 N) in rapporto 9:1.

4.16. Esperimenti di patch-clamp

Per misurare la corrente di Cl⁻ indotta dal rigonfiamento cellulare, è stato utilizzato il metodo del patch-clamp in configurazione whole-cell che permette, mettendo in comunicazione la soluzione interna dell'elettrodo con il citoplasma, di effettuare misure delle correnti che attraversano i canali ionici di tutta la membrana plasmatica di una singola cellula. L'apparato strumentale utilizzato per gli esperimenti di patch-clamp, è costituito da: gabbia di Faraday, tavolo antivibrante, microscopio invertito, amplificatore da patch-clamp (Axopatch 200 Axon Instruments), e relativo holder, micromanipolatore, sistema di perfusione, convertitore analogico-digitale e computer per immagazzinamento e analisi dati (programma Pulse Heka, Germania). Tutte le misure sono effettuate con una frequenza di campionamento di 20 kHz e filtrate a 5 kHz con un filtro Bessel a 8 poli. Un sistema di perfusione permette di immettere ad una velocità di circa 5 ml/min una determinata soluzione nel bagno, il cui volume è di circa 300 µl. La soluzione contenuta nel bagno è messa a terra con l'ausilio di un elettrodo ad Ag/AgCl. Le pipette da patch-clamp sono preparate a partire da capillari in borosilicato (BRAND, diametro esterno di 1.55 mm, diametro interno di 1.15 mm) con un puller orizzontale (Sutter Instrument CO Made in U.S.A. Model P-87 Flaming/Brown Micropipette Puller) ed in modo tale da avere una resistenza di circa 4-8 M.

Protocollo:

- realizzare il sigillo in soluzione ipertonica;
- sempre in soluzione ipertonica, applicando un'ulteriore suzione, passare alla configurazione whole-cell. A questo punto eseguire un protocollo "I/V" che prevede l'invio alla cellula di impulsi di potenziale della durata di 500 ms, da -100 a +100 mV, con incrementi di 20 mV e da un potenziale di holding di 0 mV;
- successivamente sostituire la soluzione esterna con la soluzione ipotonica e registrare l'incremento della corrente con un protocollo "sweeps +40 mV".

Nel corso di tale protocollo, da un potenziale di holding di 0 mV, è inviato alla cellula, ogni 30 secondi e per 250 ms, uno step di potenziale di 40 mV. Dopo 2.5 minuti dall'inizio della sostituzione, eseguire nuovamente un "I/V", di seguito altri 2.5 minuti con "step +40 mV" e continuare i cicli fino a 10 minuti.

Soluzioni utilizzate per gli esperimenti di patch-clamp:

Le soluzioni sono state opportunamente scelte per misurare le correnti di Cl⁻.

CsCl ₂	125 mM
MgCl ₂	5 mM
EGTA	11 mM
HEPES	10 mM
Raffinosio	50 mM
MgATP	2 mM

La composizione della soluzione contenuta nell'elettrodo per gli esperimenti di patch-clamp, in configurazione whole-cell, presenta un pH 7.2 e un'osmolarità di 340 mOsm.

Composizione della soluzione ipertonica:

NaCl	125 mM
MgCl ₂	2.5 mM
CaCl ₂	2.5 mM
HEPES	10 mM
Mannitolo	100 mM

La composizione della soluzione ipertonica per gli esperimenti di patch-clamp, utilizzata per la realizzazione del sigillo, per il passaggio alla configurazione whole-cell e per la prima serie sperimentale, presenta un pH 7.4 e un'osmolarità di 390 mOsm.

Composizione della soluzione ipotonica:

NaCl	125 mM
MgCl ₂	2.5 mM
CaCl ₂	2.5 mM
HEPES	10 mM

La composizione della soluzione ipotonica per gli esperimenti di patch-clamp, in configurazione whole-cell, presenta un pH 7.4 e un'osmolarità di 270 mOsm.

4.17. Esperimenti di localizzazione 4.1R in membrana in seguito a swelling

In questi esperimenti, insieme ai vettori codificanti per le differenti chimere di 4.1R, sono stati usati i vettori pECFP-Mem (C-mem) e pEYFP-Mem (Y-mem) (Clotech Laboratories). Questi vettori codificano per una proteina di fusione che presenta all'N-terminale 20 aminoacidi di neuromodulina, conosciuta anche con il nome di GAP-43, e rispettivamente una fluorescenza ciano o giallo-verde della variante della proteina fluorescente EGFP. L'espressione di C-mem e Y-mem in cellule di mammifero mostrano un forte legame alla membrana plasmatica ed è proprio per questa ragione che nei nostri esperimenti vengono usati come markers di membrana.

Cellule HEK sono state piastrate su vetrini da 24 mm in petri da 3.5 cm. 24 ore dopo le cellule sono state trasfettate con il metodo del calcio-fosfato con le seguenti coppie di vettori:

C-mem + Y-mem

C-mem + Y-4.1R^{135(ATG2m)}

C-mem + Y-4.1R⁸⁰

C-mem + 4.1R⁸⁰-Y

Le immagini sono state acquisite con il microscopio confocale (Leica TCS SP5) su cellule in vivo (tenute nell'incubatore microscope a 37°C al 5% di CO₂ durante l'intera acquisizione) 24 ore dopo la trasfezione. CFP è stata eccitata con il laser a 405 nm e la banda di emissione raccolta da PMT1 era: 460 nm - 500 nm. YFP è stata eccitata con il laser a 514 nm e la banda di emissione raccolta da PMT2 era: 525 nm - 600 nm. Ogni immagine è stata ottenuta con un obiettivo 63X (olio, apertura numerica 1.4) e velocità di scansione a 8000Hz (resonant scanner). Inizialmente le cellule sono state messe in una soluzione isotonica (329 mOsm teorica). Trascorsi 5 minuti in soluzione isotonica abbiamo acquisito le immagini in Z-stack dell'intera cellula per entrambi i canali YFP e CFP (pixel size xy: 98.41 nm x 98.41 nm, Z-step size: 0.25 µm, fino a 20 sezioni, line everage 4-8 bit). Dopo la prima sessione di acquisizione la soluzione isotonica è stata sostituita con una soluzione ipotonica (229 mOsm teorica) e dopo 5 e 10 minuti, sempre dalle stesse cellule, sono state acquisite con gli stessi parametri con l'eccezione della dimensione Z dello stack che è stato aumentato in seguito a swelling cellulare. Le analisi di co-localizzazione sono state eseguite con ImageJ JACoP Pluin, sugli interi stack dopo l'applicazione di un filtro (Gaussian Blur) per la rimozione del noise. Per ogni canale è stata scelta una soglia in modo da selezionare il segnale di fluorescenza associato alla membrana plasmatica.

4.18. Analisi statistiche

Per l'analisi statistica dei dati degli esperimenti di FRET e di Western Blot, tutti i risultati sono stati espressi come media \pm errore standard. È stato applicato il test T di Student per dati non appaiati. Le differenze tra i dati sono assunte come statisticamente significative quando $p < 0.05$.

5. RISULTATI

5.1. ICIn interagisce con YFP-4.1R⁸⁰ e YFP-4.1R¹³⁵ in cellule HEK

Abbiamo condotto esperimenti di co-immunoprecipitazione e FRET per analizzare in vivo l'interazione tra la proteina ICIn e la 4.1R (in particolare la due isoforme 4.1R⁸⁰ e 4.1R¹³⁵). Abbiamo allestito esperimenti di FRET utilizzando la metodica dell'*Acceptor photobleaching* ampiamente utilizzata in letteratura (Rodighiero et al., 2008). Tale tecnica consente di valutare la variazione dell'intensità di emissione del donatore ECFP (Enhanced Cyan Fluorescence Protein) dopo bleaching del fluoroforo accettore EYFP (Enhanced Yellow Fluorescence Protein), ottenuto illuminando una regione del preparato con un laser ad elevata potenza. Questi esperimenti sono stati condotti in vivo su cellule transfettate con plasmidi che consentono l'espressione di proteine di fusione aventi il fluoroforo CFP in N- o C-terminale rispetto a ICIn ed inizialmente con il fluoroforo YFP in N- o C-terminale rispetto alla proteina 4.1R^{80/135}.

Gli esperimenti di FRET sono stati condotti per queste possibili coppie: 4.1R (Y-4.1R⁸⁰ o 4.1R⁸⁰-Y e Y-4.1R¹³⁵ o 4.1R¹³⁵-Y) e ICIn (C-ICIn o ICIn-C). Abbiamo osservato un segnale di FRET tra la coppia C-ICIn/Y-4.1R⁸⁰ risultato essere statisticamente significativo se paragonato al controllo C/Y-4.1R⁸⁰ (Fig. 1A e 1B), mentre per quanto riguarda tutte le altre coppie di FRET non sono stati osservati segnali statisticamente significativi (Fig. 1B, C). L'efficienza di FRET (FRET_{eff}) calcolata per la coppia Y-4.1R⁸⁰ e C-ICIn mutata (C-ICInT), mancante

del sito di legame per la 4.1R (Tang Tang, 1998), risulta essere statisticamente minore della FRETeff misurata in cellule esprimenti la coppia C-ICln/Y-4.1R⁸⁰ (FRETeff C-ICln/Y-4.1R⁸⁰T=4.16±0.89, N=20; FRETeff C-ICln/Y-4.1R⁸⁰=16.39±0.87, N=20; p<0.0001, Anova test), e non differente se paragonato al controllo (FRETeff C/Y-4.1R]=2.42±0.89, N=10, ns, Anova test), confermando la specificità dell'interazione tra Y-4.1R⁸⁰ e C-ICln.

In parallelo abbiamo condotto esperimenti di co-immunoprecipitazione (Fig. 2A, B) per verificare l'esistenza di una possibile interazione tra 4.1R¹³⁵ e ICln. Le cellule HEK sono state trasfettate con gli stessi costrutti di 4.1R utilizzati per gli esperimenti di FRET e la proteina ICln a cui era legato un Flag-tag all'estremità C-terminale (FLAG-ICln sequenza di otto aminoacidi legati all'N-terminale di ICln). Abbiamo inoltre effettuato un esperimento di controllo transfettando le cellule con la proteina 4.1R135 (con il YFP al N- o al C-terminale) e pFLAG-BAP (Sigma), Bovine Alkaline Peroxidase, che non interagisce con 4.1. A 24h dalla trasfezione le cellule sono state raccolte e lisate. Il lisato è stato successivamente incubato con una resina, l'anti-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma), costituita da anticorpi monoclonali anti-FLAG coniugati ad agarosio. Il tag FLAG coniugato alla proteina si lega alla resina e con esso le proteine che interagiscono con la proteina d'interesse. L'eluizione è stata effettuata per competizione in presenza di un eccesso di un peptide Flag purificato (Sigma). I lisati (Lys) e gli eluati (tre eluzioni successive, E2, E3 ed E1) sono stati controllati tramite Western Blot (Fig. 2A) per verificare la presenza negli eluati di FLAG-ICln (mediante anticorpi anti-FLAG) e 4.1 (mediante anticorpi anti 4.1 o anti GFP). Come mostrato in figura 2A nei lisati dell'immunoprecipitazione è presente un segnale evidenziabile con tutti e due gli anticorpi e questo ci indica la presenza nei lisati di partenza di entrambe le proteine di interesse. L'anti-GFP ci indica la presenza della proteina 4.1R negli eluati mentre il segnale con l'anti-FLAG ci indica la co-presenza della proteina ICln. Il dato d'immunoprecipitazione indica quindi che tutte le proteine di fusione 4.1R immunoprecipitano fortemente con FLAG-ICln, suggerendo che il basso segnale di FRETeff misurato per la 4.1R¹³⁵ e 4.1R⁸⁰-Y non è dovuto a una mancata interazione con ICln ma sia, invece, determinato dal fatto che il fluoroforo posto al C-terminale della 4.1R80 non è la configurazione ottimale

affinchè avvenga il trasferimento energetico tra YFP e CFP. Nelle ultime quattro corsie del gel in figura 2A sono stati caricati il lisato e gli eluati dell'immunoprecipitazione (4.1R + FLAG-BAP): il segnale con l'anti-GFP dimostra la presenza della 4.1R nel lisato di partenza ma non negli eluati, mentre è presente la FLAG-BAP, a conferma della specificità del risultato positivo ottenuto con FLAG ICln.

Dagli esperimenti d'immunoprecipitazione è emerso un altro dato importante. Dal Western Blot in figura 2A si vede che per la 4.1R¹³⁵-YFP negli eluati è presente anche una banda più bassa (circa 130 kDa) che viene riconosciuta sia dall'anti-GFP che dall'anti-4.1 e che potrebbe rappresentare la banda relativa all'isoforma corta (4.1R⁸⁰) in fusione con il YFP. È stato infatti recentemente riportato (Lospitao et al., 2008) che è presente una sequenza IRES tra ATG1 e l'ATG2 dell'ORF delle 4.1R ad alto peso molecolare che può causare la traduzione anche d'isoforme corte quando vengono over-espresse le isoforme lunghe. Per indagare cosa avvenisse nelle nostre condizioni quando over-esprimiamo la 4.1R¹³⁵ in fusione con YFP, abbiamo effettuato esperimenti di Western Blot sui lisati totali di cellule transfettate con YFP-4.1R⁸⁰, YFP-4.1R¹³⁵, 4.1R⁸⁰-YFP e 4.1R¹³⁵-YFP (Fig. 2B). Questi esperimenti confermano che, soprattutto nel caso di over-espressione di 4.1R¹³⁵ con il YFP fuso all'estremità C-terminale, è evidenziabile una seconda banda, alla stessa altezza della 4.1R⁸⁰-YFP. Non abbiamo invece riscontrato la presenza significativa di una seconda banda, quando il YFP era fuso all'estremità C-terminale di 4.1R¹³⁵ suggerendo che la presenza di un tag voluminoso come la YFP all'estremità N-terminale potrebbe inibire l'utilizzo della sequenza interna IRES. Per gli esperimenti successivi, abbiamo quindi provveduto a silenziare per mutagenesi sito specifica il secondo sito d'inizio trascrizione ATG2 (4.1R^(ATG2m)) presente nella sequenza di tale isoforma per evitare che quando over-esprimiamo la 4.1R¹³⁵ venga contemporaneamente prodotta la 4.1R⁸⁰. La mutagenesi è stata effettuata sia sui plasmidi usati per il FRET che sul vettore pIRES2-EGFP-4.1R¹³⁵, che permette di over-esprimere GFP e 4.1R¹³⁵ come proteine separate (quindi una 4.1 priva di tag). I risultati di questa seconda mutagenesi sono riportati nel western di figura 2B. Come si può vedere nelle cellule transfettate con pIRES-4.1R⁸⁰ c'è una banda

all'altezza di circa 80 kDa, come atteso per l'isoforma corta. Nei lisati di cellule transfettate con pIRES-4.1R¹³⁵ e vediamo la presenza di una banda alta a 135 kDa corrispondente all'isoforma lunga (come atteso) e una seconda banda più bassa che presumibilmente corrisponde alla 4.1R⁸⁰ che viene prodotta tramite l'utilizzo della sequenza IRES presente tra ATG1 e ATG2 (Lospitao et al., 2008). Nella terza corsia abbiamo caricato il lisato di cellule transfettate con il vettore pIRES-4.1R^{135(ATG2m)}, in cui l'ATG2 è stato mutato in GTG: si può notare che la banda a 80 kDa non è più visibile, indicando che effettivamente non viene più prodotta la 4.1R⁸⁰ ma solo l'isoforma lunga.

Ulteriori esperimenti di immunoprecipitazione sono stati fatti per valutare differenze nell'affinità di legame tra ICIn e la 4.1R⁸⁰ e 4.1R¹³⁵. Sono state condotte due serie sperimentali (Fig. 2C, D), una riguardante la co-immunoprecipitazione di ICIn con 4.1R endogena; una riguardante la co-immunoprecipitazione di ICIn in cellule over-esprese con le due isoforme di 4.1R in esame. Nel primo caso le cellule sono state trasfettate unicamente con ICIn taggata con FLAG o FLAG-BAP (Bovine Alkaline Peroxidase, controllo) (Fig. 2D). Nel secondo caso invece è stata effettuata una co-transfezione di FLAG-ICIn con pEYFP-C1-4.1R⁸⁰ o con pEYFP-C1-4.1R^{135(ATG2m)} (Fig. 2C). I lisati di proteine totali ottenuti sono stati fatti interagire con resina di agarosio coniugata ad anticorpo anti-FLAG. Gli eluati di proteine co-immunoprecipitate insieme a FLAG-ICIn o FLAG-BAP sono poi stati fatti correre su gel, insieme ai lisati proteici totali. Le lastre del western blot (Fig. 2D) riferite al segnale di 4.1 mostrano delle bande sia nei lisati (in quanto le due isoforme di 4.1R sono presenti del lisato proteico totale) che negli eluati di cellule transfettate con FLAG-ICIn. Ciò conferma che sia 4.1R¹³⁵ che 4.1R⁸⁰ legano ICIn, rimanendo associati al complesso FLAG-ICIn associato agli anticorpi anti-FLAG presenti sulla resina. tale interazione non è dovuta ad un legame aspecifico, in quanto nell'eluato di controllo (cellule transfettate con FLAG-BAP) non si osservano bande di 4.1R. L'analisi densitometrica dei diversi segnali permette di avere maggiori informazioni sulle caratteristiche di tale interazione. Il rapporto delle bande di 4.1R nei lisati mostra una maggior presenza di 4.1R¹³⁵ endogena; lo stesso rapporto negli eluati mostra, invece, una sostanziale uguaglianza. È possibile quindi supporre che, nonostante il livello di 4.1R¹³⁵ sia maggiore, il

fatto di trovare circa la stessa quota di 4.1R associata a ICIn sia indice di una maggiore affinità di 4.1R⁸⁰ verso ICIn. Per convalidare il dato, è stata allestita una seconda serie sperimentale per analizzare le interazioni fra ICIn e 4.1R over-espresse separatamente. Le cellule sono state quindi co-transfettate con FLAG-ICIn e pEYFP-C1-4.1R⁸⁰ o pEYFP-C1-4.1R^{135(ATG2m)}. Per l'analisi densitometrica dei segnali, i dati ottenuti per gli eluati sono stati normalizzati con quelli dei lisati. La normalizzazione è stata effettuata per rendere indipendente la quantità di proteine co-immunoprecipitate con ICIn dalla quantità di proteine sottoposte a immunoprecipitazione. Si può osservare come anche in over-espressione sembra che la 4.1R⁸⁰ legghi meglio ICIn. Infatti il rapporto eluato/lisato è significativamente maggiore per 4.1R⁸⁰ rispetto a 4.1R¹³⁵.

5.2. Lo shock ipotonico determina un aumento dell'attivazione dell'IClswell in cellule over-espresse con 4.1R⁸⁰ (ma non con 4.1R¹³⁵)

Poiché è risaputo che ICIn è coinvolta nella regolazione del volume cellulare in risposta a uno stress ipotonico giocando un ruolo centrale nell'RVD, abbiamo voluto valutare se ci fossero possibili coinvolgimenti della 4.1R negli stessi processi.

Per valutare il significato funzionale dell'interazione tra ICIn e 4.1R nell'attivazione dell'IClswell, abbiamo effettuato degli esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell (Fig. 3). In particolare una prima serie sperimentale è stata allestita per indagare gli effetti dell'over-espressione delle proteine di interesse sull'attivazione della corrente IClswell. Gli esperimenti sono stati effettuati su cellule HEK 293T, transfettate con i plasmidi pIRES-4.1R^{135(ATG2m)} e pIRES-4.1R⁸⁰. Sono stati anche effettuati esperimenti di controllo su cellule transfettate con il vettore vuoto pIRES-2-EGFP-EGFP, esprime la sola EGFP. Le cellule sono state inizialmente incubate in una soluzione ipertonica (390 mOsm nel bagno, 340 mOsm in pipetta) (Fig. 3A, D, E); dopo aver ottenuto un sigillo ad elevata resistenza, veniva raggiunta la conformazione whole-cell e la stabilità del sigillo veniva

controllata per circa 2 minuti, al termine dei quali è stata registrata la corrente, imponendo gradini di potenziale della durata di 500 ms, con una variazione da -100 mV a +100 mV ("protocollo I/V"), con intervallo di 20 mV. In un secondo momento la soluzione ipertonica di mantenimento veniva sostituita con una soluzione ipotonica (270 mOsm), per determinare gli effetti indotti dal rigonfiamento cellulare sull'attivazione della corrente $I_{Clswell}$. Dopo il cambio di soluzione, la corrente veniva misurata per 10 minuti, facendo delle registrazioni con il "protocollo I/V" ad intervalli di tempo di 2 minuti e 30 secondi. I risultati ottenuti sono stati poi riportati su grafici, con le relazioni fra la densità di corrente (ottenuta normalizzando i valori della corrente assoluta per la capacità di membrana) e il voltaggio. I valori di corrente sono stati normalizzati per renderli indipendenti dalle variazioni di volume cellulare. In tutti i casi visti la sostituzione con una soluzione ipotonica determina l'attivazione di una corrente anionica, con rettificazione uscente, inattivazione ai potenziali oltre i +60 mV, caratteristiche tipiche della $I_{Clswell}$ (Fürst et al., 2002) (Fig. 3A, B). Andando a paragonare l'attivazione della corrente tra le due isoforme, le cellule transfettate con 4.1R⁸⁰ ma non con 4.1R^{135(ATG2m)} mostrano un aumento della corrente statisticamente significativo, sia nel caso dell'attivazione della corrente in ipotonia (Fig. 3B) sia nel caso della corrente basale misurata in condizioni di ipertonia (Fig. 3D). La trasfezione di 4.1R^{135(ATG2m)} presenta una corrente attivata dall'ipotonia addirittura inferiore rispetto al controllo EGFP. Infine è stata valutata l'attivazione della corrente nel tempo, imponendo step di potenziale di +40 mV (da un potenziale di holding di 0 mV) ogni 10" dopo la sostituzione con la soluzione extracellulare ipotonica (Fig. 3C). Dal grafico si osserva che la corrente si attiva più rapidamente e con maggiore intensità in cellule transfettate con 4.1R⁸⁰, rispetto alle cellule transfettate con 4.1R¹³⁵ e rispetto alla condizione di controllo. Nelle cellule transfettate con l'isoforma ad alto peso molecolare (135kDa) si ha una attivazione della corrente nel tempo che è addirittura minore rispetto alla condizione di controllo.

5.3. Dopo esposizione a ipotonia in cellule HEK la quantità di 4.1R in membrana diminuisce, l'interazione tra 4.1R⁸⁰-ICln aumenta

Durante la regolazione del volume, sono riportati cambi di localizzazione subcellulare di ICln, che a seguito dello stress ipotonico trasloca verso la membrana cellulare, un passaggio considerato importante per i meccanismi dell'RVD. Vista l'importanza delle 4.1 per la membrana cellulare, abbiamo voluto valutare cosa succedesse per la 4.1R durante l'ipotonia. A tale scopo abbiamo condotto esperimenti in cui l'associazione con la membrana plasmatica fu valutata, attraverso imaging, per le proteine chimeriche (Y-4.1R⁸⁰, 4.1R⁸⁰-Y e Y-4.1R^{135(ATG2m)}) attraverso la loro co-localizzazione con un marker di membrana (CFP-mem: un vettore che permette di aggiungere un segnale di sorting per la membrana cellulare all'ECFP), co-trasfettate in condizioni sia di isotonia che di ipotonia (Fig. 4A, B, C). Le analisi di colocalizzazione (coefficiente di Pearson e Manders) sono state eseguite in z-stack comprendenti intere cellule, mantenute inizialmente in una soluzione isotonica per poi sostituirla con una soluzione ipotonica, misurando i valori di fluorescenza a 5 e 10 minuti dopo lo shock ipotonico. Cellule co-trasfettate con Cm e YFP-mem (Ym) sono state usate come controllo. C-mem e Y-mem sono proteine palmitoilate, principalmente presenti nella membrana plasmatica, che non cambiano posizione e associazione, rispetto alla membrana plasmatica, in seguito a stress ipotonico. La co-localizzazione generale (rappresentata dal coefficiente di Pearson) tra 4.1R^{135(ATG2m)} e Cm diminuisce significativamente in soluzione ipotonica e, di conseguenza, anche la frazione di sovrapposizione tra 4.1R^{135(ATG2m)} e Cm (indicata dal coefficiente di Manders, figura 4C) diminuisce significativamente in ipotonia. In parallelo, abbiamo condotto esperimenti di western blot su proteine totali di membrana e in accordo con i dati di colocalizzazione, abbiamo osservato una riduzione della quantità di 4.1R associata alla membrana, significativa solo nel caso dell'isoforma 135kDa (Fig. 4D).

Per poter studiare l'andamento dell'interazione 4.1R-ICln in seguito a rigonfiamento cellulare, abbiamo condotto esperimenti di "sensitized emission" FRET su Y-4.1R⁸⁰/C-ICln e Y-4.1R⁸⁰/C (Fig. 4E). La tecnica

“sensitized emission”, non dannosa per la cellula, permette di eseguire misure ripetute e, pertanto, di seguire nel corso del tempo l’interazione tra 4.1R⁸⁰/ICln durante l’esposizione all’ipotonìa. I valori di NFRET (Fig. 3E) indicano che l’ipotonicità determina un aumento significativo dell’interazione tra C-ICln e Y-4.1R⁸⁰, iniziando dal quinto minuto dopo sostituzione con una soluzione ipotonica. Il controllo (Y-4.1R⁸⁰+C) non mostra differenze significative tra i valori ottenuti in ipotonìa e i valori registrati in condizioni di ipertonìa, dimostrando la specificità della risposta di ICln-4.1R⁸⁰ all’ipotonìa (Fig. 3F, G). Questi risultati sono stati confermati da esperimenti di acceptor photobleaching dove la FRETeff, calcolata tra Y4.1R⁸⁰/C-ICln espresse in cellula esposte a soluzione extracellulare ipertonica, aumenta significativamente dopo 10 minuti di esposizione alla soluzione ipotonica (FRETeff=11.62±0.86, N=40 in iper vs FRETeff=15.07±1.17, N=20 in ipo, p<0.05).

5.4. L’over-espressione di ICln in cellule HEK mima gli effetti dello shock ipotonico sulla localizzazione di 4.1R in membrana

È risaputo che ICln è in grado di traslocare nella regione membranaria sotto stimolo ipotonico (Ritter et al., 2003; Rodighiero et al., 2008). Abbiamo ipotizzato che questa traslocazione e la conseguente interazione con 4.1R potesse essere coinvolta nel distacco della 4.1R dalla membrana. Per testare questa ipotesi abbiamo analizzato la localizzazione in membrana della 4.1R in presenza di ICln over-espressa in condizioni di isotonia, una condizione che permette di mimare un suo aumento di concentrazione nei diversi distretti cellulari. Entrambe le varianti di 4.1R contengono l’esone 16, essenziale per l’interazione con l’actina/spectrina (Gimm et al., 2002)) e per il targeting nucleare (Luque et al., 2000); e l’esone 5, implicato nel legame di membrana (Seo et al., 2009) e nell’export nucleare (Luque et al., 2003). Esperimenti di imaging con YFP-4.1R over-esprese in cellule HEK mostrano inequivocabilmente che C-ICln inibisce l’associazione in membrana di entrambe le isoforme Y-4.1R⁸⁰ e Y-4.1R^{135(ATG2m)} (Fig. 5A) evidenziando un

accumulo di quest'ultime nel citoplasma. Questo effetto, legato ad ICIn, è stato anche osservato sia evidenziando proteine 4.1R endogene, sia 4.1R cotrasfettate con vettori GFP-IRES-4.1R⁸⁰ (4.1R⁸⁰) o GFP-IRES-4.1R^{135(ATG2m)} (4.1R^{135(ATG2m)}) (Fig. 5B) per visualizzarne il segnale. Esperimenti di Western blot mostrano che il pool di 4.1R endogene legate alla membrana è statisticamente diminuito in presenza di ICIn (Fig. 5C).

5.5. ICIn promuove il distacco di 4.1R dalla membrana plasmatica interferendo con l'interazione tra 4.1R-actina

Con gli esperimenti di FRET e di Western blot abbiamo osservato come ICIn modifichi la localizzazione in cellula di 4.1R. Dal momento che la localizzazione di 4.1R è fortemente legata al citoscheletro, abbiamo condotto esperimenti di co-immunoprecipitazione al fine di studiare l'effetto di ICIn sulla interazione fra la 4.1R e una fondamentale proteina citoscheletrica, l'actina (Fig. 6C). Le cellule sono state transfettate con i plasmidi pIRES-4.1R⁸⁰ o pIRES-4.1R^{135(ATG2m)}. Alle 48 ore, le cellule sono state raccolte e sottoposte a protocollo di estrazione proteica per co-immunoprecipitazione. Per ogni condizione sperimentale, le proteine estratte sono state fatte interagire con resina coniugata ad anticorpo anti-actina (condizione di analisi) o con resina coniugata ad anticorpo anti-goat (condizione di controllo). Gli eluati così ottenuti sono stati quindi fatti correre su gel insieme ai lisati proteici totali. Come si può osservare dalla lastra della figura 6C, sia per quanto riguarda la proteina 4.1R¹³⁵ che per 4.1R⁸⁰ è presente un segnale negli eluati di resine con anticorpo anti-actina. In questi eluati (E135/E80), come si osserva dalla lastra più in basso, l'actina immunoprecipita con tutte le proteine con le quali è associata. Negli eluati di controllo (Ectr), con resina coniugata ad anticorpo anti-rabbit, la actina non immunoprecipita e non si osservano nemmeno le bande all'altezza di 4.1R, a riprova della specificità del risultato ottenuto con la resina anti-actina. Si è effettuato una seconda serie di esperimenti di co-immunoprecipitazione al fine di valutare se ICIn fosse in grado di modulare l'interazione fra l'actina e l'isoforma 4.1R ad alto peso molecolare (Fig. 6D). Le

cellule sono state transfettate con pIRES-4.1R^{135(ATG2m)}, pIRES-4.1R⁸⁰ e pECFP-C1-ICln o pECFP-C1. Alle 48 ore le cellule sono state raccolte e sottoposte ad un protocollo di estrazione proteica per co-immunoprecipitazione. Per ognuna delle due condizioni sperimentali, le proteine sono state fatte interagire con resina coniugata ad anticorpo anti-actina. Gli eluati così ottenuti sono stati fatti correre su gel insieme ai lisati proteici totali. Dalla figura è possibile osservare che ICln gioca un ruolo importante nella regolazione dell'interazione fra le due isoforme 4.1R e l'actina. Infatti negli eluati della condizione di controllo (co-espressione di 4.1R^{135/80} e vettore CFP vuoto) si osserva un segnale relativo alla 4.1R, a conferma dell'avvenuta interazione e precipitazione con l'actina. In quelli ottenuti da cellule co-transfettate con 4.1R^{135/80} e ICln il segnale di 4.1R negli immunoprecipitati è ridotto (4.1R⁸⁰) o addirittura assente (4.1R¹³⁵). L'over-espressione di ICln, quindi, sembrerebbe regolare negativamente l'interazione fra le isoforme 4.1R e l'actina. Questo effetto è in accordo con gli esperimenti di FRET (Fig. 6B). In cellule esprimenti Y-4.1R^{135(ATG2m)}/C-β-actina appare un segnale statisticamente significativo, rispetto al controllo, nella regione di membrana (FRETeff=0.79±0.41, N=8, p<0.01), a conferma che l'interazione di 4.1R avviene soprattutto a livello dell'actina sottocorticale in queste cellule. Come evidenziato anche dagli esperimenti di immunoprecipitazione, a FRETeff diminuisce se si co-overesprime ICln.

5.6. L'over-espressione di ICln antagonizza lo spreading cellulare e l'emissione di filopodi promossa dall'over-espressione di 4.1R¹³⁵

Immagini acquisite al microscopio confocale mostrano che l'over-espressione delle proteine chimere 4.1R determinano l'acquisizione di una particolare morfologia delle cellule (Fig. 7A): le caratteristiche principali che sembrano essere influenzate dall'over-espressione di 4.1R sono la superficie cellulare e il numero di filopodi; le cellule transfettate con 4.1R presentano infatti dei sottili filopodi, se confrontati con il controllo.

Le cellule sono state trasfettate con i seguenti costrutti:

- EGFP-IRES (controllo)
- 4.1R^{135(ATG2m)}-IRES-EGFP
- 4.1R⁸⁰-IRES-EGFP
- 4.1R^{135(ATG2m)}-IRES-EGFP e ICIn-IRES-DsRED
- 4.1R⁸⁰-IRES-EGFP e ICIn-IRES-DsRED
- ICIn-IRES-DsRED

L'informazione più interessante è l'inversione del fenotipo in presenza di ICIn. Per quantificare il dato, ci siamo avvalsi della tecnica di "correlative-light scanning electron microscopy" per misurare l'area della cellula e il numero e lunghezza dei filopodi (Fig. 7C) dal momento che lo spessore dei filopodi è sotto il limite di risoluzione per la microscopia confocale convenzionale (Faix et al., 2009) come confermato dalla tecnica microscopica super-resolution g-STED (gated-Stimulated Emission Depletion) (Fig. 7B) (Vicidomini et al., 2011). Abbiamo così potuto osservare come l'over-espressione di 4.1R^{135(ATG2m)} induca un aumento significativo della superficie cellulare ($P < 0.001$) e la co-overespressione di ICIn inverta questo fenotipo dal momento che la media dell'area cellulare non differisce dalle cellule over-esprimenti EGFP (controllo) (Fig. 7D).

L'over-espressione di 4.1R⁸⁰ induce un minore aumento della superficie media della cellula che non risulta però essere statisticamente significativa se paragonata al controllo ma nemmeno diversa da quella delle cellule over-esprese con 4.1R^{135(ATG2m)}. Anche in questo caso la concomitante over-espressione di ICIn determina una inversione significativa di questa tendenza ($p < 0.001$). Abbiamo successivamente misurato la densità di filopodi presenti intorno al profilo della cellula osservando che solo le cellule over-esprese con 4.1R^{135(ATG2m)} mostrano un aumento del numero di filopodi ($p < 0.05$) (Fig. 7B, E) rispetto al controllo. Inoltre, anche in questo caso, abbiamo osservato un effetto inibente da parte di ICIn, risultato essere statisticamente significativo ($p < 0.001$). L'over-espressione di 4.1R⁸⁰ non ha effetti statisticamente significativi sulla densità dei filopodi, suggerendo un simile ma non identico ruolo per le due isoforme di 4.1R nella regolazione dinamica del citoscheletro corticale.

5.7. L'effetto sulla proliferazione da parte di 4.1R⁸⁰ su cellule HEK è influenzato dalla co-espressione di ICIn

In letteratura è riportato che i membri della superfamiglia FERM sembrano avere caratteristiche antiproliferative. Infatti la proteina 4.1B, un suo frammento denominato DAL-1, la proteina 4.1R e la proteina merlin sembrano poter essere implicate nel processo di sviluppo neoplastico (Tran et al., 1999; Gutmann et al., 2000; Perry et al., 2000; Huang et al., 2001). I risultati precedentemente riportati hanno mostrato come 4.1R e ICIn mutuino vicendevolmente la propria localizzazione in cellula. In particolare, l'over-espressione di ICIn sembra determinare una traslocazione di 4.1R dal nucleo al citoplasma. Considerando queste due premesse, si è quindi voluto osservare se l'over-espressione di 4.1R¹³⁵ e 4.1R⁸⁰, con o senza co-espressione con ICIn, potessero influenzare la proliferazione cellulare.

Per studiare il ruolo dell'interazione tra 4.1R e ICIn anche in questo contesto, abbiamo analizzato, in collaborazione con la dottoressa Rodighiero (Fondazione Filarete), la proliferazione cellulare identificando le cellule in fase S al microscopio confocale grazie all'incorporazione nel DNA dell'EdU, un nucleoside analogo alla timina, durante la sintesi attiva del DNA. Le cellule HEK sono state co-trasfettate con EGFP-4.1R⁸⁰ o EGFP-4.1R^{135(ATG2m)} e con DsR, per valutare l'effetto delle sole 4.1R sulla proliferazione cellulare, o in combinazione con DsR-ICIn per determinare se la loro interazione è implicata in questo processo regolativo (Fig. 8A) L'effetto dell'over-espressione della sola DsR-ICIn è stata analizzata; in questo caso è stata co-trasfettata con EGFP. Il controllo del test di proliferazione è la co-trasfezione delle cellule HEK con DsR e EGFP dal momento si supponga non abbiano effetti sulla proliferazione.

I dati della percentuale di cellule in fase S, over-esprimenti le proteine di interesse, è il risultato di tre differenti sessioni sperimentali. L'analisi statistica è stata fatta usando l'ANOVA a una via (One-way Analysis of Variance) post test Bonferroni con il programma GraphPad Prism.

Si è visto che l'over-espressione di 4.1R⁸⁰ induce una diminuzione statisticamente significativa del numero di cellule in fase S se comparate alla

4.1R^{135(ATG2m)} e al controllo (EGFP+DsRED); effetto invertito dalla co-espressione con ICl_n (Fig. 8A, $p < 0.05$ per EGFP+DsRED vs 4.1R⁸⁰+DsR, t-test). In parallelo abbiamo condotto esperimenti di proliferazione con MTT assay (Fig. 8B) su cellule transfettate con pEYFP-C1-4.1R⁸⁰ o pEYFP-C1-4.1R^{135(ATG2m)} o pIRES2-EGFP (controllo). Le cellule sono state transfettate e alle 24-48-72 ore successive la semina si è effettuato il test. In ogni seduta sperimentale, tutte e tre le condizioni sono state analizzate contemporaneamente, ognuna ripetuta in tre serie indipendenti fra loro. Dalla figura è possibile constatare che l'over-espressione di 4.1R⁸⁰ determina una diminuzione del rapporto proliferativo delle cellule HEK trasfettate normalizzate alle 24 ore, che è statisticamente differente dal risultato ottenuto con la 4.1R^{135(ATG2m)} e il controllo (cellule trasfettate con il vettore pIRES2-EGFP), confermando l'ipotesi che le due varianti hanno differenti effetti nella regolazione del ciclo cellulare.

6. Discussione

ICln è una proteina multifunzionale, altamente conservata e ubiquitariamente espressa (Paulmichl et al., 1992; Voets et al., 1995; Buyse et al., 1996). Proteina coinvolta in un gran numero di funzioni cellulari, è in grado di interagire con numerose componenti del proteoma cellulare come actina (Krapivinski et al., 1994; Schwarz et al., 1997; Li et al., 1999), miosina (Emma et al., 1998), integrine (Larkin et al., 2004), proteine coinvolte nei processi di splicing (Pu et al., 1999; Friesen et al., 2001; Meister et al., 2001; Friesen et al., 2002; Pesiridis et al., 2009) e proteine strutturali multifunzionali come le 4.1 (Tang & Tang, 1998; Calinisian et al., 2006). Questo insieme di possibili interazioni ha portato a ipotizzare per ICln un ruolo di "connector hub", una proteina in grado di legare e mediare le interazioni fra numerose altre proteine coinvolte in processi e vie di signalling differenti (Fürst et al., 2006).

Le 4.1 sono proteine appartenenti alla superfamiglia delle FERM (Four.one-Ezrin - Radixin - Moesin), proteine caratterizzate dalla presenza di un dominio strutturale e funzionale comune. Inizialmente scoperte a livello del citoscheletro sottomembranario dei globuli rossi, numerose isoforme delle 4.1 sono state poi individuate in diversi organi e tessuti dove giocano un ruolo fondamentale in parecchie funzioni cellulari, non solo strutturali (Taylor et al., 2005; Calinisian et al., 2006; Diakowsky et al., 2006). Fra le varie componenti della famiglia delle 4.1, in questo lavoro si è scelto di studiare la 4.1R in quanto la prima ad essere stata individuata e la prima per la quale si è

descritta una interazione con ICln (Tang & Tang, 1998). Di 4.1R sono state descritte numerose isoforme (Gascard et al., 1998), dovute a due possibili siti di inizio trascrizione e a meccanismi di splicing alternativo. Tali isoforme sono di regola espresse contemporaneamente in cellula (Gascard et al., 1998), dove sembra possano svolgere funzioni peculiari e differenti. Per questo lavoro si è scelto di studiare le due isoforme di 4.1R rappresentative di varianti ad alto peso molecolare, da 135 kDa (4.1R¹³⁵), e a basso peso molecolare, da 80 kDa (4.1R⁸⁰) (Gascard et al., 1998). Tali isoforme differiscono fra loro per la presenza o assenza del dominio unico iniziale U1, coinvolto nella traslocazione nucleare di 4.1R (Gascard et al., 1998; Gascard et al., 1999; Luque et al., 1999), nell'interazione con una proteina centrosomale (Hung et al., 2000) e che possiede un sito di fosforilazione che viene fosforilato in base alle variazioni del ciclo cellulare (Huang et al., 2005).

6.1. ICln interagisce con 4.1R80 /4.1R135 in cellule HEK

Abbiamo studiato in vivo, tramite la tecnica del FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), l'interazione dinamica tra ICln e 4.1R umana, per studiarne la localizzazione subcellulare in isotonia e l'evolversi durante l'ipotonia. Inoltre abbiamo indagato l'influenza di ICln sulla loro localizzazione subcellulare a livello della membrana e del citosol. È un dato estremamente rilevante dato che la localizzazione delle due proteine è strettamente correlata alla loro funzione.

Esperimenti di FRET sull'interazione tra ICln e la 4.1R sono stati condotti per ogni configurazione possibile per entrambe le isoforme dando risultati molto diversi a seconda delle coppie donatore-accettore utilizzate, suggerendo che l'organizzazione spaziale del complesso 4.1R-ICln sembra essere rigidamente orientata nello spazio. Per quanto riguarda l'isoforma 4.1R⁸⁰, abbiamo visto che quando il CFP si trova all'estremità C-terminale di ICln l'efficienza di FRET diminuisce. Poiché ICln lega la 4.1 con la sua estremità C-terminale (Tang et al., 1998) è possibile che il fluoroforo in questa posizione interferisca con l'interazione tra le due proteine a causa del suo ingombro sterico oppure che

posizionare il CFP all'estremità C-t di ICIn sia sufficiente ad allontanare donatore e accettore quanto basta per inibire il trasferimento energetico. Analogamente, quando il YFP si trova al C-terminale della 4.1R80 abbiamo misurato un'efficienza di FRET molto bassa. A differenza dei saggi di immunoprecipitazione, il FRET risente fortemente della vicinanza tra i fluorofori, che è esattamente il motivo per cui viene utilizzato per discriminare tra interazioni indirette (come ad es. tra proteine facenti parte di uno stesso complesso proteico) e interazioni dirette. I nostri dati di FRET con YFP-4.1R80, i saggi di doppio ibrido e, soprattutto, quelli di interazione in vitro, (Tang et al., 1998), indicano che nel caso di 4.1R e ICIn si tratta di una interazione diretta. Poiché i dati di immunoprecipitazione confermano che anche nel nostro caso, dove abbiamo utilizzato proteine con un tag relativamente ingombrante come le EYFP/ECFP, non si tratta di una assenza di interazione, è probabile che il basso FRETeff con 4.1R80-YFP sia soprattutto una conseguenza dell'allontanamento di donatore e accettore. Quando il YFP è fuso all'estremità N-t di 4.1R80, viene infatti a trovarsi legato direttamente al FERM, il dominio di interazione di ICIn, mentre quando è legato al C-t viene a trovarsi all'estremità opposta. Anche i dati sulla isoforma lunga suggeriscono una rigida organizzazione spaziale del complesso. La FRETeff è infatti risultata nulla per tutte le coppie 4.1-ICIn utilizzate, anche quelle in cui è stata utilizzata la variante con il YFP N-t, che nel caso delle variante corta aveva dato un buon segnale di FRETeff. Entrambe le proteine di fusione YFP-4.1R¹³⁵ e 4.1R¹³⁵-YFP tuttavia coimmunoprecipitano con ICIn. Non si può escludere a priori che la perdita del segnale di FRET possa dipendere da una diversa organizzazione del complesso ICIn-4.1R (e forse altri partner), in cui le due proteine vengono a trovarsi più distanti. Tuttavia sembra ragionevole attendersi che, così come per la variante corta priva di U1, anche nel caso di 4.1R¹³⁵ l'interazione tra ICIn e 4.1R si mantenga diretta. Le due proteine potrebbero interagire, come indica la co-immunoprecipitazione, ma la distanza tra i fluorofori non consentirebbe un trasferimento energetico efficace. È possibile che a questo fatto si sommi anche una effettiva ridotta interazione di ICIn con l'isoforma lunga. I saggi di immunoprecipitazione con 4.1R¹³⁵-YFP forniscono infatti un dato interessante in tal senso. Come già accennato in

precedenza, è evidente che quando viene over-espressa la 4.1R¹³⁵-YFP viene contemporaneamente espressa l'isoforma corta, che viene riconosciuta sia dall'anti 4.1R che dall'anti-GFP (Fig. 2A), in quanto la proteina prodotta a partire dall'ATG2 presente nell'ORF della 4.1R¹³⁵-YFP ha anch'essa il YFP fuso al C-terminale. Tale dato è in accordo con quanto riscontrato anche da altri (Lospitao et al., 2008), e si è ipotizzato che possa dipendere dalla presenza di una sequenza IRES tra ATG1 e ATG2, entrambi presenti nell'ORF delle isoforme lunghe. Abbiamo riscontrato che questo tipo di comportamento è molto attenuato (se non assente) nel caso della YFP-4.1R¹³⁵ (Fig. 2A), come se la presenza di un tag C-terminale interferisse con l'utilizzo della sequenza IRES responsabile della traduzione della isoforma corta. Come mostrato nella corsia corrispondente ai lisati cellulari di Fig. 2A, la quantità prodotta di isoforma corta resta comunque inferiore rispetto alla lunga. Tuttavia negli eluati della immunoprecipitazione di 4.1R¹³⁵-YFP, con FLAG-ICln, o di 4.1R endogena (Fig. 2D), entrambe le isoforme vengono arricchite e compaiono in quantità paragonabile, nonostante l'isoforma corta addirittura non appaia nei lisati di partenza. Questo suggerisce che l'isoforma corta possa rappresentare un competitore più forte della lunga per il legame con ICln, che legherebbe quindi con maggiore affinità. Il problema legato alla produzioni di varianti corte anche over-esprimendo i soli ORF delle lunghe non sembrerebbe alterare il quadro ottenuto dagli esperimenti di FRET, né le informazioni riguardo la loro localizzazione. Per quanto riguarda gli esperimenti con YFP-4.1R¹³⁵ infatti, la sintesi di isoforma corta sembra molto bassa se non assente, come già discusso. Inoltre l'eventuale quota di isoforma corta prodotta con l'over-espressione sarebbe comunque priva di YFP e quindi non contribuirebbe né alla localizzazione né alla FRETeff, se non, in questo ultimo caso, competendo con YFP-4.1R¹³⁵ per il legame con ICln. L'immunoprecipitazione ci conferma tuttavia che questa competizione, se esiste, è estremamente ridotta: non ci sono bande all'altezza attesa per 4.1R⁸⁰ negli eluati, a differenza di quanto ottenuto con 4.1R¹³⁵-YFP (Fig. 2A), in accordo con una bassa o nulla produzione di 4.1R⁸⁰ da YFP-4.1R¹³⁵. Questo è confermato anche da esperimenti di FRET ripetuti con YFP-4.1R¹³⁵(ATG2m), che non hanno dato risultato diverso da quelli ottenuti con YFP-4.1R¹³⁵ non

mutata(riporta valori se non vuoi mettere figura in risultati, li trovi sul lavoro)
Per quanto riguarda 4.1R¹³⁵-YFP, il risultato ottenuto negli esperimenti di FRET non è presumibilmente alterato dalla simultanea espressione delle due isoforme perché l'efficienza di FRET che abbiamo misurato in cellule transfettate con 4.1R⁸⁰-YFP era già di per sé non significativa.

Non possiamo in ogni caso escludere che una minore affinità di legame di ICln per le isoforme ad alto peso molecolare, come suggerito dai dati di coimmunoprecipitazione, possa contribuire alla minore efficienza FRET misurata con 4.1R¹³⁵.

6.2. Shock ipotonico: 4.1R⁸⁰ attiva ICln in cellule HEK

È nota da tempo la capacità, da parte della 4.1R, di regolare sistemi di trasporto di membrana tra cui Cl⁻/HCO₃⁻ (AE1) (Nunomura et al., 2006; Calinisan et al., 2006; Takakuwa et al., 2000). Più di recente, molti altri canali e trasportatori ionici sono stati aggiunti alla lista (Rivera et al., 2006; Baines et al., 2006) di sistemi regolati dalla 4.1R. In particolare, è già stato proposto un suo coinvolgimento nella regolazione del volume cellulare, poiché è stato dimostrato che fisiologicamente 4.1R è in grado di down-regolare lo scambiatore Na⁺/H⁺, coinvolto nella regolazione dei processi di regolazione d'incremento del volume cellulare (RVI) (Rivera et al., 2006; Nunomura et al., 2012). In questo lavoro si è cercato di comprendere, attraverso esperimenti elettrofisiologici, il significato funzionale dell'interazione fra ICln e le due isoforme di 4.1R prese in esame (4.1R¹³⁵ e 4.1R⁸⁰), nell'ambito della attivazione della ICln indotta da stress ipotonico. I risultati ottenuti negli esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell (Fig. 3) hanno effettivamente mostrato che le isoforme di 4.1R influenzano l'attivazione dell'ICln. L'over-espressione di 4.1R⁸⁰ porta ad una attivazione della corrente che risulta essere statisticamente maggiore rispetto al controllo (cellule transfettate con pIRES-2-EGFP) (Fig. 3B, C). Al contrario, l'over-espressione dell'isoforma 4.1R¹³⁵ sembrerebbe inibire l'attivazione della corrente ICln. Pertanto la 4.1R potrebbe essere un fattore cruciale alla

regolazione e sincronizzazione dei sistemi di trasporto coinvolti nella regolazione del volume cellulare, sapendo essere legato a diverse altre funzioni della cellula quali la morfologia e la proliferazione cellulare (Hoffmann et al., 2011; Hoffmann et al., 2009). Anche se i nostri dati non sono in grado di darci una spiegazione del perché le due isoforme 4.1R si comportino diversamente riguardo l'attivazione dell'IClswell, altri studi hanno riportato differenze sul comportamento e sulla funzione delle due diverse isoforme, come per esempio la loro affinità di legame per proteine di membrana (Nunomura et al., 2009). È probabile che la regione U1 giochi un ruolo importante nel conferimento di funzioni specifiche ad ogni isoforma 4.1R. È possibile che la maggior affinità dell'isoforma 4.1R⁸⁰ per IClN possa essere strettamente legata alla assenza della regione U1 e che la regolazione del rapporto tra 4.1R^{80/135} (più che in assoluto la presenza della singola proteina) nell'area di membrana possa essere cruciale per il corretto funzionamento degli eventi di signaling legati all'ipotonicità (RVD).

Nel caso della 4.1R sono già stati riportati effetti sulle correnti di Na⁺, Cl⁻, K⁺ e Ca²⁺ (Stagg et al., 2008; Baines et al., 2009), con implicazioni in patologie cardiache (Stagg et al., 2008; Cunha et al., 2008) e in soggetti con un'alterata conduzione nervosa (Rose et al., 2008; Douyard et al., 2007). Non sempre è chiaro a che livello le 4.1R intervengano nel modulare l'attività dei canali/trasportatori di membrana, anche se alcuni studi hanno mostrato come le 4.1 regolino l'espressione in membrana di alcuni di questi sistemi di trasporto (Baines et al., 2009, Binda et al., 2002). Nel caso dell'IClswell, cercare di capire quale sia il meccanismo alla base della regolazione da parte di 4.1R è particolarmente complesso poiché l'identità della proteina canale coinvolta è tuttora dibattuta (Kurbannazarova et al., 2011; Okada et al., 1997). La traslocazione di IClN verso la membrana è considerata una dei processi chiave dell'attivazione dell'IClswell (Ritter et al., 2003; Rodighiero et al., 2008) e i nostri dati indicano che un aumento della quantità di IClN in cellula riflette una diminuzione della 4.1R legata al citoscheletro corticale actinico e alla membrana (Fig. 5C). Sappiamo che durante uno stress ipotonico si ha una riorganizzazione del complesso del citoscheletro actinico (Tamma et al., 2007; Klausen et al., 2006; Cantiello et al., 1997) con il

coinvolgimento di differenti pools cellulari di F-actina (corticale, perinucleare) nella regolazione dei canali che attivano lo swelling, probabilmente con effetti differenti (Wang et al., 2005). È possibile che le interazioni fra ICIn e 4.1R coinvolgano anche riorganizzazioni del citoscheletro l'actina, uno step importante per il meccanismo di "sensing" e signalling del pathway legato all'RVD.

6.3. Stress ipotonico: Interazione tra 4.1R⁸⁰-ICIn in cellule HEK

Come è stato riportato che ICIn gioca un ruolo nella regolazione del volume cellulare (Paulmichl et al., 1992; Laich et al., 1997; Ritter et al., 2003 Furst et al., 2002), la diretta associazione tra 4.1R e ICIn potrebbe suggerire un ruolo funzionale per l'interazione ICIn/4.1R nella regolazione del volume cellulare.

Per testare queste ipotesi abbiamo inizialmente valutato se un cambiamento ipotonico avesse un effetto sulla localizzazione di 4.1R in membrana. Abbiamo focalizzato la nostra attenzione sull'accumulo di 4.1R nella membrana plasmatica dal momento che 4.1R è un elemento strutturale fondamentale del citoscheletro membranario in grado di interagire con l'actina, un'altra componente chiave del meccanismo di regolazione del volume cellulare (Lambert et al., 2008; Pedersen et al., 2001). È stato dimostrato, infatti, che la risposta alla regolazione del volume cellulare richiede un cambiamento dinamico nell'organizzazione dei filamenti di actina (Pedersen et al., 1999).

Attraverso esperimenti di co-localizzazione (Fig. 4A, B, C), condotti su entrambe le isoforme 4.1R, abbiamo osservato come, dopo 10 minuti dall'esposizione ad una soluzione ipotonica, si ha un distacco significativo della 4.1R^{135(ATG2m)} dalla membrana. Anche gli esperimenti di western blot, condotti su proteine di membrana (membrane totali), sono in accordo con i dati di colocalizzazione, mostrando una riduzione della quantità di 4.1R associata alla membrana, risultato essere significativo solo nel caso dell'isoforma 135kDa (Fig. 4D).

I dati di N-FRET (confermati anche da esperimenti di acceptor photobleaching)

indicano che, perlomeno per l'isoforma corta con il YFP fuso all'N-terminale della 4.1R⁸⁰ (YFP-4.1R⁸⁰), lo stato ipotonico aumenta i valori d'efficienza di FRET e quindi presumibilmente l'interazione tra 4.1R⁸⁰ e ICln. Ci dicono inoltre che l'aumento dell'interazione tra ICln e la 4.1R⁸⁰ avviene con tempistiche compatibili con la traslocazione di ICln dal citosol alla membrana (Tamma et al., 2007; Ritter et al., 2003; Rodighiero et al., 2008), che viene indotta dall'ipotonìa, e con l'attivazione della ICIswell (Tamma et al., 2007). È stato dimostrato che la traslocazione di ICln in membrana aumenta significativamente dopo 10 minuti dallo stimolo ipotonico e grazie agli esperimenti di N-FRET, volti a studiare l'interazione tra ICln e la 4.1R⁸⁰ (Fig. 4E), abbiamo visto che se diamo uno stimolo ipotonico l'interazione aumenta significativamente già dopo 5 minuti mantenendosi costante fino a 20 minuti dal momento della sostituzione con la soluzione ipotonica. Pertanto lo shock ipotonico induce la traslocazione di una quota di ICln verso la membrana plasmatica, il distacco di 4.1R dal citoscheletro di membrana e l'aumento dell'interazione tra ICln e 4.1R, la cui sede principale sembra essere il citosol. Possiamo, pertanto, presupporre che il ruolo di ICln nella regolazione del volume cellulare potrebbe essere mediato dalla sua interazione con la 4.1R associata alla membrana plasmatica e indirettamente attraverso la modulazione dei canali ionici coinvolti nell'RVD.

6.4. Interazione tra 4.1R-actina-ICln

È noto in letteratura che ICln interagisce con l'actina (*Krapivinski et al., 1994*), in particolare con la forma filamentosa o F-actina (*Li et al., 1999*), e che le variazioni dello stato del citoschelettrico sono fondamentali per l'attivazione della corrente ICIswell (*Byfield et al., 2006; Tamma et al., 2007*). Anche la 4.1R lega, attraverso il dominio SAB, l'actina (in particolare la F-actina) (*Correas et al., 1986*). In accordo, gli esperimenti di coimmunoprecipitazione da noi condotti (Fig. 6C) hanno evidenziato l'effettiva interazione fra l'actina ed entrambe le isoforme 4.1R prese in esame. È quindi possibile immaginare la presenza di una complessa rete di legami fra ICln, le 4.1R e il citoscheletro

di actina, fondamentale per le loro funzioni in cellula e per la loro modulazione. In effetti i dati di immunoprecipitazione (Fig. 6D) indicano che l'over-espressione di ICIn non solo determina una delocalizzazione di 4.1R, ma questo si accompagna, per quanto riguarda 4.1R135, anche a una diminuzione del suo legame con l'actina (Fig. 6C). A tale proposito è interessante ricordare che il sito di legame tra ICIn e 4.1R avviene a livello del lobo C del dominio FERM (*Tang & Tang, 1998; Calinistian et al., 2006*), una regione coinvolta nel legame diretto con i fosfolipidi di membrana (*Sato & Onishi, 1983; Diakowski et al., 2006*) e dove legano alcuni fattori, come p55, il 4, 5InsP e la calmodulina, che modulano proprio l'interazione delle 4.1R con membrana e citoscheletro (*Edwards & Keep, 2001; Sun et al., 2002; Nunomura et al., 2011*). Nel caso della calmodulina è stato di recente dimostrato che il suo legame partecipa alla stabilizzazione strutturale del FERM (*Nunomura et al., 2011*) e delle sue interazioni. È quindi possibile ipotizzare che ICIn, legandosi proprio in questa regione, vada a interferire con il legame di 4.1R con partner molecolari fra cui la membrana il citoscheletro actinico sotto membranario.

6.5. Morfologia cellulare: 4.1R¹³⁵-ICIn

Il quadro che emerge dalla letteratura e dai i nostri dati, è che le due isoforme 4.1R possono avere funzioni ed effetti differenti nella fisiologia della cellula; 4.1R¹³⁵ sembra, infatti, essere la principale isoforma coinvolta nella regolazione dell'adesione cellulare e nell'emissione di filopodi. In collaborazione con la Dott.ssa Rodighiero (Fondazione Filarete), utilizzando la tecnica della microscopia elettronica a scansione (SEM), siamo andati a studiare gli effetti delle due isoforme 4.1R sulla morfologia cellulare, focalizzando la nostra attenzione su due parametri: l'area di adesione cellulare e il numero di filopodi. Come osservabile in figura 7, in presenza di 4.1R^{135(ATG2m)} si ha un incremento statisticamente significativo di entrambi i parametri analizzati. Tale incremento non si realizza, invece, in presenza di 4.1R⁸⁰ che mostra un effetto paragonabile al controllo (cellule transfettate

solo con pIRES-2-EGFP). È interessante notare come la co-espressione di ICIn annulli il fenotipo osservato. L'overespressione della sola ICIn non ha effetti sul numero di filopodi e sull'area cellulare.

Questi esperimenti mostrano come la 4.1R, specialmente l'isoforma 135kDa, influenzi pesantemente la morfologia cellulare. Questi dati supportano soprattutto il ruolo strutturale di 4.1R¹³⁵, probabilmente conferito dal dominio U1, e l'abilità di riorganizzazione del citoscheletro actinico. Sappiamo che 4.1R, attraverso il dominio SAB, gioca un ruolo cruciale nel mantenimento dell'integrità meccanica di membrana legando sia la F-actina che la spectrina (Gimm et al., 2002), ma il suo ruolo nella dinamica di emissione dei filopodi non è ancora chiaro. Molto probabilmente questo fenotipo potrebbe non essere semplicemente l'effetto di una diretta interazione con la F-actina ma bensì l'effetto dell'interazione con altre proteine citoscheletriche come le integrine (Calisan et al., 2005) e l'attivazione di un pathway di segnale conseguente alla riorganizzazione dell'actina. Abbiamo visto come ICIn sia in grado di modulare la morfologia cellulare anche se il meccanismo con cui ICIn interferisce in questo processo non è ancora chiaro. È inoltre possibile che l'overespressione di 4.1R¹³⁵ possa interferire con il signaling indotto dall'ipotonicità. L'attivazione dell'ICIswell è già stata messa in relazione allo stiffness dell'actina citoscheletrica (Cai et al., 1998; Byfield et al., 2006), e potrebbe essere plausibile che il cambio di morfologia, indotto dalla 4.1R¹³⁵, determini un'alterazione dell'architettura dell'actina citoscheletrica, influenzando negativamente, o almeno rallentando, l'attivazione dell'ICIswell. Il fatto che ICIn, che solitamente determina un'attivazione della corrente (Huber et al., 2000), possa inibire tutti i cambiamenti morfologici connessi a 4.1R¹³⁵ è in accordo con l'ipotesi che questi aspetti connessi a funzioni specializzanti di 4.1R¹³⁵ potrebbero essere cruciali per l'attivazione dell'ICIswell.

6.6. Proliferazione cellulare: 4.1R⁸⁰-ICln

Come emerso dai nostri studi, l'espansione cellulare e il numero di filopodi sono le caratteristiche morfologiche cellulari microscopiche maggiormente influenzate dall'overespressione di 4.1R, e ICln è la proteina in grado di invertire questi effetti legati all'isoforma 135kDa. È ragionevole ipotizzare che questi fenotipi possano essere collegati al ruolo di 4.1R nell'organizzazione del citoscheletro actinico (Faix et al., 2009; Le Clainche et al., 2008) ed è altrettanto plausibile che ICln interferisca con questo processo attraverso il suo legame con 4.1R e conseguente inibizione della sua affinità per la membrana e il citoscheletro sottomembranario. In letteratura è riportato che i membri della superfamiglia delle proteine FERM e, in particolare, le proteine 4.1 sembrano avere un effetto antiproliferativo (Tran et al., 1999; Gutmann et al., 2000; Perry et al., 2000; Huang et al., 2001; Perez-Ferreiro et al., 2004). Lo stato di proliferazione delle cellule a volte è stato messo in correlazione alla localizzazione delle 4.1 (Bretscher et al., 2002; Calinisan et al., 2006), uno degli aspetti influenzati da ICln, ed è stato in parte spiegato sulla base delle numerose interazioni che le 4.1R sono in grado di instaurare con numerosi e differenti componenti del proteoma cellulare. È stato proposto ad esempio che le 4.1 possano andare a influenzare i meccanismi di signalling volti a trasdurre i segnali proliferativi che dalla membrana agiscono sul nucleo, pathway che coinvolgono la proteina di membrana CD44, uno dei partner di 4.1R (Sun et al., 2002).

È stato dimostrato, inoltre, che anche ICln, oltre alle 4.1R, è in grado di legare le integrine (Larkin et al., 2004; Larkin et al., 2009), supportando l'ipotesi che potrebbe essere coinvolta una signalling in grado di regolare diverse funzioni tra cui migrazione e proliferazione cellulare (Desgrosellier et al., 2010), agendo principalmente sul citoscheletro actinico. È risaputo, inoltre, che la regolazione della morfologia cellulare è strettamente correlata con l'ingresso della cellula in fase-S (Chen et al., 1997; Pirone et al., 2006). Per queste ragioni abbiamo messo a punto una serie di esperimenti al fine di studiare la proliferazione cellulare analizzando la percentuale di cellule HEK in fase-S over-esprimenti le nostre due isoforme con o senza ICln. Dagli esperimenti

condotti, (Fig. 8A) abbiamo nuovamente evidenziato un comportamento differente per le due isoforme di 4.1R; solo la 4.1R⁸⁰ sembra avere un effetto antiproliferativo, riducendo in modo significativo la percentuale di cellule presenti in fase-S. Anche in questo caso la presenza di ICIn inverte gli effetti della 4.1R⁸⁰. Emerge pertanto un ruolo differente tra l'interazione di ICIn con l'una o l'altra isoforma, una considerazione che porta ad ipotizzare che il rapporto relativo tra le due isoforme e il loro legame specifico con ICIn rappresenti uno dei meccanismi di regolazione non solo della morfologia ma anche della proliferazione cellulare; 4.1R⁸⁰ sembra essere la principale isoforma coinvolta nella proliferazione cellulare (antiproliferativa), in accordo con il fatto che la variante 80kDa sono considerate proteine tipiche delle cellule differenziate (Gascard et al., 1998). ICIn, come nel caso della morfologia cellulare, sembra invertire l'effetto antiproliferativo della 4.1R⁸⁰. Questo risultato è coerente con l'osservazione che ICIn, legando il dominio FERM, è in grado di alterare l'affinità di 4.1R nei confronti della membrana e dell'actina citoscheletrica, e la perdita d'interazione del dominio FERM con le molecole d'adesione delle cellule sembra essere un meccanismo chiave nella patogenesi di tumori relazionati a 4.1 e relazionati alle proteine ERM (Sun et al., 2002) 4.1B (Kuns et al., 2005; Wong et al., 2007; Zhang et al., 2012), 4.1N (Ji et al., 2012) e 4.1R (Robb et al., 2003).

6.7. CONCLUSIONE

In conclusione i dati presentati in questo lavoro evidenziano un nuovo ruolo di ICIn come regolatore delle funzioni delle 4.1R. Non solo ICIn è in grado di influenzare la localizzazione di entrambe le isoforme (ad alto e basso peso molecolare) di 4.1R, ma sembra anche agire come regolatore delle loro funzioni, con effetti diversi a seconda dell'isoforma considerata. L'interazione di ICIn con specifici tipi di 4.1R (e potenzialmente anche di altre 4.1) è coinvolta in numerosi aspetti della fisiologia cellulare, quali la regolazione del volume e della morfologia cellulare e la proliferazione cellulare. L'effetto di tali interazioni sembra tuttavia essere particolarmente complesso e variegato e strettamente dipendente dal tipo di isoforma di 4.1R coinvolta.

7. FIGURE

Figura 1

Interazione tra 4.1R^{80/135} e ICln in cellule HEK: FRET. (A) immagini di un esperimento di FRET acceptor photobleaching su cellule in vivo over-esprimenti Y-4.1R⁸⁰ e C-ICln; (B,C) quantificazione degli esperimenti di FRET con CFP-tagged ICln e YFP-tagged 4.1R⁸⁰ (B) o YFP-tagged 4.1R¹³⁵ (C). La media del FRET \pm sem è stata tracciata (*= $p < 0.05$ per Y-4.1R⁸⁰+C-ICln vs Y-4.1R⁸⁰+C, one-way Anova test). Scale bar 10 μ m.

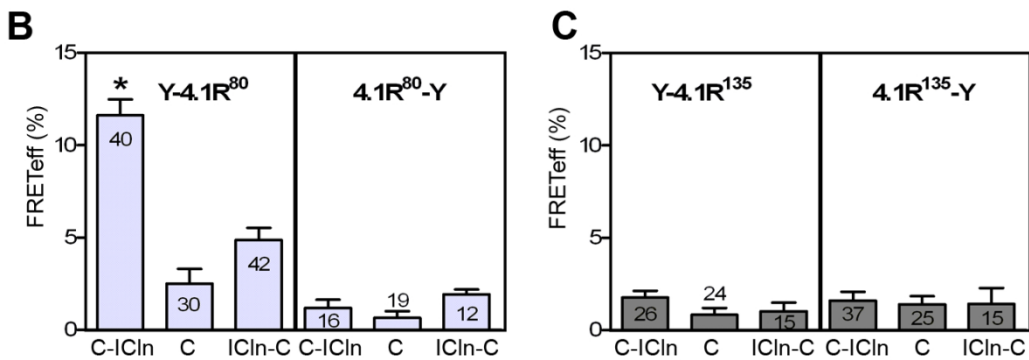
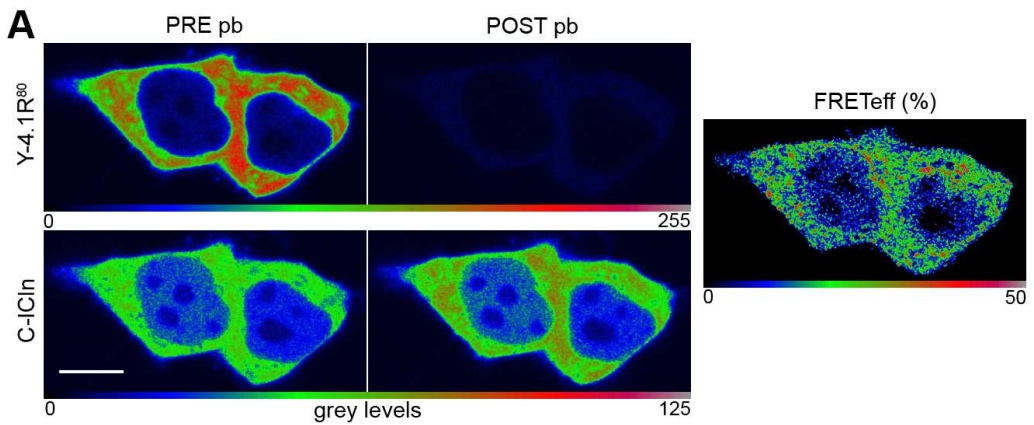


Figura 2

Interazione tra 4.1R^{80/135} e ICIn in cellule HEK: co-immunoprecipitazione. (A) Co-immunoprecipitazione di YFP-tagged 4.1R⁸⁰ o 4.1R¹³⁵ con FLAG-ICIn (*ICIn*) o con FLAG tagged BAP (Bovine Alkaline Peroxidase) (*BAP*, controllo). Le cellule HEK sono state co-trasfettate con FLAG-ICIn al C-terminale e Y-4.1R⁸⁰/4.1R⁸⁰-Y/Y-4.1R¹³⁵/4.1R¹³⁵-Y. FLAG-ICIn è stata immunopurificata utilizzando un anticorpo anti-FLAG. Per tutte le condizioni, sono mostrati i segnali di 4.1R (anticorpi anti-GFP e anti-4.1R) e FLAG (anticorpo anti-FLAG) in lisati cellulari (L), e tre sequenze di eluati 40 µl (E1-E3). (B) Western blot (anticorpo anti-4.1R) di proteine totali estratte da cellule HEK trasfettate con proteine C- o N-terminale YFP-tagged 4.1R o cellule trasfettate con EGFP-IRES-4.1R^{80/135/135(ATG2m)} (*4.1R*). Nel caso di 4.1R^{80/135/135(ATG2m)}-Y, l'espressione delle proteine è stata controllata con un anticorpo anti-4.1R e con un anticorpo anti-GFP. (C) Co-immunoprecipitazione di Y-4.1R⁸⁰ o Y-4.1R^{135(ATG2m)} con FLAG-ICIn, è riportato un western blot condotto con un anticorpo anti-4.1R (*4.1R*) e un anti-FLAG (*FLAG*), mostrando il risultato di due esperimenti differenti. Il relativo grafico rappresenta la media (n=4) del rapporto OD_E/OD_{lys} , calcolato tra la densità ottica (OD) delle bande 4.1R nell'eluizione finale (E) e i loro relativi lisati (lys). (D) Co-immunoprecipitazione con FLAG-ICIn della 4.1R endogena in cellule HEK. Sulla sinistra è riportato un esperimento di western blot che mostra il risultato di 4 esperimenti indipendenti con FLAG-ICIn. Anti-4.1R (*4.1R*) e anti-FLAG (*FLAG*) sono stati usati per rilevare le proteine 4.1R e FLAGed, rispettivamente. Nel grafico relativo, è mostrato il rapporto della media tra le bande OD di 4.1R¹³⁵ e 4.1R⁸⁰ ($OD_{4.1R^{135}}/OD_{4.1R^{80}}$) (n=5). Sulla destra è riportato un esperimento di western blot che mostra l'immunoprecipitazione di 4.1R con Flag-ICIn, ma non è riportato con FLAG-BAP (controllo)

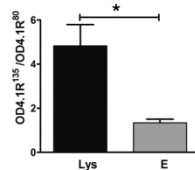
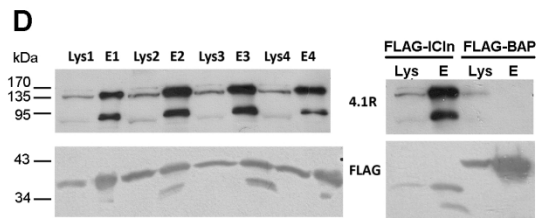
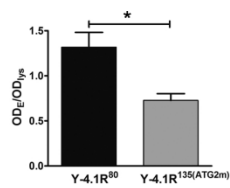
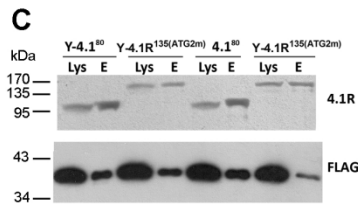
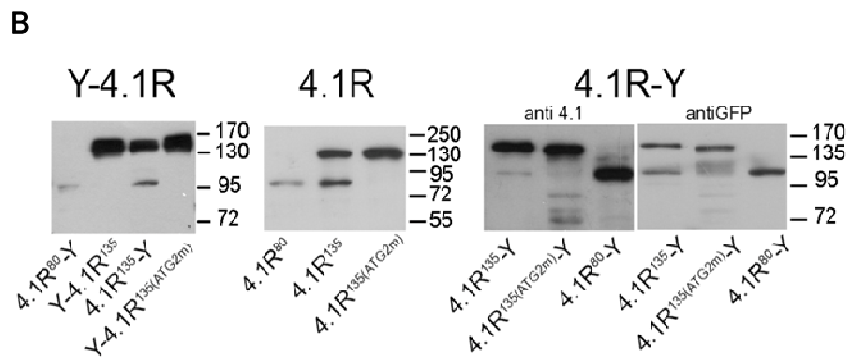
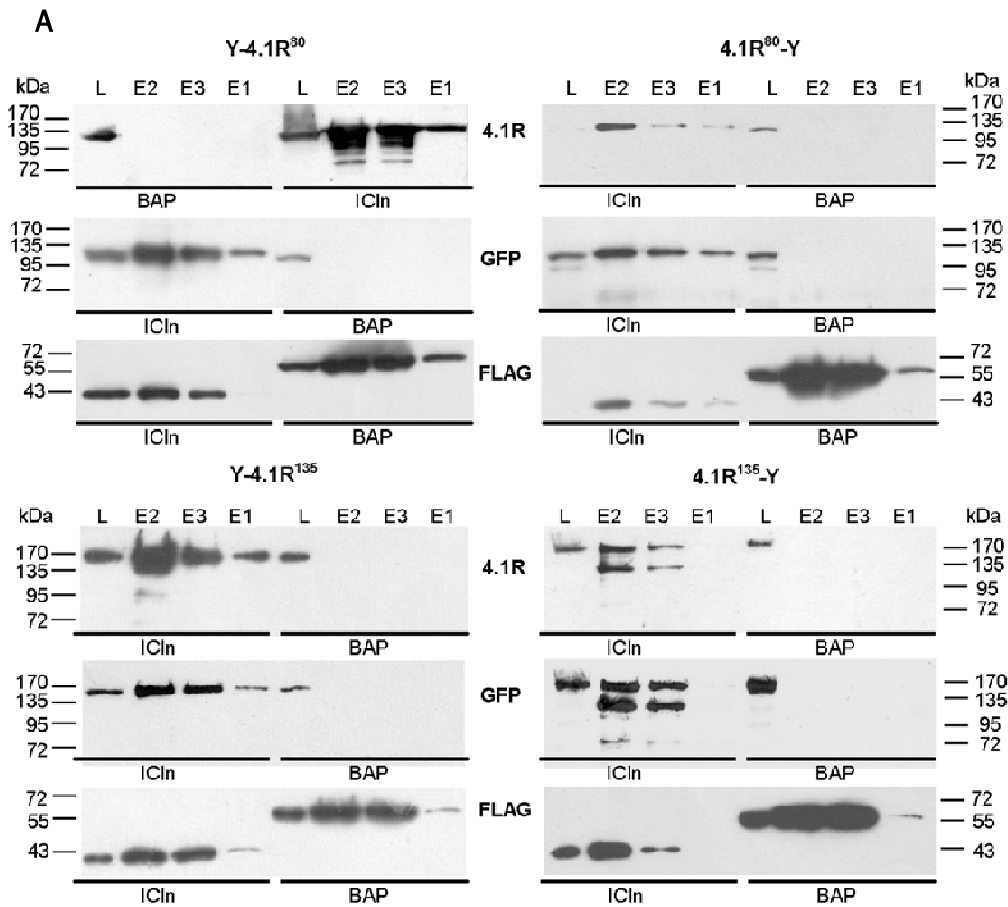
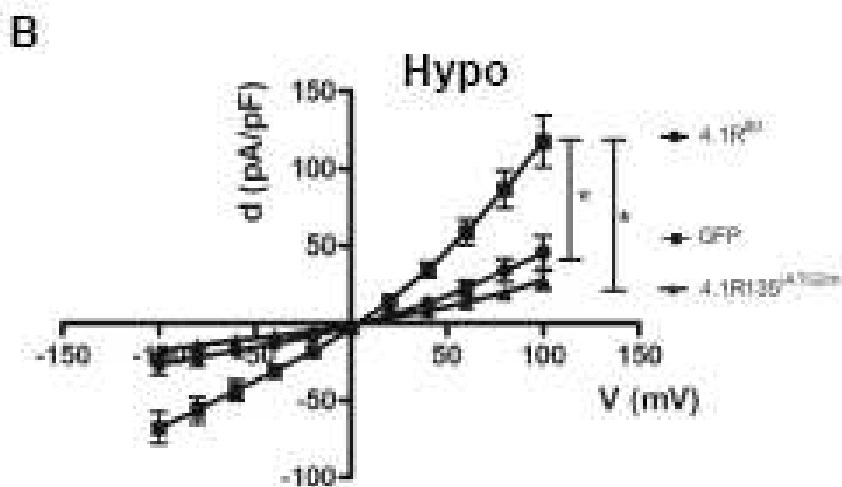
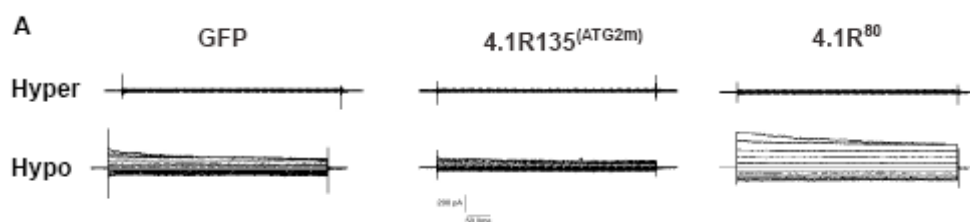


Figura 3

Caratterizzazione dell' ICl_{swell} in cellule over-esprimenti 4.1R^{80/135}. (A) relazione della densità media di corrente, d (pA/pF), rispetto al voltaggio di membrana, V (mV), in cellule over-esprimenti le proteine indicate ed esposte a soluzione extracellulare ipotonica per 10 min (GFP: n=22, 4.1R⁸⁰: n=15, 4.1R^{135(ATG2m)}: n=14). (B) Attivazione della corrente di cloruro durante l'esposizione a soluzione ipotonica (GFP: n=24, 4.1R⁸⁰: n=17, 4.1R^{135(ATG2m)}: n=14). (C,D) relazione tra la densità di corrente media e il voltaggio di membrana valutata in soluzione extracellulare ipertonica in cellule controllo (over-esprimenti GFP) o in cellule over-esprimenti la proteina 4.1R⁸⁰ (C) o la 4.1R¹³⁵ (D) (GFP: n=43, 4.1R⁸⁰: n=38, 4.1R^{135(ATG2m)}: n=27). *= $p < 0.05$, ***= $p < 0.001$, by two-way Anova.



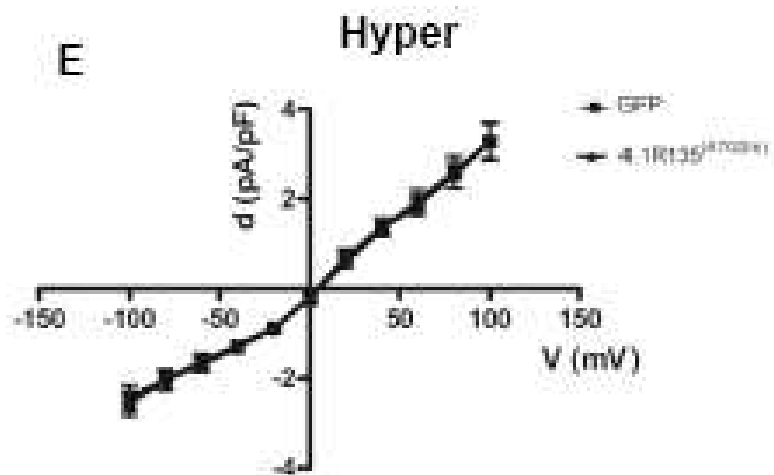
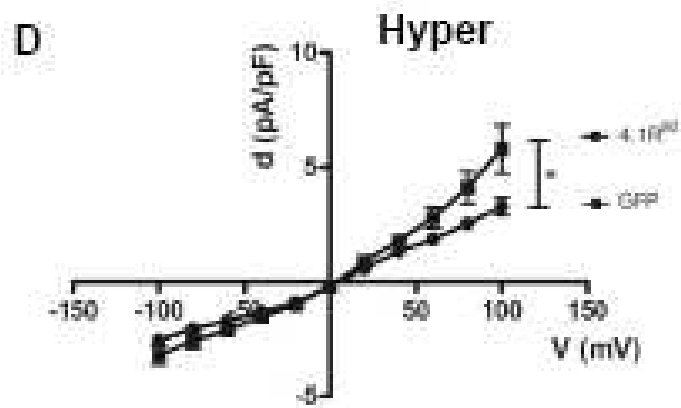
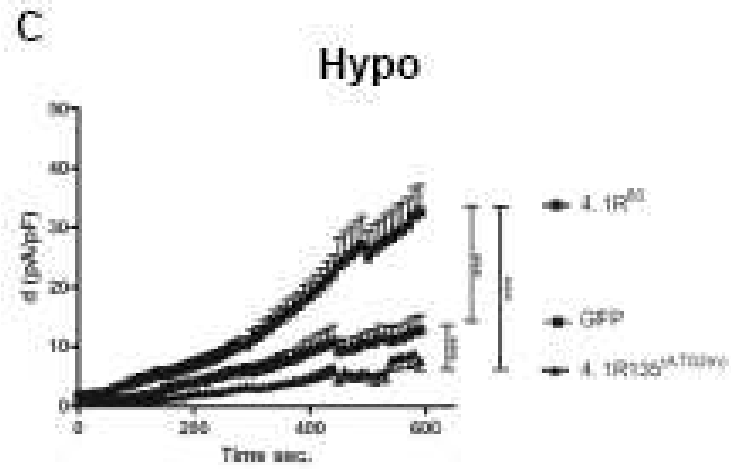


Figura 4

Effetti sulla localizzazione in membrane di 4.1R e sull'interazione 4.1R-ICln in seguito a shock ipotonico. (A) singolo piano confocale di una cellula esprime la protein marker di membrana C-mem (Cm) e la Y-4.1R^{135(ATG2m)} acquisita in soluzione extracellulare ipertonica/ipotonica. Le frecce indicano la regione di membrane dove il segnale 4.1R^{135(ATG2m)} diminuisce fortemente dopo stress ipotonico. Il coefficiente di Pearson (B) e Manders (C) sono stati calcolati dalla Z-stacks tra le proteine Cm e la YFP-tagged indicate nei grafici. Il coefficiente di Manders mostrato rappresenta la frazione del segnale YFP sovrapposto al segnale CFP. Per ogni campione, la media dei coefficienti ottenuti in soluzione extracellulare ipertonica è stata comparata alla media del coefficiente in condizioni di ipotonia (Anova with Post-hoc Dunnett's Multiple comparison test, $*=p<0.05$). Scale bar 10 mm. (D) Western blot di proteina endogena di membrana 4.1R di cellule HEK, in condizione di ipertonia (*hyper*), o ipotonia (*hypo*). Sono riportate nel grafico relativo (n=8) la media OD delle bande 4.1R, normalizzate per la banda della pompa Na/K ($OD_{4.1R}/OD_{NaK}$). I valori sono espressi come percentuali in relazione alla condizione ipertonica relativa. $*=p<0.05$. (E) Immagine NFRET rappresentativa di Y-4.1R⁸⁰/C-ICln espresse in cellule HEK in soluzione extracellulare ipertonica o, dopo 10 min dalla sostituzione, in soluzione extracellulare ipotonica. Grafico relativo all'andamento nel tempo del segnale di NFRET durante l'RVD. In cellule esponenti Y-4.1R⁸⁰/C-ICln, ma non nella condizione di controllo (cellule esponenti Y-4.1R⁸⁰/C-ICln), il segnale di NFRET aumenta significativamente dopo 5 minuti in soluzione extracellulare ipotonica comparata alla condizione di ipertonia (one-way Anova con Dunnett's multiple comparison test). I valori di NFRET calcolati in soluzione extracellulare ipertonica in cellule esponenti Y-4.1R⁸⁰/C-ICln erano significativamente diversi dal controllo (cellule Y-4.1R⁸⁰/C, T-test), sia a 0 che a 10 minuti. Scale bar 10 mm. $*** = p<0.001$, $** = p<0.01$.

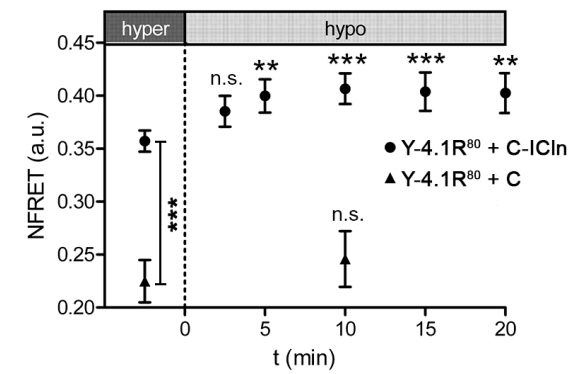
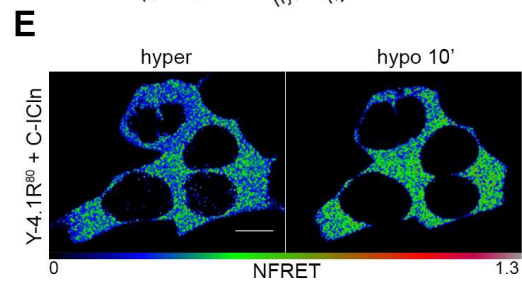
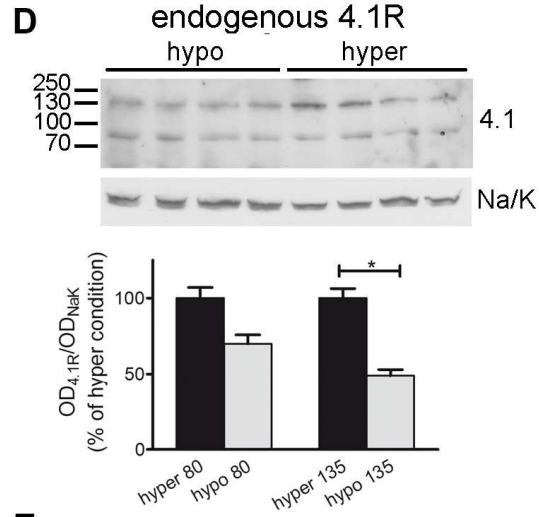
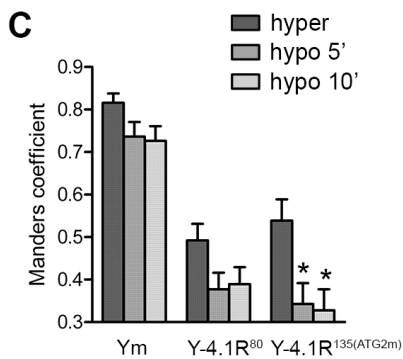
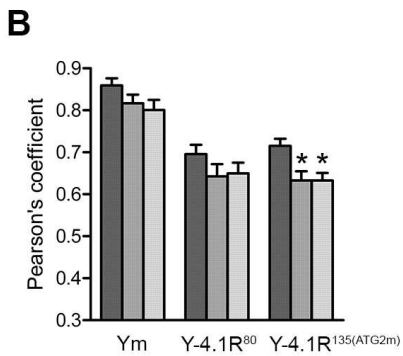
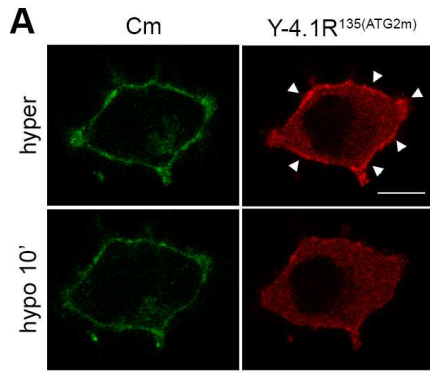


Figura 5

Effetti dell'overespressione di ICln sulla localizzazione di 4.1R in membrana. (A) L'immagine rappresenta la localizzazione intracellulare della proteina indicata (singolo piano confocale). La proteina co-trasfettata non mostrata è indicata dentro la parentesi. (B) Immagini esplicative di cellule HEK co-trasfettate con vettori GFP-IRES-4.1R⁸⁰ (4.1R⁸⁰) o GFP-IRES-4.1R^{135(ATG2m)} (4.1R^{135(ATG2m)}) e CFP (C) o CFP-ICln (C-ICln). I campioni sono stati immunotrattati con un anticorpo anti-4.1R per visualizzare il segnale di 4.1R. Gli asterischi presenti nel pannello del segnale endogeno 4.1R indicano le cellule trasfettate con CFP o C-ICln. Scale bar 10 mm. (C) Effetti di ICln sulla localizzazione della 4.1R endogena: western blot su estratto totale di proteine di membrane di cellule HEK trasfettate con C-ICln o C (controllo). Gli istogrammi rappresentano il valore della media OD del segnale delle 4.1R normalizzate per il corrispettivo segnale di caderina (n=4). I valori sono espressi in percentuali. **=p<0.01, *=p<0.05.

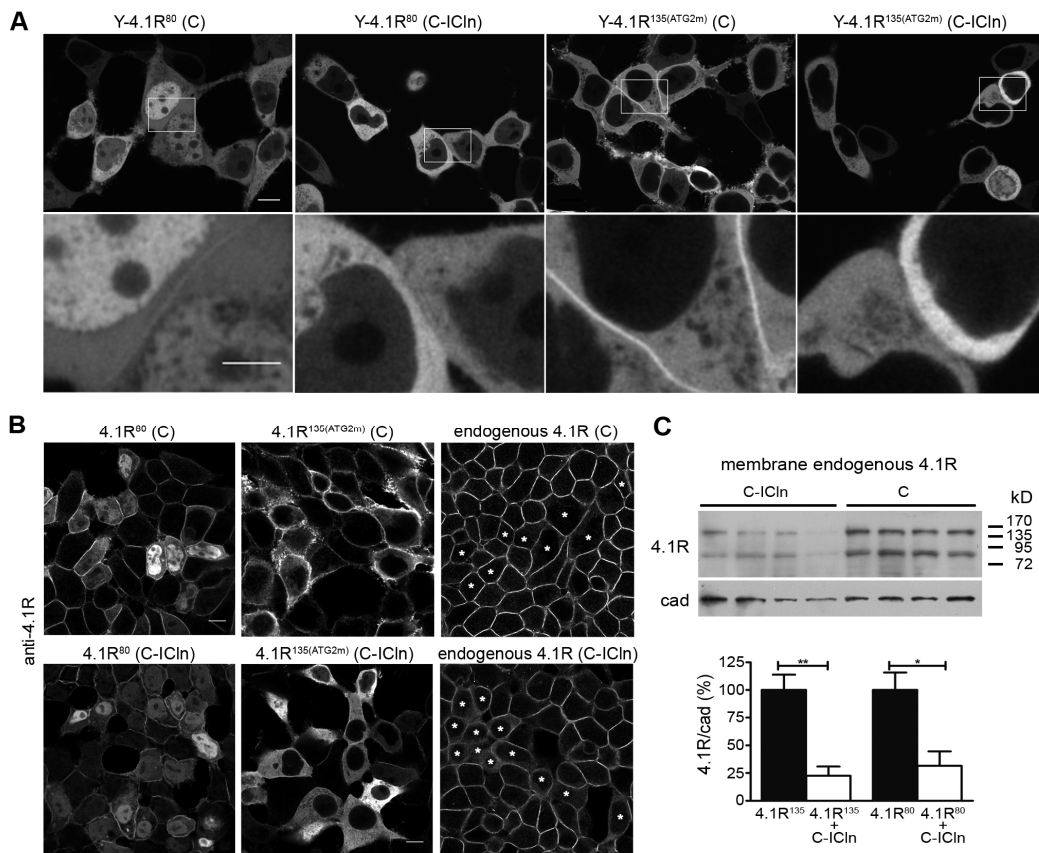


Figura 6

Analisi di FRET dell'interazione tra YFP-tagged 4.1R eCFP- β Actin (C-Actin). (A) esempio di un esperimento di FRET acceptor photobleaching in cellule HEK over-esprimenti Y-4.1R^{135(ATG2)} e C- β Actin. Un segnale di FRET può essere osservato sotto la membrana plasmatica (asterischi). Scale bar 5 μ m. La FRET_{eff} è stata misurata in ROIs comprendendo la regione della membrana e del citoplasma. (B) Media FRET_{eff} \pm s.e.m. calcolato in cellule over-esprimenti Y-4.1R^{135(ATGm)}, C- β Actin e IRES-DsRED (-ICln) o Y-4.1R^{135(ATG2m)}, C- β Actin e ICln-IRES-DsRED (+ICln). (***)= $p < 0.001$, -ICln vs +ICln). (C, D) Co-immunoprecipitazione con actina di proteine 4.1R⁸⁰ o 4.1R^{135(ATG2m)} over-esprese. (C) Sono state trasfettate cellule HEK con GFP-IRES-4.1R^{80/135(ATG2m)} e immunoprecipitate usando un anticorpo goat anti-actina (campioni 135 o 80). Goat Ig-G (Bovine Alkaline Peroxidase) è stato usato come controllo negativo (*ctr*). In (D) C-ICln (+ICln) o C (-ICln) è stato co-trasfettato con 4.1R per investigare l'effetto di ICln sull'interazione 4.1R/actina. I western blots mostrati sono rappresentativi del numero totale di 3 (4.1R¹³⁵) o 2 (4.1R⁸⁰) esperimenti indipendenti, tutti con risultati comparabili. Per tutte le condizioni sono mostrati in (C) e in (D) i segnali 4.1R (*anti-4.1R*) e actina (*anti-Act*), in lisati cellulari (L) e negli eluati finali (E). Le bande addizionali nella colonna 4.1R⁸⁰ presenti nel western blot (D), sono residui non completamente denaturati (*anti-4.1R*) o catene dell'anticorpo denaturate (*anti-actina*). Sono stati riconosciuti anche dal solo anticorpo secondario anti-goat.

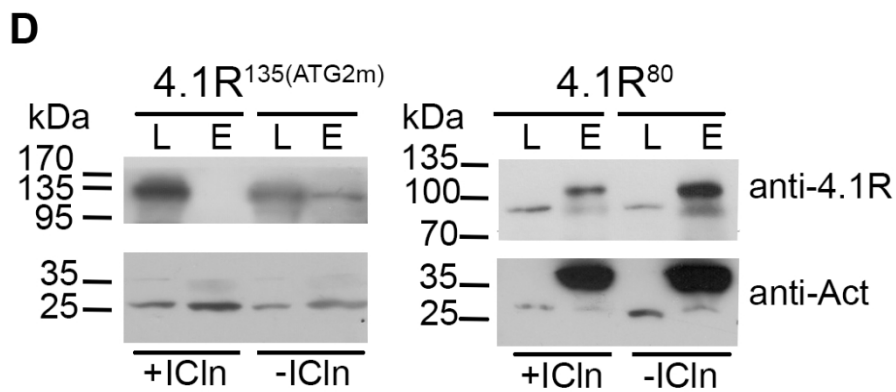
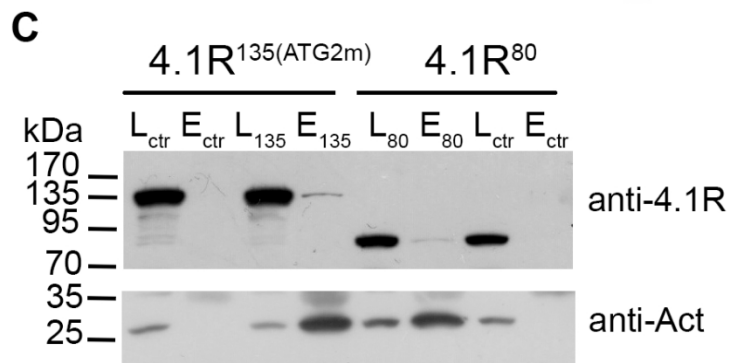
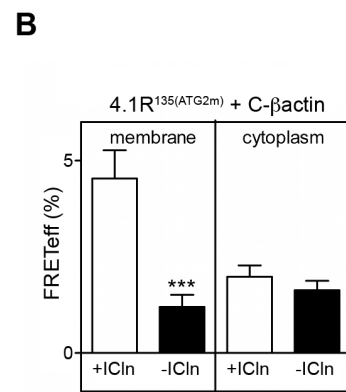
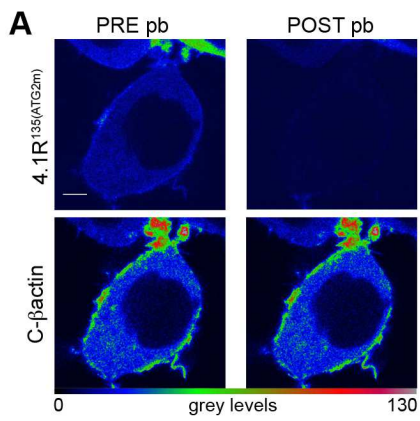


Figura 7

Analisi morfologiche di cellule HEK over-esprimenti 4.1R e ICIn. (A) Proiezione massima del numero di sezioni ottiche corrispondenti almeno alla metà della cellula (z-step size 0.25 μm). sono mostrate le proteine over-esprese. È mostrato solo il canale YFP. Scale bar: 20 μm . (B) È mostrato il piano confocale della cellula attaccata al vetrino, acquisita con il confocale o il gated-STED (g-STED) Leica TCS SP8. La cellula over-esprime la proteina marker di membrana (YFP-mem) e la 4.1R^{135(ATG2m)}. È mostrato solo il segnale YFP. Scale bar 5 μm in A e 0.5 μm in 1 e 2. (C) Esempio di acquisizione SEM di cellule trasfettate con GFP-IRES-4.1R^{135(ATG2m)}. (D) Il grafico a barre mostra la media dell'area cellulare \pm s.e.m. (μm^2) calcolata dalle immagini di SEM. (E) Densità media dei filopodi per cellula. Numero di filopodi per cellula/perimetro della cellula (μm). Il numero di barre rappresenta il numero di cellule analizzate dai tre esperimenti indipendenti. *=p<0.05; ***=p<0.001.

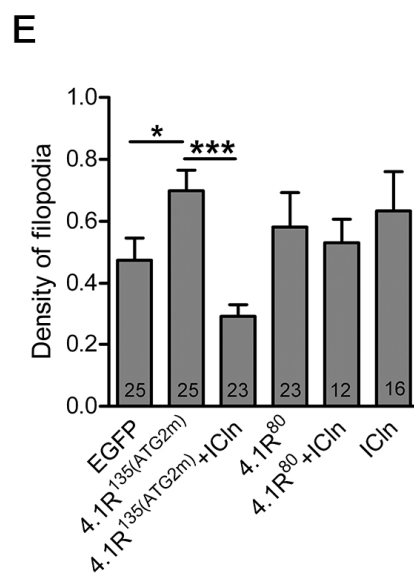
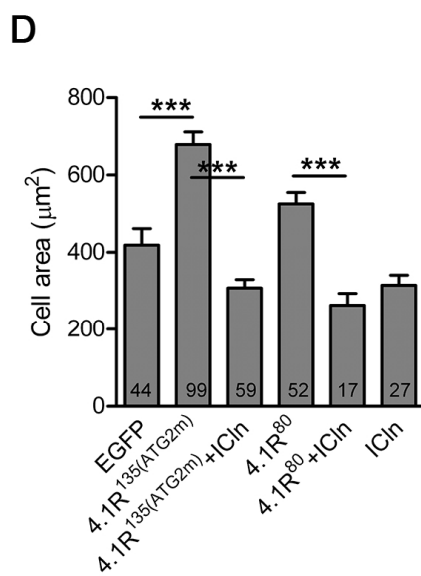
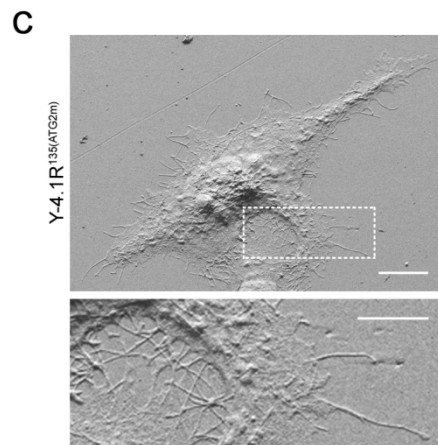
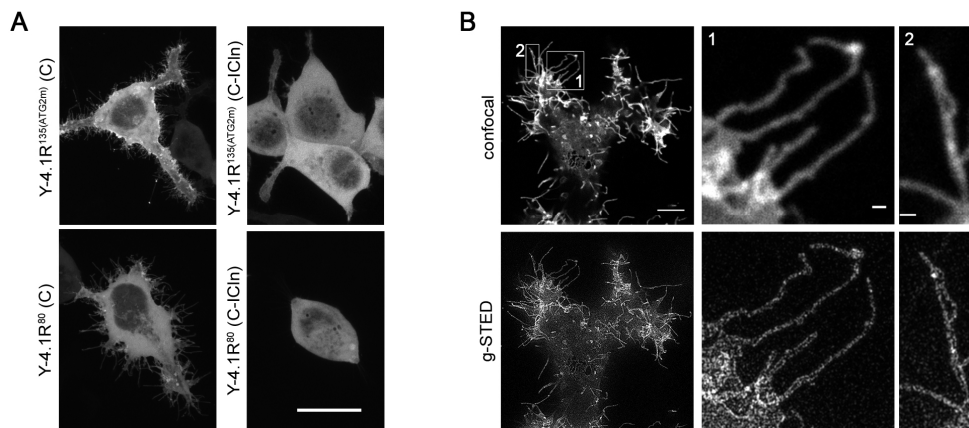
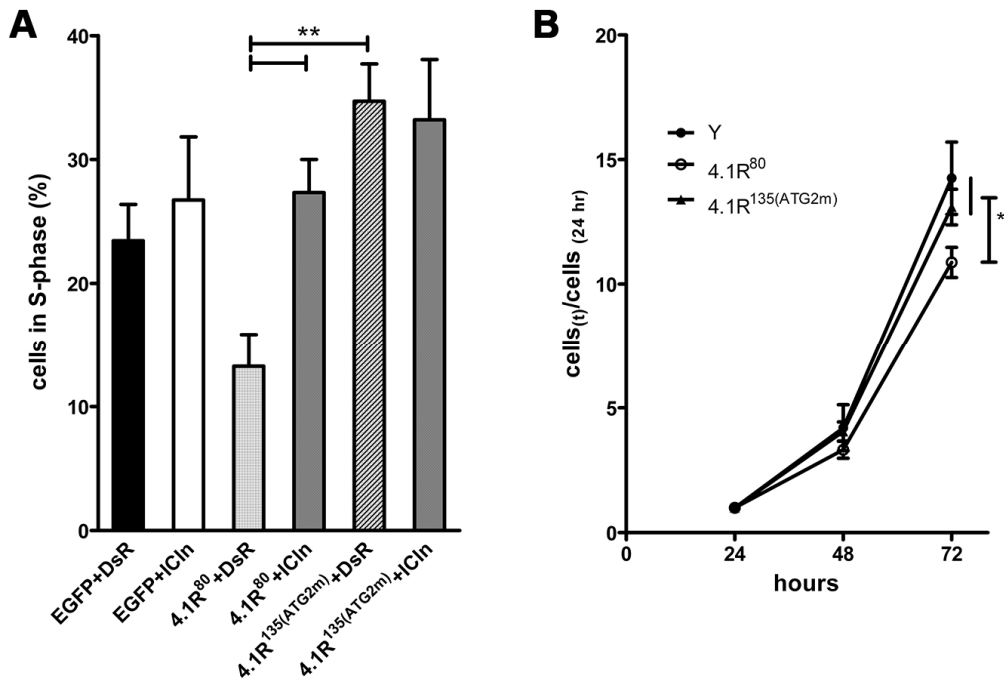


Figura 8

Analisi del ciclo cellulare in fase S e della proliferazione cellulare in cellule HEK over-esprimenti le isoforme 4.1R^{80/135(ATG2m)} con o senza l'over-espressione di ICln. (A) Media in percentuale delle cellule in fase S \pm sem per i campioni over-esprimenti le proteine indicate. (B) MTT assay di cellule alle 24, 48 e 72 ore dalla trasfezione (curva di crescita). Per ogni tempo l'assorbanza dell'MTT è stata normalizzata con l'assorbanza dell'MTT a 24 ore dalla trasfezione ($cells_{(t)}/cells_{(24hr)}$).



8. BIBLIOGRAFIA

- ACKERMAN M.J., WICKMAN K.D., CLAPHAM D.E. (1994)-Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes- *J. Gen. Physiol.* 103(2):153-79
- BLOMBERG N., NILGES M. (1997)-Functional diversity of PH domains: an exhaustive modelling study *Fold- Des* 2:343-55
- BUYSE G, DEGREEF C, RAEYMAEKERS L, DROOGMANS G, NILIUS B, EGGERMONT J (1996)-The ubiquitously expressed p1Cln protein forms homodimeric complexes in vitro- *Biochem Biophys Res Commun* 218:822
- APLIN AE., HOWE A., ALAHARI SK., JULIANO RL. (1998)-Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins- *Pharmacol Rev* 50: 197-263.
- ALLOISIO N, DALLA VENEZIA N, RANA A, ANDRABI K, TEXIER P, GILSANZF, CARTRON J-P, DELAUNAY J, CHISHTI AH (1993)-Evidence that red blood cell protein p55 may participate in the skeleton membrane linkage that involves protein 4.1 and glycophorin-*Blood* 82: 1323-1327
- AN X-L, TAKAKUWA Y, MANNO S, HAN B-G, GASCARD P, MOHANDASN (2001)-Structural and functional characterization of protein 4.1R-phosphatidylserine

interaction: potential role in 4.1R sorting within cells-J Biol Chem 276: 35778-35785

- AN X-L, TAKAKUWA Y, NUNOMURA W, MANNO S, MOHANDAS N (1996)- Modulation of band3- ankyrin interaction by protein 4.1:functional implications in regulation of erythrocyte membrane mechanical properties-J Biol Chem 271: 33187-33191

- AN X, ZHANG X, DEBNATH G, BAINES AJ, MOHANDAS N (2006)- Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) differentially regulates the interaction of human erythrocyte protein 4.1 (4.1R) with membrane proteins- Biochemistry 45: 5725-5732

- DISCHER D, PARRA M, CONBOY JG, MOHANDAS N (1993)- Mechanochemistry of the alternatively spliced spectrin-actin binding domain in membrane skeletal protein 4.1- J Biol Chem 268: 7186-7195

- GARY R, BRETSCHER A (1995)-Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site- Mol Biol Cell 6: 1061-1075

- GASCARD P, COHEN CM (1994)-Absence of high-affinity band 4.1 binding sites from membranes of glycophorin C- and D-deficient (Leach phenotype) erythrocytes- Blood 83: 1102- 1108

- GASCARD P, NUNOMURA W, LEE G, WALENSKY LD, KRAUSS SW, TAKAKUWA Y, CHASIS JA, MOHANDAS N, CONBOY JG (1999)-Deciphering the nuclear import pathway for the cytoskeletal red cell protein 4.1R- Mol Biol Cell 10: 1783-1798

- GIMM JA, AN X, NUNOMURA W, MOHANDAS N (2002)-Functional characterization of spectrin- actin-binding domains in 4.1 family of proteins- Biochemistry 41: 7275-7282

- EDWARDS SD, KEEP NH (2001)-The 2.7 Å crystal structure of the activated FERM domain of moesin: an analysis of structural changes on activation- *Biochemistry* 40: 7061-7068

- HOOVER KB, BRYANT PJ (2000)-The genetics of the protein 4.1 family: organizers of the membrane and cytoskeleton- *Curr Opin Cell Biol* 12: 229-234

- HORNE WC, PRINZ WC, TANG EK (1990)-Identification of two cAMP dependent phosphorylation sites on erythrocyte protein 4.1- *Biochim Biophys Acta* 1055: 87-92

- HOU C-L, TANG C-JC, ROFFLER SR, TANG TK (2000)-Protein 4.1R binding to eIF3-p44 suggest an interaction between the cytoskeletal network and the translational apparatus- *Blood* 96:747-753

- LUQUE CM, CORREAS I (2000)-A constitutive region is responsible for nuclear targeting of 4.1R: modulation by alternative sequences results in differential intracellular localization- *J Cell Sci* 113: 2485-2495

- LUQUE CM, PEREZ-FERREIRO CM, PEREZ-GONZALES A, ENGLMEIER L, KOFFA MD, CORREAS I (2003)-An alternative domain containing a leucine-rich sequence regulates nuclear cytoplasmic localization of protein 4.1R- *J Biol Chem* 278: 2686-2691

- MANNO S, TAKAKUWA Y, MOHANDAS N (2005)-Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation- *J Biol Chem* 280: 7581-7587

- MARFATIA SM, LEU RA, BRANTON D, CHISHTI AH (1994)-In vitro studies suggest a membrane-associated complex between erythroid p55, protein 4.1 and glycophorin C- *J Biol Chem* 269: 8631-8634

- MARFATIA SM, LEU RA, BRANTON D, CHISHTI AH (1995)-Identification of the

protein 4.1 binding interface on glycophorin C and p55, a homologue of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein-J Biol Chem 270: 715-719

- MATTAGAJASINGH SN, HUANG S-C, HARTEISTEIN JS, BENZ EJ JR (2000)- Characterization of the interaction between protein 4.1R and ZO-2. A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton-J Biol Chem 275: 30573-30585

- NUNOMURA W, TAKAKUWA Y (2006)-Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca²⁺ and calmodulina-Front Biosci 11:1522-1539

- NUNOMURA W, TAKAKUWA Y, PARRA M, CONBOY JG, MOHANDAS N (2000)- Ca(2+)- dependent and Ca(2+)-independent calmodulin binding sites in erythrocyte protein 4.1. Implications for regulation of protein 4.1 interactions with transmembrane proteins-J Biol Chem 275: 6360-6367

- NUNOMURA W, TAKAKUWA Y, PARRA M, CONBOY JG, MOHANDAS N (2000)- Regulation of protein 4.1R, p55, and glycophorin C ternary complex in human erythrocyte membrane-J Biol Chem 275: 24540-24546

- NUNOMURA W, TAKAKUWA Y, TOKIMITSU R, KRAUSS SW, KAWASHIMA M, MOHANDAS N (1997)-Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by Ca²⁺ and calmodulin: implications for modulation of CD44-ankyrin interaction-J Biol Chem 272: 30322-30328

- PARRA M, GASCARD P, WALENSKY LD, GIMM JA, BLACKSHAW S, CHAN N, TAKAKUWA Y, BERGER T, LEE G, CHASIS JA, SNYDER SH, MOHANDAS N, CONBOY JG (2000)-Molecular and functional characterization of protein 4.1B, a novel member of the protein 4.1 family with high level, focal expression in brain-J Biol Chem 275: 3247-3255

- PARRA M, GASCARD P, WALENSKY LD, SNYDER SH, MOHANDAS N, CONBOY JG (1998)- Cloning and characterization of 4.1G (EPB41L2), a new member of the

skeletal protein 4.1 (EPB41) gene family-Genomics 49: 298-306

- PEREZ-FERREIRO CM, LUQUE CM, CORREAS I (2001)-4.1R proteins associate with interphase microtubules in human T cells: a 4.1R constitutive region is involved in tubulin binding-J Biol Chem 276: 44785-44791

- PEREZ-FERREIRO CM, VERNOS I, CORREAS I (2004)-Protein 4.1R regulates interphase microtubule organization at the centrosome-J Cell Sci 117: 6197-6206

- PINDER JC, GARDNER B, GRATZER WB (1995)-Interaction of protein 4.1 with the red cell membrane: effects of phosphorylation by protein kinase C- Biochem Biophys Res Commun 210: 478-482

- RAMEZ M, BLOT-CHABAUD M, CLUZEAUD F, CHANAN S, PATTERSON M, WALENSKY LD, MARFATIA S, BAINES AJ, CHASIS JA, CONBOY JG, MOHANDAS N, GASCARD P (2003)-Distinct distribution of specific members of protein 4.1 gene family in the mouse nephron-Kidney Int 63: 1321-1337

- SATO SB, ONISHI S (1983)-Interaction of a peripheral protein of the erythrocyte membrane, band 4.1 with phosphatidylserine containing liposomes and erythrocyte inside-out vesicles-Eur J Biochem 130: 19-25

- SCOTT C, KEATING L, BELLAMY M, BAINES AJ (2001)-Protein 4.1 in forebrain postsynaptic density preparations: enrichment of 4.1 gene products and detection of 4.1R binding proteins-Eur J Biochem 268: 1084-1094

- SCOTT C, PHILLIPS GW, BAINES AJ (2001)-Properties of the C terminal domain of 4.1 proteins- Eur J Biochem 268: 3709-3717

- SHI ZT, AFZAL V, COLLIER B, PATEL D, CHASIS JA, PARRA M, LEE G, PASZTY C, STEVENS M, WALENSKY L, PETERS LL, MOHANDAS N, RUBIN E, CONBOY JG (1999)-

Protein 4.1R-deficient mice are viable but have erythroid membrane skeleton abnormalities-J Clin Invest 103: 331-340

- SUN CX, ROBB VA, GUTMANN DH (2002)-Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation-J Cell Sci 115: 3991-4000

- TAKAKUWA Y (2001)-Regulation of red cell membrane protein interactions: implications for red cell function-Curr Opin Hematol 8: 80-84

- WINARDI R, DISCHER D, KELLEY C, ZON L, MAYS K, MOHANDAS N, CONBOY JG (1995)- Evolutionarily conserved alternative pre-mRNA splicing regulates structure and function of the spectrin actin binding domain of erythroid protein 4.1-Blood 86: 4315- 4322

- YAMAKAWA H, OHARA R, NAKAJIMA D, NAKAYAMA M, OHARA O(1999)- Molecular characterization of a new member of the protein 4.1 family (brain 4.1) in rat brain-Brain Res Mol Brain Res 70: 197-209

- TURUNEN O, WAHLSTROM T, VAHERI A (1994)-Ezrin has a COOH terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family-J Cell Biol 126: 1445-1453

- BENNETT V., BAINES A.J. (2001)-Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues-Physiol Rev 81(3):1353-92

- BOIVIN P. (1988)-Role of the phosphorylation of red blood cell membrane proteins-Biochem. J. 256, 689-695k

- CALINISAN V., GRAVEM D., CHEN R., BRITTIN S., MOHANDAS N., LECOMTE M., GASCARD P. (2006)-New insights into potential functions for the protein 4.1 superfamily of proteins in kidney epithelium-Frontiers in Bioscience 11: 1646-1666

- CHASIS J. A., COULOMBEL L., MCGEE S., LEE G., TCHERNIA G., CONBOY J. and MOHANDAS N. (1996)-Differential use of protein 4.1 translation initiation sites during erythropoiesis: implications for a mutation-induced stage-specific deficiency of protein 4.1 during erythroid development- Blood 87, 5324-5331

- CHIEH-JU C., TANG AND TANG K. TANG (1998)-The 30 kD domain of protein 4.1 mediates its binding to the carboxyl terminus of p130Cas, a protein involved in cellular volume regulation-Blood, vol.92, No 4 pp 1442-1447

- CONBOY J.G., CHAN J. Y., CHASIS J. A., KAN Y. W. and MOHANDAS N. (1991)-Tissue- and development-specific alternative RNA splicing regulates expression of multiple isoforms of erythroid membrane protein 4.1-J. Biol. Chem. 266, 8273-8280

- CONBOY J.G., CHASIS J.A., WINARDI R., TCHERNIA G., KAN Y.W., MOHANDAS N. (1993)-An isoform-specific mutation in the protein 4.1 gene results in hereditary elliptocytosis and complete deficiency of protein 4.1 in erythrocytes but not in nonerythroid cells-J Clin Invest 91:77-82

- CONBOY J. (1987)-Molecular cloning and characterization of the gene coding for red cell membrane skeletal protein 4.1-Biorheology 24, 673-687

- CORREAS I., LETO T.L., SPEICHER D.W., MARCHESI V.T. (1986)-Identification of the functional site of erythrocyte protein 4.1 involved in spectrin-actin interactions-J Biol Chem 261:3310

- DE CARCER G., LALLENA M.J., CORREAS I (1995)-Protein 4.1 is a component of the nuclear matrix of mammalian cells-Biochem J 312:871-877

- DIAKOWSKI W., GRZYBEK M., SIKORSKI A.F. (2006)-Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily - Folia histochemica et cytobiologica, Vol. 44 No 4. Pp 231-248

- FURST J., BOTTA' G., SAINO S., DOPINTO S., GANDINI R. ET AL. (2006)-The ICln interactome - *Acta Physiol (Oxf)* 187:43-49

- FURST J., SCHEDLBAUER A., GANDINI R., GARAVAGLIA M.L., SAINO S. ET AL. (2005)-ICln 159 folds into a pleckstrin homology domain-like structure. Interaction with kinases and the splicing factor LSm4 - *Biol. Chem.* 280:31276-82

- GALLAGHER P.G. (2004)-Hereditary elliptocytosis: spectrin and protein 4.1R - *Semin Hematol.* 41(2):142-64

- GASCARD P. & MOHANDAS N. (2000)-New insights into functions of erythroid proteins in nonerythroid cells - *Curr Opin Hematol* 7, 123-129

- GASCARD P., PARRA M.K., ZHAO Z., CALINISAN V.R., NUNOMURA W., RIVKEES S.A., MOHANDAS N., CONBOY J.G. (2004)-Putative tumor suppressor protein 4.1B is differentially expressed in kidney and brain via alternative promoters and 5' alternative splicing - *Biochem Biophys Acta*;1680(2):71-82

- GSCHWENTNER M., FURST J., RITTER M., BAZZINI C., WOLL E., DIENSTL A., JAKAB M., KONIG M., SCANDELLA E., RUDZI J., BOTTA' G., MEYER G., LANG F., DEETJEN P. AND PAULMICHL M. (1999)-ICln an anion channel-forming protein associated with cell volume regulation - *Experimental Physiology* 84:1023-1031

- GSCHWENTNER M., NAGL U.O., WOLL E., SCHMARDA A., RITTER M., PAULMICHL M. (1995) - Antisense oligonucleotides suppress cell-volume-induced activation of chloride channels - *Pflugers Arch* 430:464-470

- GUTMANN D.H., DONAHOE J., PERRY A., LEMKE N., GORSE K., KITTINIYOM K., REMPEL S.A., GUTIERREZ J.A. AND NEWSHAM I.F. (2000)-Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas - *Hum. Mol. Genet.*, 9, 1495-1500

- HAN B.G., NUNOMURA W., TAKAKUWA Y., MOHANDAS N., JAP B.K. (2000)- Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization - *Nat Struct Biol.* (10):871-5

- HUANG S.C., LIU E.S., CHAN S.H., MUNAGALA I.D., CHO H.T., JAGADEESWARAN R. & BENZ E.J. Jr (2005)-Mitotic regulation of protein 4.1 in kidney physio-pathology 1658 4.1R involves phosphorylation by cdc2 kinase - *Mol Biol Cell* 16, 117-127

- HUNG L.Y., TANG C.J. & TANG T.K. (2000)-Protein 4.1 R-135 interacts with a novel centrosomal protein (CPAP) which is associated with the gamma-tubulin complex-*Mol Cell Biol* 20, 7813-7825

- KRAPIVINSKY G., PU W., WICKMAN K., KRAPIVINSKY L. & CLAPHAM D. E. (1998)-p130Cas Binds to a mammalian homolog of a yeast protein involved in regulation of cell morphology - *Journal of Biological Chemistry* 273, 10811-10814

- KRAPIVINSKY G. B., ACKERMAN M. J., GORDON E. A., KRAPIVINSKY L. D. & CLAPHAM D. E. (1994)-Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, p130Cas - *Cell* 76, 439-448

- KUNS R.E. (2005)-Protein 4.1B Functions as a Putative Tumor Suppressor with Novel Growth Regulatory Activities in the Mammary Gland - PhD, University of Cincinnati, Medicine : Molecular & Developmental Biology

- LALLENA M.J., MARTINEZ C., VALCARCEL J., CORREAS I. (1998)-Functional association of nuclear protein 4.1 with pre-mRNA splicing factors - *J Cell Sci* 111:1963-1971

- LECLERC E. & VETTER S. (1998)-Characterization of a calcium dependent calmodulin-binding domain in the 135-kD human protein 4.1 isoform - *Eur J Biochem* 258, 567-571

- JOHN G. CONBOY, JEFFERSON CHAN, NARLA MOHANDAS, AND YUET W.KAN (1988)- Multiple protein 4.1 isoforms produced by alternative splicing in human erythroid cells- Cell Biology vol.85, pp 9062-9065

- LUQUE C.M., LALLENA M.J., PEREZ-FERREIRO C.M., DE ISIDRO Y., DE CARCER G., ALONSO M.A. & CORREAS I. (1999)-The N-terminal 209-aa domain of high molecular-weight 4.1R isoforms abrogates 4.1R targeting to the nucleus - Proc Natl Acad Sci U S A 96, 14925-14930

- LUQUE C. M., CORREAS I. (2000)-A constitutive region is responsible for nuclear targeting of 4.1R: modulation by alternative sequences results in differential intracellular localization - Journal of Cell science 113, 2485-2429

- MANNO S., TAKAKUWA Y. & MOHANDAS N. (2005)-Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation - J Biol Chem 280, 7581-7587

- MATTAGAJASINGH S.N., HUANG S.C., HARTENSTEIN J.S., SNYDER M., MARCHESI V.T., BENZ E.J. (1999)-A non erythroid isoform of protein 4.1R interacts with the nuclear mitotic apparatus (NuMA) protein - J Cell Biol 145:29-43

- MUSCH M.W., LUER C.A., DAVIS-AMARAL E.M., GOLDSTEIN L. (1997)- Hypotonic stress induces translocation of the osmolyte channel protein pICln in embryonic skate (*Raja eglanteria*) heart - J Exp Zool 277:460

- NUNOMURA W., PARRA M., HEBIGUCHI, SAWADA K., MOHANDAS N., TAKAKUWA Y. (2009)- Marked difference in membrane-protein-binding properties of the two isoforms of protein 4.1R expressed at early stages of erythroid differentiation - Biochem 417: 141-148

- OKADA Y., MAENO E., SHIMIZU T., MANABE K., MORI S., NABEKURA T. (2004)- Dual roles of plasmalemmal chloride channels in induction of cell death -

Pflugers Arch 448:287-295

- ORDAZ B., TUZ K., OCHOA L.D., LEZAMA R., PENA-SEGURA C., FRANCO R. (2004)- Osmolytes and mechanisms involved in regulatory volume decrease under conditions of sudden or gradual osmolarity decrease - *Neurochem Res* 29:65-72
- PARRA M., GASCARD P., WALENSKY L.D., SNYDER S.H., MOHANDAS N. & CONBOY J.G. (1998)-Cloning and characterization of 4.1G (EPB41L2), a new member of the skeletal protein 4.1 (EPB41) gene family - *Genomics* 49, 298-306
- PAULMICHL M., LI Y., WICKMAN K., ACKERMAN M., PERALTA E. & CLAPHAM D. (1992)-New mammalian chloride channel identified by expression cloning - *Nature* 356:238-241
- PU W.T., WITCKEMAN K., CLAPHAM D.E. (2000)-ICln is essential for cellular and early embryonic viability - *J. Biol. Chem.* 275:12363-6
- RITTER M., RAVASIO A., JAKAB M., CHWATAL S., FURST J., LAIGH A., GSCHWENTNER M., SIGNORELLI S., BURTSCHER C., EICHMULLER S. AND PAULMICHL M. (2003)-Cell swelling stimulates cytosol to membrane transposition of ICln - *J Biol Chem* 278(50):50163-74
- ROBB V.A., LI W., GASCARD P., PERRY A., MOHANDAS N., GUTMANN D. (2003)- Identification of a third Protein 4.1 tumor suppressor, Protein 4.1R, in meningioma pathogenesis - *Neurobiology of Disease* 13 191-202
- ROBB V.A., GERBER M.A., HART-MAHON E.K. & GUTMANN D.H. (2005)-Membrane localization of the U2 domain of Protein 4.1B is necessary and sufficient for meningioma growth suppression *Oncogene* 24, 1946-1957
- FIGEYS D, MCBROOM LD, MORAN MF. (2001)-Mass spectrometry for the study of protein- protein Interactions *Methods* 24:230-9

- SCHWARZ R. S., RYBICKI A. C. & NAGEL R. L. (1997)-Molecular cloning and expression of a chloride channel-associated protein pICln in human young red blood cells: association with actin Biochemical Journal 327, 609-616

- SCHWIEBERT E.M., MILLS J.W., STANTON B.A. (1994)-Actin-based cytoskeleton regulates a chloride channel and cell volume in a renal cortical collecting duct cell line - J Biol Chem 269:70811.

- SINGH P.K., GUTMANN D.H., FULLER C.E., NEWSHAM I.F. AND PERRY A. (2002)-Differential involvement of protein 4.1 family members, DAL-1 and NF2 in intracranial and intraspinal ependymomas - Mod. Pathol., 15, 526-531.

- TAKAKUWA Y. (2000)-Protein 4.1, a multifunctional protein of the erythrocyte membrane skeleton: structure and functions in erythrocytes and nonerythroid cells - Int J Hematol 72, 298- 309.

- TAMMA G., PROCINO G., STRAFINO A., BONOMI E., MEYER G., PAULMICHL M., FORMOSO V., SVELTO M., VALENTI G. (2007)-Hypotonicity Induces Aquaporin-2 Internalization and Cytosol- to-Membrane Translocation of ICln in Renal Cells - Endocrinology 148(3):1118-1130

- TANG T. K., QIN Z., LETO T., MARCHESI V. T. and BENZ E. J., Jr. (1990)-Heterogeneity of mRNA and protein products arising from the protein 4.1 gene in erythroid and nonerythroid tissues - J. Cell Biol. 110, 617-624

- TANG C.J.C., TANG T.K. (1991)-Rapid localization of membrane skeletal protein 4.1 (EL1) to human chromosome 1p33-34.2 by nonradioactive in situ hybridization - Cytogenet Cell Genet 57:119

- WALENSKY L.D., SHI Z.T., BLACKSHAW S., DEVRIES A.C., DEMAS G.E., GASCARD P., NELSON R.J., CONBOY J.G., RUBIN E.M., SNYDER S.H. ET AL. (1998)-Neurobehavioral deficits in mice lacking the erythrocyte membrane

cytoskeletal protein 4.1-Curr. Biol. 8, 1269-1272

- WALENSKY L.D., BLACKSHAW S., LIAO D., WATKINS C.C., WEIER H.U., PARRA M., HUGANIR R.L., CONBOY J.G., MOHANDAS N. & SNYDER S.H. (1999)-A novel neuron-enriched homolog of the erythrocyte membrane cytoskeletal protein 4.1 - J Neurosci 19, 6457-6467

- BLOMBERG N., NILGES M. (1997)-Functional diversity of PH domains: an exhaustive modelling study Fold. Des 2:343-55

- BROWE DM, BAUMGARTEN CM. (2003)-Stretch of α_1 integrin activates an outwardly rectifying chloride current via FAK and Src in rabbit ventricular myocytes. J Gen Physiol 122: 689-702

- GASCARD P., LEE G., COULOMBEL L., AUFRAY I., LUM M., PARRA M., CONBOY J., MOHANDAS N. & CHASIS J.A. (1998)-Characterization of multiple isoforms of protein 4.1R expressed during erythroid terminal differentiation - Blood 92, 4404-4414

- FÜRST J, GSCHWENTNER M, RITTER M, BOTTA' G, JAKAB M, MAYER M, GARAVAGLIA L, BAZZINI C, RODIGHERO S, MEYER G, EICHMÜLLER S, WÖLL E, PAULMICHL M. (2002 Jan)- Molecular and functional aspects of anionic channels activated during regulatory volume decrease in mammalian cells - J Physiol. 444:1-25. Review

- JAKAB M, FÜRST J, GSCHWENTNER M, BOTTA' G, GARAVAGLIA ML, BAZZINI C, RODIGHERO S, MEYER G, EICHMÜLLER S, WÖLL E, CHWATAL S, RITTER M, PAULMICHL M. (2002)- Mechanisms sensing and modulating signals arising from cell swelling - Cellular physiology and biochemistry. 12:235-258

- F, SANCHEZ-OLEA R, STRANGE K. (1998)-Characterization of p1(Cln) binding proteins: identification of p17 and assessment of the role of acidic domains in

mediating protein-protein interactions- Biochim. Biophys. Acta 1404:321-8

- FRIESEN WJ, WYCE A, PAUSHKIN S, ABEL L, RAPPSILBER J ET AL. (2002)-A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins -J. Biol. Chem. 277:8243-7

- FRIESEN WJ, PAUSHKIN S, WYCE A, MASSENET S, PESIRIDIS GS ET AL. (2001)-The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins- Mol. Cell Biol. 21:8289-300

- PEREZ-FERREIRO CM, I VERNOS & I CORREAS. (2004)-Protein 4.1R regulates interphase microtubule organization at the centrosome-J Cell Sci 117, 6197-6206

- RIVERA A, DE FRANCESCHINI L, PETERS LL, GASCARD P, MOHANDAS N, BRUGNARA C, (2006)-Effect of complete protein 4.1R deficiency on ion transport properties of murine erythrocytes -Am J Physiol Cell Physiol 291: C880-C886

- SALOMAO M, ZHANG X, YANG Y, LEE S, HARTWIG JK, CHASISJA, MOHANDAS N, AND AN X (2008)-Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: New insights into the structural organization of the red blood cell membrane -PNAS 105: 8026-8031

- TAMMAG; PROCINO G; SVELTO; VALENTI (2006)-Hypotonicity causes actin reorganization and recruitment of the actin-binding ERM protein moesin in membrane protrusion in collecting duct principal cells- Am J Cells Physiol 292: C1476-C1484

- CALINISAN V, GRAVEM D, CHEN PHR, BRITTIN S, MOHANDAS N, LECOMTE MC, GASCARD P. (2006 May)-New insights into potential functions for the protein 4.1 superfamily of proteins in kidney epithelium - Frontiers in Bioscience. 1; 11:1646-66

- ANTHONY J. BAINES A, PAULINE M. BENNETT B, EDWARD W. CARTER A, CESARE TERRACCIANO (2009)-Protein 4.1 and the control of ion channels - Blood Cells, Molecules, and Diseases 42 211-215

- SACHIKO TSUKITA AND SHIGENOBU YONEMURA (Dec 1999)-Cortical Actin Organization: Lessons from ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) Proteins- The journal of biological chemistry vol. 274, No. 49, pp. 34507-34510

- SHARON WALD KRAUSS, CYNTHIA CHEN, SHELDON PENMAN, AND REBECCA HEALD (2003) - Nuclear actin and protein 4.1: Essential interactions during nuclear assembly in vitro- Berkeley, 10752-10757 PNAS vol. 100 no. 19

- CARMEN M. PEREZ-FERREIRO¹, EVA LOSPITAO AND ISABEL CORREAS (2006)- Protein 4.1R self-association: identification of the binding domain Biochem. J. 400, 457-465

- HORACIO F. CANTIELLO (1997)-Role of Actin Filament Organization in Cell Volume and Ion Channel Regulation - The journal of biological experimental zoology 279:425-435

- AIKATERINI KONTRIGIANNI-KONSTANTOPOULOS, SHU-CHING HUANG, AND EDWARD J. BENZ, JR. (2000)-A Nonerythroid Isoform of Protein 4.1R Interacts with Components of the Contractile Apparatus in Skeletal Myofibers-Molecular Biology of the Cell Vol. 11, 3805-3817

- DAVID H. GUTMANN, ANGELA C. HIRBE, ZHI-YONG HUANG, AND CARRIE A. HAIPEK (2001)- The Protein 4.1 Tumor Suppressor, DAL-1, Impairs Cell Motility, But Regulates Proliferation in a Cell-Type-Specific Fashion - Neurobiology of Disease 8, 266-278)

- P.OLIVIER SCHISCHMANOFF, PAUL YASWEN, MARILYN K. PARRA, GLORIA LEE, JOEL A. CHASIS, NARLA MOHANDAS, AND JOHN G. CONBOY (1997)-Cell Shape-

dependent Regulation of Protein 4.1 Alternative Pre-mRNA Splicing in Mammary Epithelial Cells - The journal of biological chemistry Vol. 272, No. 15, pp. 10254-10259

- ROBERT E. WARD, IV, 1 LIANG SCHWEIZER, 2 REBECCA S. LAMB3 AND RICHARD G. FEHON (2001)-The Protein 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin (FERM) Domain of Drosophila Coracle, a Cytoplasmic Component of the Septate Junction, Provides Functions Essential for Embryonic Development and Imaginal Cell Proliferation- Genetics 159: 219-228

- CARLOS M. LUQUE, MARIA-JOSE´ LALLENA, MIGUEL A. ALONSO, AND ISABEL CORREA (1998)-An Alternative Domain Determines Nuclear Localization in Multifunctional Protein 4.1- The journal of biological chemistry Vol. 273, No. 19, pp. 11643-11649

- JEN-PIN HUANG, CHIEH- JU C. TANG, GUANG-HSIUNG KOULT, VINCENT T. MARCHESILLEDWARD J. BENZ, JR., AND TANGK. TANG (1993)-Genomic Structure of the Locus Encoding Protein 4.1- The journal of biological chemistry Vol. 268, No. 5, pp. 3758-3766, 1993

- KEVIN STRANGE (1998)-Molecular Identity of the Outwardly Rectifying, Swelling-activated Anion Channel: Time to Reevaluate pICln- J. Gen. Physiol. Volume 111 617-622

- WATARU NUNOMURA, YUICHI TAKAKUWA, MARILYN PARRA, JOHN CONBOY AND NARLA MOHANDAS (2000)- Regulation of Protein 4.1R, p55, and Glycophorin C Ternary Complex in Human Erythrocyte Membrane- The journal of biological chemistry Vol. 275, No. 32 24540-24546

- JA CHASIS, L COULOMBEL, S MCGEE, G LEE, G TCHERNIA, J CONBOY AND N MOHANDAS (1996)-Differential use of protein 4.1 translation initiation sites during deficiency of protein 4.1 during erythroid development erythropoiesis:

implications for a mutation-induced stage-specific-
Blood, 87: 5324-5331

- BAZZINI C., RODIGHIERO S., GARAVAGLIA M.L., ZANONI C., MAFFI E., BOTTÀ G., MEYER G. AND PAULMICHL M. (2008) - Interaction between the ICln and 4.1R proteins - Transporters 2008 Meeting, Murten, Switzerland. 27 August - 30 August

- Rodighiero, S., Bazzini, C., Ritter, M., Fürst, J., Botta, G., Meyer, G., and Paulmichl, M. (2008) Fixation, mounting and sealing with nail polish of cell specimens lead to incorrect FRET measurements using acceptor photobleaching. *Cell Physiol Biochem* 21, 489-498

- Seo, P. S., Jeong, J. J., Zeng, L., Takoudis, C. G., Quinn, B. J., Khan, A. A., Hanada, T., and Chishti, A. H. (2009) Alternatively spliced exon 5 of the FERM domain of protein 4.1R encodes a novel binding site for erythrocyte p55 and is critical for membrane targeting in epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1793, 281-289

- Vicidomini, G., Moneron, G., Han, K. Y., Westphal, V., Ta, H., Reuss, M., Engelhardt, J., Eggeling, C., and Hell, S. W. (2011) Sharper low-power STED nanoscopy by time gating. *Nat Methods* 8, 571-573

- Nunomura, W., and Takakuwa, Y. (2006) Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca²⁺ and calmodulin. *Front Biosci* 11, 1522-1539

- Baines, A. J., Bennett, P. M., Carter, E. W., and Terracciano, C. (2009) Protein 4.1 and the control of ion channels. *Blood Cells Mol Dis* 42, 211-215

- Nunomura, W., Denker, S. P., Barber, D. L., Takakuwa, Y., and Gascard, P. (2012) Characterization of cytoskeletal protein 4.1R interaction with NHE1 (Na(+)/H(+) exchanger isoform 1). *Biochem J* 446, 427-435

- Hoffmann, E. K. (2011) Ion channels involved in cell volume regulation: effects on migration, proliferation, and programmed cell death in non adherent EAT cells and adherent ELA cells. *Cell Physiol Biochem* 28, 1061-1078
- Hoffmann, E. K., Lambert, I. H., and Pedersen, S. F. (2009) Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev* 89, 193-277
- Nunomura, W., Parra, M., Hebiguchi, M., Sawada, K., Mohandas, N., and Takakuwa, Y. (2009) Marked difference in membrane-protein-binding properties of the two isoforms of protein 4.1R expressed at early and late stages of erythroid differentiation. *Biochem J* 417, 141-148
- Stagg, M. A., Carter, E., Sohrabi, N., Siedlecka, U., Soppa, G. K., Mead, F., Mohandas, N., Taylor-Harris, P., Baines, A., Bennett, P., Yacoub, M. H., Pinder, J. C., and Terracciano, C. M. (2008) Cytoskeletal protein 4.1R affects repolarization and regulates calcium handling in the heart. *Circ Res* 103, 855-863
- Cunha, S. R., and Mohler, P. J. (2008) Cardiac cytoskeleton and arrhythmia: an unexpected role for protein 4.1R in cardiac excitability. *Circ Res* 103, 779-781
- Rose, M., Dütting, E., and Enz, R. (2008) Band 4.1 proteins are expressed in the retina and interact with both isoforms of the metabotropic glutamate receptor type 8. *J Neurochem* 105, 2375-2387
- Douyard, J., Shen, L., Hugarir, R. L., and Rubio, M. E. (2007) Differential neuronal and glial expression of GluR1 AMPA receptor subunit and the scaffolding proteins SAP97 and 4.1N during rat cerebellar development. *J Comp Neurol* 502, 141-156
- Binda, A. V., Kabbani, N., Lin, R., and Levenson, R. (2002) D2 and D3 dopamine receptor cell surface localization mediated by interaction with protein 4.1N. *Mol Pharmacol* 62, 507-513

- Kurbannazarova, R. S., Bessonova, S. V., Okada, Y., and Sabirov, R. Z. (2011) Swelling-activated anion channels are essential for volume regulation of mouse thymocytes. *Int J Mol Sci* 12, 9125-9137

- Okada, Y. (1997) Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J Physiol* 273, C755-789

- Klausen, T. K., Hougaard, C., Hoffmann, E. K., and Pedersen, S. F. (2006) Cholesterol modulates the volume-regulated anion current in Ehrlich-Lette ascites cells via effects on Rho and F-actin. *Am J Physiol Cell Physiol* 291, C757-771

- Cantiello, H. F. (1997) Role of actin filament organization in cell volume and ion channel regulation. *J Exp Zool* 279, 425-435

- Wang, G. X., Dai, Y. P., Bongalon, S., Hatton, W. J., Murray, K., Hume, J. R., and Yamboliev, I. A. (2005) Hypotonic activation of volume-sensitive outwardly rectifying anion channels (VSOACs) requires coordinated remodeling of subcortical and perinuclear actin filaments. *J Membr Biol* 208, 15-26

- Cai, S., Pestic-Dragovich, L., O'Donnell, M. E., Wang, N., Ingber, D., Elson, E., and De Lanerolle, P. (1998) Regulation of cytoskeletal mechanics and cell growth by myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol* 275, C1349-1356

- Byfield, F. J., Hoffman, B. D., Romanenko, V. G., Fang, Y., Crocker, J. C., and Levitan, I. (2006) Evidence for the role of cell stiffness in modulation of volume-regulated anion channels. *Acta Physiol (Oxf)* 187, 285-294

- Hubert, M. D., Levitan, I., Hoffman, M. M., Zraggen, M., Hofreiter, M. E., and Garber, S. S. (2000) Modulation of volume regulated anion current by I(Cln). *Biochim Biophys Acta* 1466, 105-114

- Faix, J., Breitsprecher, D., Stradal, T. E., and Rottner, K. (2009) Filopodia: Complex models for simple rods. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1656-1664

- Le Clainche, C., and Carlier, M. F. (2008) Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev* 88, 489-513

- Larkin, D., Murphy, D., Reilly, D. F., Cahill, M., Sattler, E., Harriott, P., Cahill, D. J., and Moran, N. (2004) ICln, a novel integrin alphaIIb beta3-associated protein, functionally regulates platelet activation. *J Biol Chem* 279, 27286-27293

- Larkin, D., Treumann, A., Murphy, D., DeChaumont, C., Kiernan, A., and Moran, N. (2009) Compartmentalization regulates the interaction between the platelet integrin alpha IIb beta 3 and ICln. *Br J Haematol* 144, 580-590

- Desgrosellier, J. S., and Cheresch, D. A. (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10, 9-22

- Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M., and Ingber, D. E. (1997) Geometric control of cell life and death. *Science* 276, 1425-1428

- Pirone, D. M., Liu, W. F., Ruiz, S. A., Gao, L., Raghavan, S., Lemmon, C. A., Romer, L. H., and Chen, C. S. (2006) An inhibitory role for FAK in regulating proliferation: a link between limited adhesion and RhoA-ROCK signaling. *J Cell Biol* 174, 277-288

- Sun, C. X., Robb, V. A., and Gutmann, D. H. (2002) Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation. *J Cell Sci* 115, 3991-4000

- Kuns, R., Kissil, J. L., Newsham, I. F., Jacks, T., Gutmann, D. H., and Sherman, L. S. (2005) Protein 4.1B expression is induced in mammary epithelial cells during pregnancy and regulates their proliferation. *Oncogene* 24, 6502-6515

- Wong, S. Y., Haack, H., Kissil, J. L., Barry, M., Bronson, R. T., Shen, S. S., Whitaker, C. A., Crowley, D., and Hynes, R. O. (2007) Protein 4.1B suppresses prostate cancer progression and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12784-12789

- Zhang, Y., Xu, R., Li, G., Xie, X., Long, J., and Wang, H. (2012) Loss of expression of the differentially expressed in adenocarcinoma of the lung (DAL-1) protein is associated with metastasis of non-small cell lung carcinoma cells. *Tumour Biol* 33, 1915-1925

- Ji, Z., Shi, X., Liu, X., Shi, Y., Zhou, Q., Li, L., Ji, X., Gao, Y., Qi, Y., and Kang, Q. (2012) The membrane-cytoskeletal protein 4.1N is involved in the process of cell adhesion, migration and invasion of breast cancer cells. *Exp Ther Med* 4, 736-740

- Robb, V. A., Li, W., Gascard, P., Perry, A., Mohandas, N., and Gutmann, D. H. (2003) Identification of a third Protein 4.1 tumor suppressor, Protein 4.1R, in meningioma pathogenesis. *Neurobiol Dis* 13, 191-202