



Università della Calabria
Facoltà di Farmacia
e Scienze della Nutrizione e della Salute
Dipartimento Farmaco-Biologico
(BIO/10-11- Biochimica-Biologia Molecolare)

Dottorato di Ricerca in
Biochimica Cellulare
ed Attività dei Farmaci in Oncologia
-XXI Ciclo-

Tesi di Dottorato

“BACULOVIRUS EXPRESSION VECTOR SYSTEM”
SISTEMA EUCARIOTICO PER L’OVERESPRESSIONE E
LA LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE DI PROTEINE
DI MEMBRANA: STUDI DI PURIFICAZIONE E
CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE

Docente Tutor

Dr.ssa Anna Rita Cappello

Anna Rita Cappello

Dottoranda

Dr.ssa Marianna Madeo

Marianna Madeo

Il Coordinatore del Dottorato

Prof. Diego Sisci

Diego Sisci

Anno Accademico 2007/2008



INDICE

SUMMARY

1. INTRODUZIONE

1.1 I mitocondri	pag. 2
1.2 Sistemi di trasporto	pag. 5
1.3 Patologie correlate alle deficienze di <i>carrier</i> mitocondriali	pag. 10
1.4 I lisosomi: “ sistema di demolizione e di riciclaggio della cellula”	pag. 12
1.5 Proteine di trasporto lisosomiale	pag. 18
1.6 I lisosomi: target per la terapia contro il cancro	pag. 25
1.7 Disordini lisosomiali	pag. 28

2 “BACULOVIRUS EXPRESSION VECTOR SYSTEM”

2.1 Baculoviridae	pag. 39
2.2 Ciclo vitale del virus	pag. 41
2.3 Espressione eterologa di proteine ricombinanti in cellule di insetto	pag. 43

3. METODOLOGIE SPERIMENTALI

3.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)	pag. 47
3.2 Analisi di espressione genica mediante RT-PCR	pag. 48
3.3 Costruzione dei primer	pag. 50
3.4 Elettroforesi su gel d'agarosio	pag. 53
3.5 Purificazione dei frammenti di DNA	pag. 54
3.6 Digestione del frammento di DNA	pag. 54
3.7 Vettore di clonaggio e di trasferimento	pag. 55
3.8 Digestione del plasmide	pag. 57
3.9 Purificazione del DNA digerito	pag. 57

3.10	Reazione di ligazione	pag. 58
3.11	Preparazione di cellule di <i>E. coli</i> ad alta efficienza di trasformazione	pag. 59
3.12	Trasformazione di cellule di <i>E. coli</i> TG1	pag. 59
3.13	Estrazione “veloce” del DNA dai batteri	pag. 60
3.14	Estrazione del DNA dai batteri con il QIA prep®Spin Miniprep kit	pag. 61
3.15	Crescita e mantenimento delle cellule di insetto	pag. 62
3.16	Bac-N-Blue™ DNA	pag. 62
3.17	Trasfezione delle cellule di insetto <i>Sf9</i>	pag. 63
3.18	Saggio delle placche	pag. 65
3.19	Amplificazione del virus ricombinante	pag. 66
3.20	Estrazione del DNA virale ed analisi di PCR	pag. 67
3.21	Preparazione dello stock virale ad alto titolo	pag. 68
3.22	Infezione delle cellule <i>Sf9</i> ed espressione della proteina ricombinante	pag. 69
3.23	Immunofluorescenza indiretta	pag. 70
3.24	Localizzazione subcellulare	pag. 70
3.25	Isolamento dei lisosomi e dei mitocondri da cellule <i>Sf9</i>	pag. 71
3.26	Dosaggio proteico	pag. 72
3.27	Elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)	pag. 72
3.28	Colorazione con <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	pag. 73
3.29	Colorazione in <i>Silver Stainig</i>	Pag 74
3.30	Immunoblot su nitrocellulosa: <i>Western Blot</i>	pag. 74
3.31	Solubilizzazione proteica	pag. 76
	3.31.1 Solubilizzazione della proteina hPAT4/V5-His	
	3.31.2 Solubilizzazione della proteina CIC/V5-His	

3.32 Purificazione della proteina mediante cromatografia di affinità su colonna di Ni-NTA agarosio	pag. 77
3.33 Ricostituzione	pag. 79
3.34 Preparazione dei liposomi.	pag. 80
3.35 Preparazione delle colonne di amberlite.	pag. 81
3.36 Preparazione delle colonne di Sephadex G-75.	pag. 81
3.37 Preparazione delle colonne Pierce.	pag. 82
3.38 Determinazione della radioattività entrata nei liposomi e calcolo dell'attività di trasporto	pag. 82
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	
4.1 Scopo della tesi	pag. 83
4.2 Ricerca di sequenze proteiche in Banca Dati	pag. 85
4.3 Analisi del trascritto e del gene codificante per la proteina hPAT4	pag. 89
4.4 Distribuzione tissutale della proteina mediante analisi di RT-PCR	pag. 91
4.5 Amplificazione dei cDNA	pag. 93
4.6 Costruzione dei plasmidi ricombinanti	pag. 94
4.7 Produzione dei baculovirus ricombinanti	pag. 97
4.8 Stima del titolo virale attraverso saggio delle placche	pag. 99
4.9 Analisi del baculovirus ricombinante mediante PCR	pag. 101
4.10 Studi di espressione delle proteine ricombinanti	pag. 103
4.10.1 SDS-PAGE ed analisi di Western blot	
4.10.2 Analisi di immunofluorescenza indiretta	pag. 106
4.11 Localizzazione subcellulare in cellule Sf9	pag. 107
4.12 Determinazione delle condizioni ottimali di espressione proteica	pag. 111

4.13 Prove di solubilizzazione delle proteine ricombinanti	pag. 114
4.14 Purificazione della proteina ricombinante CIC/V5-His mediante cromatografia di affinità su colonna al Ni ²⁺	pag. 119
4.15 Caratterizzazione cinetica di CIC/V5-His	pag. 122
4.16 Purificazione della proteina ricombinante PAT4/V5-His mediante cromatografia di affinità su colonna al Ni ²⁺	pag. 127
5. CONCLUSIONI	pag. 130
BIBLIOGRAFIA	pag. 134
ALLEGATI: PRESENTAZIONE A CONGRESSI E PUBBLICAZIONI	

SUMMARY

The amino acid/auxin permease (AAAP) family is one of the largest families of amino acid transporters so far identified. Three different subfamilies of the AAAP transporters have been identified in mammals: a) the vesicular GABA transporter (VGAT); b) the system A/N subfamily and c) the proton/amino acid transporter (PAT) subfamily.

The third mammalian AAAP subfamily is represented by hPAT1 to hPAT4 proteins. hPAT1 and hPAT2 are characterized as electrogenic amino acid/proton cotransporters, whereas hPAT3 and hPAT4 are orphan transporters

In this work we focused on expression and purification of the putative human lysosomal membrane protein hPAT4 in order to obtain functional characterization.

The major limitation to understand of the molecular mechanism of membrane transport processes is the lack of detailed structural informations on transport proteins. This paucity of structural studies results from the difficulty in producing enough quantity of pure and functional transport protein. The natural abundance of most transporters is low and purification is difficult. Heterologous expression of recombinant proteins is an essential technology for protein characterization and it is a necessary step to obtain sufficient amount of protein useful for structural and functional characterization studies. Therefore we tried to obtain enough quantity of hPAT4 by using conventional expression systems: bacterial and yeast, but they failed.

In this work we describe an efficient strategy for the hPAT4 overexpression in baculovirus infected *Spodoptera frugiperda* cells (*Sf9*). The Baculovirus Expression Vector System (BEVS), developed by Smith, is an efficient way to produce high levels of recombinant membrane proteins. In most cases, the recombinant membrane proteins exhibit, in insect cells, identical transport activity properties as in native tissues.

Moreover this system excels in producing large quantities of eukaryotic recombinant proteins and they might be proteolytically processed and translocated in the right subcellular compartment.

In this study, for the first time, the *Sf9*-baculovirus system is used to express a mitochondrial carrier protein: the tricarboxylate (or citrate) carrier (CIC) from eel (*Anguilla anguilla*) liver mitochondria, in order to assay the system's potentiality of expressing active membrane proteins.

This protein was taken as it was already purified to homogeneity from yellow and silver eel liver mitochondria functionally reconstituted into liposomes and characterized.

Total silver eel RNA was extracted from liver and reverse-transcribed; the coding sequence of silver eel CIC was amplified by PCR, cloned into the pBlueBac 4.5/V5-His baculotransfer vector, fused with the sequence encoding the C-terminal peptide, V5 epitope, followed by the sequence encoding a six histidines tag.

The tissue distribution of mRNAs for the human PAT family evidenced that hPAT4 transcripts were detected ubiquitously, but more abundantly in kidney and brain. Therefore the coding region for hPAT4 was amplified by PCR from human kidney cDNA; The amplified cDNA obtained was cloned into the same pBlueBac4.5/V5-His baculo transfer vector.

The expression of hPAT4/V5-His and of eel liver CIC/V5-His, in *Sf9* cells, was analysed by SDS-PAGE, followed by immunoblotting and by immunofluorescence analysis.

Furthermore, since high over-expression of a membrane protein often leads to accumulation of recombinant non-native protein in extramembranous particles, the subcellular localization was investigated. This study, conducted by immunofluorescence analysis showed that eel CIC/V5-His is localized in mitochondrial network while hPAT4/V5-His is strictly localized in lysosomes.

The expression levels of our recombinant proteins were optimised with regard to two parameters, including post-infection time and multiplicity of infection (MOI).

The recombinant CIC/V5-His and hPAT4/V5-His reached the highest expression level in 72 h post-infection time and the optimal MOI was 10.

Solubilization is a critical and essential step in membrane proteins purification but, on the other hand, it could destabilize the protein. Detergents are critical for the isolation and solubilization of membrane proteins, and the selection of suitable detergents is an important aspect of successful functional membrane protein purification.

Different non-ionic detergents were tested for solubilization of hPAT4/V5-His and L-DAO was found to be effective in the purification of this protein.

The non-ionic detergents TX-100 DDM and OG were tested for CIC/V5-His solubilization. We found that TX-100 and DDM have similar effect on CIC/V5-His solubilization but they differ in their ability to maintain the correct folding and therefore the activity of the protein, these results show that TX-100 is the most effective detergent. No solubilization neither transport activity were observed with OG.

The recombinant proteins were purified by affinity chromatography on Ni²⁺-NTA chelating column.

Subsequently the recombinant purified CIC/V5-His was reconstituted into liposomes and transport properties of this protein were studied. It catalysed a counter-exchange external [^{14}C]citrate for internal citrate with first order kinetics, isotopic equilibrium being approached exponentially. Maximum uptake of [^{14}C]citrate was approached after 20 min.

The kinetic constants of the recombinant purified CIC/V5-His were determined, the K_m and V_{max} values were $68 \pm 0.1 \mu\text{M}$ and $14.28 \pm 1.7 \mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg protein}$, respectively.

Furthermore the recombinant protein transported efficiently another physiological substrates such as threo-isocitrate, phosphoenolpyruvate and L-malate.

The [^{14}C]citrate/citrate exchange reactions catalyzed by reconstituted CIC/V5-His were strongly inhibited by the impermeable specific inhibitor 1,2,3-benzentricarboxylate and by bathophenanthroline and thiol reagents (p-hydroxymercuribenzoate, mersalyl and mercuric chloride).

We show that the functional properties of the recombinant citrate carrier are similar to those determined for the native carrier following isolation from eel liver mitochondria.

Interestingly, it could be noted that the transport activity of our purified protein is higher than that previously reported for the purified eel liver citrate carrier, most likely because the multi-step protocols, used to purify the protein from tissue, could have caused partial loss of protein activity.

Moreover, our data show that the purified recombinant citrate carrier retains the substrates specificity, the inhibitor sensitivity and the kinetic characteristics that were previously demonstrated for the native eel liver citrate carrier.

This work is the first study on baculovirus-mediated production of a mitochondrial carrier protein in insect cells.

This strategy, which combines a high level expression and a protein purification by affinity chromatography, provides a source of highly pure protein in amount sufficient for kinetic characterization.

Therefore, it is likely that this procedure could be applied successfully to other transport proteins; the next step, given the potentiality of BEVS, will consist in hPAT4/V5-His kinetic characterization.

1. INTRODUZIONE

Le cellule costituiscono le unità fondamentali di tutti gli organismi viventi.

Le più importanti differenze tra le strutture cellulari definiscono le due grandi classi di organismi: procarioti ed eucarioti.

Diversamente dai procarioti, batteri sempre unicellulari, gli eucarioti comprendono, oltre ad organismi unicellulari, anche piante ed animali pluricellulari.

La maggior parte delle cellule eucariotiche animali ha dimensioni maggiori (di circa 10-20 volte) di quelle procariotiche, ma compensa le grosse dimensioni con una compartimentazione interna. Le loro funzioni specializzate vengono svolte negli organuli, strutture circondate da una membrana immerse nel circostante citoplasma.

Organuli di primaria importanza comuni a tutte le cellule eucariotiche sono: i mitocondri, specializzati nel metabolismo ossidativo, ed i lisosomi, corpuscoli specializzati a compiere la funzione digestiva.

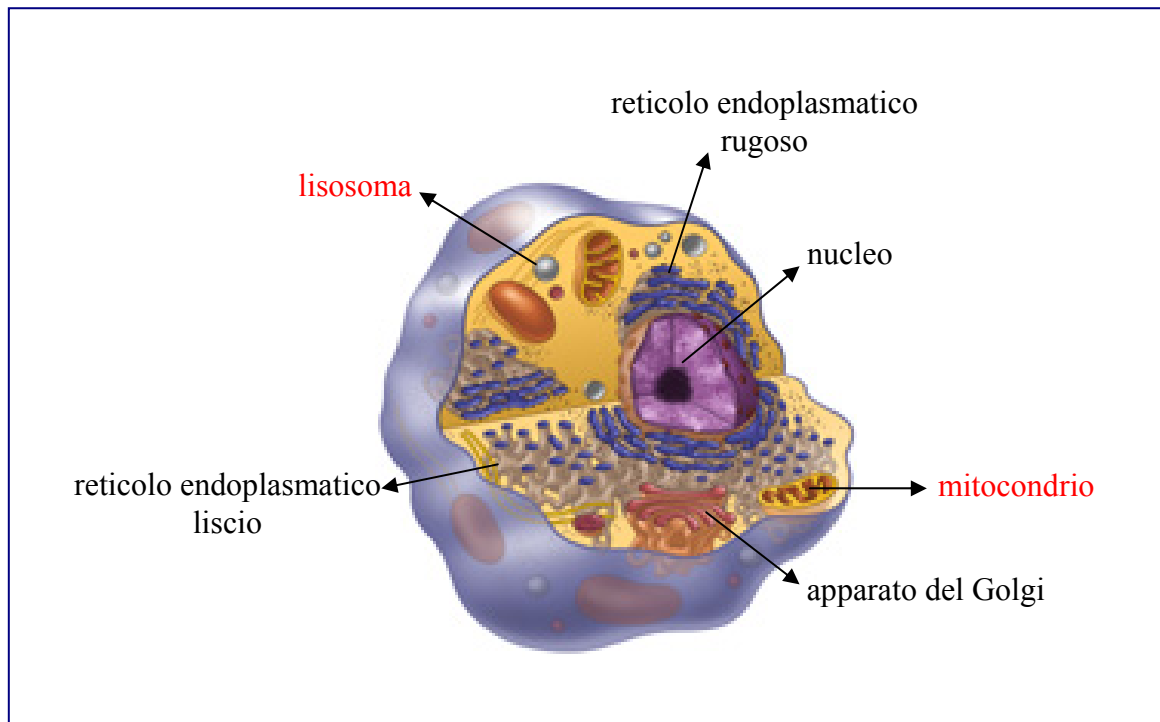


Fig. 1
Cellula eucariotica.

1.1 I mitocondri

I mitocondri sono organuli citoplasmatici tipici delle cellule animali e vegetali, delle alghe e dei protozoi, a metabolismo aerobio. La loro principale funzione è fornire energia alla cellula, sottoforma di ATP (adenosin-5'-trifosfato), grazie alle diverse reazioni metaboliche che avvengono al loro interno, quali la β -ossidazione degli acidi grassi, il ciclo di *Krebs* e la fosforilazione ossidativa.

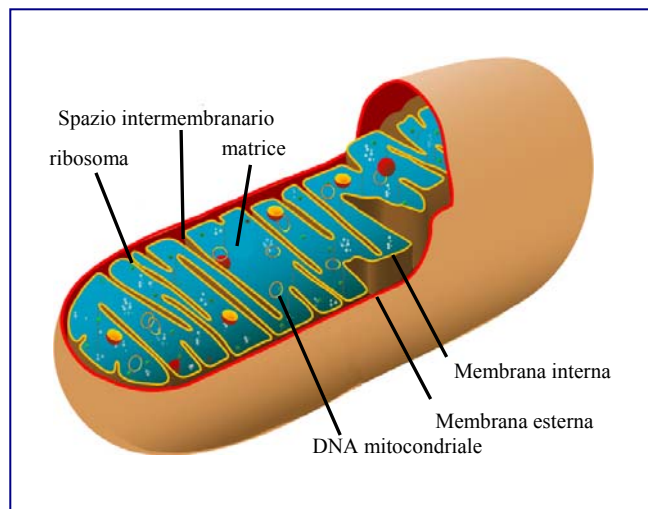


Fig. 2
Particolare di un mitocondrio.

Forma, dimensione, numero e distribuzione sono strettamente associati al momento funzionale e al tipo cellulare. In base alle richieste energetiche, nella cellula ci possono essere da pochi ad alcune centinaia di mitocondri, come nelle cellule di fegato di mammifero. Questi organuli possono, inoltre, distribuirsi uniformemente o raggrupparsi nella regione con più intensa attività metabolica, ad esempio negli spermatozoi l'unico grande mitocondrio spiralato si localizza attorno all'assonema della coda ^[1].

Generalmente di forma bastoncellare, osservandoli al microscopio ottico in contrasto di fase possono apparire granulari o filamentosi.

Le dimensioni variano da 1 μm a 10 μm di lunghezza e da 0.2 μm a 1 μm di diametro ^[2].

La microscopia elettronica (Fig. 2) consente un'analisi ultrastrutturale di questi organelli, evidenziando due membrane di circa 6 nm di spessore.

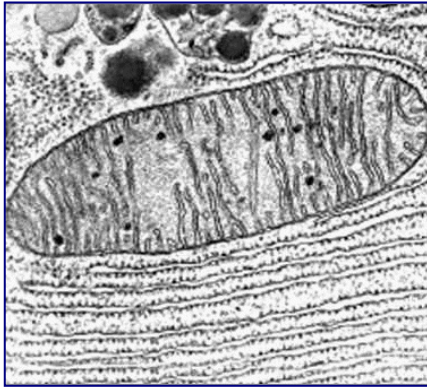


Fig. 3
Mitocondrio al microscopio elettronico.

La membrana mitocondriale esterna è separata da uno spazio di 6-8 nm, detto spazio intermembrana o compartimento perimitocondriale, da quella interna. Quest'ultima si solleva formando pieghe o creste all'interno di una soluzione acquosa, ricca di molecole proteiche e vari intermedi metabolici, detta matrice mitocondriale. Il numero delle creste mitocondriali rispecchia l'attività metabolica cellulare. Infatti, è elevato nelle cellule del rene, del muscolo striato e cardiaco mentre è basso nelle cellule vegetali, in relazione alla diversa attività respiratoria, più intensa nelle prime che nelle seconde.

Mentre la membrana mitocondriale esterna è completamente permeabile a diverse sostanze e rappresenta una barriera di scarsa o nulla efficacia per il controllo dell'ingresso di diversi substrati, la permeabilità della membrana interna è piuttosto limitata. Le "porine", canali proteici presenti nella membrana esterna dei mitocondri, la rendono facilmente attraversabile da ioni e piccole molecole (con peso molecolare fino a 10.000 Dalton), tanto che la composizione in ioni e substrati dello spazio intermembrana risulta essere simile a quella del citosol.

L'effettivo filtro di selezione, tra citosol e matrice mitocondriale, è rappresentato, pertanto, dalla membrana mitocondriale interna. Essa è altamente impermeabile agli ioni e alle molecole con peso molecolare superiore ai 100-150 Dalton, tale selettività è dovuta principalmente, alla presenza di un'elevata concentrazione di cardiolipina o difosfatidilglicerolo. Proprio a causa della diversa permeabilità delle due membrane mitocondriali, la matrice e la camera esterna assumono e mantengono capacità metaboliche molto diverse ed hanno distinti compiti.

I mitocondri sono la sola struttura della cellula, oltre al nucleo, che contiene materiale genetico (Fig. 3). Il mitocondrio possiede un sistema proprio di replicazione; contiene l'enzima DNA γ -polimerasi, che assicura una modalità replicativa di tipo semiconservativo.

Il DNA dei mitocondri (mtDNA) è relativamente scarso, rappresenta l'1,5% del DNA cellulare totale, è estremamente piccolo, contiene, infatti, solamente 37 geni. Di questi 13 codificano alcune delle subunità proteiche dei complessi della catena respiratoria e 24 geni codificano molecole indispensabili alla sintesi di tali subunità (2 RNA ribosomali o rRNA e 22 RNA transfer o tRNA). Queste proteine rappresentano una piccola parte delle proteine presenti nei mitocondri, infatti, in questi organulivi sono inoltre, proteine solubili della matrice mitocondriale, proteine della membrana esterna, e proteine delle membrana mitocondriale interna tra cui trasportatori o *carrier* mitocondriale. Tutte queste proteine sono codificate da geni nucleari, sintetizzate dai ribosomi citoplasmatici e, in seguito, trasferite nei mitocondri.

A differenza di altri organuli cellulari che sono prodotti *ex novo*, i mitocondri al momento della duplicazione cellulare si duplicano, per scissione binaria, in seguito alla duplicazione del loro DNA. Gli organuli completi sono poi ereditati dalle cellule figlie, casualmente, metà in una cellula e metà nell'altra, secondo quella che viene definita eredità non mendeliana o citoplasmatica.

Altra caratteristica importante dei mitocondri degli animali superiori è che, al momento della riproduzione sessuata, essi vengono trasmessi ai figli solo dalla madre. Durante la fecondazione, i mitocondri presenti nel nuovo individuo (zigote) provengono solo dalla cellula uovo (oocita). Pertanto una madre portatrice di una mutazione del DNA mitocondriale trasmetterà tale mutazione a tutti i propri figli, ma solo le figlie la trasmetteranno, a loro volta, alla loro progenie (eredità matrilineare). Al contrario dei geni nucleari che sono presenti nell'uomo in duplice copia (allele materno ed allele paterno), vi sono centinaia di molecole di mtDNA all'interno di ogni cellula. Poiché i mitocondri sono presenti in tutti i tessuti, le malattie mitocondriali possono colpire qualsiasi organo dell'organismo, tuttavia interessano maggiormente il muscolo ed il cervello, data la maggiore richiesta di energia di questi tessuti. Per questo motivo le malattie mitocondriali sono spesso definite come encefalo-mio-patie mitocondriali.

I mitocondri sono, inoltre, veri e propri regolatori della vita e della morte cellulare. Sono il principale bersaglio dei processi di invecchiamento; tendono ad accumulare delezioni e mutazioni puntiformi, che portano ad un cambiamento della

morfologia e della funzionalità mitocondriale. L'invecchiamento e la perdita di efficienza del mitocondrio, compromettono la produzione energetica e, spesso, conducono alla morte del tessuto. In seguito ai processi di invecchiamento o a messaggi fisiologici che giungono alla cellula, si attivano una serie di processi che comportano modificazioni strutturali delle membrane mitocondriali. I segnali apoptotici determinano transizione di permeabilità mitocondriale; la formazione di pori nella membrana mitocondriale interna provoca riduzione del potenziale di membrana e rigonfiamento mitocondriale. I segnali possono anche causare aumento della permeabilità della membrana mitocondriale esterna, rilasciando un fattore di innesco dell'apoptosi, il citocromo c, che passa dai mitocondri al citosol e, mette in moto gli eventi proteolitici che uccidono la cellula.

Una semplice mutazione genetica dei mitocondri, potrebbe essere alla base di tutta una serie di gravi malattie del metabolismo, come l'ipertensione arteriosa, l'ipercolesterolemia ed altre disfunzioni, comprese, l'obesità ed il diabete ^[2].

1.2 Sistemi di trasporto

Studi di frazionamento proteico, condotti sulla membrana mitocondriale interna, hanno dimostrato che in essa sono presenti, oltre ai complessi proteici coinvolti nel processo di fosforilazione ossidativa e di sintesi dell'ATP, anche proteine transmembrana, chiamate trasportatori o carrier, che permettono il trasporto selettivo di substrati, dalla matrice verso lo spazio intermembrana e viceversa.

I substrati trasportati variano significativamente nella loro struttura e dimensione, dal più piccolo ione H^{+} ^[3, 4], a quelli più grandi e carichi, quali l'ATP⁴⁻ ^[5, 6]. La maggior parte dei substrati trasportati sono anioni, ma non solo, alcuni sono cationi, altri zwitterioni.

I *carrier* mitocondriali utilizzano come loro driving-force, il gradiente di concentrazione dei soluti e/o il potenziale elettrochimico protonico a cavallo della membrana mitocondriale interna, generato dalla catena respiratoria. Anche la componente elettrica del potenziale elettrochimico protonico ($\Delta\mu H^{+}$) è piuttosto elevata, ed alcuni *carrier* sfruttano tale gradiente elettrico per effettuare il loro trasporto. E' il caso del *carrier* ADP/ATP e aspartato/glutammato, che trasportano così, ATP e

aspartato contro il gradiente di concentrazione a cavallo tra la matrice mitocondriale ed il citosol.

Dagli anni sessanta ad oggi, sono stati condotti numerosi studi, sui mitocondri integri, che hanno permesso di dimostrare l'esistenza di queste proteine trasportatrici. L'importanza di tali proteine è palesata dall'osservazione che la membrana mitocondriale interna possiede una frazione proteica di circa il 76%, di gran lunga superiore rispetto alla frazione proteica di altre membrane biologiche ^[7]. La maggior parte di queste proteine sono *carrier* mitocondriali.

La comune funzione dei *carrier* fornisce un legame, tra mitocondri e citosol, grazie al flusso di una larga varietà di soluti attraverso la membrana mitocondriale interna. Questo legame è indispensabile, in quanto alcuni processi fisiologici richiedono la partecipazione simultanea di reazioni enzimatiche intra-mitocondriali ed extra-mitocondriali.

Oltre a questa funzione basilare, alcuni *carrier* mitocondriali, giocano un ruolo importante nel regolare e nel mantenere un corretto equilibrio, tra citosol e matrice mitocondriale, per esempio, dei potenziali di fosforilazione e ossidoriduzione. In più alcuni flussi esercitano un controllo sulle vie metaboliche.

Tutti i *carrier* mitocondriali sono proteine nucleo-codificate che vengono poi trasportate alla membrana mitocondriale interna. Nell'uomo sono codificate dalla classe dei geni SLC25 e sono state raggruppate in un'unica famiglia detta "famiglia dei *carrier* mitocondriale" (MCF) ^[8].

Esistono diverse isoforme dei *carrier* mitocondriali, codificate da differenti geni SLC25, ad eccezione del *carrier* del fosfato, che ha due varianti che derivano da uno splicing alternativo del gene SLC25A3 ^[9].

Diversa è la distribuzione tissutale di queste proteine, sono presenti in quasi tutti i tessuti, altre sono tessuto-specifiche ed hanno una distribuzione che riflette la loro importanza in funzioni specifiche. Spesso, le isoforme di uno stesso *carrier* presentano differente distribuzione tissutale.

Studi funzionali, eseguiti su mitocondri intatti, hanno indicato la presenza di circa 20 sistemi *carrier* per il trasporto di metaboliti, implicati nella fosforilazione ossidativa, nel ciclo dell'acido citrico, nell'ossidazione degli acidi grassi, nella gluconeogenesi, nella lipogenesi, nel trasporto di equivalenti riducenti, nella sintesi di urea, nella degradazione aminoacidica, nella sintesi di DNA, RNA e proteine mitocondriali e in altre funzioni che avvengono tra citosol e mitocondri.

Tutti i *carrier* mitocondriali a funzione nota presentano una struttura primaria a sequenza tripartita, che contiene tre domini omologhi, ripetuti in tandem, di circa 100 aminoacidi. Ogni dominio, costituito da 2 regioni idrofobiche, che attraversano la membrana mediante struttura ad α -elica e che sono connesse da lunghi loop, presenta una sequenza aminoacidica caratteristica, altamente conservata^[8]: P-h-D/E-X-h-K/R-X-K/R-(20-30 aa)-D/E-G-(4 aa)-a-K/R-G, dove: h= aa idrofobico; a= aa aromatico; X= aa qualunque.

Nei vari *carrier* mitocondriali tale sequenza è parzialmente modificata, in uno, due, o addirittura in tutti e tre i domini.

La tipica struttura tripartita, la presenza delle due regioni idrofobiche ad α -elica in ogni dominio e della sequenza conservata, sottolineano l'appartenenza di tali proteine alla stessa famiglia.

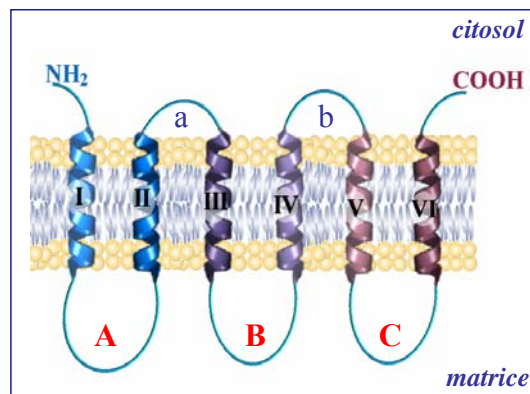


Fig. 4

Rappresentazione schematica della struttura di una proteina appartenente alla famiglia dei carrier mitocondriali. Nel riquadro è mostrato il classico motivo ripetuto tre volte.

Ad oggi, è stato possibile associare solo a quattordici strutture primarie di *carrier* mitocondriali di mammifero uno specifico trasporto, mediante ricostituzione delle proteine in sistemi di membrane artificiali (liposomi) isolati. Tali *carrier* e le loro relative isoforme, sono^[10]:

- Il *carrier* del citrato: CIC⁵;
- Il *carrier* dell'ornitina. ORC1 e ORC2;
- Il *carrier* del fosfato: PiCA e PiCB⁵;
- Il *carrier* dell'ADP/ATP: AAC1, AAC2, AAC3, AAC4;
- La proteina disaccoppiante: UCP1, UCP2, UCP3, UCP;

- Il *carrier* del 2-chetoglutarato: OGC;
- Il *carrier* degli acidi di carbossilici: DIC;
- Il *carrier* dell'aspartato/glutammato: AGC1 E AGC2;
- Il *carrier* del glutammato: GC1 e GC2;
- Il *carrier* dei deossinucleotidi: DNC;
- Il *carrier* della carnitina/acilcarnitina: CAC;
- Il *carrier* degli acidi cheto-dicarbossilici: ODC;
- Il *carrier* della S-adenosilmetionina: SAMC^[11];
- Il *carrier* ATP-Mg/Pi; APC1, APC2 e APC3^[12].

I *carrier* mitocondriali attualmente noti, possono essere suddivisi in trasportatori elettrogenici ed elettroneutri; in particolare la caratterizzazione funzionale dei *carrier* noti ha permesso di suddividerli ulteriormente in tre categorie, in base al tipo di substrato trasportato:

- *Carrier* che catalizzano un trasporto elettrogenico, come il trasportatore dell'ADP⁴⁻/ATP³⁻.
- *Carrier* che catalizzano un trasporto elettroneutro, in cui le cariche trasportate verso l'interno, sono controbilanciate da cariche uguali in uscita (simporto: anione/H⁺) o cariche opposte in entrata (antiporto: anione/OH⁻), come il *carrier* del fosfato o il *carrier* degli acidi tricarbossilici.
- *Carrier* che catalizzano un trasporto neutro in cui la molecola trasportata non ha cariche elettriche, come nel caso del *carrier* della carnitina.

Le proprietà cinetiche di molti *carrier* mitocondriali e la variazione della loro attività in base al pH, potenziale di membrana, fosfolipidi e altri parametri, sono state chiarite nel dettaglio nei mitocondri e, specialmente, dopo la loro ricostituzione funzionale in membrane artificiali (liposomi). La maggior parte dei *carrier* mitocondriali, catalizza una reazione di scambio di specifici soluti. Studi di cinetica, variando le concentrazioni di entrambi i substrati, esterni ed interni, hanno messo in evidenza, con l'eccezione del *carrier* della carnitina, che tutti i *carrier* mitocondriali analizzati finora concordano nella funzione di un meccanismo sequenziale, che implica che i substrati, uno interno ed uno esterno, formino un complesso ternario con il *carrier*, affinché avvenga la traslocazione. Il *carrier* della carnitina, per contro, segue un meccanismo a ping-pong che suppone la formazione di un complesso binario *carrier*-substrato: il sito di legame del *carrier* è alternativamente esposto ai lati della membrana.

Sulla base del profilo idropatico e di dati immunochimici ed enzimatici, è stato proposto un modello di struttura secondaria secondo il quale tale *carrier* è organizzato in sei segmenti transmembrana idrofobici, probabilmente con struttura ad α -elica.

Da studi effettuati utilizzando proteasi specifiche e mediante studi immunologici si è visto che entrambe le estremità N-terminale che C-terminale, sporgono nella lato citoplasmatico della membrana.

I tre segmenti idrofilici, che connettono i domini transmembrana dal lato della matrice, vengono denominati “*loops*” A, B, C. I due segmenti idrofilici, più brevi, che uniscono i tre elementi ripetuti, chiamati a’ e b’ sporgono verso il lato citoplasmatico della membrana mitocondriale. E’ possibile che durante il cambio conformazionale che si verifica con il trasporto, uno o più *loops* (A, B, C) possono inserirsi nel doppio strato lipidico con una struttura a forcina^[8].

La struttura terziaria di queste proteine è poco nota. Questo dipende dal fatto che si tratta di proteine di membrana, di conseguenza difficilmente cristallizzabili a causa della loro elevata idrofobicità, tendenza all’aggregazione e della natura metastabile. Tutto ciò non consente un’analisi strutturale. Infatti, fino ad oggi, è stata ottenuta solo la struttura cristallografica con diffrazione a raggi X del *carrier* catalizza il trasporto ADP/ATP (AAC1) di cuore bovino in complesso con la carbossitrattilosside^[13].

La maggior parte dei *carrier* mitocondriali isolati, formano degli omodimeri, e ciò sembrerebbe applicabile a tutti i membri della famiglia dei *carrier* mitocondriali.

Quale sia il ruolo degli omodimeri nel meccanismo di trasporto deve essere ancora chiarito; potrebbe essere la formazione del canale tra i monomeri o la presenza di due canali uguali, uno per ogni monomero. Se i *carrier* mitocondriali funzionassero come dimeri, queste strutture consisterebbero di dodici segmenti transmembrana, come la maggior parte delle proteine *carrier*^[14].

1.3 Patologie correlate alle deficienze di *carrier* mitocondriali

Le informazioni funzionali ottenute dagli studi effettuati sui *carrier* mitocondriali hanno permesso di ottenere informazioni sul ruolo fisiologico di queste proteine nel metabolismo cellulare. Le malattie dovute a deficienze di proteine di trasporto mitocondriale sono alterazioni del metabolismo dovute a mutazioni di geni che codificano per esse (Tab. I), sono trasmesse con modalita' autosomica recessiva, ad eccezione della Oftalmologia Esterna Progressiva ereditata con modalita' autosomica dominante (adPEO).

Tabella. I
Malattie associate ai carrier mitocondriale.

DISORDINE	GENE	CARRIER	SUBSTRATO
Deficienza AAC1	SLC25A4	AAC1	ADP/ATP
Sindrome di Sengers	?	AAC1	ADP/ATP
Deficienza PiC	SLC25A3	PiC	Fosfato
adPEO	SLC25A4	AAC1	ADP/ATP
Deficienza CAC	SLC25A20	CAC	Carnitina/acilcarnitina
Sindrome HHH	SLC25A15	ORC1	Ornitina/citrullina
NICCD/CTLN2	SLC25A13	AGC2	Aspartato/glutammato
Microcefalia Amish	SLC25A19	TPC	Tiamina pirofosfato
Epilessia neonatale mioclonica	SLC25A22	GC1	Glutammato

Le malattie correlate ai *carrier* mitocondriali possono essere divise in due gruppi [15].

- patologie che presentano un difetto genico su *carrier* mitocondriali la quale funzione e' legata alla fosforilazione ossidativa.
- patologie dovute all'alterazione della funzione di quei *carrier* mitocondriali che non sono implicati nella fosforilazione ossidativa ma determinano una alterazione delle concentrazioni fisiologiche di importanti intermedi di alcune vie metaboliche. Le sintomatologie in questo caso dipendono dalla via metabolica e dal tipo di tessuto colpito (distribuzione tissutale del *carrier*).

La disfunzione a livello della fosforilazione ossidativa e' dovuta al *carrier* dell'ADP/ATP e al *carrier* del Pi, trasportatori nella matrice mitocondriale di ADP e Pi, utilizzati dal complesso dell'ATP sintetasi per la produzione di ATP. Nel primo gruppo troviamo: sindrome di Sengers', AAC1 deficienza, PiC deficienza e adPEO. Le

sintomatologie delle patologie correlate a questo tipo di difetto genico sono causate da un'insufficiente produzione di energia, soprattutto in quei tessuti, dove tali *carrier*, sono fortemente espressi e dove e' presente una elevata attivita' di fosforilazione ossidativa. In questo gruppo di patologie viene inclusa anche la PEO, anche se, la mutazione eterozigote a carico dell' isoforma 1 del *carrier* dell' ADP/ATP non determina un'azione diretta sulla disfunzione energetica ma, contribuisce all'instabilita' del DNA mitocondriale ^[15].

Le patologie conosciute appartenenti al secondo gruppo sono: CAC deficienza, la sindrome HHH, ACG2 deficienza, microcefalia della popolazione degli Amish ed epilessia mioclonica neonatale ^[15].

Altri *carrier* potrebbero essere corresponsabili di patologie, ma i meccanismi ancora da chiarire. Ad esempio il *carrier* del citrato (CIC), codificato dal gene SLC25A1, sembra essere implicato nella **sindrome di DiGeorge** (DGS) e nella sindrome velo-cardio-facciale (VCFS) ^[15].

1.4 I lisosomi:

“ sistema di demolizione e di riciclaggio della cellula”

I lisosomi, dal greco *λυσις*: dissoluzione e *σωμα*: corpo, sono organuli citoplasmatici, caratteristici delle cellule eucariotiche, ricchi di enzimi idrolitici, responsabili della degradazione di macromolecole assunte sia dall'ambiente extracellulare, attraverso il meccanismo di fagocitosi e di endocitosi, che dal citoplasma, tramite l'autofagia.

Sono stati identificati per la prima volta nel 1949 ^[16] nelle cellule di fegato di ratto dal biologo belga de Duve ^[17], grazie ad un'osservazione fortuita. Egli riuscì ad isolare i lisosomi attraverso semplici tecniche di centrifugazione, che consentirono di purificarli, separandoli da tutti gli altri componenti cellulari. Questa scoperta è stata reputata così importante da essere riconosciuta con il conferimento del Premio Nobel per la medicina e la fisiologia nel 1974 con la seguente motivazione: "per le loro scoperte sull'organizzazione strutturale e funzionale della cellula". Dopo essere stato considerato per molto tempo semplicemente il compartimento *waste-disposal* ^[18], ossia per l'eliminazione dei rifiuti della cellula, come lo stesso de Duve lo definì, oggi il lisosoma è ritenuto un organello dinamico che si muove attraverso il citoscheletro ed interagisce con altri comparti cellulari ^[19]. Questi organuli degradativi acidi sono circondati da una singola membrana a doppio strato lipidico (Fig. 5) ed hanno un pH di circa 5, più basso del pH citoplasmatico di circa 7.2 ^[16].

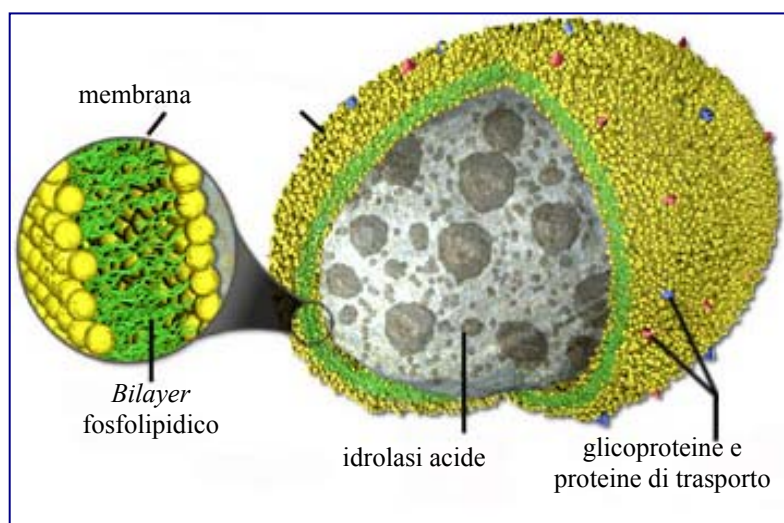


Fig. 5
Particolare di un lisosoma.

Al microscopio elettronico questi organuli appaiono come corpi densi tondeggianti o ovoidali delimitati dalla membrana lisosomiale e con un diametro compreso tra 0,2 e 1 μm . In generale, però, le loro dimensioni, forma e struttura sono variabili e negli studi morfologici vengono solitamente messi in evidenza colorandoli con anticorpi specifici (Fig. 6), mediante il dosaggio di enzimi o per via istochimica attraverso il precipitato prodotto dall'azione di un'idrolasi acida sul suo substrato.

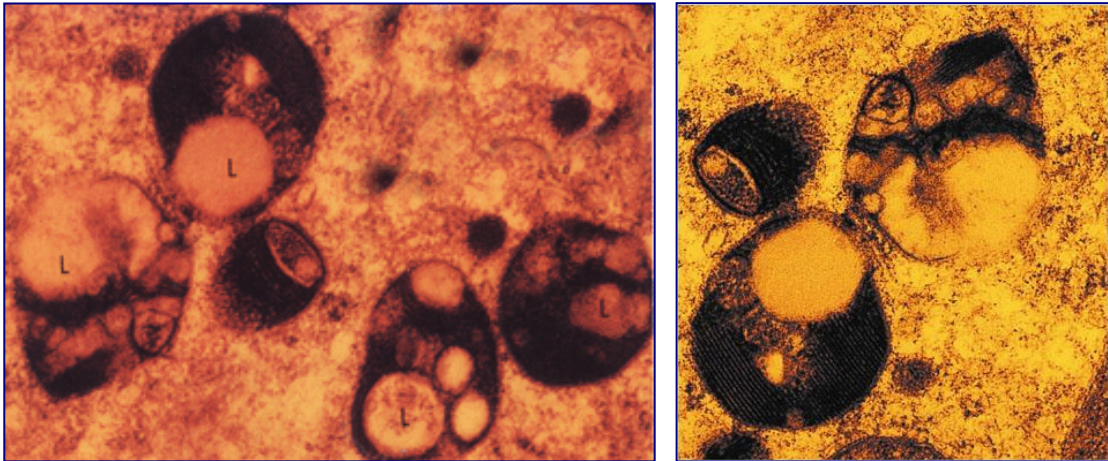


Fig. 6
Lisosomi al microscopio elettronico.

La formazione dei lisosomi viene descritta generalmente come il punto di intersezione tra due vie distinte: endocitotica, attraverso la quale sono assunte molecole extracellulari, e secretoria, attraverso la quale sono processate le proteine ^[19]. Attraverso la prima, il materiale esterno alla cellula è assunto in vescicole rivestite di clatrina che gemmano dalla membrana plasmatica e, fondendosi con gli endosomi precoci (pH 6,0-6,5), danno origine agli endosomi tardivi (pH 5,0-6,0), precursori dei lisosomi primari. Mediante la seconda, invece, le idrolasi acide, sintetizzate nel reticolo endoplasmatico ruvido, vengono caricate a livello del Golgi *trans* in vescicole di trasporto, i lisosomi primari, per poi essere rilasciate negli endosomi tardivi che maturano a lisosomi secondari (pH 4,5-5,0) nel momento in cui acquisiscono un corredo completo di enzimi lisosomiali (*proteasi, nucleasi, lipasi, glicoidrolasi, fosfoidrolasi, fosfatasi, glicosidasi, solfatasi, etc.*) ^[19].

Uno dei cambiamenti importanti durante la maturazione degli endosomi è l'abbassamento del pH interno fino ad un valore di circa 5,5; tale diminuzione ha un ruolo chiave nel trasporto delle idrolasi acide lisosomiali dal sistema del Golgi *trans*. Le idrolasi acide, appena sintetizzate, acquisiscono un residuo di mannosio-6-fosfato

nell'apparato del Golgi. Questo residuo serve come marker di riconoscimento specifico per il legame degli enzimi lisosomiali al recettore del mannosio-6-fosfato localizzato sulla membrana dell'apparato del Golgi. Il complesso recettore-enzima lisosomiale viene traslocato, da vescicole ricoperte di clatrina, al compartimento pre-lisosomiale, dove il complesso è scisso a causa del basso valore di pH (pH-5.5). Gli enzimi lisosomiali sono continuamente impacchettati nei lisosomi, mentre il recettore del mannosio-6-fosfato è riciclato nell'apparato del Golgi^[7]. A questo punto gli endosomi tardivi maturano a lisosomi acquisendo un corredo completo di idrolasi acide, che digeriscono le molecole assunte per endocitosi (Fig. 7).

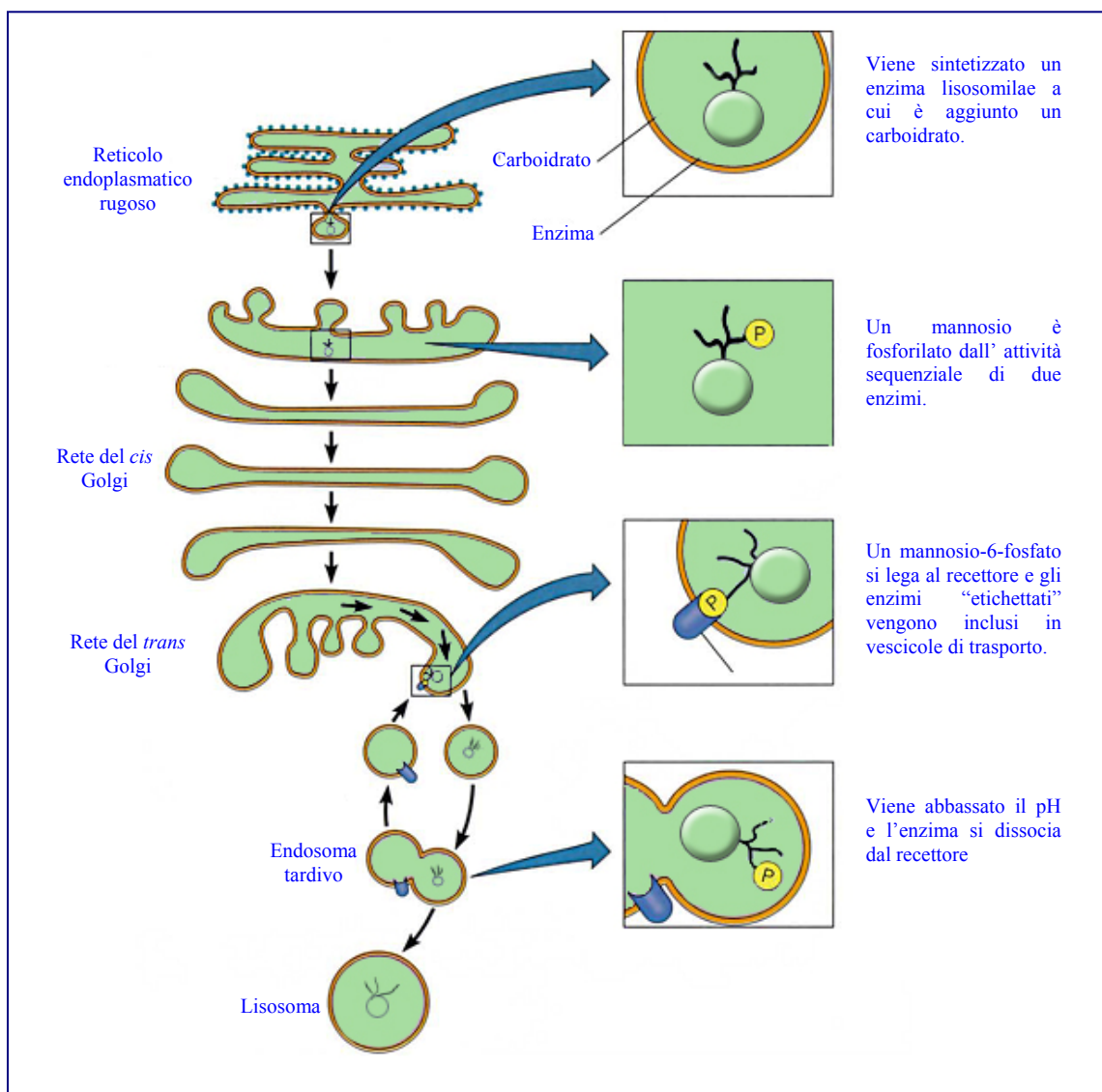


Fig. 7
Trasporto delle idrolasi acide neosintetizzate dal Golgi ai lisosomi.

Caratteristica comune dei lisosomi (denominati anche endosomi tardivi) è rappresentata dalla presenza di un pH luminale acido.

L'ambiente acido del lume è importante per diverse funzioni:

- Endocitosi mediata da recettore e riciclo;
- Movimento/maturazione di organelli;
- Attività di trasportatori di membrana;
- Attivazione di idrolasi lisosomiali e proteolisi.^[20]

L'ambiente acido è stabilito e mantenuto dall'azione della ATPasi protonica vacuolare (V-ATPasi) presente sulla membrana lisosomiale, che pompa protoni nel lume dell'organulo^[34]. Tale pompa protonica, costituita da 13 subunità, trasporta attivamente protoni dal citoplasma nel lisosoma, consumando energia sottoforma di idrolisi di ATP e mantenendo una concentrazione dei protoni maggiore di circa 100 volte all'interno del lisosoma. La proteina V-ATPasi è costituita da 2 subunità maggiori conosciute come V_1 e V_0 . La subunità V_1 , costituita da otto differenti subunità (A-H), contiene il sito catalitico, formato dalle subunità A e B ed è responsabile dell'idrolisi dell'ATP; la subunità V_0 , costituita da 5 subunità (a, c, c', c'', d) è responsabile invece della traslocazione protonica attraverso la membrana (Fig. 8)^[20].

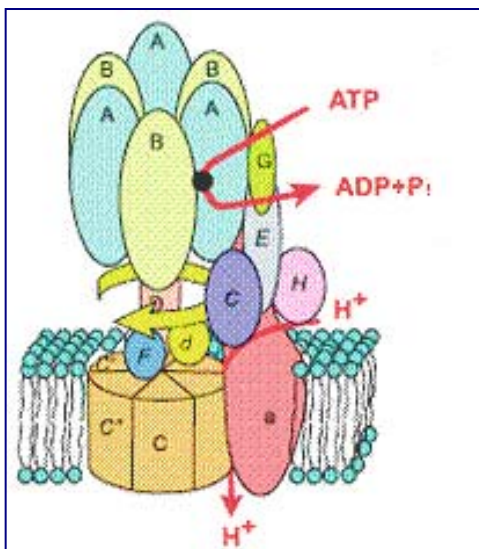


Fig. 8
Rappresentazione schematica della pompa protonica V-ATPasi.

La necessità di un pH acido per il funzionamento delle idrolasi lisosomiali rappresenta una doppia protezione per la cellula eucariotica; in primo luogo evita la

digestione incontrollata dei contenuti del citoplasma, pertanto anche se la membrana lisosomiale dovesse rompersi, le idrolasi acide rilasciate sarebbero inattive al pH neutro citoplasmatico. L'eterogeneità del loro aspetto riflette la grande varietà di funzioni che essi ricoprono. I lisosomi, *in primis*, rappresentano il sistema digestivo cellulare in quanto gli enzimi litici che essi contengono degradano, in maniera specifica e controllata, sia sostanze proprie della cellula sia sostanze provenienti dall'esterno, nei loro componenti elementari ^[21, 22]. Questi ultimi vengono, poi, rilasciati in vescicole dirette verso altri compartimenti o verso la superficie cellulare oppure traslocate, mediante specifici sistemi di trasporto, attraverso la membrana lisosomiale nel citoplasma per essere ulteriormente metabolizzate o utilizzate a fini biosintetici allo scopo di mantenere l'omeostasi cellulare ^[23].

I precursori degli enzimi litici lisosomiali, riconosciuti grazie ad un gruppo segnale di amminoacidi, subiscono nel Golgi *cis* la fosforilazione dei residui terminali di mannosio presenti sulle ramificazioni oligosaccaridiche. Successivamente, a pH neutro, legano il recettore del mannosio-6-fosfato localizzato sulla superficie interna delle membrane del Golgi *trans*. Nel processo di maturazione che porta al lisosoma secondario questi enzimi si dissociano dal recettore destinato ad essere riciclato, subiscono la rimozione del fosfato che impedisce un loro eventuale ritorno all'apparato di Golgi e, in seguito all'abbassamento del pH, si attivano ^[19]. Alcune idrolasi sfuggono al comune impacchettamento in vescicole e vengono trasportate alla superficie cellulare per essere esocitate. A livello della membrana plasmatica sono, però, presenti recettori che, riconoscendo il mannosio-6-fosfato, ricatturano questi enzimi litici riportandoli attraverso endosomi precoci e tardivi, con un meccanismo di endocitosi mediata da recettore, ai lisosomi. Dato che le idrolasi lisosomiali richiedono un ambiente acido per funzionare non creano danno nei fluidi extracellulari che in genere presentano un pH neutro, nè degradano il lisosoma diffondendo nel citoplasma per la particolare composizione della sua membrana.

Le sostanze da digerire possono essere acquisite dai lisosomi anche per altre vie, predominanti o esclusive in particolari tipi cellulari, come l'autofagia, la fagocitosi, la pinocitosi e la crinofagia ^[19].

L'autofagia consente il *turnover* graduale dei componenti cellulari ^[21, 23] con una velocità maggiore rispetto a quella con la quale si succedono le divisioni della cellula a cui essi appartengono. Ciò garantisce il rinnovarsi continuo di vari organuli citoplasmatici che possono usurarsi nel tempo o accumulare detriti di origine

metabolica. Il primo passaggio in questo processo è l'inglobamento dell'organello difettoso o mal funzionante in una membrana derivante probabilmente dal reticolo endoplasmatico. La vescicola che si forma, l'autofagosoma, si fonde con il lisosoma che ne digerisce il contenuto [21, 23].

Diversamente, liquidi e soluti o grosse particelle (microrganismi, materiale organico ed inorganico corpuscolato, cellule morte o senescenti, residui cellulari in disfacimento) vengono racchiusi rispettivamente nei pinosomi e nei fagosomi che rilasciano il loro carico nei lisosomi. Nel caso di molecole non degradabili, per l'assenza degli enzimi necessari, il lisosoma fonde con la membrana plasmatica liberando per esocitosi i residui non digeriti. Possiedono spiccata attività fagocitaria i granulociti neutrofilo, i monociti, i macrofagi, gli istiociti e i reticolociti.

Nelle cellule endocrine, infine, i lisosomi sono responsabili della crinofagia ossia della digestione dei granuli di secrezione in eccesso il cui accumulo provocherebbe danni alla cellula e all'organismo, portandolo addirittura alla morte [35].

Questa descrizione dei lisosomi potrebbe apparire oggi semplicistica perché un numero sempre più grande di ricerche mostra come questi organelli siano coinvolti in altre funzioni specializzate. Modulando la degradazione di una moltitudine di proteine, i lisosomi sono organelli chiave nella regolazione dell'omeostasi cellulare. Studi più approfonditi suggeriscono, inoltre, che i lisosomi non rappresentano soltanto un semplice sito per la degradazione terminale di macromolecole, ma sono coinvolti in diverse funzioni specializzate. Le idrolasi lisosomiale si sono rivelate essere implicate in molte attività cellulari:

- il rimodellamento della struttura dell'osso;
- la formazione e la propagazione delle metastasi tumorali;
- il *processing* e la presentazione degli antigeni nelle cellule del sistema immunitario;
- la maturazione dei pro-ormoni;
- il rilascio extracellulare di enzimi attivi (ad esempio nelle cellule del pancreas);
- l'apoptosi.

Non in tutti questi casi, però, sono stati dimostrati i precisi meccanismi di coinvolgimento [20].

La membrana lisosomiale presenta proteine integrali della membrana lisosomiale altamente glicosilate ed appartenenti per maggior parte alle famiglie

denominate LAMP e LIMP ^[24]. I cDNA di LAMP-1 e LAMP-2 sono stati isolati da cellule di topo, ratto, pollo ed uomo ^[24]. Negli ultimi anni sono state identificate specifiche glicoproteine denominate LAMP-1, LAMP-2, LIMP-1/CD63 e LIMP-2/LGP85 che rappresentano il 50% delle proteine della membrana lisosomiale e sono costituite da una lunga catena polipeptidica caratterizzata da un dominio luminale, uno transmembrana ed uno citosolico^[24]. Queste proteine integrali di membrane sono costituite da una lunga catena polipeptidica avente una regione N-terminale, esposta nel lume lisosomiale, un dominio intraluminale, un dominio transmembrana e un dominio citosolico. La loro regione N-terminale presenta due domini omologhi separati da una regione cerniera ricca di prolina, mentre ogni dominio è costituito da quattro residui di cisteina formanti due ponti disolfuro. La posizione di questi residui è conservata nelle proteine LIMP-1/CD63 LAMP-1 e LAMP-2. Il dominio transmembrana è seguito da una regione C-terminale citosolica, costituita da 11 amminoacidi, e contenente la sequenza segnale per lo smistamento delle proteine. I carboidrati sono legati alle proteine mediante legami N- ed O-glicosidici. Ruolo principale delle glicoproteine LAMP e LIMP è la protezione della membrana dalla degradazione ad opera delle idrolasi lisosomiali, grazie all'elevata glicosilazione di queste proteine nel versante intraluminale. Studi condotti su queste proteine hanno dimostrato che la delezione dei residui di asparagina, capaci di legare gli oligosaccaridi, determina una rapida degradazione di LAMP-1 e LAMP-2, al contrario LIMP-2/LGP85 risulta relativamente stabile, indicando che non tutti i residui di asparagine sono necessari per la stabilità delle proteine di membrana. Un anomalo funzionamento di LAMP-2 nell'uomo, sembra essere coinvolto nella sindrome di Danon, una forma molto grave di cardiomiopatia ^[24].

1.5 Proteine di trasporto lisosomiale

Contrariamente agli enzimi idrolitici, la membrana lisosomiale rimane poco caratterizzata. In essa accanto alle ben note glicoproteine lisosomiali di membrana, LAMP e LIMP, è stata dimostrata la presenza di molteplici classi di sistemi di trasporto, molti dei quali ancora non caratterizzati.

Come già ampiamente illustrato, i lisosomi sono responsabili della degradazione di macromolecole internalizzate mediante endocitosi, o di molecole ed

organelli sequestrati mediante autofagia. Dopo la degradazione i risultanti cataboliti sono trasportati fuori dai lisosomi e riutilizzati nel metabolismo cellulare. Questo trasporto è generalmente realizzato mediante trasportatori attivi secondari, presenti sulla membrana lisosomiale^[25] (Tab II).

Sebbene primi studi suggerirono che i lisosomi fossero permeabili in maniera non specifica a piccole molecole, esperimenti con traccianti radioattivi su lisosomi estratti dai pazienti affetti da cistinosina hanno dimostrato l'esistenza di un trasporto selettivo, mediato da proteine, attraverso la membrana lisosomiale^[25]. Esperimenti successivi dimostrarono l'esistenza di trasportatori per amminoacidi, di- o tri-peptidi, zuccheri ed ioni inorganici nei lisosomi purificati^[25]. Esperimenti di competizione hanno dimostrato l'esistenza di più di 20 trasportatori lisosomiali :

Studi genetici sulla cistinosi hanno rivelato l'identità del primo trasportatore lisosomiale conosciuto a livello molecolare, la cistinosina, una proteina con sette domini transmembrana (TM) che trasporta fuori dal lisosoma la cistina^[25]. Successivamente è stata rivelata l'identità del trasportatore lisosomiale dell'acido sialico, la sialina^[25], coinvolto in una malattia d'accumulo nota col nome di "*Salla disease*", dovuta ad un anomalo funzionamento di questo trasportatore.

Pochi altri trasportatori attivi secondari sono stati caratterizzati.

PHT2 è un trasportatore di istidina di- e tri-peptidi, accoppiato a protoni. ENT3 è un trasportatore lisosomiale di nucleosidi , in accordo con la tesi secondo cui gli acidi nucleici non vengono ulteriormente degradati in basi azotate semplici e zuccheri nel lume lisosomiale. Negli endosomi tardivi e nei lisosomi è presente una isoforma del trasportatore dei metalli divalenti DMT1, che trasporta ioni Fe dagli endosomi riciclati^[25]. Recentemente è stato trovato il trasportatore GLUT8 nei lisosomi^[25], ma non è chiaro se esso corrisponda al trasportatore lisosomiale di zuccheri esosi neutri descritto da precedenti studi biochimici^[25].

Tabella. II
Sistemi di trasporto della membrana lisosomiale.

SISTEMA	SUBSTRATI PRINCIPALI	I POTETICI SUBSTRATI SECONDARI
Aminoacidi (a.a.)		
Cationici (c)	L-Lys, Arg	L-ORN, cisteammina, cisteina solforata
Anionici (d)	L-Glu, Asp	L- α -aminoadipato
Piccoli a.a. neutri (e)	L-Ala, Ser, Thr	L-Leu
Piccoli a.a. neutri (f)	L-Pro, Ala	B-aminoacidi (con meno di 3 atomi di C), Sarcosina, N-metil-L-Ala
Piccoli a.a. neutri (p)	L-Pro, 3,4-deossiprolina	-
Grandi a.a. neutri (h)	L-Tyr, Leu, Ile, Trp, His, Val, Met, Phe	D-Tyr, monoiodotirosina
a.a. dipolari (l)	L-Leu, Val	Nor-Leu
a.a. aromatici (t)	L-Trp, Phe	D-Trp
Cisteina	L-Cisteina	-
Cisteammina, aminosolfuri	Cisteammina	Aminotioili, tiocolina
Cistina	L-Cistina	-
Taurina	Taurina	B-Ala, ipotaurina
Dipeptidi	Gly-Gln	Dipeptidi, tripeptidi
Zuccheri		
Acidi saccaridici	Neu5Ac, GlcA	IdoA, L-lattato, α -chetoglutarato
Esosi neutri	D-glucosio	D-galattosio, D-mannosio, D- e L-fruttosio
Esosi N-acetilati	N-acetilglucosamina	-
Nucleosidi	Purine, pirimidine	-
Ioni inorganici		
Pompa H⁺/ATPasi	Protoni	-
Canale del Cl⁻	Cl ⁻	-
Canale del Ca²⁺	Ca ²⁺	Cd ²⁺ , Hg ²⁺ , Zn ²⁺ , Mg ²⁺
Ioni fosfato	HPO ₄ ⁻	Ascorbato
Ioni solfato	SO ₄ ²⁻	Molibdato
Metalli pesanti	Ag ⁺	Cu ²⁺ , Cd ²⁺
Vitamine		
Cobalamina	Cianocobalamina	Adenoilcobalamina, Metilcobalamina

Altre proteine di trasporto della membrana lisosomiale, la cui esatta natura è ancora sconosciuta sono ^[24]:

- LAPT_{M4} α , proteina a 4 domini transmembrana, probabilmente coinvolta nel trasporto di nucleotidi ;
- ABCA2 e ABCB9, recentemente clonate ed appartenenti alla famiglia dei trasportatori ABC (adenosine 5'-triphosphate-binding cassette);
- NRAMP2, (natural resistance-associated macrophage protein 2), glicoproteina integrale di membrana costituita da 12 segmenti transmembrana, trasportatore di metalli bivalenti; trasporta il ferro, nel ciclo della transferrina, negli endosomi;
- NCP1, glicoproteina implicata nella sindrome di Niemann-Pick di tipo C, caratterizzata dall'accumulo di colesterolo nei fibroblasti, dovuto alla mancata ridistribuzione del colesterolo assorbito tramite endocitosi mediata dal recettore ;
- CLN3, proteina integrale di membrana coinvolta nel Morbo di Batten o lipofusinosi ceroidi, coinvolta nel trasporto di arginina;
- LALP70, (lysosomal apprese-like protein) probabilmente coinvolta nel metabolismo dei nucleotidi di- e trifosfato, sequestrati nel citosol durante l'autofagocitosi .

Sono stati, inoltre, individuati tre sistemi di traslocazione per piccoli amminoacidi neutri: *f*, *p* ed *e*. Il sistema *f* catalizza l'assorbimento della maggior parte della prolina e dell'alanina, il sistema *p* solo della prolina ma ha una minore affinità, e al sistema *e* è affidato il trasporto dell'alanina, della serina e della treonina. La traslocazione dei grandi amminoacidi neutri (tirosina, leucina, isoleucina, triptofano, fenilalanina, istidina), invece, è mediata dal sistema *h*. È stato, anche, descritto un trasportatore specifico per il trasporto della cisteina all'interno dei lisosomi dove reagisce con le proteine, riduce i loro ponti disolfuro svolgendole e consentendo alle proteinasi di idrolizzarle e quindi degradarle ^[26].

Uno dei maggiori gruppi, al momento conosciuti, di proteine di trasporto di amminoacidi e loro derivati è rappresentato dalla superfamiglia APC (*amino acid/polyamine/organocation*) a cui appartengono trasportatori eucariotici, procariotici o ubiquitari ^[27]. Della superfamiglia APC fa parte la famiglia AAAP (*amino acid/auxin permease*), scoperta in tutti gli organismi eucariotici, quali piante, lievito, invertebrati e vertebrati ^[28]. Di essa, nei mammiferi, sono state descritte tre differenti subfamiglie che,

sebbene possiedano sequenze amminoacidiche abbastanza divergenti, mostrano caratteristiche strutturali e funzionali molto simili [29].

- Trasportatore vescicolare per il GABA (VIAAT/VGAT);
- I diversi sistemi di trasportatori A/N;
- La sottofamiglia LYAAT/PAT.

Queste proteine presentano, infatti, un'uguale o simile topologia transmembrana, tutte riconoscono e trasportano amminoacidi o composti strettamente correlati e risultano sensibili alle alterazioni nella concentrazione protonica intra- ed extracellulare (Fig. 9) [28].

I primi studi sono quelli relativi alla famiglia SLC32 il cui unico membro, VIAAT (*vesicular inhibitory amino acid transporter*) o VGAT (*vesicular GABA transporter*), è implicato essenzialmente nella trasmissione glicinergica e GABAergica. In particolare, esso media, per antiporto protonico, dapprima l'accumulo di glicina e acido γ -amminobutirrico nelle vescicole secretorie e, successivamente, il loro rilascio a livello delle terminazioni nervose presinaptiche [30, 31].

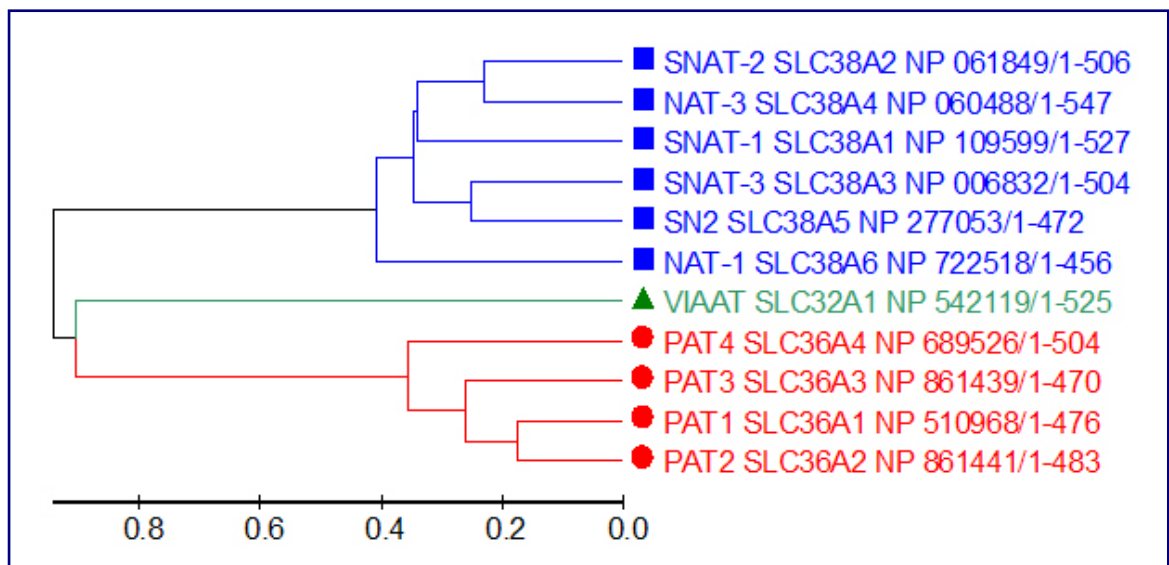


Fig. 9
Relazioni filogenetiche tra i componenti delle famiglie SLC38 (SNAT1-3, SN2, NAT1), SLC32 (VIAAT/VGAT) ed SLC36 (PAT1-4). Le sequenze ottenute dalla banca dati *Entrez Gene* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>) sono state allineate con il programma *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) ed utilizzate nella costruzione del dendrogramma mediante il software *Mega 2.1*. La lunghezza dei rami è proporzionale alla distanza temporale tra le sequenze.

L'altro sottogruppo, SLC38, è costituito dai trasportatori A/N coinvolti nel trasferimento della glutammina dagli astrociti ai neuroni del sistema nervoso centrale, nella detossificazione dell'ammonio, nella gluconeogenesi epatica e nella risposta

renale all'acidosi. Quelli di tipo A, presenti in più tipi cellulari, trasportano amminoacidi alifatici: alanina, asparagina, cisteina, glutammina, glicina, metionina e serina. Quelli di tipo N, invece, principalmente glutammina, asparagina ed istidina. Entrambi i sistemi, A ed N, sono localizzati sulla membrana plasmatica o, come apparso recentemente, su quella di organelli cellulari come gli endosomi e sono tutti e due cotrasportatori Na^+ -dipendenti, ma solo il primo sfrutta come *driving force* il gradiente di protoni, l'altro è tuttavia marcatamente influenzato dalla loro concentrazione [32, 33].

Le proteine PAT (*proton-coupled amino acid transport*), codificate dai geni *SLC36*, costituiscono la terza e ultima subfamiglia.

I trasportatori SLC36 sono stati identificati usando come “*query*”, per la ricerca di nuovi membri di mammifero appartenenti alla superfamiglia AAAP, sia il trasportatore vescicolare per il GABA (VIAAT/VGAT) che il trasportatore vacuolare per amminoacidi di lievito AVT3 [34].

Dalle indagini realizzate negli ultimi quindici anni sembra che questi trasportatori catalizzino, per simporto protonico, il trasporto di α -amminoacidi dipolari (glicina e alanina), imminoacidi (prolina e idrossiprolina), β -amminoacidi (β -alanina e taurina), osmoliti (betaina) e agenti neuromodulatori (GABA, D-cicloserina e D-serina) in diversi tessuti, sia a livello della membrana cellulare che, in alcuni casi, di quella lisosomiale [35]. La loro attività dipende dal pH, ma non dal Na^+ e dal Cl^- , conduce ad una pronunciata acidificazione intracellulare e può essere alterata da cambiamenti nel potenziale di membrana [36]. Tutte le sequenze, di circa 500 amminoacidi [36], sono caratterizzate da numerosi residui conservati ad eccezione dei 40-50 che formano la regione N-terminale che sembra essere localizzata, secondo studi di topografia, sul versante citosolico a differenza di quella C-terminale orientata dal lato extracellulare o verso il compartimento lisosomiale [28]. Sono noti, inoltre, comuni siti di glicosilazione e residui di istidina probabilmente coinvolti nel legame col protone [28]. Una stessa organizzazione strutturale, 9-11 domini transmembrana, appare dai profili idropatici di ogni proteina [28].

Il primo membro della famiglia SLC36, SLC36A1, è stato isolato dal ratto [37], dal topo [38] e dall'uomo [35] e, espresso in cellule eterologhe effettua un trasporto di amminoacidi accoppiato a protoni, pH dipendente, ma Na^+ indipendente da qui il nome PAT1: *proton-coupled amino acid transporter 1* [35, 38]. Inizialmente questo trasportatore è stato identificato in ratto [37], caratterizzato molecolarmente e funzionalmente e denominato LYAAT1 (*lysosomal amino acid transporter 1*) data la sua localizzazione

lisosomiale. La microscopia confocale su sezioni di cervello ha rivelato, infatti, che questo trasportatore colocalizza con la *cathepsina D*, un *marker* lisosomiale, indicando la sua principale funzione di esportazione dei prodotti di proteolisi da questo organello al citosol^[37]. Il trasportatore media l'*export* di piccoli amminoacidi neutri, glicina, alanina e prolina dal lisosoma al citosol. Successivamente, è stato clonato ed espresso in cellule di *Xenopus laevis* l'ortologo murino, che presenta simile specificità di substrato. La specificità di substrato è ben descritta e sembrano essere trasportati, oltre a piccoli L- α -aminoacidi (glicina, alanina e prolina), anche alcuni β - e γ - aminoacidi (es. β - alanina e GABA), D - aminoacidi (es. D-serina e D-alanina) e osmoliti come sarcosina (N-metilglicina) e betaina (N-trimetilglicina). Le caratteristiche strutturali critiche dei substrati che mostrano un trasporto elettrogenico mediato da PAT1 sono: breve lunghezza del modello a sedia dell'aminoacido, un gruppo libero carico negativamente (come un gruppo carbossilico) e uno spazio ristretto tra il gruppo amminico e quello carbossilico; mentre un gruppo libero amminico non è essenziale per l'interazione con PAT1. Il trasporto mediato da PAT1 è fortemente dipendente dal pH extracellulare e dal potenziale di membrana. Il trasporto di protoni e della forma zwitterionica degli aminoacidi substrati è elettrogenico, con una stechiometria di 1:1, con una K_m apparente per tali substrati nel *range* di 1-10 mM. E' noto dalla letteratura che, durante il trasporto, PAT1 presenta un meccanismo di legame ordinato: per primi vengono legati i protoni, seguiti poi dal legame degli aminoacidi. Successivamente, si ha la traslocazione simultanea attraverso la membrana di protoni ed aminoacidi. Altri esperimenti di efflusso hanno dimostrato che PAT1 è capace di trasportare i suoi substrati in maniera bidirezionale, in modo che la direzione di trasporto sia determinata dal gradiente elettrico e chimico dei protoni e dal gradiente di concentrazione del substrato. Difetti nel gene umano SLC36A1, il gene di PAT1, potrebbero essere associati con la causa genetica dell'iminoglicinuria, una patologia autosomica recessiva caratterizzata da una marcata riduzione del riassorbimento renale di prolina, idrossiprolina e glicina^[39], anche se tale ipotesi non ha una base molecolare dato che la localizzazione di PAT1 nel rene non è stata ancora determinata.

Oltre a PAT1, la famiglia comprende anche un altro trasportatore già caratterizzato, PAT2, codificato dal gene SLC36A2, ed isolato dal ratto^[38], dal topo^[40], e dall'uomo^[41]. Questa proteina ha mostrato, rispetto a PAT1, inizialmente una distribuzione tissutale più ristretta, ma studi approfonditi hanno evidenziato una maggiore localizzazione in cuore e polmoni, ma una presenza anche in rene, muscolo,

testicoli, milza, timo e nervo sciatico ^[41, 42]. PAT2 mostra una maggiore selettività rispetto a PAT1, infatti trasporta piccoli L- α -aminoacidi con una maggiore affinità: K_m pari a 100-60 μM ^[42]. La sua attività di trasporto è, inoltre, meno sensibile ai cambiamenti di pH extracellulare e di potenziale di membrana. Il ruolo fisiologico di questa proteina non è ancora del tutto noto, sebbene la localizzazione dell'RNA e della proteina murina PAT2 nel cervello e nel midollo spinale ^[28] suggerisca che tale trasportatore potrebbe svolgere un ruolo nel controllo del trasporto di neurotrasmettitori e in particolare nei movimenti transmembrana della glicina ^[43]. La glicina è coinvolta sia nell'inibizione post-sinaptica attraverso l'attivazione dei canali al Cl^- che nell'eccitazione attraverso il potenziamento della neurotrasmissione glutammatergica.

Pochissime sono, invece, le informazioni disponibili in letteratura su PAT3. Questo nuovo trasportatore sembra essere localizzato nei testicoli di topo adulto dove potrebbe ricoprire un compito fisiologico cruciale ^[41]. La funzione resta ancora oggi sconosciuta.

I geni umani SLC36A1-3 sono localizzati sul cromosoma 5q33.1.

1.6 I lisosomi: *target* per la terapia contro il cancro

Nel microambiente dei tumori sono frequentemente riscontrati ipossia e un pH extracellulare acido. Questo pH acido è alla base del comportamento migratorio ed invasivo in vitro e del fenomeno metastatico in vivo, attraverso l'attivazione e il rilascio da parte delle cellule tumorali di proteasi ^[44].

E' stato osservato che il pH extracellulare acido provoca lo spostamento dei lisosomi verso la periferia della cellula (Fig. 10), mentre il numero totale dei lisosomi per cellula diminuisce. Il movimento lisosomiale all'interno della cellula è reso possibile dalla co-operazione dei filamenti di actina, miosina $\text{I}\alpha$, e dei microtubuli ^[44]. Il diametro di questi organuli aumenta durante le fasi replicative con l'acidità extracellulare nelle cellule di cancro mammario con metastasi, mentre diminuisce nelle cellule di cancro prive di metastasi ^[43]. Questo è un fenomeno rilevante in quanto i lisosomi ingrossati sono più suscettibili alla rottura rispetto a quelli di minori dimensioni ^[45]. Infatti, le membrane lisosomiali potrebbero essere destabilizzate dallo stress ossidativo provocato dal continuo accumulo di ferro nei lisosomi, dovuto alla reazione di Fenton, che si

verifica in quelle cellule in cui si ha un rapido accrescimento e dunque un notevole *turn-over* proteico [46].

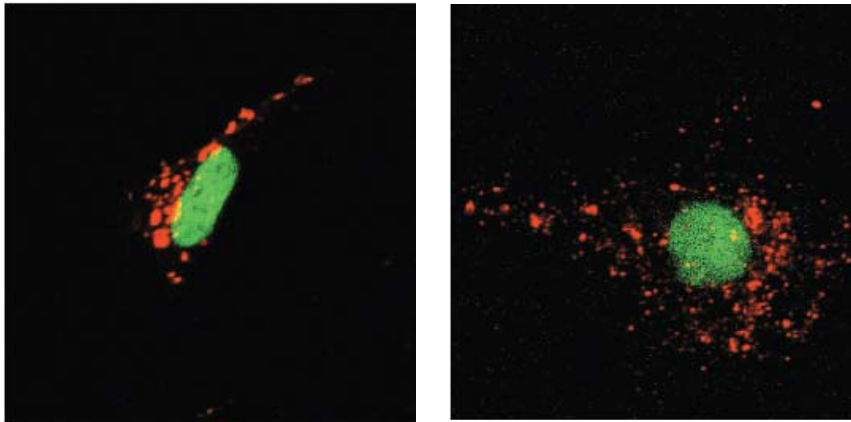


Fig. 10 Immunofluorescenza di cellule di cancro mammario metastatico.

Nelle cellule controllo, pannello A, i lisosomi (in rosso) sono a livello perinucleare, mentre nelle cellule tumorali, pannello B, sono più spostati e concentrati verso la periferia cellulare. In verde è rappresentato il nucleo.

Nella progressione tumorale si verificano nei lisosomi dei cambiamenti a livello degli enzimi idrolitici coinvolti nel processo di morte cellulare.

Le proteasi più studiate tra le idrolasi lisosomiali sono le catepsine. Esse esibiscono un'attività ottimale al pH acido dei lisosomi, ma, sebbene con minore attività, possono funzionare anche al pH neutro citosolico. Accanto alla loro funzione di regolazione del turnover delle proteine, alcune catepsine posseggono altre specifiche funzioni nel controllo della progressione del ciclo cellulare, nella presentazione antigenica, nell'omeostasi dell'epidermide. Inoltre, studi recenti dimostrano che le catepsine rivestono importanti ruoli anche fuori dal compartimento lisosomiale, quali la degradazione della matrice cellulare quando secrete nello spazio extracellulare e l'esecuzione del processo di morte cellulare programmata quando rilasciate nel citosol [47].

Le catepsine B, L e D sono gli enzimi idrolitici implicati nella progressione tumorale e sono usate come *marker* identificativi della morte cellulare, offrendo perciò un rilevante *marker* diagnostico per la prognosi; infatti, diversi segnali di morte cellulare come l'attivazione della proteina p53, lo stress ossidativo e la perdita di fattori di crescita possono indurre la parziale permeabilizzazione della membrana lisosomiale e il rilascio delle catepsine nel citosol. A seconda del grado della permeabilizzazione della membrana lisosomiale e della quantità di catepsine attive rilasciate nel citoplasma, la

morfologia di morte, che può essere innescata varia dalla classica apoptosi alla necrosi. Le catepsine attivano il *pathway* apoptotico classico clivando il fattore pro-apoptotico Bcl-2 (membro della famiglia Bid). L'espressione di inibitori delle catepsine potrebbe aumentare la vitalità delle cellule tumorali potenziando l'attività lisosomiale.

I cambiamenti che si verificano nei lisosomi durante il processo di trasformazione cellulare e il coinvolgimento degli enzimi idrolitici nei meccanismi di morte, suggeriscono che il *pathway* di morte lisosomiale possa contribuire significativamente alla sensibilità delle cellule tumorali nei confronti della morte cellulare programmata.

Recenti studi dimostrano che sia la classica via apoptotica sia il *pathway* di morte cellulare lisosomiale, cioè innescato dalle catepsine, devono essere soppressi per l'effettivo sviluppo e progressione del cancro.

La stabilità dei lisosomi nelle cellule tumorali è regolata dall'attività dell'enzima fosfatidilinositolo-3-chinasi. Accanto alle sue molteplici funzioni, questo enzima la controlla il processo di formazione, le dimensioni e l'attività dei lisosomi e l'aumento della sua attività, caratteristico delle cellule tumorali può contribuire ad un aumento della stabilità dei lisosomi. Le cellule tumorali possono, inoltre, proteggersi dalla degradazione lisosomiale traslocando sulla membrana di questi organuli la *heat shock protein 70*. Le cellule che presentano la *heat shock protein 70* sulla loro membrana lisosomiale, contengono lisosomi più larghi e molto più stabili, infatti la deplezione di questa proteina conduce alla morte lisosomiale programmata specifica delle cellule tumorali. I meccanismi metabolici implicati nella progressione tumorale, finora descritti, hanno quindi permesso di ipotizzare che farmaci che inibiscono: la fosfatidilinositolo-3-chinasi, la localizzazione lisosomiale della *heat shock protein 70* o l'attività di alcuni inibitori delle catepsine, sono probabili agenti che possono sensibilizzare le cellule cancerose ai farmaci antitumorali facilitando la permeabilizzazione della membrana lisosomiale e dunque la morte delle cellule neoplastiche^[47].

I lisosomi possono essere pertanto considerati come organuli target per la terapia contro il cancro.

1.7 Disordini lisosomiali

I lisosomi sono stati a lungo considerati soltanto compartimenti degradativi. Oggi questo punto di vista risulta semplicistico, perché un numero sempre più grande di ricerche mostra che questi organuli sono coinvolti in diverse funzioni specializzate.

Le idrolasi lisosomiali, nella maggioranza dei casi proteasi, sono implicate in molte funzioni cellulari come il rimodellamento della struttura dell'osso, il processing e presentazione degli antigeni, il processing dei pro-ormoni e altre ancora. Accanto a questo si sono accumulate prove dell'esistenza di un *pathway* lisosomiale nell'apoptosi, anche se non ne sono stati ancora descritti i meccanismi precisi. Alcune di queste funzioni lisosomiali richiedono il rilascio delle idrolasi in modo costitutivo o regolato in risposta ad un incremento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} .

I ruoli giocati da questi organuli sono ancora poco definiti, in larga parte per la mancanza di conoscenze sulla struttura e sulla funzione delle proteine integrali di membrana e sull'identità di proteine citosoliche che potrebbero formare complessi macromolecolari permanenti o transienti per facilitare le interazioni membrana-membrana e gli eventi di fusione.

Il ruolo essenziale in diversi processi cellulari, può essere messo chiaramente in evidenza dall'esistenza di molteplici malattie a base lisosomiale. Difetti nel funzionamento di questi organuli digestivi possono avere conseguenze devastanti, come dimostrato dal rapido aumento del numero delle patologie che sono dovute a difetti primari o secondari nel sistema lisosomiale.

Eventuali anomalie di conformazione o di funzione dei lisosomi determinano disturbi congeniti del metabolismo trasmessi per via ereditaria e compresi tra le malattie metaboliche. Tuttavia aberrazioni lisosomiali sono state riscontrate non solo nei classici "disordini lisosomiali" ^[26], *lysosomal storage diseases* (letteralmente malattie da accumulo lisosomiale) ma anche in patologie differenti tra loro, come disordini muscolari e neurologici ^[48], numerosi tipi di cancro ^[49], malattie da immuno-deficienza e disfunzioni nella pigmentazione ^[50].

Le malattie da accumulo lisosomiale sono gravi disordini genetici che riguardano il catabolismo di tutte le classi di macromolecole, ad eccezione degli acidi nucleici, ed in particolare di glicolipidi, carboidrati complessi e proteine i cui intermedi vengono accumulati all'interno dell'organello alterando l'omeostasi cellulare ^[51]. Il

difetto causa un accumulo di metaboliti all'interno dei lisosomi (fenomeno noto come "tesaurismosi") che, essendo incapaci di utilizzarli o eliminarli, si rigonfiano e provocano gravi danni alla cellula e all'organismo, l'organulo risulta essere letteralmente soffocato dai propri prodotti di scarto ^[51].

Il difetto primario di queste patologie dipende dalla perdita di funzionalità parziale o totale di una proteina lisosomiale. Questa proteina può essere un'idrolasi acida, un trasportatore o una proteina integrale di membrana, in qualsiasi caso il substrato si accumulerà nell'organulo acido poichè o il suo trasporto o il suo catabolismo è alterato ^[52]. Accanto al deficit enzimatico o ad un anomalo funzionamento del trasportatore, anche anomalie a livello del traffico vescicolare possono condurre a disordini da accumulo lisosomiale ^[16]. Geneticamente sono stati descritti numerosi difetti responsabili di queste malattie; sono state descritte tutti i tipi di alterazioni molecolari, spaziano da mutazioni puntiformi a grandi delezioni, che causano l'assenza, l'instabilità, un anomalo processamento o una funzione alterata del prodotto genico. La maggior parte di questi geni sono ubiquitariamente espressi; esistono tuttavia delle eccezioni, quali la catepsina K, una proteasi maggiormente espressa negli osteoclasti ^[53].

Oggi si conoscono circa 50 malattie lisosomiali ^[52] che si presentano in modo eterogeneo sia da un punto di vista clinico che biochimico e possono essere classificate secondo due modalità complementari ma distinte. La prima classificazione si basa sulla natura biochimica del materiale accumulato, mentre la seconda le classifica in base al meccanismo che causa il disordine. Tra i diversi gruppi, quasi tutti mostrano variabilità clinica, in particolar modo rispetto all'età di insorgenza ed alla progressione dei sintomi. La nomenclatura di queste patologie è complessa poiché l'identità di molte di esse è conosciuta clinicamente prima ancora di definire la loro relazione con i lisosomi e con lo specifico difetto genico.

Classicamente possono essere distinte in (Tab.III) ^[54, 55]:

- Mucopolisaccaridosi: difetto di degradazione delle lunghe catene eteropolisaccaridiche dei mucopolisaccaridi o dei glicosoamminoglicani. Queste patologie mostrano caratteristiche cliniche differenti: coinvolgimenti multiviscerali, organomegalia, malformazioni ossee multiple ed anomalie facciali. Possono essere compromesse le funzioni visive, uditive, cardiovascolari e deambulatorie. Il ritardo mentale è presente nella sindrome di Hurler (MPS I), nella sindrome di Sanfilippo (MPS III) e nella forma precoce della sindrome di Hunter (MPS II), ma assente in

altre mucopolisaccaridosi. Specifiche lesioni ossee si riscontrano nella sindrome di Morquio (MPS IV).

- Sfingolipidosi (o glicolipidosi): difetto di degradazione delle sfingomieline, dei cerebrosidi e dei gangliosidi (componenti importanti delle membrane delle cellule nervose). Questo gruppo di disordini neurologici è caratterizzato da ritardo psicomotorio.
- Oligosaccaridosi: difetto nella degradazione degli oligosaccaridi delle glicoproteine e dei glicolipidi. Presentano caratteristiche cliniche simili alle mucopolisaccaridosi.
- Glicogenosi di tipo II: patologia caratterizzata da una deficienza dell'enzima maltasi acida, responsabile dell'accumulo intralisosomiale in molti tessuti. La forma infantile, chiamata anche sindrome di Pompe, è una malattia letale, caratterizzata da cardiomegalia, debolezza muscolare progressiva e marcata ipotonia. Nella forma adulta la compromissione muscolare ha un andamento progressivo più lento con manifestazioni ristrette solo ai muscoli scheletrici.
- Malattie di mancato trasporto degli enzimi lisosomiali: alcune idrolasi non arrivano ai lisosomi e, quindi, non assolvono alla loro funzione;
- Malattie di trasporto lisosomiale alterato: le sostanze non vengono trasportate correttamente nei lisosomi per essere degradate o non fuoriescono accumulandosi all'interno.

Tab. III
Classificazione delle malattie lisosomiale.

MALATTIA	DEFICIT ENZIMATICO
Sfingolipidosi	
Gangliosidosi GM1: malattia di Landing	<i>B-galattosidasi</i>
Gangliosidosi GM2: variante B o B1: malattia di Tay-Sach variante O: malattia di Sandhoff	<i>Esosamidasi A</i> <i>Esosamidasi A e B</i>
Leucodistrofia metacromatica	<i>Arilsulfatasi A</i>
Malattia di Krabbe	<i>Galactosilceramidasi</i>
Malattia di Fabry	<i>α galattosidasi A</i>
Malattia di Gaucher	<i>β glucosidasi</i>
Malattia di Niemann-Pick A o B	<i>Sfingomielinasi</i>
Malattia di Farber	<i>Ceramidasi</i>
Malattia di Wolman	<i>Lipasi acida</i>
Malattia di Austin	<i>Deficit multiplo delle sulfatasi</i>
Mucopolisaccaridosi	
Tipo I: malattia di Hurler (IH)	<i>α-L-iduronidasi</i>
Malattia di Scheie (IS)	<i>α-L-iduronidasi</i>
Tipo II: malattia di Hunter	<i>Sulfatasi iduronato-2-solfato</i>
Tipo III: malattia di Sanfilippo:	<i>Eparan-sulfamidasi</i>
tipo III A	<i>N-acetil-α-glucosamidasi</i>
tipo III B	<i>Acetil-CoA</i>
tipo III C	<i>α-glucosaminide-N-acetil transferasi</i>
tipo III D	<i>N-acetilglucosamina-6-solfato sulfatasi</i>
Tipo IV: malattia di Morquio	
tipo IV A	<i>N-acetilgalattosammina-6-solfato sulfatasi</i>
tipo IV B	<i>β galattosidasi</i>
Tipo VI: malattia di Maroteaux-Lamy	<i>Arilsulfatasi B</i>
Tipo VII: malattia di Sly	<i>β glucuronidasi</i>
Tipo IX	<i>Ialuronidasi (HYAL1)</i>
Picnodisostosi	<i>Catepsina K</i>
Glicoproteinosi	
Aspartilglucosamminuria	<i>N-acetil β-glucosaminidasi</i>
Fucosidosi	<i>α fucosidasi</i>
α-mannosidosi	<i>α mannosidasi</i>
B-mannosidosi	<i>β mannosidasi</i>
Malattia di Schindler e Kanzaki	<i>α-N-acetilgalattosaminidasi o galattosidasi B</i>

Mucopolipidosi	
Tipo I: sialidosi	<i>α neuraminidasi</i>
Tipo I B: galattosialidosi	<i>Catepsina A</i>
Tipo II e III: mucopolipidosi	<i>N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasi</i>
Glicogenosi di tipo II	
Forme infantile (malattia di Pompe) e adulta	<i>α-1,4 glucosidasi o maltasi acida</i>
Lipofuscinosi ceroidi	
Locus CLN1: forma infantile (Santavuori-Haltia)	<i>Tioesterasi palmitoil-proteina</i>
Locus CLN2: forma infantile tardiva (Jansky-Bielschowsky)	<i>Tripeptidil peptidasi I</i>
Locus CLN3: giovanile (Batten)	<i>Proteina CLN3</i>
Locus CLN4: adulta (Kufs)	?
Locus CLN5: forma infantile tardiva (variante finlandese)	<i>Proteina CLN5</i>
Locus CLN6: forma infantile tardiva (variante)	?
Locus CLN7: forma infantile tardiva (variante)	?
Locus CLN8: epilessia nordica	<i>Proteina transmembrana</i>
Altre	
Cistinosi	<i>Cistinosina (carrier della cistina)</i>
Malattia da accumulo d acido sialico (forma infantile, Salla disease)	<i>Carrier dell'acido sialico</i>
Aciduria metilmalonica	<i>Carrier della vitamina B12 (CblF)</i>
Malattia di Niemann Pick di tipo C : NPC1 e NPC2	<i>Proteina NPC1, NPC2 sconosciuta</i>
Mucopolipidosi di tipo IV	?

Queste patologie presentano delle caratteristiche in comune e altre che le rendono uniche. Tutte sono abbastanza rare nella popolazione: si stima, infatti, che nel loro insieme colpiscano circa 1 su 8000 nati anche se in certi gruppi etnici alcune di esse sono molto più frequenti ^[56]. La maggior parte sono gravi, colpiscono i bambini fin dai primi mesi di vita e gli organi interessati, in funzione del tipo di difetto enzimatico, sono milza, fegato, reni, ossa, muscoli e talvolta anche il cervello. Le malattie lisosomiali sono caratterizzate da un decorso progressivo che porta al deterioramento delle funzioni vitali, e purtroppo molte di esse hanno esito letale ^[50].

Si trasmettono principalmente per via genetica con modalità autosomica recessiva, fanno eccezione la sindrome di Fabry e quella di Hunter la cui trasmissione recessiva è legata al cromosoma X, mentre la malattia di Danon, rarissima, è l'unico caso di disordine *X-linked* dominante ^[50].

Di solito i disturbi lisosomiali non si possono prevenire. Attualmente l'unica alternativa possibile, ma difficilmente praticabile, è l'identificazione di genitori portatori sani ed effettuare l'interruzione della gravidanza se dopo la diagnosi prenatale il feto risulta affetto. La difficoltà consiste nel fatto, trattandosi quasi sempre di malattie autosomiche recessive, che i genitori non siano a conoscenza di essere portatori sani e lo scoprono solo dopo la nascita del figlio malato. Inoltre, bisogna tener presente che il difetto può essere diagnosticato nel feto solo sapendo quale alterazione ricercare poiché è impossibile effettuare una quantità di test paragonabile all'elevato numero di malattie genetiche.

La prima malattia da accumulo compresa è stata la **glicogenosi di tipo II**, in cui i bambini piccoli accumulano quantità eccessive di glicogeno nel fegato, nel cuore e nei muscoli scheletrici e muoiono in giovane età. Il difetto è dovuto ad una carenza dell'enzima lisosomiale α -1,4-glicosidasi, che nelle cellule normali catalizza l'idrolisi del glicogeno. Il metabolismo del glicogeno avviene prevalentemente nel citosol, ma una piccola quantità di glicogeno può entrare nel lisosoma per autofagia dove si accumula fino a livelli dannosi se non viene degradato a glucosio. Due delle malattie a base lisosomiale meglio conosciute sono la **sindrome di Hurler** e la **sindrome di Hunter**. Entrambe derivano da difetti della degradazione dei glicosamminoglicani, che sono i principali componenti glucidici dei proteoglicani presenti nella matrice extracellulare. Il ritardo mentale è una caratteristica comune delle malattie da accumulo lisosomiale a causa del metabolismo danneggiato dei glicolipidi, composti rilevanti del tessuto nervoso e delle guaine degli assoni della cellula nervosa. Un esempio di patologia lisosomiale particolarmente noto è la malattia di **Tay-Sachs**, una condizione ereditata come carattere recessivo, in cui i bambini affetti presentano, dopo circa sei mesi dalla nascita, un deterioramento mentale rapido, seguito da paralisi e morte entro i tre anni. La malattia deriva dall'accumulo nel tessuto nervoso di un particolare glicolipide, chiamato ganglioside. I lisosomi dei bambini con tale patologia sono colmi di frammenti di membrana contenenti gangliosidi non digeriti, per via dell'assenza dell'enzima β -N-acetilesosamminidasi.

La malattia a base lisosomiale più diffusa è la **malattia di Gaucher** (*Gaucher disease*) che fu descritta, per la prima volta, nel 1882 da P.Gaucher. Il difetto primario all'origine della patologia consiste nella ridotta attività dell'enzima β -glucosilceramidasi, che idrolizza il glucosilceramide a ceramide e glucosio. Come conseguenza si ha l'accumulo di glucosilceramide, particolarmente nei macrofagi del fegato, della milza e del midollo spinale. Essa si presenta con manifestazioni patologiche molto eterogenee, i sintomi possono comparire a qualsiasi età e progredire con velocità variabile, sebbene il difetto genetico sia presente fin dal concepimento.

Nel gruppo delle malattie da accumulo lisosomiale, i disordini dovuti ad anomalie nei trasportatori occupano un ruolo speciale poiché essi rappresentano rari esempi di errori congeniti del metabolismo causati da un difetto di un trasportatore intracellulare di membrana. In pochi casi le sostanze che si accumulano non sono macromolecole non degradate, ma sono prodotti di degradazione idrolitica che dovrebbero lasciare il compartimento lisosomiale per essere riciclate in altre vie metaboliche. In particolare due errori congeniti del metabolismo (disordini da accumulo di cistinosina ed acido sialico) hanno contribuito alla comprensione del funzionamento del trasporto attraverso la membrana lisosomiale.

Altri ipotetici disordini del trasporto lisosomiale consistono nel difetto della biosintesi della cobalamina, conosciuto come mutazione F della cobalamina, la malattia di Niemann-Pick di tipo C e probabilmente la lipofuscinosi ceroide di tipo 3.

Nel difetto F della cobalamina viene danneggiato il rilascio di cobalamina dal lisosoma dopo l'internalizzazione del complesso con la trans-cobalamina. Ad ogni modo l'evidenza di un trasporto di membrana difettoso è ancora da dimostrare.

Nella malattia di Niemann-Pick di tipo C il riciclo del colesterolo dopo endocitosi mediata da recettore è difettoso, con conseguente accumulo di colesterolo. Tuttavia il gene difettoso non sembra codificare per un trasportatore di membrana.

Nella lipofuscinosi ceroide di tipo 3, nota come *Batten disease* ^[56], il gene mutato codifica per una proteina di membrana con caratteristiche strutturali tipiche di un trasportatore di membrana; comunque l'anormalità biochimica in questa grave patologia neurodegenerativa è ancora oscura.

Studi biochimici e molecolari dimostrano che nelle malattie da accumulo di cistinosina e acido sialico il difetto primario riguarda la traslocazione del soluto attraverso la membrana.

La **cistinosi** è una patologia monogenica autosomica recessiva a bassa incidenza (1 individuo su 200000); è caratterizzata da un accumulo intralisosomiale di cistina, legato a un trasporto difettivo della stessa al di fuori dei lisosomi. Esiste un ampio spettro di fenotipi patologici, ma generalmente tutti i fenotipi si raggruppano in tre principali forme cliniche, distinte in funzione dell'età di comparsa e della gravità dei sintomi ^[57]. La forma più grave è la cistinosi infantile; essa compare fra i sei e i dodici mesi d'età e si manifesta con una tubulopatia renale a livello prossimale, conosciuta come Sindrome di Fanconi. E' caratterizzata dalla perdita di elettroliti, di fluidi e altri componenti vitali con le urine. Si manifesta con rachitismo, ritardo nell'accrescimento e, in assenza di cure specifiche, evolve fino a provocare un blocco renale acuto (ESRD) intorno all'età di dieci anni. Altre evidenze cliniche sono rappresentate da notevole cecità retinica, ipotiroidismo, diabete mellito, difficoltà a deglutire, deterioramento neurologico, epatico, gastrointestinale e muscolare, eventualmente correlato all'accumulo di cristalli di cistina nei diversi tessuti ^[57]. La cistinosi giovanile è generalmente contraddistinta da una forma di fotofobia che compare in età adolescenziale e da un indebolimento renale di tipo glomerulare, ma non necessariamente sotto forma di Sindrome di Fanconi. Si verifica un deposito di cristalli principalmente a livello corneale. L'ultima forma è la cistinosi oculare non nefropatica, caratterizzata esclusivamente da una lieve fotofobia che compare in età adulta, senza disturbi renali. Sono state poi recentemente identificate le cosiddette forme atipiche, nelle quali le evidenze cliniche hanno gravità compresa fra la forma infantile e quella giovanile.

Salla disease e la **malattia da accumulo di acido ialico infantile (ISSD)** sono malattie autosomiche recessive con caratteristiche comuni ma differente gravità. Salla *disease* è caratterizzata da un ritardo nello sviluppo motorio e cognitivo, evidenziabile già a 6-12 mesi di età, tuttavia molti individui affetti riescono a raggiungere l'età adulta. Il quadro patologico è caratterizzato da nistagmo, ipotonia ed atassia. Il progredire della malattia comporta severo ritardo mentale, demenza e difficoltà di deambulazione.

La ISSD mostra anormalità patologiche e biochimiche simili a quelle riscontrate per Salla *disease*. Questa patologia ha una precoce insorgenza e un più rapido decorso accompagnato da ritardo psicomotorio, visceromegalia con cardiopatia, nefrosi e malformazioni ossee multiple. Il quadro clinico può essere aggravato da idropsia intrauterina, ascite neonatale e dismorfismi. La morfologia cellulare in entrambe le patologie è caratterizzata da lisosomi rigonfiati e ricchi in acido ialico, derivanti dalle

catene oligosaccaridiche delle glicoproteine e dei glicolipidi sialilati, degradate all'interno dei lisosomi. Studi genetici condotti su pazienti affetti da Salla disease hanno condotto alla determinazione del gene che codifica per una proteina designata come sialina contenente la mutazione. La sialina è un membro della famiglia di proteine ACS: *anion/cation symporter*, e presenta un alto grado di similarità con il trasportatore vescicolare del glutammato (VGUT1-3). Sedici mutazioni della sialina sono associate con il fenotipo della malattia.

La diagnosi si basa sulla dimostrazione della anormale escrezione di acido sialico nelle urine, dell'accumulo nei fibroblasti in coltura e nelle evidenze microscopiche del proliferamento e rigonfiamento dei lisosomi.

Nonostante i grandi progressi registrati negli ultimi anni non esiste ancora un trattamento efficace nel guarire definitivamente i disturbi metabolici. Per molti di essi esiste viceversa l'opportunità di praticare cure in grado di prevenire, totalmente o parzialmente, i danni provocati dalla malattia ^[54]. In passato le terapie più utilizzate erano basate su diete appropriate, sulla somministrazione di farmaci, sul trapianto di organi.

Attualmente i risultati della ricerca biologica più avanzata hanno offerto la possibilità di disporre di terapie, come l'ERT (*enzyme replacement therapy*, ossia trattamento enzimatico sostitutivo), che non solo bloccano il decorso di alcune malattie lisosomiali, ma ne fanno regredire i sintomi. L'ERT consiste nella somministrazione periodica dell'enzima deficitario, allo scopo di evitare o ridurre l'accumulo del substrato responsabile del quadro clinico. Anche se oggi, grazie alla biologia molecolare, è possibile produrre grandi quantitativi di enzima ricombinante, il limite maggiore di questa terapia resta la difficoltà di far raggiungere all'enzima specificatamente l'organo bersaglio ed in concentrazioni sufficientemente elevate ^[55].

Un altro approccio intrapreso più di recente è l'SBS (*substrate balance therapy*, ossia terapia di bilancio del substrato), in cui si cerca di prevenire l'accumulo del prodotto tossico riducendone la velocità di sintesi ^[58], mediante la somministrazione di specifici inibitori.

Infine, negli ultimi anni si sta studiando la possibilità di curare le malattie lisosomiali tramite *gene therapy*, cioè reintroducendo il gene dell'enzima difettoso nelle cellule degli individui affetti attraverso l'uso di vettori virali ^[59]. Le cellule geneticamente corrette potrebbero quindi secernere l'enzima nei tessuti e nel sangue bilanciando il deficit primario. Anche se questo approccio sembra molto promettente, vi

sono ancora vari problemi da risolvere prima che possa trovare una pratica applicazione clinica; in particolare, bisogna ulteriormente controllare l'innocuità dei vettori virali, migliorare l'*uptake* e il *targeting* del virus geneticamente manipolato e poi verificare che l'enzima prodotto dalle cellule trattate sia sufficiente a bloccare il progredire della malattia e a farne regredire i sintomi. Il prerequisito per iniziare questo tipo di terapie è un'inequivocabile diagnosi precoce basata sul dosaggio dell'enzima coinvolto in ciascuna malattia.

Mentre la caratterizzazione delle patologie lisosomiali che coinvolgono gli enzimi luminali è molto avanzata, solo alcuni dei difetti sono stati associati alle proteine di membrana. Lo studio dei lisosomi appare pertanto essenziale per fare luce su molti settori della medicina e per comprendere il meccanismo d'azione di farmaci ed ormoni.

La ricerca è comunque rallentata e resa complessa dalla rarità e dalla eterogeneità con cui queste malattie si manifestano nella popolazione. Analisi approfondite sui lisosomi si spera possano portare ad eliminare o per lo meno ad attenuare i danni dovuti ad un loro eventuale malfunzionamento.

Questo lavoro nasce dal crescente desiderio di contribuire, attraverso lo studio dell'ultimo membro finora conosciuto della famiglia PAT, PAT4, ad una maggiore comprensione del ruolo biologico giocato dai lisosomi nelle cellule umane. Chiarire nuovi dettagli molecolari potrebbe, inoltre, portare a terapie per curare eventuali malattie legate a questa proteina.

Per caratterizzare strutturalmente e funzionalmente una proteina è indispensabile che sia disponibile in opportune quantità. Molte proteine sono naturalmente poco abbondanti nelle cellule e questo preclude l'uso di alcuni metodi di investigazione. Per anni, numerosi sforzi sono stati compiuti per superare questo problema portando, infine, all'uso di organismi eterologhi.

Escherichia coli (Fig. 11) rappresenta un sistema di espressione indubbiamente conveniente essendo facile da riprodurre ed economico da crescere ma esistono degli svantaggi legati alla sua natura procariotica che ne limitano l'utilizzo principalmente agli studi strutturali. La presenza nel genoma di pochi nucleotidi GC o l'esistenza di codoni differenti da quelli di mammifero può determinare una riduzione nell'espressione o la sintesi di forme proteiche tronche. Inoltre, per la mancanza di chaperonine appropriate si può verificare l'accumulo di proteine *misfolded* nel citoplasma con formazione dei "corpi di inclusione". I batteri, infine, non sono capaci di

effettuare modificazioni post-traduzionali (glicosilazione, acilazione degli acidi grassi, fosforilazione) considerate di critica rilevanza per la funzione di alcune proteine ^[60].

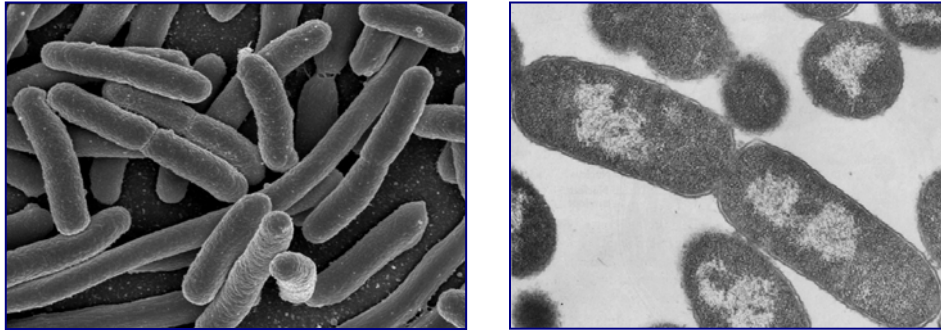


Fig. 11 Cellule di *Escherichia coli* al microscopio elettronico.

Le cellule di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*) (Fig. 12) offrono, al contrario, un contesto cellulare adatto per un processamento proteico simile a quello eucariotico (sebbene l’N-glicosilazione sembri essere piuttosto inefficiente), tuttavia la parete cellulare rende difficoltoso il recupero delle proteine non secrete ^[60].

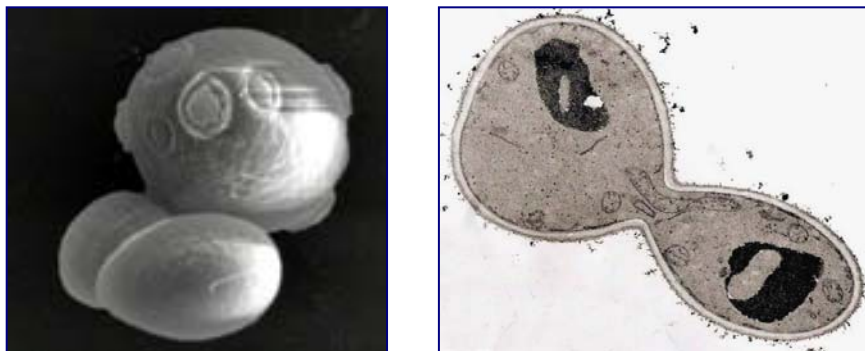


Fig. 12 Cellule di *Saccharomyces cerevisiae* al microscopio elettronico.

Oggi l’espressione delle proteine nelle cellule di mammifero rappresenta l’alternativa più vicina al loro ambiente nativo. In questo contesto, il *Baculovirus Expression Vector System* offre una migliore soluzione infatti a partire dal 1985, quando è stata prodotta mediante baculovirus ricombinante l’interleuchina-2, il suo utilizzo è aumentato notevolmente fino a diventare oggi uno dei sistemi più accurati e vantaggiosi per l’overespressione di proteine citosoliche, nucleari, mitocondriali, di membrana e di secrezione ^[61].

2. “BACULOVIRUS EXPRESSION VECTOR SYSTEM”

2.1 *Baculoviridae*

Il *Baculovirus Expression Vector System* è un sistema di espressione eterologa che utilizza il baculovirus ricombinante e le cellule di insetto in coltura.

I baculovirus (*Baculoviridae*) sono diffusi in tutti gli ambienti, sono particolarmente idonei a resistere fuori dai loro ospiti ed infettano solo specie del phylum *Arthropoda*. Il nome “baculo” deriva dal latino *baculum* (bacchetta), che richiama la forma bastoncellare delle particelle virali (Fig. 13).

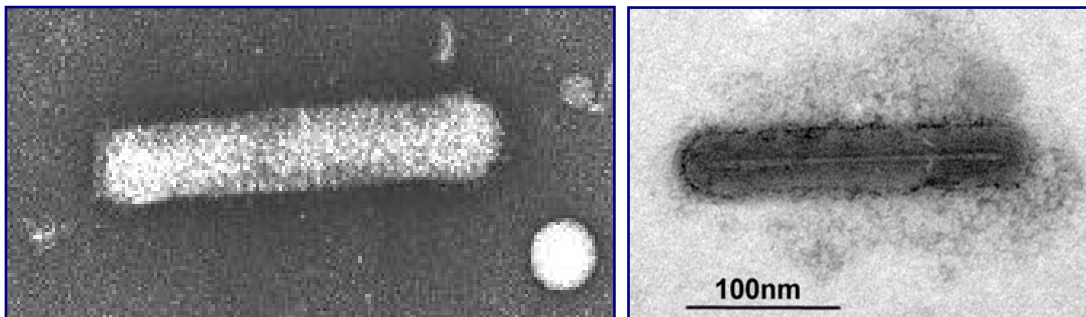


Fig. 13 *Baculovirus* al microscopio elettronico a trasmissione.

I *baculoviridae* rappresentano una cospicua famiglia di virus, suddivisibili in due gruppi o generi, distinti sia per morfologia che per eziopatogenesi:

- NPV o virus della nucleopoliedrosi, i quali hanno una struttura cristallina, producono particelle virali di grandi dimensioni, a forma di poliedro e contengono numerose copie del genoma virale o virioni;
- GV o virus della granulosa, che sono invece sferoidali e di aspetto granulare, infestano solo le larve di Lepidotteri, sono molto più piccoli dei precedenti ed hanno una sola copia virionica per particella.

Entrambi i gruppi possiedono un genoma formato da una doppia elica circolare di DNA superavvolta su se stessa mediante minute proteine ricche di aminoacidi positivi, con una lunghezza stimata pari a 90 - 180 Kb al cui interno del suo genoma, vi sono circa 120-160 sequenze ORF (*Open reading frame*).

Durante il ciclo infettivo si possono osservare due forme di baculovirus: la prima è costituita da singoli virioni liberati da una cellula ospite infetta (*budded virus*), la seconda è rappresentata da un certo numero di virioni intrappolati (*occluded virus*) in una matrice proteica. Le forme occluse, prodotte nelle ultime fasi dell'infezione virale, possono essere chiaramente osservate al microscopio (Fig. 14).

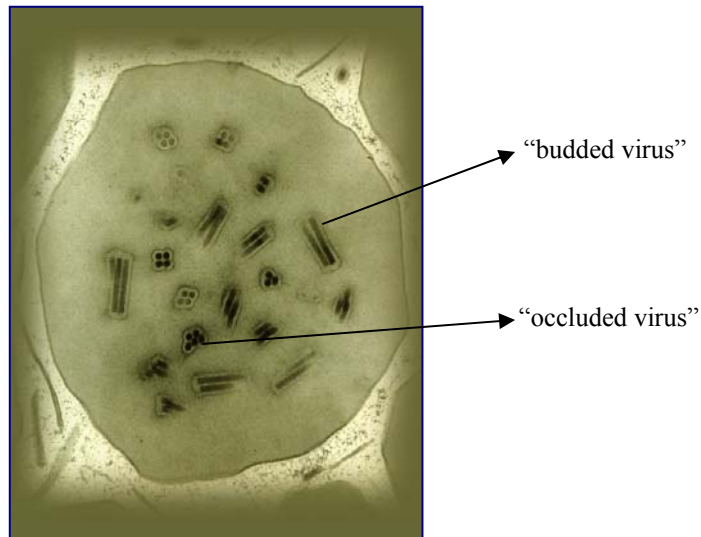


Fig. 14 “*Budded virus*” ed *occluded virus* visibili al microscopio elettronico.

Il baculovirus nella forma “occlusa” (ODV: *Occlusion derived virus*) è protetto da un capsido esterno proteico formato dalle due più note proteine dei *Baculoviridae*, ovvero la poliedrina negli NPV e la granulina nei GV, costituite da circa 245 residui aminoacidici.

I baculovirus hanno anche una seconda morfologia, quella di *budded virus* (BV), che si trova all’interno degli insetti infetti e nelle colture tissutali.

Il baculovirus più studiato è *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Questo virus è stato isolato dall’*alfalfa looper* (un lepidoptero) e contiene un genoma costituito da 134 kbp con 154 ORF.

2.2 Ciclo vitale del virus

Il ciclo infettivo dei baculovirus prevede l'entrata in scena delle due differenti forme del virus e la replicazione consta di tre differenti fasi. Solitamente, l'infezione iniziale si verifica quando un insetto ospite sensibile si ciba di piante che sono state contaminate con la forma incapsulata del virus. I corpi poliedrici proteggono, infatti, i virioni dal calore, da un pH acido e da molte sostanze chimiche; in questa forma i virus possono rimanere integri e vitali per anni nel suolo. La forma occlusa, pertanto, è quella che garantisce al virus di essere conservato anche fuori dal corpo dell'ospite (quindi nell'ambiente esterno) e di infettare il canale alimentare di questo tramite la sua ingestione. I corpi inclusi, una volta ingeriti, si disgregano quando vengono a contatto con l'ambiente alcalino dell'intestino dell'ospite, liberando così i virioni (o *budded virus*) contenuti al suo interno, i quali hanno la funzione di invadere il corpo dell'ospite, moltiplicarsi e portarlo al disfacimento.

I virioni possono, allora, fondersi alla membrana cellulare dell'epitelio colonnare dell'intestino dell'ospite ed essere portati all'interno delle cellule sotto forma di endosomi. Alcune particelle virali rimangono in questa sede, ma le altre diffondono in tutto l'organismo.

I nucleocapsidi, che contengono il DNA virale, escono dagli endosomi e sono trasportati verso il nucleo delle cellule infette. Questo *step* è possibile perché mediato dai filamenti di actina. Nel nucleo hanno luogo la trascrizione e la replicazione virale e nuove particelle di *budded virus* vengono rilasciate dal versante basolaterale per permettere la diffusione sistemica dell'infezione.

L'infezione del baculovirus può essere quindi distinta in tre fasi (Fig.19):

- Fase precoce (0 – 6 h dopo l'infezione); Il baculovirus lega la membrana della cellula ospite, penetra e va incontro a disassemblamento. Si assiste allo spegnimento dei geni endogeni, al blocco della sintesi proteica delle cellule dell'ospite e all'espressione dei geni virali precoci.
- Fase tardiva (6 – 24 h dopo l'infezione); Si replica il DNA virale e vengono assemblati i virioni. Si producono così i *budded virus*, che presentano un *envelope* costituito dalla membrana delle cellule dell'ospite e dalla proteina gp64, necessaria per l'ingresso in cellula mediante endocitosi. I BV diffondono nell'ospite.

- Fase finale (da 18-24 a 72 h dopo l'infezione); Stadio avanzato dell'infezione virale. Viene espresso il gene della poliedrina, per cui i virioni vengono occlusi in essa. Gli ODV così ottenuti determinano la lisi cellulare, il corpo dell'ospite viene liquefatto dalle proteasi virali e viene degradato lo scheletro di chitina. La progenie di virus occlusi è disseminata nell'ambiente circostante provocando la diffusione orizzontale dell'infezione.

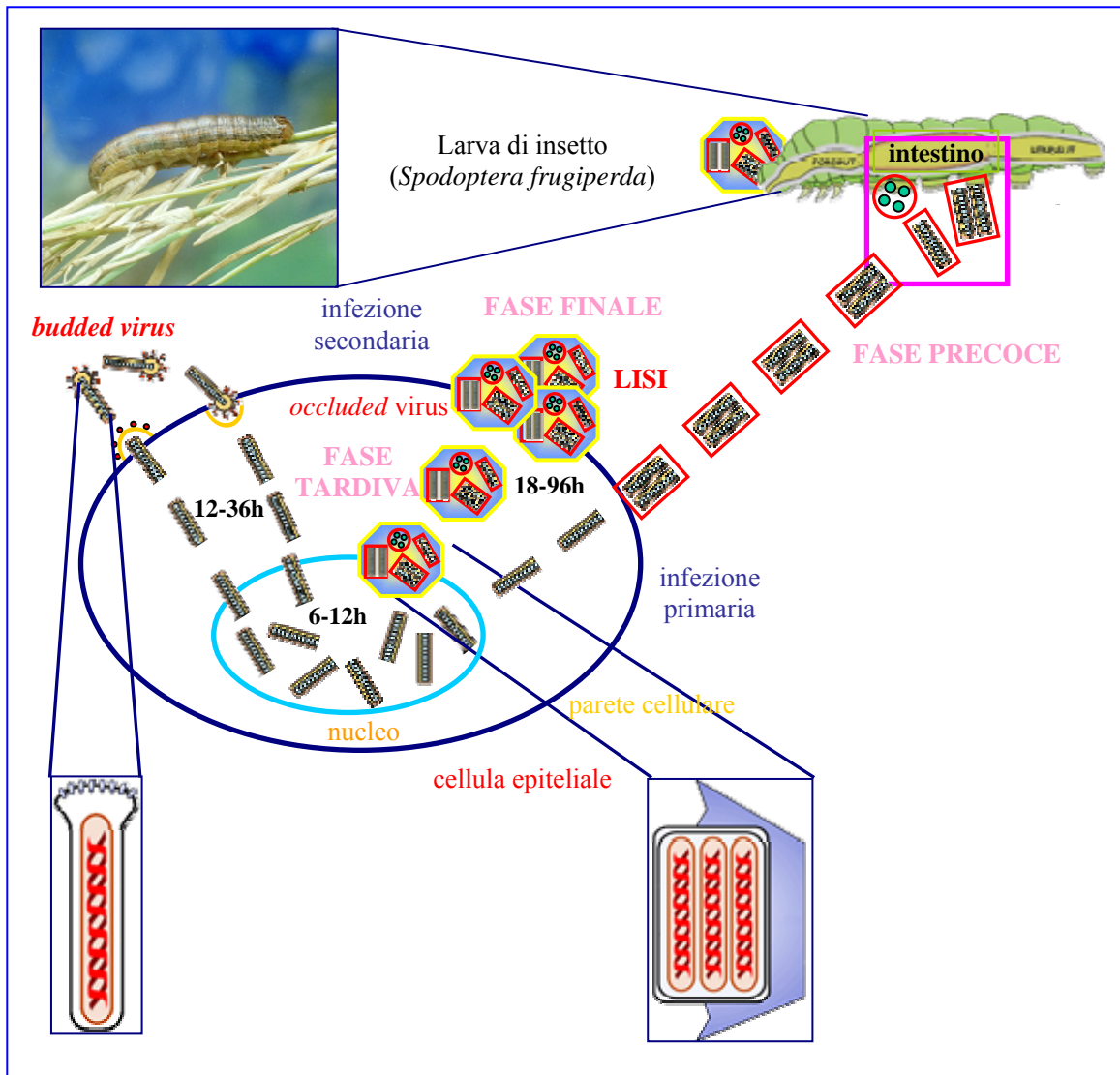


Fig.15 Ciclo replicativo del baculovirus all'interno dell'ospite e diffusione dell'infezione agli ospiti vicini.

2.3 Espressione eterologa di proteine ricombinanti in cellule di insetto

L'espressione eterologa di una proteina in cellule di insetto si basa sulla produzione del baculovirus ricombinante. Un virus di questo tipo si ottiene con l'introduzione del gene di interesse in una regione non essenziale del genoma virale mediante la ricombinazione omologa tra il DNA virale ed un vettore di trasfezione contenente il gene di interesse. Tale evento che si verifica nelle cellule di insetto co-trasfettate.

Il gene clonato è sotto il controllo trascrizionale di promotori virali singoli o multipli, il più usato è quello del gene della poliedrina^[62]. Il virus ricombinante così ottenuto viene usato per infettare colture di cellule d'insetto che produrranno perciò la proteina desiderata. il controllo.

Il prototipo di baculovirus adoperato è il virus della poliedrosi nucleare *Autographa californica* (AcNPV) e le tre linee cellulari di insetto più usate sono *Sf9* ed *Sf21*, cellule ottenute dalle ovaie delle larve di *Spodoptera frugiperda* e *High 5*, ricavate da cellule uovo di *Trichoplusia ni*. Tutte e tre possono crescere in colture monostrato o in sospensione, a temperatura ambiente (25-27°C) e non necessitano di CO₂^[60, 63]. Nel nucleo delle cellule infette questo virus forma i corpi d'occlusione o "poliedri", costituiti in gran parte dalla proteina poliedrina, la cui espressione è sotto il controllo del suo stesso promotore. In pratica, il frammento di cDNA viene inserito in un vettore di trasferimento contenente sequenze di ricombinazione. La cotrasfezione del DNA virale linearizzato e del vettore ricombinante nella linea cellulare di insetto porta ad un evento di doppia ricombinazione che sostituisce il gene della poliedrina con il cDNA clonato. In questo modo, nella fase finale del ciclo replicativo virale (24 ore dopo l'infezione), viene espresso, al posto della poliedrina, il gene di interesse^[60]. In tal caso si sfrutta il fatto che la poliedrina viene espressa ad alti livelli (più del 20% della sintesi proteica totale) e non è essenziale per la propagazione virale in colture cellulari. I virioni che gemmano dalla cellula infettata risultano del tutto normali e funzionali, ma non presentano la matrice esterna poliedrica. La proteina ricombinante, prodotta dal baculovirus dopo l'infezione, viene successivamente processata, modificata ed indirizzata verso l'appropriata localizzazione (Fig.16).

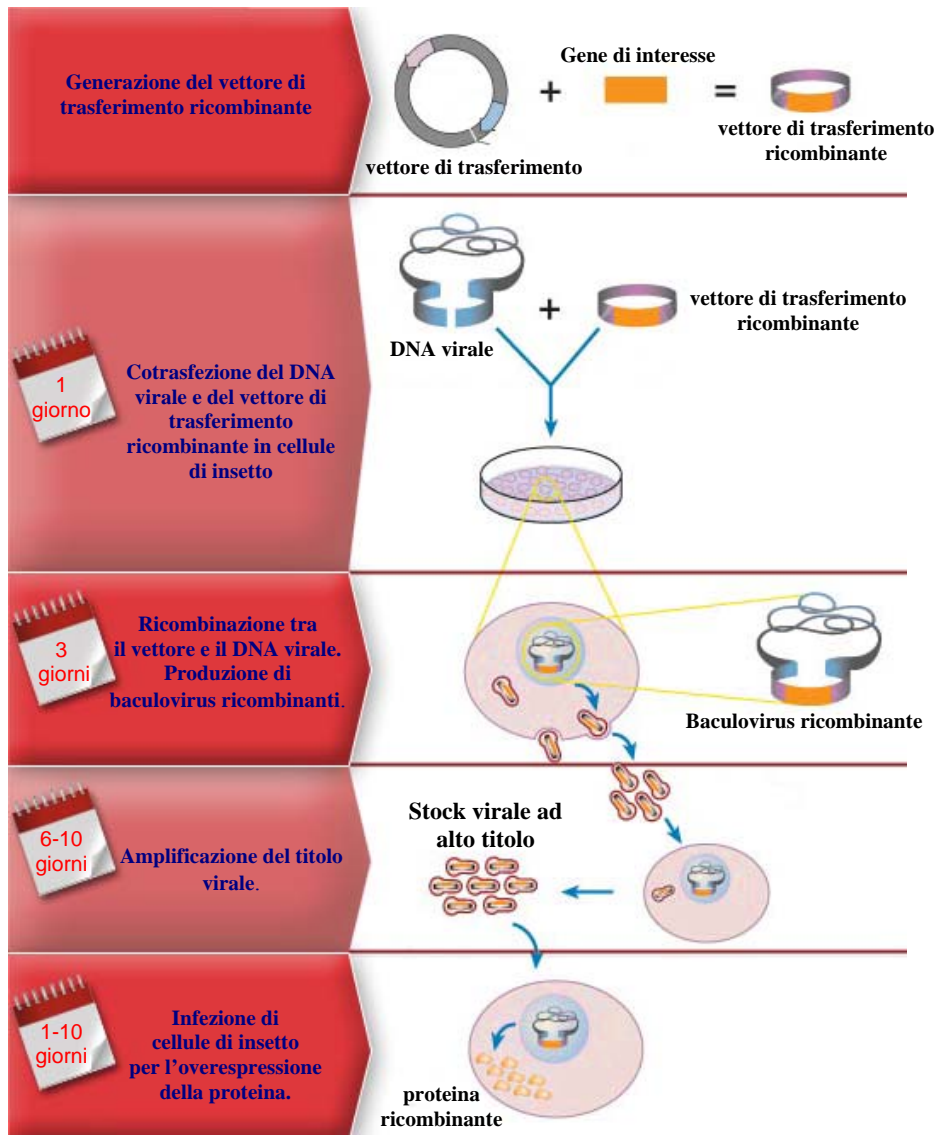


Fig. 16 Fasi di un esperimento di overespressione di una proteina ricombinante.

La caratteristica più importante del BEVS è che l'attività biologica e la somiglianza alle proteine native offrono enormi vantaggi rispetto ai sistemi convenzionali di espressione.

Perciò, le proteine prodotte con il sistema di espressione del vettore baculovirus sono capaci di esibire tutto il *range* di caratteristiche mostrate dalle proteine native nell'ambiente ospite naturale se confrontate, invece, alle proteine prodotte con sistemi batterici. Tra le numerose proprietà che vengono accuratamente riprodotte nel sistema di espressione virale si annoverano: la struttura terziaria, i ponti di solfuro, la formazione di complessi proteici omo- ed etero-multimerici, la fosforilazione, la

glicosolazione, il *targeting* e l'inserimento nelle membrane, e la localizzazione cellulare.

Attualmente con la tecnologia del baculovirus si possono produrre migliaia di proteine ricombinanti. In particolare questo sistema è stato utilizzato con successo nella produzione di:

- ✓ proteine di membrana, trans membrana, canali e recettori. Le grandi quantità di proteina prodotte hanno permesso di sviluppare con successo numerosi studi strutturali di interazione proteina-proteina e proteina-ligando. Alcuni esempi sono i recettori associati a proteine G e proteine G stesse (ad esempio Rab38^[64]), pompa Na⁺K⁺^[65], pompa del calcio^[66], recettore delle secretine^[67], recettore dei cannabinoidi CB2^[68], recettore dell'angiopoietina-1^[69], recettori β-adrenergici^[70], recettori degli androgeni^[71], recettori degli estrogeni^[72], recettore della lactoferrina^[73], etc.
- ✓ interleuchine ricombinanti (IL-2^[74], IL-3^[75], IL-4^[76], IL-6^[77], IL-18^[78], IL-21^[79]), interferone-α^[80], interferone-γ^[81] ed interferone-τ^[82].
- ✓ molecole enzimatiche e molecole di segnale intercellulare ed intracellulare. La forte attività catalitica delle proteine prodotte con il sistema baculovirus ha permesso di sviluppare con successo studi di caratterizzazione funzionale. Alcuni esempi sono gli inibitori delle serinproteinas^[83], la piruvatocarbossilasi umana^[84], la amminopeptidasi B^[85], la metiltransferasi G9a^[86], la fosfoproteina ribosomale umana P0^[87], la tirosina chinasi RET^[88], etc..

La produzione di proteine ricombinanti mediante l'utilizzo del baculovirus ricombinante presenta notevoli vantaggi :

Biosicurezza:

- I. i baculovirus sono generalmente non patogeni per mammiferi e piante. Presentano, infatti, un ristretto range infettivo spesso limitato a determinate specie di artropodi;
- II. le cellule di insetto non vengono trasformate da virus patogeni o infettivi e, quindi, possono essere mantenute con minime condizioni di sicurezza;
- III. non sono necessarie linee cellulari o virus *helper* in quanto il genoma del baculovirus contiene già tutte le informazioni necessarie per la sua replicazione.

Alti livelli di espressione del gene ricombinante: Il sistema di espressione del baculovirus offre la capacità di produrre quantità significative (1-500 mg/l di coltura) della proteina desiderata.

Accuratezza: le proteine ricombinanti subiscono all'interno delle cellule di insetto un *processing* post-traduzionale (proteolisi, N- e O- glicosilazione, acilazione, fosforilazione, ammidazione, prenilazione, carbossimetilazione, etc.) molto somigliante a quello dei mammiferi che garantisce la stessa localizzazione subcellulare e la stessa funzione della proteina nativa. Tuttavia, il processamento delle proteine di insetto non è del tutto equivalente a quello dei più alti eucarioti. Per ovviare a questo problema sono comunque in via di sviluppo linee cellulari di insetto ingegnerizzate affinché le modificazioni post-traduzionali avvengano in maniera del tutto simile a quelle dei mammiferi.

Capacità di espressione: la flessibilità del nucleocapside e le dimensioni del genoma virale permettono il clonaggio di più geni contemporaneamente o di inserti di grandi dimensioni.

Questo sistema di espressione, per le qualità peculiari finora descritte, ci è sembrato una possibile soluzione al problema dell'overespressione della proteina oggetto del nostro studio, hPAT4. L'utilizzo di altri organismi modello inferiori e di più comune diffusione, quali batteri e lieviti, non ha fornito infatti alcun risultato incoraggiante. Obiettivo di questo lavoro di tesi è stato, quindi, quello di ottenere la proteina ricombinante, hPAT4, in grosse quantità e con caratteristiche strutturali e funzionali del tutto simili alla proteina nativa in modo da poterne studiare, successivamente, la caratterizzazione cinetico-funzionale.

3.MATERIALI E METODI

3.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)^[89]

La *Reazione di Polimerizzazione a Catena* è una tecnica biomolecolare utilizzata per amplificare, in breve tempo e in modo specifico e selettivo, frammenti di DNA mediante due oligonucleotidi (*primer forward* e *reverse*) che delimitano la regione da amplificare e che fungono da inneschi per la *DNA polimerasi*. Questi *primer* vengono sintetizzati con opportuni siti di restrizione, necessari per il successivo clonaggio nel vettore, e sono orientati, entrambi, in direzione 5'→3'. La PCR si compone di tre fasi successive:

1. **denaturazione:** il DNA di partenza a doppia elica viene separato, al calore, nei due filamenti complementari, nel nostro caso la temperatura di denaturazione è stata di 94°C;
2. **appaiamento:** i *primer* oligonucleotidici, complementari alle due estremità 3' della sequenza da amplificare, ibridano con i due filamenti denaturati ad una temperatura che è orientativamente 5°C più bassa della T_m $[4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)]$ dei *primer* stessi. La loro sequenza è orientata in modo da poter guidare la polimerizzazione del DNA nel tratto compreso tra le due regioni a cui essi si legano. I *primer* vengono utilizzati in eccesso per favorire la loro associazione al filamento stampo, rispetto a quella tra i due filamenti complementari
3. **estensione:** i *primer*, in presenza dei quattro dNTP e di una *DNA polimerasi* termostabile, vengono estesi ognuno in direzione dell'altro, ma su due diverse catene complementari, portando così alla sintesi di due molecole di DNA a doppia elica, che sono copie della regione bersaglio delimitata dagli inneschi.

L'insieme di questi tre passaggi costituisce un ciclo di reazione. Cicli successivi di denaturazione, appaiamento ed estensione portano all'amplificazione in maniera esponenziale (2^n , dove n = numero di cicli) del segmento di DNA di interesse, in quanto ogni ciclo raddoppia la quantità di DNA che verrà, nel ciclo successivo, utilizzata come stampo.

3.2 Analisi di espressione genica mediante RT-PCR

La *Reverse Transcriptase-PCR* è una metodica rapida e versatile che viene largamente impiegata per valutare l'espressione genica attraverso il contenuto di mRNA.

Il primo passaggio della reazione è la conversione di mRNA in cDNA a singolo filamento: un oligodeossinucleotide (*primer*) è ibridizzato all'RNA e poi esteso da una *DNA polimerasi RNA-dipendente*. Questa copia di cDNA rappresenta lo stampo per la successiva amplificazione.

Nel nostro caso, la sintesi del 1° filamento di cDNA è stata effettuata su RNA totale umano (*Invitrogen*) mediante il *GeneAmp RNA PCR Core kit* (*Applied Biosystem*) e il seguente protocollo:

- 200 ng di RNA totale umano;
- 2 µl di *PCR buffer* 10X;
- 4 µl di MgCl₂ 25 mM;
- 1 µl di inibitore delle ribonucleasi 1 U/ µl;
- 2 µl di dGTP 10 mM;
- 2 µl di dATP 10 mM;
- 2 µl di dTTP 10 mM;
- 2 µl di dCTP 10 mM;
- 1 µl di *random primer*;
- 1 µl di *trascrittasi inversa* 2,5 U/ µl.

I *random primer* sono degli esameri con sequenze apposite che si legano casualmente in diverse regioni dell'RNA generando brevi tratti di cDNA. Sono particolarmente utili quando l'RNA bersaglio è molto lungo o contiene strutture secondarie che ne rendono impossibile la retrotrascrizione completa.

La reazione prevede:

1. 42°C per 15 minuti;
2. 99°C per 5 minuti;
3. 4°C per 5 minuti

L'ibrido DNA/RNA così ottenuto è stato utilizzato per determinare la distribuzione tissutale degli mRNA delle quattro proteine appartenenti alla famiglia PAT. La miscela di reazione utilizzata è stata:

- 4 µl (~ 200 ng) di retrotrascritto (ibrido DNA/RNA);
- 1,5 µl PATRT *For* 10 µM;
- 1,5 µl PATRT *Rev* 10 µM;
- 5 µl di *PCR buffer* 10X;
- 8 µl di dNTP 1,25 mM;
- 30 µl di H₂O sterile.

La sequenza degli oligonucleotidi utilizzati è stata:

hPAT1RT *For*

5'-CTTCGGAATGAAGACTACCACGAC-3' (T_m = 60 °C)

hPAT1RT *Rev*

5'-AATCAGGAAGAAGTCCACAACACG-3' (T_m = 60,4 °C)

hPAT2RT *For*

5'-TTGGAGAACAAGGACTCTACATTCTTG-3' (T_m = 60 °C)

hPAT2RT *For*

5'-ATAAGGAAGAAGCTCACGATATGCC-3' (T_m = 60 °C)

hPAT3RT *For*

5'-TTRACTCAGAGAATGTCCATCCTGCT-3' (T_m = 60 °C)

hPAT3RT *For*

5'-GGGTGATGACTAATAAGAAGCTGACAGT-3' (T_m = 60 °C)

hPAT4RT *For*

5'- AGGAGCTAGATATGGATGTAATGAGGC- 3' (T_m = 60 °C);

hPAT4RT *Rev*

5'- CTCCAAGGACTCACTTCCATAGCA- 3' (T_m = 61 °C).

Dopo una preincubazione di 2 minuti a 94°C, sono state aggiunte 2,5 U di *Taq polimerasi*. Il programma, replicato per 30 cicli, è stato il seguente:

1. **denaturazione** a 94°C per 30 secondi;
2. **appaiamento** a 60°C per 30 secondi;
3. **estensione** a 68°C per 30 secondi.

Per concludere, uno *step* finale di estensione a 68°C per 7 minuti.

E' stato amplificato un frammento di 431 bp codificante per hPAT1, uno di 379 bp codificante per hPAT2, uno di 353 bp per hPAT3 ed infine uno di 381 bp codificate per hPAT4.

Come controllo è stato amplificato, nelle stesse condizioni, un frammento di 534 bp del gene umano della G3PDH usando come *primer forward* e *reverse* oligonucleotidi sintetizzati sulla base della sequenza presente in banca dati (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>):

hG3PDH For

5' ACCCCTTCATTGACCTCAACTACAT 3' ($T_m = 60^\circ\text{C}$);

hG3PDH Rev

5' CCAGTAGAGGCAGGGATGATGTT 3' ($T_m = 60,3^\circ\text{C}$).

3.3 Costruzione dei primer

Per amplificare, a partire da cDNA di rene, la sequenza nucleotidica codificante per hPAT4 sono stati sintetizzati 2 *primer* (*forward* e *reverse*) contenenti opportuni siti di restrizione indispensabili per il successivo clonaggio nel vettore di espressione (Fig 17). Tali siti sono stati scelti dopo aver controllato, mediante il programma *DNA Strider*, quali sequenze di riconoscimento di endonucleasi fossero presenti all'interno dell'*Open Reading Frame* oggetto di studio.

Per la costruzione del *primer forward* è stata copiata una breve sequenza nucleotidica (AAGCGGCGGCGAC) all'estremità 5' del cDNA.

A monte di questa sono state, quindi, inserite nell'ordine:

- la sequenza consenso di *Kozak* (**ACCATGG**), già comprensiva del codone di inizio **ATG**, per migliorare l'espressione della proteina nell'organismo modello;
- il sito riconosciuto dall'endonucleasi di restrizione *Bam HI* (**GGATCC**);
- tre "extrabasi" (**TAG**) per aumentare l'efficienza di taglio dell'enzima.

hPAT4 For

5' **TAGGGATCCGCCACCATGG**AAGCGGCGGCGAC 3' ($T_m = 68^\circ\text{C}$)

Per la costruzione, invece, del *primer reverse* è stata copiata, complementata (CAAACCAGATGTTAAGCATGTTGAATTC) ed invertita una breve sequenza nucleotidica all'estremità 3' del cDNA.

Dopo di che, a questa sono stati aggiunti:

- il sito di riconoscimento dell'enzima di restrizione *Hind III* (**AAGCTT**);
- tre "extrabasi" (**CGA**) sempre allo scopo di aumentare l'efficienza di taglio dell'enzima.

hPAT4 Rev

5' **CGAAAGCTT**CAAACCAGATGTTAAGCATGTTGAATTC 3' ($T_m = 68^\circ\text{C}$)

Entrambi i *primer* oligonucleotidici sono stati utilizzati nei primi 30 cicli di PCR alla concentrazione di 0,5 μM e nei successivi 30 alla concentrazione di 10 μM al fine di accrescere la specificità di legame.

5' - TGA
GGATCCGCCACCATGGAAGCGG **CGGCGAC** - 3'

```

1 atggaagcgg cggcgacgcc ggcggctgcc gggcgggcga ggcgcgagga gctagatatg
61 gatgtaatga ggcccttgat aaatgagcag aattttgatg ggacatcaga tgaagaacat
121 gagcaagagc ttctgctgt tcagaagcat taccaacttg atgatcaaga gggcatttca
181 tttgtacaaa ctcttatgca ccttcttaaa ggaatattg gaactggcct ttaggactt
241 ccatgggcaa taaaaaatgc aggcatagtg ctgggaccaa tcagccttgt gtttatagga
301 attatctctg ttcactgtat gcacatattg gtacgttgca gtcactttct atgtctgagg
361 tttaaaaagt caacattagg ttatagtgc actgtgagct ttgctatgga agtgagtcct
421 tggagttgtc ttcagaagca agcagcatgg ggcgggagtg tggttgactt tttctggtg
481 ataacacagc tgggattctg tagtgttat attgtcttct tagctgaaaa tgtgaaacaa
541 gttcatgaag gattcctgga gagtaaagt tttatttcaa atagtaccaa ttcatcaaac
601 ccttgtgaga gaagaagtgt tgacctaaag atatatatgc ttgcttttct tccatttata
661 attcttttgg tcttcattcg tgaactaaag aatctatttg tactttcatt ccttgccaac
721 gtttccatgg ctgtcagctc tgtgataatt taccagtatg ttgtcaggaa catgcccagat
781 cccacaacc ttccaatagt gctgggttgg aagaaatacc cactcttttt tggactgct
841 gtatttgctt ttgaaggcat aggagtggtc ctccactgg aaaaccaaat gaaagaatca
901 aagcgtttcc ctcaagcgtt gaatattggc atggggattg ttacaacttt gtatgtaaca
961 ttagctactt taggatatat gtgtttccat gatgaaatca aaggcagcat aactttaaat
1021 cttccccaaag atgtatgggt atatcaatca gtgaaaatcc tatattcctt tggcattttt
1081 gtgacatatt caattcagtt ctatgttcca gcagagatca ttatccctgg gatcacatcc
1121 aaatttcata ctaaattgaa gcaaactctgt gaatttggga taagatcctt cttggttagt
1181 attacttgty cgggagcaat tcttattcct cgtttagaca ttgtgatttc cttcgttgga
1241 gctgtgagca gcagcacatt ggcctaatac ctgccacctt tggttgaaat tcttacattt
1301 tcgaaggaac attataatat atggatggtc ctgaaaaata tttctatagc attcactgga
1361 gttgttggct tcttattagg tacatatata actggtgag aaattattta tccactccc
1421 aaagttgtag ctggcactcc acagagtcct tttctaaatt tgaattcaac atgcttaaca
3' - CTTAAGTTG TACGAATTGT
tctggttga aatag
AGACCAAAC TTCGAAAGC - 5'

```

Fig. 17

Costruzione ed appaiamento dei *primer* all'*Open Reading Frame* di *hPAT4*.

Per amplificare la sequenza nucleotidica codificante per il *carrier* del citrato di *Anguilla anguilla* (CIC) sono stati sintetizzati 2 *primer* (*forward* e *reverse*) contenenti gli opportuni siti di restrizione indispensabili per il successivo clonaggio nel vettore di trasferimento (Fig. 18).

Per la costruzione del *primer forward* (Fig.) è stata copiata una breve sequenza nucleotidica (CACCGGCAGGCA) all'estremità 5' dell'ORF .

A monte di questa sono state, quindi, inserite nell'ordine:

- la sequenza consenso di *Kozak* (**ACCATGG** già compresa del codone di inizio **ATG**, per migliorare l'espressione della proteina nell'organismo modello;
- il sito riconosciuto dall'*endonucleasi* di restrizione *Bam HI* (**GGATCC**);
- tre "extrabasi" (**TAG**) per aumentare l'efficienza di taglio dell'enzima.

CIC For:

5' **TAGGGATCCGCCACCATGGCACCGGCAGGCA**3'

Per la costruzione, invece, del *primer reverse* (Fig. 10) è stata copiata, complimentata ed invertita una breve sequenza nucleotidica (CTCAGTCTTCCAGACCTTGTTTCAGAAC) all'estremità 3' dell'ORF.

Dopo di che, a questa sono stati aggiunti:

- due extrabasi (**AG**) necessarie per mandare in *frame* la sequenza codificante per CIC con l'epitopo V5 e la coda di 6 residui di istidine presenti nel vettore di espressione pBlueBac4.5/V5-His;
- il sito di riconoscimento dell'enzima di restrizione *Eco RI* (**GAATTC**);
- tre "extrabasi" (**CGA**) con la stessa precedente funzione.

CIC Rev:

5'-**CGAGAATTCAG**CTCAGTCTTCCAGACCTTGTTTCAGAAC-3'

Entrambi i *primer* oligonucleotidici sono stati utilizzati nei primi 30 cicli di PCR alla concentrazione di 0,5 µM e nei successivi 30 alla concentrazione di 10 µM al fine di accrescere la specificità di legame.

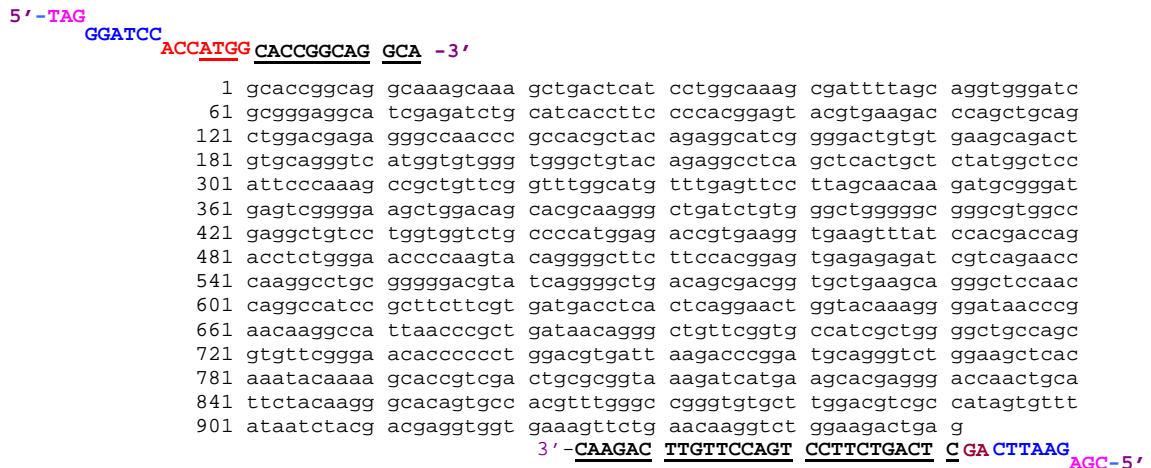


Fig. 18
Costruzione ed appaiamento dei *primer* all'*Open Reading Frame* di CIC di Anguilla *anguilla*.

3.4 Elettroforesi su gel d'agarosio ^[47]

Il prodotto amplificato con la reazione di PCR è stato analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1%, che permette di separare, e quindi identificare, in maniera semplice e veloce, frammenti di DNA in base al loro peso molecolare.

Per la preparazione del gel, e come tampone per la corsa elettroforetica, è stata impiegata una soluzione 1X *TAE*. A questa è stato aggiunto etidio bromuro, alla concentrazione finale di 0,5 µg/ml, che, grazie alla sua conformazione ciclica planare, si intercala tra le coppie di basi del DNA, rendendolo fluorescente, e quindi visibile, con l'ausilio di una lampada UV.

Sul gel di agarosio è stato, inoltre, caricato un *marker* (*1 kb Ladder*), costituito da una miscela di frammenti di DNA con lunghezza in paia di basi e peso molecolare noti, in modo tale che, confrontando la loro corsa elettroforetica con quella dei frammenti prodotti mediante PCR, è stato possibile risalire alla grandezza e al peso molecolare di questi ultimi.

1X TAE buffer: Tris/HCl 40 mM; EDTA 1 mM; portato a pH 7,7 con Acido Acetico glaciale.

3.5 Purificazione dei frammenti di DNA

La banda dell'amplificato presente sul gel di agarosio, che al transilluminatore U.V. appare di colore rosso-arancio, è stata tagliata e si è proceduto all'estrazione da essa del DNA mediante il *kit Gene Clean (BIO 101 LA JOLLA, California)*. Questo prevede inizialmente la solubilizzazione della banda contenente il DNA in un volume di NaI fino a totale copertura della stessa. La fusione dell'agarosio è agevolata incubando a 50°C per circa 15 minuti o, comunque, fino a quando la striscia di agarosio si sia completamente sciolta. La miscela è stata caricata, a questo punto, su una colonnina, inclusa nel *kit*, che presenta sul fondo una membrana di natura silicea alla quale si lega il DNA. Dopo aver tenuto la miscela in ghiaccio per 5 minuti, si è proseguito con una centrifugazione al massimo della velocità per 1 minuto. Si allontana il sovrantante e si effettuano tre lavaggi con il tampone *New Wash* (a base di Tris/HCl ed etanolo), allontanando di volta in volta l'eluato raccolto nella provetta sottostante la colonnina. Alla fine, si ottiene un *pellet* formato dalla resina silicea e dal DNA ad essa adsorbito. Questo è stato risospeso, quindi, con 50 µl di H₂O sterile e vortexato. Si pone la miscela a 55°C per 5 minuti, in modo da provocare il distacco del DNA dalla resina, e dopo centrifugazione a 12000 rpm per 5 minuti è stato recuperato il DNA in soluzione acquosa da utilizzare, previa digestione enzimatica, per il clonaggio.

3.6 Digestione del frammento di DNA

Clonare un frammento di DNA significa inserirlo in un vettore in modo da ottenere il plasmide ricombinante necessario per la trasformazione. Per questo è necessario digerire sia l'inserito che il plasmide con le medesime endonucleasi di restrizione.

Per il cDNA codificante per hPAT4 state utilizzate le endonucleasi *Bam HI* ed *Hind III*, i cui siti di riconoscimento sono contenuti nei *primer* precedentemente costruiti, mentre per il cDNA codificante per CIC sono state utilizzate gli enzimi di restrizione *Bam HI* ed *Eco RI*.

La miscela di digestione del frammento di DNA, dal volume finale di 100 µl, è costituita da:

- 25 µl di DNA 80 ng/µl;
- 10 µl di *buffer* di digestione;
- 65 µl di H₂O sterile;
- 1 µl di *Bam HI*;
- 1 µl di *Hind III*.

Il *buffer* utilizzato varia a seconda degli enzimi di restrizione impiegati. Dopo aver aggiunto i componenti della miscela di reazione ed averli opportunamente mescolati con l'ausilio di un vortex, si centrifuga e si va ad incubare per due ore in un bagno termostato a 37°C, affinché avvenga la digestione.

3.7 Vettore di clonaggio e di trasferimento

Il vettore di clonaggio e di trasferimento da noi utilizzato è stato il pBlueBac4.5/V5-His di 5027 bp con le seguenti caratteristiche, osservabili sulla mappa (Fig. 19):

- **promotore della poliedrina** (P_{PH}): consente un'elevata espressione della proteina ricombinante;
- **polylinker** (MCS): contiene le sequenze riconosciute dalle endonucleasi di restrizione *Bam HI*, *Hind III* ed *Eco RI* utilizzate per il clonaggio del frammento e sequenze riconosciute da altre endonucleasi che, ovviamente, non sono presenti all'interno della sequenza nucleotidica del plasmide;
- **epitopo V5** : sequenza codificante per un peptide di 14 amminoacidi (Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr): permette la rivelazione della proteina ricombinante mediante un anticorpo specifico;
- **coda di 6 istidine**: necessaria per la purificazione della proteina ricombinante tramite cromatografia per affinità su colonna al nichel;
- **segnale di poliadenilazione del virus SV40**: incrementa l'efficienza della terminazione della trascrizione e la stabilità del messaggero;
- **3' ORF1629**: primo sito di ricombinazione tra il vettore di espressione e il DNA virale linearizzato;

- **5' lacZ**: secondo sito di ricombinazione tra il vettore di espressione e il DNA virale linearizzato;
- **promotore *early-to-late*** (P_{ETL}): consente l'espressione del gene intatto lacZ;
- **resistenza all'ampicillina**: rende possibile la selezione in *E. coli*;
- **origine pUC**: essenziale per la replicazione del vettore in *E. coli*.

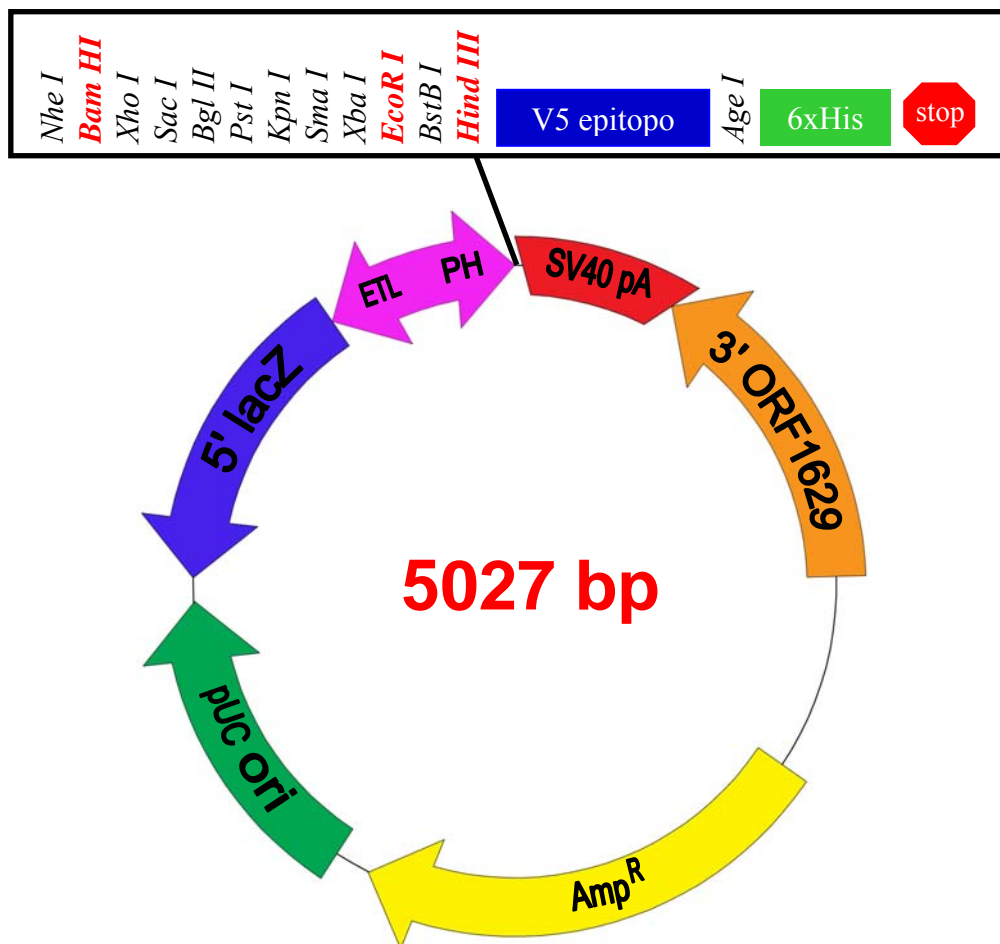


Fig. 19
pBlueBac4.5/V5-His.

3.8 Digestione del plasmide

La digestione del plasmide avviene in maniera analoga a quella del frammento di DNA. L'unica differenza è che, dopo la digestione, è stata effettuata una reazione di defosforilazione aggiungendo alla miscela 1 µl dell'enzima *fosfatasi alcalina* e ponendo a 37°C in un bagno termostato per un tempo massimo di 8 minuti. Ciò viene fatto al fine di ridurre la probabilità che il plasmide possa rilegare su se stesso impedendo, così, l'ingresso dell'inserito nella successiva reazione di ligazione.

3.9 Purificazione del DNA digerito

Dopo aver digerito il DNA si è proceduto all'allontanamento degli enzimi di restrizione. Questa operazione può essere effettuata per elettroforesi su gel di agarosio e successiva estrazione del DNA dalla banda o utilizzando il *Removal kit* disponibile in commercio.

In quest'ultimo caso si aggiungono 10 volumi, rispetto al totale della miscela di digestione, di *buffer PN* (a base di isopropanolo e sodio perclorato) miscelando in maniera tale da bloccare l'attività degli enzimi. La soluzione viene, a questo punto, versata nell'apposita colonnina fornita dal *kit* e centrifugata a 6000 rpm per 2-3 minuti. Si allontana l'eluato, contenuto nella provetta sottostante, si effettuano due lavaggi aggiungendo ogni volta 500 µl di *buffer PE* (etanolo in miscela) e centrifugando per 2-3 minuti a 6000 rpm. Infine, si allontana l'eluato e si aggiungono 50 µl di *buffer TE* sterile e si centrifuga per 2 minuti al massimo della velocità consentita. In tal modo si recupera il DNA, in soluzione acquosa, pronto per la reazione di ligazione.

Buffer TE: Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0.

3.10 Reazione di ligazione

Dopo aver digerito il plasmide e l'inserto, si può mettere a punto una reazione di ligazione per ottenere il plasmide ricombinante. Affinché la reazione di ligazione (Fig.24) avvenga nelle migliori condizioni possibili il vettore e l'inserto devono rispettare determinati rapporti molecolari, nel nostro caso 1:3 a favore dell'inserto (10-50 ng).

Il volume finale della miscela di reazione è di 10 µl a cui si arriva aggiungendo opportuni volumi di:

- DNA dell'inserto;
- DNA plasmidico;
- *buffer di ligazione* 1X (Tris/HCl 0,5 M, pH 7,6; MgCl₂ 100 mM; BSA 500 mg/ml; DTT 100 mM; ATP 10 mM);
- H₂O sterile (per arrivare a volume);
- Enzima *T4 DNA ligasi* (di volume trascurabile).

Nella reazione di ligazione si effettuano anche i controlli del plasmide, rilegato e non rilegato, per valutare l'efficienza di taglio degli enzimi di restrizione adoperati. Nel caso del controllo rilegato, nella miscela di reazione non si aggiunge il DNA dell'inserto; questo controllo serve per verificare se il plasmide si sia richiuso su se stesso per la presenza di estremità coesive e se, quindi, uno dei due enzimi non abbia tagliato. Nel controllo del non rilegato, non si aggiunge il DNA dell'inserto, né l'enzima T4 ligasi; in questo modo si va a verificare l'efficienza di entrambi gli enzimi di restrizione utilizzati. L'enzima T4 ligasi viene diluito in acqua (diluizione 1:1) prima di essere impiegato per la ligazione.

Dopo aver aggiunto tutti i componenti, si lascia andare la reazione per almeno 2-3 ore a temperatura ambiente. La miscela di ligazione ottenuta è stata, quindi, utilizzata per la trasformazione delle cellule rese, in precedenza, supercompetenti.

3.11 Preparazione di cellule di *E. coli* ad alta efficienza di trasformazione

Per il clonaggio è stato utilizzato il ceppo di *E. coli* TG1. La preparazione di cellule ad alta efficienza di trasformazione permette di ottenere migliori risultati in termini di colonie che ricevono il plasmide ricombinante e di poterle utilizzare anche dopo parecchio tempo (se opportunamente conservate ad una temperatura di -80°C), qualora ve ne sia la necessità.

Un volume di 0,5 ml di cellule TG1, provenienti da una coltura satura *overnight*, viene aggiunto a 50 ml di brodo di coltura o LB e posto a 37°C sotto costante agitazione. Quando la densità ottica, stimata spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda di 600 nm, ha raggiunto valori compresi tra 0,5 e 0,6 la sospensione cellulare si centrifuga a 3500 rpm, 4°C , per 10 minuti. Il *pellet* viene risospeso con 30 ml di soluzione *TFB 1* per ogni 100 ml di LB, e la sospensione cellulare viene incubata a 4°C per 90 minuti. Dopo un'ulteriore centrifugazione a 3500 rpm, 4°C , per 10 minuti, il *pellet* viene risospeso in 4 ml di soluzione *TFB 2*, per ogni 100 ml di LB iniziale. Le cellule rese supercompetenti con questo metodo possono essere utilizzate subito, oppure conservate ad una temperatura di -80°C ed utilizzate in seguito.

TFB1: RbCl 100 mM; MnCl₂ 50 mM; CH₃COOK 30 mM; CaCl₂ 10 mM; Glicerolo 15%; pH 8,0; sterile per filtrazione

TFB2: MOPS 10 mM; RbCl 10 mM; CaCl₂ 75 mM; Glicerolo 15%; pH 8,0; sterile.

3.12 Trasformazione di cellule di *E. coli* TG1

Il vettore pBlueBac4.5/V5-His ingegnerizzato con il cDNA di interesse, è stato utilizzato per trasformare le cellule di *E. coli* del ceppo TG1 rese supercompetenti. A 10 μl della miscela di ligazione vengono aggiunti dapprima 100 μl di cellule, e dopo 30 minuti in ghiaccio, 100 μl di LB. Il tutto viene incubato a 37°C per 30-40 minuti, agitando lievemente se si nota che le cellule si stanno depositando. La sospensione cellulare, a questo punto, viene piastrata su terreno solido addizionato di ampicillina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La presenza dell'antibiotico permette di selezionare solo le cellule che

hanno assunto il plasmide e che, quindi, hanno acquisito la resistenza ad esso. Le piastre vengono mantenute a 37°C per 12-16 ore.

Brodo liquido LB: Triptone 1%; Estratto di lievito 0,5%; NaCl 0,5%; pH 7,4;

Terreni per piastre: LB addizionato di agar all'1,5%.

3.13 Estrazione “veloce” del DNA dai batteri

Questo tipo di estrazione consente di ottenere, in breve tempo, il DNA in modo da verificare se il clonaggio ha avuto o meno successo. Singole colonie vengono prelevate dalla piastra di clonaggio, seminate in diversi tubi batteriologici contenenti ciascuno 3 ml di LB addizionato di ampicillina (100 µg/ml) ed incubate a 37°C, sotto agitazione, per almeno 4 ore. Da queste colture, si prelevano 1 ml e si centrifugano a 12.000 rpm per 2 minuti. La restante parte viene opportunamente conservata per la successiva estrazione di DNA con il *kit Miniprep*. Allontanato il sovrantante, il *pellet* si risospende in 100 µl di soluzione *P1*. Si aggiungono, quindi, 100 µl di soluzione *P2*, contenente NaOH, e si miscela fino ad ottenere una sospensione limpida che indica l'avvenuta lisi cellulare. Per bloccare l'azione degradante dell'idrossido di sodio si utilizza l'acetato di potassio contenuto nella soluzione *P3* della quale vengono aggiunti 100 µl. Agitando si osserva la formazione di una poltiglia bianca (costituita da vari componenti cellulari come fosfolipidi, proteine, etc.) che viene centrifugata a 12.000 rpm per 10 minuti. Al sovrantante recuperato, contenente il DNA, si aggiungono, miscelando gentilmente, 250 µl di isopropanolo. Una centrifugazione a 12.000 rpm per 10 minuti precipita il DNA che, ripreso in 20 µl di H₂O sterile, può essere caricato su un gel di agarosio all'1% allo scopo di valutare la presenza di eventuali cloni positivi. Sullo stesso gel si carica, come controllo negativo, DNA plasmidico privo dell'inserito.

Soluzione P1: Tris/HCl 50 mM, (portato a pH 7,5 con HCl); EDTA 10 mM; *RNAasi* 100 µg/ml;

Soluzione P2: NaOH 0,2 M; SDS 1%;

Soluzione P3: CH₃COOK 3 M, portato a pH 4,6-4,8 con acido acetico glaciale.

3.14 Estrazione del DNA dai batteri con il QIA prep®Spin Miniprep kit

A questo punto, dopo aver valutato la presenza di cloni positivi, dalle aliquote di coltura conservate si prelevano 10 µl, si seminano in tubi batteriologici contenenti ognuno 10 ml di LB ed ampicillina (100 µg/ml) e si incubano a 37°C *over-night*, sotto agitazione. La sospensione cellulare così ottenuta viene sottoposta a centrifugazione a 3500 rpm, 4°C, per 10 minuti e il *pellet* risospeso in 250 µl di *buffer P1* del kit di estrazione. Vengono, quindi, aggiunti 250 µl di *buffer P2*, che provoca la lisi cellulare e 350 µl di *buffer N3*, che riporta il pH a valori neutri e aumenta notevolmente la concentrazione salina determinando la denaturazione delle proteine e del DNA cromosomiale. Agitando lievemente si forma una poltiglia bianca che viene sottoposta a centrifugazione a 12.000 rpm per 10 minuti. Il sovrantante prelevato viene caricato sull'apposita colonnina in dotazione del *kit* e centrifugato per 30-60 secondi a 12.000 rpm. Eliminato l'eluato, la colonnina viene lavata con 500 µl di *buffer PB*, centrifugando nuovamente per 30-60 secondi. Si allontana l'eluato, si caricano 750 µl di *buffer PE* (etanolo in miscela) e si ripete la centrifugata. Dopo che la colonnina è andata a secco si centrifuga per 1 minuto a 12000 rpm. A questo punto si posiziona la colonnina su una provetta *epENDORF* pulita e sterile e si caricano 30 µl di acqua sterile e si ricentrifuga. Il DNA così ottenuto viene sottoposto a sequenziamento (*ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer*) allo scopo di verificare l'assenza nella sequenza nucleotidica di eventuali mutazioni ed adoperato per la trasfezione delle cellule di insetto *Sf9*.

3.15 Crescita e mantenimento delle cellule di insetto

In tutti gli esperimenti sono state utilizzate cellule di insetto *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*), tradizionale linea cellulare per baculovirus (*USDA Insect Pathology Laboratory*) che, al microscopio ottico invertito, si presentano con una forma sferica ed un aspetto granulare.

Le cellule sono state cresciute in monostrato in fiasche e mantenute in un incubatore a 27°C in terreno (*medium*) TNM-FH (supplementato di L-glutammina e sodio bicarbonato, *Sigma*).

Il mezzo di coltura conteneva inoltre:

- Siero Fetale Bovino (FBS, *Sigma*) 10%, precedentemente inattivato a 56°C per 30 minuti, che fornisce i nutrienti addizionali indispensabili alla crescita cellulare;
- Penicillina/Streptomicina (P/S, *Sigma*) 100 µg/ml, che inibisce la sintesi delle proteine batteriche.

Le cellule che aderiscono alla parete della fiasca si duplicano ogni 18-24 ore e crescono fino ad occupare l'intera superficie disponibile: a questo stadio si dicono confluenti.

Al raggiungimento della confluenza, per evitare che la crescita si arresti e che si vada incontro a morte cellulare, il terreno è stato eliminato, le cellule lavate, staccate meccanicamente e seminate, con opportune diluizioni, in terreno fresco.

Per la trasfezione, il saggio delle placche e le infezioni sono state sempre utilizzate cellule nella fase logaritmica di crescita e al 98% di vitalità (i *floaters*, le cellule non vitali, non devono superare il 2% della popolazione cellulare).

3.16 Bac-N-Blue™ DNA

Il vettore, nel quale è stato inserito il DNA esogeno, è stato cotrasfettato in cellule *Sf9* con il DNA virale linearizzato del virus della poliedrosi nucleare multipla di *Autographa californica* (AcMNPV).

Il DNA circolare di baculovirus (Bac-N-Blue™ DNA), utilizzato per questo sistema di trasfezione, è infatti ingegnerizzato allo scopo di inserire tre sequenze

riconosciute dall'endonucleasi *Bsu36 I* e il frammento 3' del gene reporter lacZ. La digestione con *Bsu36 I* porta alla rimozione della porzione 3' dell'ORF1629 (essenziale per la propagazione virale) e del gene della poliedrina col suo promotore, quindi, alla completa linearizzazione (Fig. 20).

Il Bac-N-Blue™ DNA, fornito dal kit (*Bac-N-Blue™ Transfection kit, Invitrogen*), comprende anche del DNA virale non linearizzato.

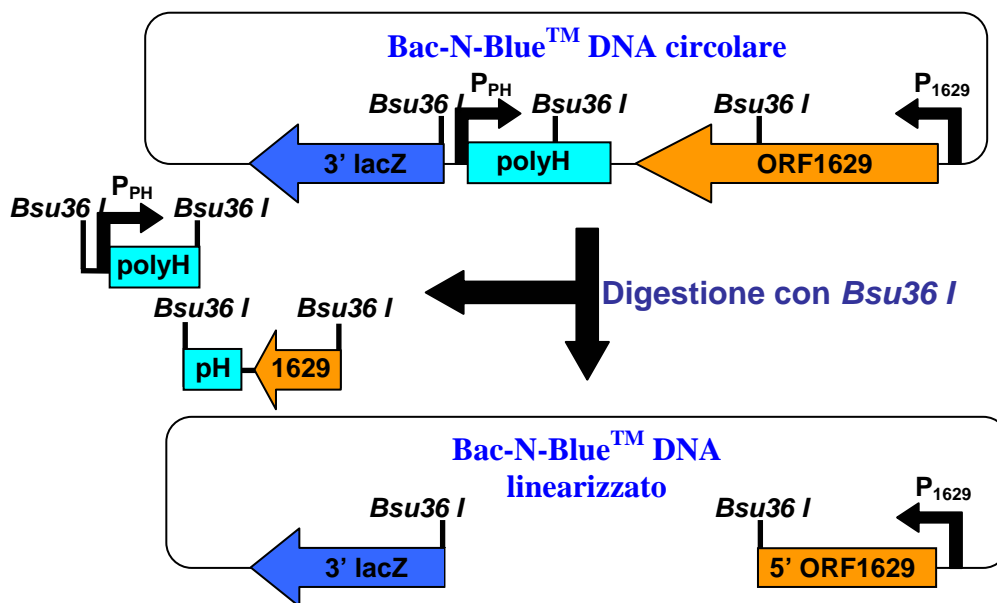


Fig. 20
Bac-N-Blue™ DNA circolare e linearizzato.

3.17 Trasfezione delle cellule di insetto Sf9

2×10^6 cellule sono state seminate in una piastrina da 60 mm², distribuite omogeneamente e lasciate aderire alla superficie per 1 ora a temperatura ambiente.

A 10 µl (0.5 µg) di Bac-N-Blue™ DNA sono stati aggiunti i seguenti reagenti:

- 4 µl di plasmide ricombinante 1 µg/µl;
- 1 ml di TNM-FH (senza FBS e P/S);
- 20 µl di Cellfectin® Reagent (1 mg/ml, *Invitrogen*): una miscela di liposomi cationici appositamente realizzata per la trasfezione in cellule di insetto.

Mescolato bene prima dell'uso e sempre aggiunto alla fine favorisce l'ingresso del DNA in cellula mediante endocitosi.

E' importante, in questo caso, utilizzare terreno privo di siero poiché questo interferisce con i liposomi abbassando l'efficienza di trasfezione. La miscela è stata incubata a temperatura ambiente per 15 minuti. Dopo aver rimosso il mezzo dalla piastrina, facendo attenzione a non danneggiare il *monolayer*, le cellule sono state lavate con 2 ml di terreno per allontanare le tracce di siero e messe a contatto con la miscela di trasfezione per 4 ore a temperatura ambiente. A questo punto, è stato aggiunto 1 ml di TNM-FH e le cellule sono state poste nell'incubatore a 27°C per 72 ore (Fig.21).

Si è quindi proceduto alla raccolta del sovranatante contenente il virus ricombinante e ad una centrifugazione a 1100 rpm per 10 minuti, in maniera tale da allontanare eventuali detriti cellulari. Il virus è stato, infine, conservato a 4°C al riparo dalla luce perché fotosensibile.

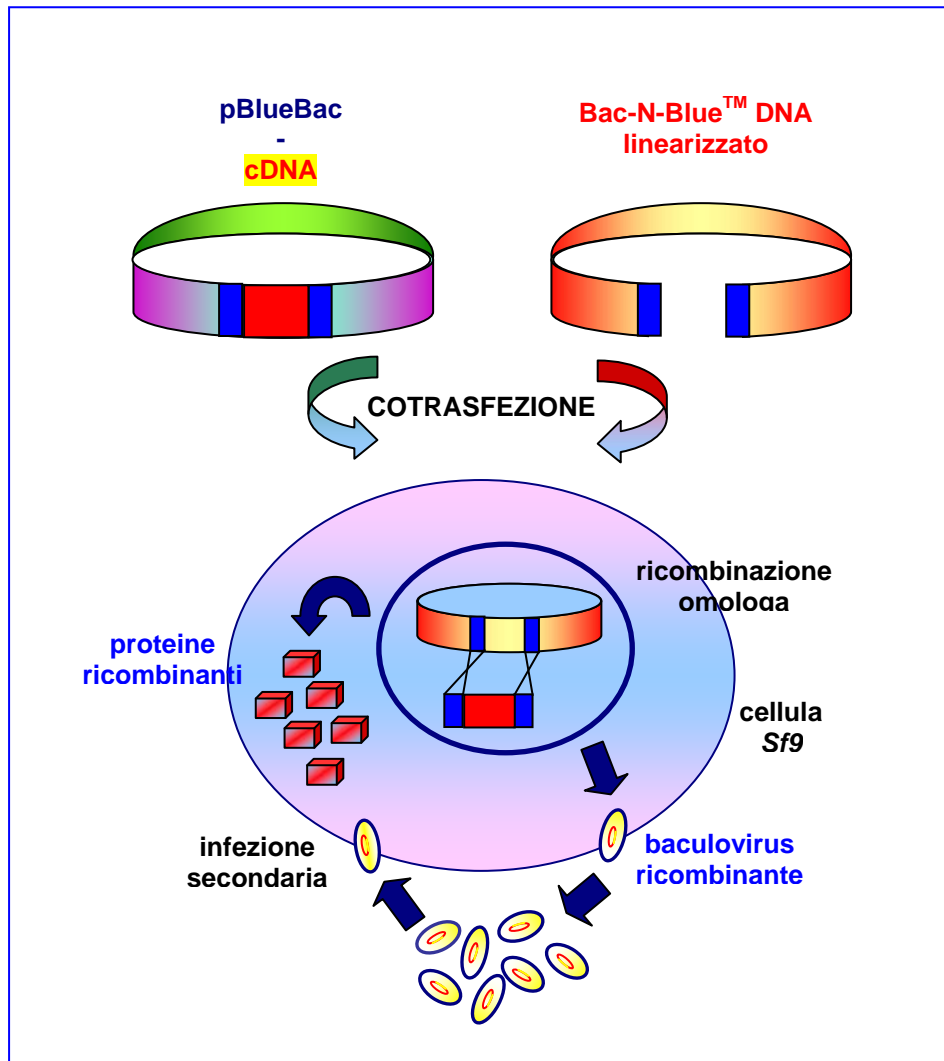


Fig. 21

Cotrasfezione delle cellule di insetto. Nel nucleo delle cellule Sf9 si verifica la ricombinazione tra le sequenze omologhe presenti sul vettore di espressione e sul DNA virale linearizzato. Il baculovirus ricombinante appena formato produce la proteina ricombinante e va anche ad infettare altre cellule di insetto.

3.18 Saggio delle placche

Il saggio delle placche è una metodica che ha un duplice scopo: ottenere virus ricombinante puro e stimarne il titolo virale in pfu/ml (*plaque-forming units/ml*).

In piastri da 60 mm² sono state seminate 2×10^6 cellule Sf9 e lasciate aderire su una superficie piana per 1 ora a temperatura ambiente.

Sono state preparate opportune diluizioni virali ($10^{-2} - 10^{-8}$), aspirato gentilmente il terreno, dopo aver spento la ventilazione della cappa a flusso laminare, le cellule sono state infettate ed incubate 1 ora su un agitatore basculante.

Nel frattempo, si è proceduto a sciogliere un'aliquota di agarosio precedentemente preparata e conservata a 4°C. Questa è una soluzione all'1% di agarosio "Seaplaque low melting", sciolto nel mezzo di coltura privo di antibiotici e siero ed autoclavato. L'aliquota è fatta sciogliere nel microonde e fatta equilibrare a 42°C in un bagno termostato per circa 1 ora. L'agarosio serve a mantenere stabili le cellule e a limitare la diffusione del virus. La temperatura è molto importante. Infatti, eccessivo calore potrebbe determinare la morte delle cellule o far precipitare i nutrienti, mentre una temperatura più bassa di quella prestabilita potrebbe portare ad una rapida polimerizzazione dell'agarosio, non consentendo la formazione di uno strato uniforme. L'agarosio è addizionato, al momento dell'uso, di FBS 10% e penicillina-streptomicina 1%, X-Gal (150 µg/ml), substrato cromogeno della β -galattosidasi codificata dal gene lacZ.

Da ciascuna coltura cellulare è stata allontanata la sospensione e si sono aggiunti 2 ml di agarosio facendolo cadere lungo la parete della piastra.

Solidificato l'agarosio è stato aggiunto 1 ml di terreno completo, le piastrine sono state incubate a 27°C fino alla comparsa delle placche ricombinanti blu (6-10 giorni).

3.19 Amplificazione del virus ricombinante

Scopo di questa procedura è amplificare la nostra putativa placca ricombinante per isolare il DNA virale da sottoporre ad analisi di PCR (come descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.20) e preparare uno *stock* P-1. L'analisi di PCR è utilizzata per identificare le placche ricombinanti pure, mentre lo *stock* P-1 è impiegato per la produzione, su larga scala, di *stocks* virali ad alto titolo (come descritto in *Materiali e Metodi* par.3.21) usati per successivi studi di espressione proteica.

Sono state utilizzate piastre a 12 pozzetti (*12-wells plates*). In ogni pozzetto sono state seminate 5×10^5 cellule Sf9 e lasciate aderire alla superficie per 1 ora a temperatura ambiente.

Utilizzando una pipetta *Pasteur* sterile è stato penetrato l'agarosio in corrispondenza della putativa placca ricombinante blu e rimosso il *monolayer* di cellule contenente la placca. Tale placca è stata rimossa, trasferita in un pozzetto ed incubata a

27°C fino a completa lisi cellulare, accertata osservando le cellule al microscopio ottico invertito (5-10 giorni). L'operazione è stata ripetuta per ciascuna placca ottenuta.

Il mezzo, contenente il virus, è stato centrifugato a 1100 rpm per allontanare i detriti cellulari e conservato a 4°C. Esso, infatti, rappresenterà lo *stock* P-1, se l'analisi di PCR confermerà la presenza di DNA virale ricombinante.

3.20 Estrazione del DNA virale ed analisi di PCR

Per isolare il DNA virale, a 750 µl di virus è stato aggiunto PEG 8000 al 20% e NaCl 1 M. Miscelati i vari componenti, la soluzione è stata incubata per 2 ore in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 5000 rpm per 10 minuti, il *pellet* è stato accuratamente risospeso in 600 µl di soluzione *SM* addizionati di 5 µl di *RNasi* ed incubati a 37°C per 30 minuti. Successivamente sono stati aggiunti:

- 20 µl di SDS 10%;
- 5 µl di *Proteinasi K* 10 mg/ml;
- 10 µl di EDTA 250 mM.

La miscela è stata incubata 10 minuti a 60°C.

Su questa sono state effettuate le seguenti estrazioni:

- fenolo;
- fenolo/cloroformio-alcool isoamilico (24:1);
- cloroformio-alcool isoamilico (24:1).

Sono stati, quindi, aggiunti 2 volumi di etanolo al 95%, si è miscelato gentilmente ed incubato a -20°C *over-night*. Dopo centrifugazione a 13000 rpm per 15 minuti, il *pellet* è stato lavato con etanolo al 70% e risospeso in 30 µl di *buffer TE*. È stata quindi allestita la seguente reazione di PCR:

- 50 ng di DNA virale;
- 5 µl di *PCR buffer* 10X;
- 8 µl di dNTP 1,25 mM;
- 3 µl di *primer forward* 10 µM ($T_m = 62^\circ\text{C}$)
(5' TTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG 3');
- 3 µl di *primer reverse* 10 µM ($T_m = 58^\circ\text{C}$)
(5' CAACAACGCACAGAATCTAGC 3');

- 0,7 µl di *Taq Polimerasi*;
- 25,3 µl di H₂O sterile.

I *primer* utilizzati fiancheggiano il gene virale della poliedrina (*Invitrogen*).

Dopo una denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti, le condizioni di reazione seguite per ognuno dei 30 cicli effettuati, sono state:

1. **denaturazione:** 94°C per 40 secondi;
2. **appaiamento:** 55°C per 40 secondi;
3. **estensione:** 68°C per 2 minuti;

A finire, un'estensione a 68°C per 7 minuti.

5 µl dell'amplificato sono stati caricati su un gel d'agarosio all'1%.

Soluzione SM: NaCl 1 M; MgSO₄·7H₂O 8 mM; Tris/HCl 50 mM, pH 7,5; gelatina OXOID 0,01%; sterile.

3.21 Preparazione dello stock virale ad alto titolo

2 x 10⁶ cellule sono state seminate in fiasche da 25 mm², lasciate aderire per un'ora a temperatura ambiente. Aggiungendo di 20 µl dello *stock* virale P-1, sono state incubate a 27°C per 10 giorni, fino ad una completa lisi cellulare. Il mezzo contenente il virus è stato raccolto; questo rappresenta lo *stock* virale P-2. Un'aliquota di questo *stock* è stata conservata a -80°C.

500 ml di coltura cellulare sono stati aggiunti dello *stock* virale P-2 ed incubati a 27°C per 7-10 giorni fino a completa lisi cellulare.

La sospensione cellulare è stata centrifugata a 4000 rpm per 20 minuti. Il sovrantante rappresenta lo *stock* virale P-3 ad alto titolo, conservato a 4°C. Questo sarà sottoposto a saggio delle placche (come descritto in *Materiali e Metodi*, par.3.18) per la determinazione dell'effettivo titolo virale ed utilizzato per i futuri studi di espressione proteica.

3.22 Infezione delle cellule Sf9 ed espressione della proteina ricombinante

Per ottenere un'ottimale infezione o per infettare le cellule con uno specifico MOI (*multiplicity of infection*) è necessario conoscere la quantità di virus da inoculare

$$\text{ml di virus da inoculare} = \frac{\text{MOI (pfu/cell)} \times \text{numero di cellule}}{\text{titolo virale (pfu/ml)}}$$

Il MOI (*multiplicity of infection*) è definito come il numero di particelle virali per cellula. E' consigliabile lavorare con un MOI compreso tra 0.5 e 1 per aumentare il titolo virale. In questo modo, solo poche cellule verranno inizialmente infettate mentre le altre continueranno a dividersi per essere infettate più tardi o quando il primo gruppo di cellule è già andato incontro a lisi. Viene suggerito, invece, un MOI alto, tra 5 e 10, per l'overespressione della proteina, tale da infettare contemporaneamente tutte le cellule che, di conseguenza, esprimeranno nello stesso momento la proteina ricombinante.

Il numero di cellule, da utilizzare nell'infezione, è dato dal prodotto tra la densità cellulare (*cells/ml*) e il volume di terreno (ml).

Cellule Sf9 sono state seminate, lasciate aderire 1 ora a temperatura ambiente ed infettate con il virus ricombinante al MOI desiderato e per il tempo richiesto per un'ottimale espressione della nostra proteina ricombinante.

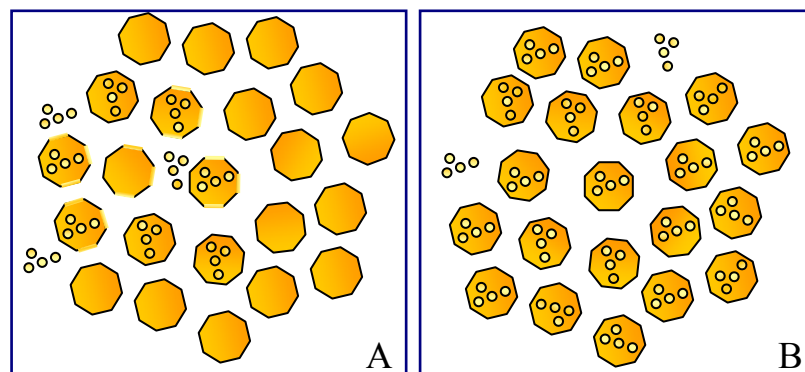


Fig. 22
Molteplicità di infezione. A) MOI = 0.5-1. B) MOI = 5-10.

3.23 Immunofluorescenza indiretta

L'immunofluorescenza indiretta permette di verificare l'espressione della proteina di interesse nella cellula.

In piastrine da 30 mm² contenenti ciascuna un *poli L-lisina coverslip* sono state cresciute e fatte aderire 1×10^5 cellule *Sf9*, poi infettate con il baculovirus ricombinante (MOI 5). Dopo 72 ore, le cellule sono state fissate, per 15 minuti, con una soluzione di paraformaldeide al 2% e permeabilizzate, per 10 minuti, con Triton X-100 allo 0.1% in una soluzione di PBS *buffer* (*phosphate buffered saline*). Le cellule sono state, a questo punto, dapprima incubate, per 1 ora, con l'anticorpo primario monoclonale anti-V5 (*Invitrogen*) 1 µg/ml in una soluzione di PBS *buffer*. Successivamente, dopo aver effettuato tre lavaggi da 5 minuti con PBS *buffer*, si è proceduto all'incubazione delle stesse cellule per 30 minuti, con un anticorpo secondario anti-mouse coniugato al fluorocromo TRITC (*tetrametilrodamina isotiocianato*) diluito 1:500 in PBS *buffer*. Tutte le operazioni sono state effettuate a temperatura ambiente. Le cellule sono state, infine, osservate al microscopio a fluorescenza Leica AF 6000- *Advanced Fluorescence Imaging System*, corredato del software di quantificazione e rielaborazione delle immagini Leica *Application Suite Advanced Fluorescence* (prodotto da *Leica Microsystem CMS, GbH Mannheim, Germany*).

PBS *buffer*: NaH₂PO₄ 100mM; Na₂HPO₄ 100 mM; KCl 137 mM; NaCl 2,7 mM; portato a pH 7,8.

3.24 Localizzazione subcellulare

1×10^5 cellule *Sf9* sono state cresciute e fatte aderire su piastrine da 30 mm² contenente un *poli L-lisina coverslip*. Dopo 48 ore di incubazione con il baculovirus ricombinante (MOI 5) le cellule sono state incubate 15 minuti a 27°C con *LysoTracker Red DND-99* 75 nM (*Molecular probe, Invitrogen*) per marcare i lisosomi, per 15 minuti a 27°C con *MitoTracker Red CMXRos* 100 nM (*Invitrogen*) per la determinazione del *network* mitocondriale o con DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindolo)

1 µg/ml (*Sigma*) per marcare i nuclei. Successivamente, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 2% in PBS *buffer*, per 15 minuti, e permeabilizzate 10 minuti con Triton X-100 0.1%. Effettuati tre lavaggi da 5 minuti con PBS, le cellule sono state incubate per 1 ora in PBS addizionato di BSA 5% contenente l'anticorpo primario monoclonale anti-V5 (*Invitrogen*) ad una concentrazione finale di 1 µg/ml. Effettuati tre lavaggi da cinque minuti con tampone PBS, le cellule sono state incubate, per 30 minuti, con l'anticorpo secondario anti-mouse FITC (*fluoresceina isotiocianato*)-coniugato ad una diluizione di 1:500. L'esperimento è stato condotto interamente a temperatura ambiente. Infine, si è proceduto all'osservazione al microscopio ottico a fluorescenza Leica AF 6000- *Advanced Fluorescence Imaging System*, corredato del *software* di quantificazione e rielaborazione delle immagini Leica *Application Suite Advanced Fluorescence* (prodotto da *Leica Microsystem CMS, GbH Mannheim, Germany*).

3.25 Isolamento dei lisosomi e dei mitocondri da cellule Sf9

Il *pellet* cellulare derivante da 100 mL di coltura cellulare è stato risospeso in un *lysis buffer* ed incubato 20 minuti in ghiaccio. La sospensione cellulare è stata potterizzata per 40 volte, verificando la lisi delle cellule al microscopio ottico invertito, addizionata di NaCl 0,8 mM, incubata 45 minuti sotto continua e costante agitazione a 4°C e centrifugata a 2000 rpm, 4°C per 7 minuti. Il *pellet* contenente i nuclei e i detriti cellulari è stato allontanato, il sovrantante, invece, è stato centrifugato a 12000 rpm 4°C per 15 minuti per isolare la frazione mitocondriale, a 18000 rpm per isolare la frazione lisosomiale.

Il *pellet* così ottenuto è stato ripreso in un opportuno volume di ST, aliquotato e conservato a -80°C per studi successivi.

Lysis buffer: PBS 50 mM pH 7,8 (NaH₂PO₄ 100 mM, Na₂HPO₄ 100 mM, KCl 137 mM, NaCl 2,7 mM); glicerolo 10%; β-mercaptoetanololo 10 mM; PMSF 5 mM;

Buffer ST: Saccarosio 250 mM, Tris 10 mM, pH 7,0.

3.26 Dosaggio proteico

Il reattivo del BIO-RAD è costituito da una soluzione acida di *Coomassie Brilliant Blue* G-250. Il principio del metodo si basa sullo spostamento del massimo di assorbimento del *Coomassie Brilliant Blue* da 465 nm a 595 nm quando la sostanza si lega alle proteine in ambiente acido. I campioni proteici lisosomiali sono stati trattati con 1 ml di reattivo BIO-RAD diluito 1:5. Dopo mescolamento ed incubazione a temperatura ambiente, la determinazione dell'assorbanza è stata effettuata allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 595 nm. La curva di taratura è stata costruita nelle stesse condizioni sperimentali, usando come standard concentrazioni note e crescenti di BSA.

3.27 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)

La purezza delle preparazioni di proteina viene controllata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS, in accordo con la procedura Laemmli ^[91]. E' stato usato un sistema di mini-gel, le cui dimensioni sono 8x10cm e spessore di 1.5 mm.

La soluzione per il gel di separazione è costituita da:

- 4,93 ml di acrilammide/bisacrilammide (30:0,2);
- 1,803 ml di Tris/HCl 1,876 M, a pH 8,8;
- 1,803 ml di H₂O;
- 83,33 µl di SDS al 10%;
- 66 µl di APS 10%;
- 7 µl di TEMED.

La soluzione per il gel di concentrazione è costituita da:

- 500 µl di acrilammide/bisacrilammide (30:0,2);
- 300 µl di Tris/HCl 1,876 M, a pH 6,8;
- 2,16 ml di H₂O;
- 30 µl di SDS 10%;
- 15 µl di APS 10%;

- 7 μ l di TEMED.

Prima della separazione elettroforetica, i campioni sono stati trattati con il tampone *sample buffer* 3x.

La corsa è stata effettuata applicando una corrente continua di 25 mA per 2 ore ed utilizzando un tampone di corsa, il *running buffer*. Per determinare il peso molecolare dei campioni proteici separati su SDS-PAGE è stata utilizzata una miscela di proteine *marker* a peso molecolare noto (*SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range BIO-RAD*):

- Albumina sierica 66,2 kDa;
- Ovalbumina 45 kDa;
- Anidrasi Carbonica 31 kDa;
- Lisozima 14,4 kDa.

Dopo la corsa elettroforetica, il gel di poliacrilammide può essere colorato sia con il metodo Blue di Coomassie, che attraverso il metodo *Silver Staining*.

Sample buffer 3X: Tris/HCl (pH 6,8) 225 mM; SDS al 7% (w/v); glicerolo al 45% (v/v); β -mercaptoetanolo o 1,4-ditrioteritriolo 50 mM; blu di bromo fenolo allo 0.01% a pH 6,8; H₂O fino a volume di 10 mL;

Running buffer: Tris 25 mM; glicina 1.4%; SDS 0.1%; pH 8,3.

3.28 Colorazione con Comassie Brilliant Blue

Il gel, dopo la corsa elettroforetica, è stato colorato per 15-30 minuti con una soluzione di Comassie Blue R 250-0.25% in metanolo al 40% ed acido acetico al 10%, per poi essere decolorato per circa un'ora in metanolo al 40% ed acido acetico al 10% (*Destaining Solution*).

3.29 Colorazione in Silver Staining

Per avere una risoluzione anche delle bande proteiche dell'ordine di 1 ng, i gel di poliacrilammide possono essere colorati con il metodo più sensibile *Silver Staining*, il quale si basa sulla riduzione dello ione Ag^+ ad Ag metallico che, depositandosi sulle proteine, conferisce loro una caratteristica colorazione rosso bruno. Dopo la corsa elettroforetica il gel viene sottoposto, per 10 minuti, a leggera agitazione, in circa 100 ml di *Destaining Solution*, allo scopo di precipitare ed immobilizzare le proteine sul gel. Quindi si lava due volte il gel in 100 ml di acqua distillata e successivamente lo si immerge in 100 ml di glutaraldeide al 10% per 10 minuti. Una volta eliminato l'eccesso di glutaraldeide, mediante due lavaggi di 5 minuti ciascuno in 100 ml di acqua distillata, si aggiungono al gel 150 ml di una soluzione acquosa contenente 30 μl di DTE 0.5 M, allo scopo di ridurre gli eventuali ponti disolfuro esistenti e di liberare i gruppi $-\text{SH}$ a cui si legherà lo ione argento. A questo punto, si allontana la soluzione acquosa, addizionata di DTE, e si pone il gel in 100 ml di nitrato d'argento allo 0.1% per 15 minuti. Quindi, il gel è pronto per lo sviluppo, che avviene quando lo si immerge in una soluzione riducente basica di carbonato di sodio al 3%, alla quale viene addizionata la formaldeide al 37%. Per ultimo si sottopone il gel, per pochi minuti, ad una leggera agitazione che favorisce il deposito dell'argento metallico sulle proteine. Man mano che questo processo avviene, si osserva il progressivo aumento dell'intensità del colore bruno delle bande proteiche contro il fondo del gel che rimane incolore e trasparente. Quando lo sviluppo è completo, è necessario bloccare la reazione di colorazione per evitare l'opacizzazione del fondo del gel che non consentirebbe una buona discriminazione delle bande proteiche. Tale scopo è ottenuto acidificando con una soluzione d'acido citrico al 5%.

3.30 Immunoblot su nitrocellulosa: Western blot

Il *Western blot*, o *immunoblotting* è una tecnica immunoenzimatica, comunemente adoperata per evidenziare la formazione del complesso antigene-anticorpo.

I campioni proteici da analizzare sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE).

Dopo la corsa elettroforetica, il gel viene equilibrato per 10 minuti nel tampone di trasferimento o *blotting buffer*. Il metanolo facilita il trasferimento su una membrana di nitrocellulosa, ma provoca contrazione del gel; è, quindi, necessario un pre-equilibrio, per evitare una distorsione delle bande durante il trasferimento.

Il trasferimento risulta completo dopo 30 minuti a corrente costante di 20 V. La sua qualità è stata verificata attraverso la colorazione del gel dopo elettrotrasferimento con *Coomassie Brilliant Blue* e la colorazione reversibile della nitrocellulosa con una soluzione di *rosso ponceau* allo 0.2% in TCA al 3%, successivamente allontanata mediante ripetuti lavaggi con H₂O corrente.

La membrana di nitrocellulosa sulla quale sono stati immobilizzati i campioni è stata incubata per 2 ore in tampone di incubazione (o *incubation buffer*) contenente l'anticorpo monoclonale anti-V5 (*Invitrogen*) ad una diluizione di 1:5000. Dopo tre lavaggi con tampone di lavaggio (*washing buffer*) la nitrocellulosa è stata incubata per 1 ora con un secondo anticorpo (Goat Anti-Mouse IgG, peroxidase conjugated, *Sigma*), diluito 1:2500 in *incubation buffer*.

Lo sviluppo del colore è stato ottenuto mediante l'aggiunta di 10 ml di una soluzione contenente 6 mg di DAB (3,3'-diamminobenzidina), 30 µl di H₂O₂ al 30% in Tris/HCl 50 mM, pH 7,5.

Tutte le procedure descritte sono state effettuate a temperatura ambiente. L'immunocomplesso formato si presenta sulla nitrocellulosa sotto forma di una macchia di colore scuro dovuta al cromogeno ossidato.

Tampone di trasferimento: Metanolo al 20%; Glicina 150 mM; Tris 20 mM; SDS 0.5%;

Tampone di incubazione: Tris/HCl 100 mM pH 7,5; NaCl 1 M; Tween 20 1% all'.

Tampone di lavaggio: Tris 50 mM; NaCl 150 mM.

3.31 Solubilizzazione proteica

3.31.1 Solubilizzazione della proteina hPAT4/V5-His

Per la solubilizzazione della proteina hPAT4/V5-His dai lisosomi di cellule *Sf9* sono stati utilizzati il Triton X-100 (TX-100), il dodecil β -D-maltoside (DDM) e l'*n*-octil β -D-glucopiranoside (OG), Triton X-101 (TX-101), [3-[(3-colammidopropil)-dimetilammonio]-1-propansulfonato] (CHAPS), Octaetilene-glicol-monododecil etere (C₁₂E₈) e laurildimetilammina-N-ossido (L-DAO).

Diverse aliquote delle frazioni lisosomiali sono state solubilizzate con un buffer di solubilizzazione A (NaCl 150 mM, PIPES (acido piperazin-1,4-bis(2-etansulfonico) 25 mM, pH 7,0) supplementato con i differenti detergenti al 2% o al 3% in modo da avere una concentrazione finale di 2 mg/ml. La sospensione è stata incubata a 4°C sotto continua e costante agitazione magnetica a differenti tempi: 30 minuti, 2 ore e *over-night*. Il pellet lisosomiale (frazione insolubile) e l'estratto lisosomiale (frazione solubile) sono stati separati a 14000 rpm, 4°C, per 30 minuti.

3.31.2 Solubilizzazione della proteina CIC/V5-His

Per la solubilizzazione del *carrier* degli acidi tricarbossilici dai mitocondri di cellule *Sf9* sono stati utilizzati il TX-100, DDM ed OG, detergente non ionico e non denaturante.

Un'aliquota della frazione mitocondriale è stata solubilizzata con un buffer di solubilizzazione A (NaCl 30 mM, PIPES 25 mM, pH 7,0) supplementato con TX-100 al 2% o DDM al 2% o OG al 2% in modo da avere una concentrazione finale di 2 mg/ml. La sospensione è stata incubata a 4°C sotto continua e costante agitazione magnetica a differenti tempi: 30 minuti, 2 ore e *over-night*. Il pellet mitocondriale (materiale insolubile) e l'estratto mitocondriale (materiale solubile) sono stati separati a 14000 rpm, 4°C, per 30 minuti.

L'estratto mitocondriale rappresenta l'estratto proteico che è stato utilizzato sia in successivi studi di purificazione mediante cromatografia di affinità su colonna al Ni²⁺-NTA Agarosio sia in studi di attività di trasporto.

3.32 Purificazione della proteina mediante cromatografia di affinità su colonna di Ni²⁺-NTA Agarosio

Per purificare la proteina è stata utilizzata una cromatografia di affinità. Tale tipologia di purificazione si distingue dagli altri tipi di cromatografia e da tecniche, quali l'elettroforesi e la centrifugazione, poiché non sfrutta, per la separazione, le differenti proprietà fisiche delle molecole. Essa si basa, invece, sulla specificità delle interazioni biologiche per ottenere la separazione e la purificazione delle molecole e può, quindi, garantire, almeno in teoria, una purificazione completa della sostanza in un unico passaggio, pur partendo da miscele complesse.

Per potere applicare questa tecnica cromatografica è necessario che il materiale da separare si leghi reversibilmente ad un ligando specifico, formando la matrice insolubile:

Nelle corrette condizioni sperimentali, aggiungendo al ligando impaccato una miscela complessa, contenente il composto da purificare, solo quest'ultimo interagirà con il ligando ^[92]. Tutte le altre sostanze sono allontanate mediante lavaggio ed il composto di interesse è recuperato per spiazzamento dal ligando.

La resina utilizzata (Ni-NTA Agarosio) è costituita da una fase stazionaria di sepharosio, che lega, per mezzo di un *link* di agarosio, un gruppo di Triacetil di nitrile, che a sua volta forma quattro legami di coordinazione con lo ione Ni²⁺. Tale resina mostra elevata affinità per proteine e peptidi che contengono 6 residui aminoacidici consecutivi di istidina all'estremità N-terminale o all'estremità C-terminale.

Sia la proteina hPAT4, che la proteina CIC di *Anguilla anguilla* sono state espresse con una coda di istidina (6 His) all'estremità C-terminale. Il gruppo reattivo (lo ione Ni²⁺) è, quindi, in grado di instaurare altri due legami di coordinazione con due molecole di istidina.

La proteina hPAT4/V5-His solubilizzata da 500 µg di lisosomi estratti da cellule *Sf9* infettate dal baculovirus ricombinante è stata messa a contatto, sotto agitazione, per 1 ora e a 4°C con la resina Ni²⁺-NTA Agarosio (200 µl) precedentemente equilibrata con una soluzione A: NaCl 150 mM e PIPES 25 mM, pH 7,0. Si è poi proceduto all'impaccamento della soluzione "estratto-resina Ni²⁺-NTA" sulla colonna cromatografica e alla raccolta di un primo eluato (*pass-through*). Successivamente sono stati aggiunti e raccolti 2 ml per ciascuna delle seguenti soluzioni di lavaggio:

- soluzione B (NaCl 500 mM; Imidazolo 10mM; L-DAO 1,5%; Glicerolo 5%; PIPES 100 mM, pH 7,0);
- soluzione C (NaCl 300 mM; Imidazolo 10 mM; L-DAO 1,2%; Glicerolo 1%; PIPES 10 mM, pH 7,0);
- soluzione D (NaCl 100 mM; Imidazolo 10 mM; L-DAO 0,5%; Glicerolo 0,5%; PIPES 10 mM, pH 7,0);
- soluzione E (NaCl 100 mM; Imidazolo 10 mM; L-DAO 0,5%; PIPES 10 mM, pH 7,0);
- soluzione F (NaCl 100 mM; Imidazolo 20 mM; L-DAO 0,4%; PIPES 10 mM, pH 7,0).

Terminati i lavaggi, la proteina, è stata recuperata dalla colonna attraverso l'eluizione con la soluzione G: NaCl 100 mM, Imidazolo 100 mM, L-DAO 0,4%, PIPES 10 mM pH 7,0, contenente un'alta concentrazione di imidazolo, che spiazza la proteina dalla matrice.

Tutte le frazioni raccolte sono state desalificate, risospese in *sample buffer* 3X e sottoposte ad SDS-PAGE.

Per la purificazione della proteina ricombinante CIC/V5-His, un aliquota di 500 µg della frazione mitocondriale delle cellule Sf9 infettate con il baculovirus ricombinante CIC/V5-His è stata solubilizzata con la soluzione A (NaCl 100 mM; PIPES 10 mM, pH 7,0; TX-100 2%). La sospensione è stata incubata per 30 minuti a 4°C e successivamente centrifugata a 13000 rpm per 15 minuti. Il sovranatante ottenuto è stato messo a contatto, sotto agitazione, per 20 minuti e a 4°C con la resina Ni²⁺-NTA Agarosio (0.2 ml) precedentemente equilibrata con una soluzione A: NaCl 500 mM e PIPES 10 mM, pH 7,0. Si è poi proceduto all'impaccamento della soluzione "estratto-resina Ni²⁺-NTA" sulla colonna cromatografica e alla raccolta di un primo eluato (*pass-through*).

Come detergente ai tamponi di lavaggio è stato aggiunto TX-100 inoltre è stata aggiunta difosfatidilGlicerolo (DPG) 0,25 mg/ml. Quest'ultima è stata addizionata alla soluzione G, di eluizione, alla concentrazione finale di 4 mg/ml.

3.33 Ricostituzione

L'estratto proteico ottenuto (come descritto in *Materiali e Metodi*, par.3.31.2) è stato ricostituito nei liposomi, mediante cromatografia su resina di amberlite (Fig. 23).

La miscela di ricostituzione è composta da:

- 70 μ l di proteina solubilizzata.
- 90 μ l di Triton X-114 al 10%.
- 20 μ l di DPG 20 mg/ml.
- 90 μ l di fosfolipidi al 10% sotto forma di liposomi sonicati.
- 70 μ l di Pipes 200 mM a pH 7.
- 70 μ l di citrato 200 mM a pH 7.
- Acqua fino ad un volume finale di 700 μ l.

La soluzione viene miscelata e sottoposta a 13 passaggi su colonne idrofobiche di amberlite (3,2 cm x 0,5 cm), che consentono l'allontanamento del detergente e favoriscono la formazione dei proteoliposomi. Il substrato esterno viene allontanato dai proteoliposomi attraverso il passaggio su una colonna per cromatografia di esclusione molecolare Sephadex G-75. Queste colonne vengono pre-equilibrate con un tampone contenente NaCl 50 mM e Pipes 10 mM. Lo stesso tampone viene utilizzato per l'eluizione. Dalle colonne si raccolgono circa 600 μ l di eluato più torbido, che è quello che contiene i proteoliposomi formati. Su questi proteoliposomi il trasporto a 25°C viene iniziato con l'aggiunta di [14 C]-Citrato nell'opportuna concentrazione e bloccato dopo vari ed opportuni intervalli di tempo aggiungendo 1,2,3-BTA 20 mM, secondo il metodo dello stop-inhibitor ^[93]. Generalmente ogni scambio è costituito da due prove e dal cosiddetto bianco, che funge da controllo, e nel quale l'inibitore viene aggiunto insieme al substrato marcato all'inizio dell'intervallo di tempo. Il substrato radioattivo esterno viene rimosso mediante una successiva cromatografia ad esclusione molecolare su colonne Pierce, riempita con la resina Sephadex G-75 e precedentemente equilibrate con un tampone contenente NaCl 50 mM. I proteoliposomi, eluiti col medesimo tampone, vengono raccolti nelle apposite *vials*, aggiunti 3 ml di miscela scintillante, agitati ed inseriti in uno scintillatore in fase liquida. La radioattività viene misurata in colpi per minuto (cpm). L'attività di trasporto viene poi calcolata sottraendo dai valori sperimentali dei campioni il valore del rispettivo controllo.

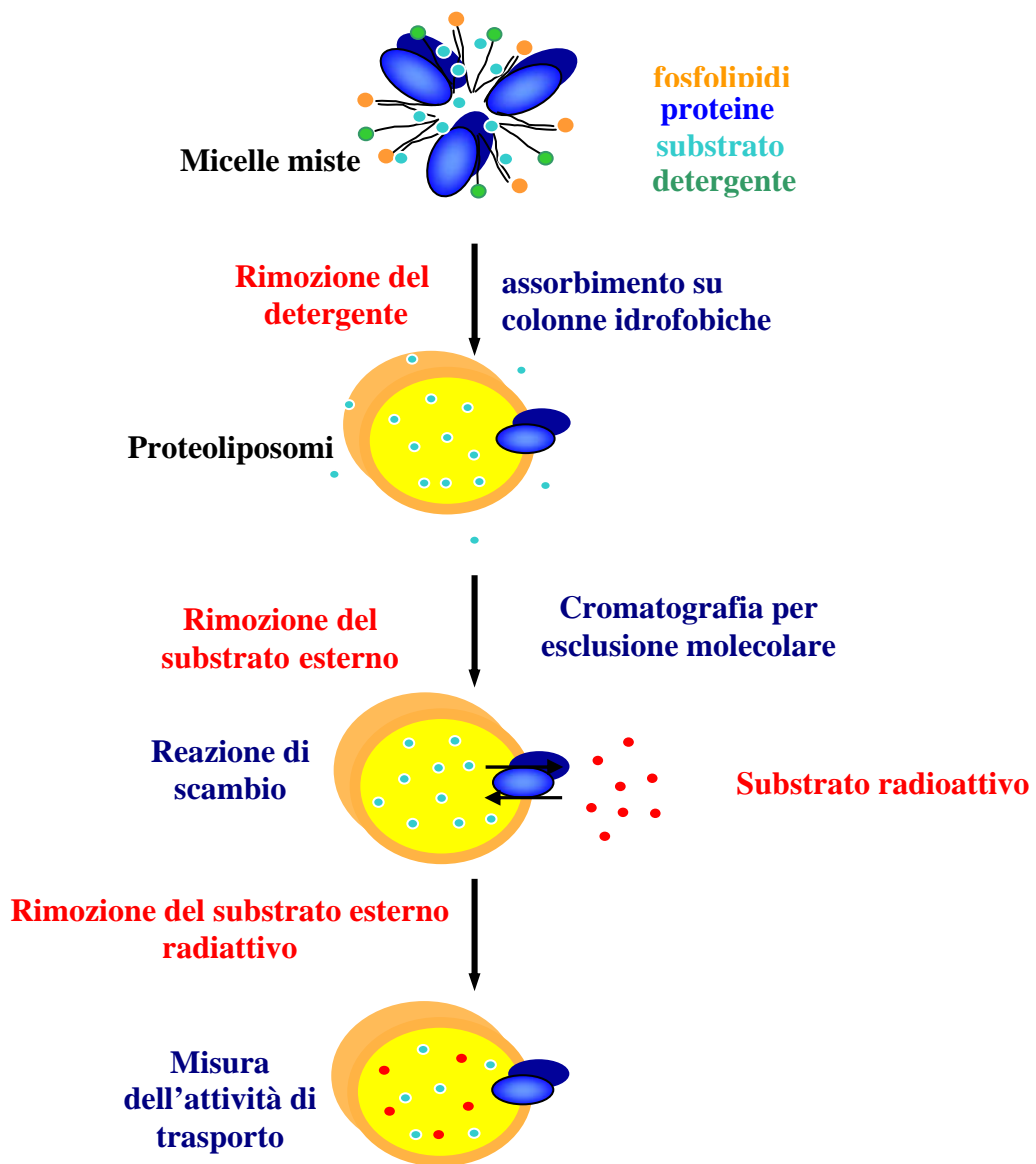


Fig. 23 Schema di ricostituzione in liposomi

3.34 Preparazione dei liposomi^[93]

Per la preparazione dei liposomi si solubilizza 1 g di fosfolipidi, parzialmente purificati dal tuorlo dell'uovo di pollo e contenenti il 60% di fosfatidilcolina, in 10 ml di acqua. La sospensione ottenuta viene sonicata con un sonicatore Branson 250 per 10

minuti a 40 watt a 0°C, ad intervalli di 1 secondo di sonicazione e 2 secondi di pausa. Attraverso la sonicazione si favorisce la formazione di vescicole sferiche monolamellari di fosfolipidi molto simili alle membrane biologiche. Infatti i liposomi sono costituiti da un bilayer fosfolipidico in cui le teste idrofile dei fosfolipidi sono a contatto con l'ambiente acquoso e le code idrofobiche interagiscono tra di loro. Le dimensioni sono variabili ed hanno, in media, un diametro di 50 nm.

3.35 Preparazione delle colonne di amberlite

L'amberlite è una resina idrofobica che viene impaccata in piccole colonne cromatografiche di circa 0,5 cm di diametro e 3,2 cm di altezza. Prima di essere impaccata viene lavata per 4 volte con un volume di metanolo pari a 5 volte il suo volume e, in seguito, risciacquata con acqua fino a scomparsa di metanolo. L'amberlite deve essere conservata a 4°C.

3.36 Preparazione delle colonne di Sephadex G-75

La resina Sephadex G-75 è utilizzata nella cromatografia per gel filtrazione. Prima di essere impaccata nelle apposite colonne deve essere trattata. Si mette a bagnomaria, per circa un'ora, una soluzione di 1 g di resina in acqua, si fa raffreddare e si degassa. A questo punto si impacca la resina in colonne cromatografiche (0,7 cm di diametro per 15 cm di altezza), si lascia sedimentare e si lava con acqua. Le colonne così ottenute vengono utilizzate per separare per cromatografia le miscele di proteoliposomi ricostituiti.

3.37 Preparazione delle colonne Pierce

Le colonne Pierce, utilizzate per rimuovere il substrato radioattivo esterno, sono state riempite con resina Sephadex G-75 preparata come descritto precedentemente (par. 3.36). L'eluizione del substrato è stata ottenuta utilizzando come tampone NaCl 50 mM.

3.38 Determinazione della radioattività entrata nei liposomi e calcolo dell'attività di trasporto

La miscela scintillante è composta da sostanze in grado di trasformare le radiazioni del ^{14}C in fluorescenza, rilevata dai fotomoltiplicatori dello scintillatore che la esprime come "colpi per minuto" (cpm). I dati ottenuti sono così elaborati: ogni prova è effettuata in doppio; i cpm relativi ai campioni vengono mediati e dal valore ottenuto si sottrae quello dei campioni di riferimento (bianchi), per ottenere il valore del trasporto reale. Per risalire dalla radioattività letta alla quantità di nanomoli di substrato scambiato è stata calcolata l'attività specifica del radioattivo (A.S.) con la seguente formula:

$$\text{A.S.} = \frac{\text{Cpm}}{\text{nanomoli di substrato radioattivo}}$$

Per questa ragione, di ogni soluzione di substrato marcato usato nel corso degli esperimenti, sono stati contati i cpm nelle stesse condizioni in cui si misura la radioattività delle singole prove. Dalla conoscenza dell'attività specifica della soluzione di substrato radioattivo usato e dalla radioattività (cpm) di un determinato campione, si è risaliti alle nanomoli di substrato per grammo di proteina trasportato nel tempo d'incubazione, ossia all'attività di trasporto della proteina, attraverso la seguente formula:

$$\text{Attività} = \frac{\text{Cpm}}{\text{A.s.} \times \text{g} \times \text{tempo}}$$

4. RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 Scopo della tesi

Nel regno animale e vegetale gli amminoacidi giocano ruoli vitali in una serie di funzioni biologiche. Per le caratteristiche strutturali che li contraddistinguono, queste molecole non riescono a permeare attraverso il *bilayer* lipidico richiedendo specifici sistemi di trasporto.

Fino ad ora sono stati caratterizzati strutturalmente e funzionalmente molti trasportatori di amminoacidi localizzati a livello della membrana plasmatica, della membrana mitocondriale interna e della membrana delle vescicole sinaptiche.

Recentemente è stata scoperta la famiglia proteica PAT (*proton-coupled amino acid transport*) comprendente quattro membri: hPAT1, hPAT2, hPAT3 e hPAT4. Nonostante ci sia ancora molta confusione circa la loro distribuzione tissutale e cellulare, si pensa che possano esistere delle isoforme lisosomiali, ipotesi dimostrata solo per hPAT1. Questa proteina, così come hPAT2, è stata ampiamente studiata e caratterizzata, poco è stato fatto, invece, su hPAT3 e su hPAT4, indicata in letteratura anche con l'acronimo LYAAT2 (*lysosomal amino acid transporter 2*).

Oggetto di questo lavoro è stato lo studio della proteina hPAT4 denominato "trasportatore orfano", poichè ad esso non è stato ancora associato uno specifico trasporto di substrato. Lo scopo di questo studio è stato far luce sulla funzione fisiologica svolta da questa proteina per comprendere se esistono eventuali patologie legate ad essa.

Dal momento che gli studi di caratterizzazione funzionale e strutturale richiedono grandi quantità di proteina, ma normalmente le proteine di membrana sono poco abbondanti nella loro sede naturale, si ricorre spesso all'uso di sistemi di espressione eterologa. *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*, sebbene siano organismi molto utilizzati per questo tipo di espressione, presentano degli svantaggi legati alle caratteristiche che li differenziano dalle cellule di mammifero e non li rendono sistemi ideali per l'espressione di proteine eucariotiche. Per questo lavoro, tali sistemi di espressione tradizionali, non hanno permesso di ottenere la proteina di nostro interesse in grandi quantità ed in forma attiva.

Si è scelto quindi di utilizzare il *Baculovirus Expression Vector System* (BEVS) perché rappresenta uno dei più potenti e versatili sistemi, oggi disponibili, per overesprimere in condizioni ottimali proteine di membrana e solubili.

Il primo obiettivo di questo lavoro di tesi è stato, quindi, quello di ottenere la proteina ricombinante, hPAT4, con caratteristiche strutturali e funzionali del tutto simili alla proteina nativa in modo da poterne studiare, nel prossimo futuro, l'attività di trasporto.

Nel nostro laboratorio, inoltre, in cellule di insetto, è stato espresso, mediante il baculovirus ricombinante il *carrier* degli acidi tricarbossilici (citrato) di mitocondri di fegato di *Anguilla anguilla* (CIC), utilizzato nei successivi esperimenti di caratterizzazione come proteina controllo.

Il *carrier* degli acidi tricarbossilici (o *carrier* del citrato) è una proteina integrale della membrana mitocondriale interna che catalizza il trasporto del citrato dalla matrice verso il citosol in controtrasporto con un dicarbossilato (malato), un tricarbossilato (cis-aconitato o isocitrato) oppure con il fosfoenolpiruvato ^[10].

Il citrato, trasportato dalla matrice al citosol, rappresenta una fonte di unità acetiliche per la sintesi degli acidi grassi, degli steroli e dei lipidi strutturali.

Ne deriva che il *carrier* degli acidi tricarbossilici gioca un ruolo cruciale nel processo di lipogenesi ^[10]. Considerando, dunque, la sua importanza in tale processo metabolico la sua funzione è stata studiata in diverse specie.

Il *carrier* dei tricarbossilici è stato purificato dai mitocondri di fegato di ratto ^[94], bovino ^[95] e caratterizzato cinematicamente dopo ricostituzione in liposomi ^[96]. Il peso molecolare della proteina matura è di 34,3 kDa ^[96]. L'analisi della sequenza amminoacidica completa di CIC dei mitocondri di fegato di ratto, dedotta dalla sequenza del cDNA ^[97] ha evidenziato una struttura tripartita caratteristica della famiglia dei *carrier* mitocondriale; analogamente la struttura secondaria proposta è in accordo con quella descritta per i membri della famiglia ^[97].

Il *carrier* dei tricarbossilici di fegato di ratto e l'omologo di lievito sono stati clonati, overespressi in e caratterizzati sia strutturalmente che funzionalmente ^[97].

Recentemente, inoltre, è stato caratterizzato cinematicamente il *carrier* di *D. melanogaster*, dopo espressione in *E. coli* ^[98].

La scelta di usare il BEVS come sistema di espressione per una proteina così ampiamente caratterizzata strutturalmente e funzionalmente ha lo scopo di dimostrare come questo sistema, rispetto ai tradizionali sistemi di espressione eterologa, consente

di ottenere maggiori quantità della proteina di interesse e di recuperarla facilmente dato che conserva la localizzazione della proteina nativa, ma anche di recuperare una proteina perfettamente funzionale. La proteina espressa con tale sistema subisce, infatti, *folding*, modificazioni post-traduzionali e oligomerizzazioni del tutto simili a quelle che avvengono nelle cellule di mammifero.

4.2 Ricerca di sequenze proteiche in Banca Dati

La ricerca di proteine trasportatrici appartenenti ad una famiglia può essere effettuata grazie alla disponibilità in Banche Dati di sequenze amminoacidiche e nucleotidiche ed alla possibilità di valutare il grado di omologia della sequenza della proteina in esame rispetto a quella di altre proteine presenti in Banca Dati.

Partendo da queste considerazioni e con l'ausilio di opportuni programmi informatici siamo in grado di ricercare in Banca Dati nuove possibili proteine, appartenenti ad una famiglia, partendo da sequenze amminoacidiche note.

Utilizzando questo procedimento è stato ipotizzato che, all'interno della famiglia AAAP (*aminoacid/auxin permease*), famiglia delle permeasi specifiche per amminoacidi ed auxina, esistano proteine di trasporto lisosomiali, che ne costituiscono un sottogruppo.

In particolare, nel ratto, ne è stata caratterizzata una, in grado di effettuare il trasporto H^+ /amminoacidi, LYAAT-1 (lysosomal amino acid transporter), localizzata nei lisosomi delle cellule di cervello.

Per questo lavoro siamo partiti dalla sequenza amminoacidica nota della proteina lisosomiale di ratto LYAAT-1r, utilizzando il programma BLAST e la Banca Dati di NCBI (disponibile on line all'indirizzo web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.html>) abbiamo effettuato la ricerca di nuove sequenze proteiche di *Homo sapiens*.

Il programma BLAST è uno degli strumenti più utilizzati per la ricerca di sequenze nucleotidiche e proteiche nelle Banche Dati telematiche mediante omologia di sequenza. Impostando in maniera opportuna i vari parametri di ricerca si possono effettuare differenti allineamenti di sequenze sia proteiche che nucleotidiche nelle varie

specie. E' possibile effettuare uno *screening* partendo sia da una sequenza proteica nota che da una nucleotidica nota ed allinearla con le sequenze presenti in Banca Dati.

Utilizzando l'opzione BLASTp si può allineare una sequenza proteica nota con le sequenze proteiche della Banca Dati, con l'opzione BLASTn si possono invece allineare sequenze nucleotidiche. Infine, dando una sequenza proteica e, utilizzando tBLASTn, si ottiene l'allineamento con le sequenze nucleotidiche della Banca Dati tradotte nelle sei possibili sequenze proteiche.

La proteina di ratto LYAAT-1r è stata utilizzata come sonda (*query*), nel programma BLAST, per individuare il suo ortologo umano mediante l'opzione BLASTp. La proteina umana avente il più alto grado di omologia (78%), indicata dal codice BAB71435.1, alla quale è stato dato il nome di hPAT1 (PAT-1h), è servita per interrogare nuovamente la Banca Dati proteica umana allo scopo di individuare altre possibili proteine appartenenti alla famiglia AAAP (Fig.24). In questa maniera sono stati individuati gli altri 3 membri della famiglia PAT di cui 2 già noti, hPAT2 (PAT-2h) e hPAT3 (PAT-3h) rispettivamente, ed una (con codice NP_689526.2), avente un'omologia del 46% con la proteina PAT-1h (Fig. 25).

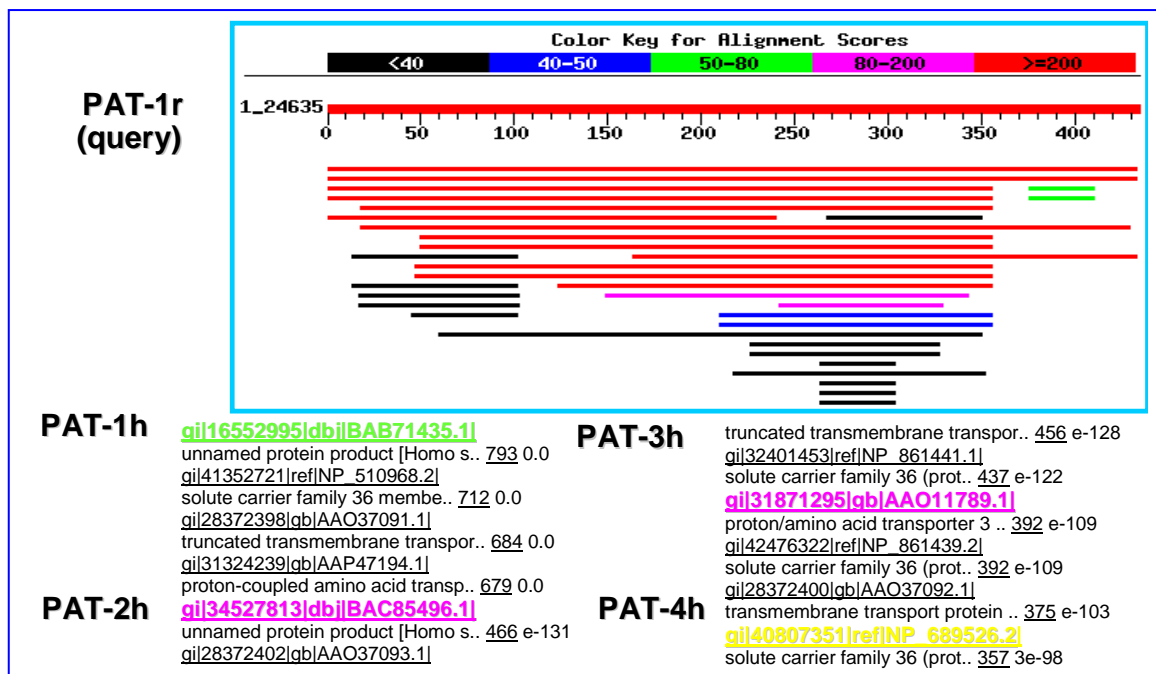


Fig.24 Ricerca in Banca Dati di sequenze proteiche ortologhe di LYAAT-1r.

La sequenza proteica di hPAT4 è evidenziata in giallo.

Chiave di lettura per gli allineamenti: in rosso sono evidenziate le sequenze molto omologhe alla sonda (*query*), in fucsia quelle omologhe, in verde quelle poco omologhe, in blu quelle molto poco omologhe, infine in nero quelle non omologhe. Le cifre sottolineate, relative ad ogni sequenza trovata, indicano i "bits", cioè i numeri di amminoacidi identici a quelli della query. Subito dopo è riportata la *value*, ossia, la significatività dell'allineamento fra *query* e sequenza nella banca dati.

```

PAT1 --MSTQRLRN--EDYHDYSSTDVSPPEESPSEGLNLS-----SPGSYQRFQGSNSTT 48
PAT2 --MSVTKSTEGPQGAVAIKLDLMSPPESAkkLENKDST---FLDESPSESAGLKKTKGIT 55
PAT3 --MSLLGRDYN-SELNSLDNGPQSPSESSSS-----ITSENVHPAGEAGLS 43
PAT4 MEAAATPAAAGAAARREELDMDMRPLINEQNFDGTSDEEHEQEELLPVQKHYQLDDQEGIS 60
      :           *           .           :           :
PAT1 WFQTLIHLKGNIGTGLLGLPLAVKNAGIVMGPISELLIIGIVAVHCMGILVKCAHHFCRR 108
PAT2 VFQALIHVLKGNMGTGILGLPLAVKNAGILMGPLSLLVMGFIAHCMHILVKCAQRFCKR 115
PAT3 MMQTLIHLKCNIGTGLLGLPLAIKNAGLLVGPVSLLAIGVLTVHCMVILLNCAQHLSQR 103
PAT4 FVQTLMLHLKGNIGTGLLGLPLAIKNAGIVLGPISLVFIGIISVHCMHILVRCSHFLCLR 120
      . * : * : * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
PAT1 LNKSFVDYGDVTMYGLESSPCSWLNRNHAHWGRRVVDFFLIVTQLGFCVYFVFLADNFKQ 168
PAT2 LNKPFMDYGDVTMHGLEANPNAWLQNHAWGRHIVSFLLINTQLGFCVYIVFLADNLKQ 175
PAT3 LQKTFVNYGEATMYGLETCPNTWLRHAVWGRYTVSFLLVITQLGFCVYFMFMADNLQ 163
PAT4 FKKSTLGYSDTVSFAMEVSPWCLQKQAAGRsvVDFFLVITQLGFCVYIVFLAENVKQ 180
      : * . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
PAT1 VIE---AANGTTNNCHNETVILTPTMDSRLYMLSFLPFLVLLVFIRNLRALSIFSLLAN 225
PAT2 VVE---AVNSTTNNCYSNETVILTPTMDSRLYMLSFLPFLVLLVLIIRNLRILTIFFMLAN 232
PAT3 MVE---EAHVTSNICQPREILTLTPILDIRFYMLIILPFLILLVFIQNLKVLVSFSTLAN 220
PAT4 VHEGFLESKVFISNSTNSNPCERRSVDLRIYMLCFLPFIILLVFIRELKLNLFVLSFLAN 240
      : *           :           .           .           : * * : * * : * : * : * : * : * : * *
PAT1 ITMLVSLVMYIQFIVQRIIPDPSHLPLVAPWKTYPLFFGTAFSFEIGMVLPLENKMKDP 285
PAT2 ISMLVSLVYIIQYITQEIIPDPSRLPLVASWKTYPLFFGTAFSFEISGVVLPLENKMKNA 292
PAT3 ITTLGSMALIFEYIMEGIPYPSNLPLMANWKTFLFFGTAFITFEGVMVLPKQMKHP 280
PAT4 VSMVSLVYIIQYVVRNMPDPHNLPVAGWKYPLFFGTAVFAFEGIGVVLPLENQMKES 300
      : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
PAT1 RKFPLILYLGMVIVTILYISLGCLGYLQFGANIQGSITLNLPN-CWLYQSVKLLYSIGIF 344
PAT2 RHFPAILSLGMSIVTSLYIGMAALGYLRFGDDIKASISLNLPN-CWLYQSVKLLYIAGIL 351
PAT3 QQFSFVLYLGMISVILYILLGTLGYMKFGSDTQASITLNLPN-CWLYQSVKLMYSIGIF 339
PAT4 KRFPQALNIGMGIVTTLVYVTLATLGYMCFHDEIKGSITLNLPDQVWVLYQSVKILYSFGIF 360
      : : * . * : * * * * * : : . * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
PAT1 FTYALQFYVPAEIIIPFVSRAPHELCVVDLFRVTVLVCLTCILAILIPRLDLVISLVG 404
PAT2 CTYALQFYVPAEIIIPFAISRVRWALPLDLSIRLVMVCLTCLLAILIPRLDLVIPLVG 411
PAT3 FTYALQFHVPAEIIIPFAISQVSESWALFVDSLVRALVCLTCVSAIIPRLDLVISLVG 399
PAT4 VTYSIQFYVPAEIIIPGITSKFHTKWKQICEFGIRSFVLSITCAGAILIPRLDIVISFVG 420
      * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
PAT1 SVSSALALIIIPPLEVTFYSEGMSPLTIFKDALISILGFVGFVVGTYEALYELIQPS- 463
PAT2 SVSGTALALIIIPPLEVTFYSEGMSPLTIFKDALISILGFVGFVVGTYQALDELLKSE- 470
PAT3 SVSSALALIIIPALLEIVIFYSEDMSCVTIAKDIMISIVGLLGCIFGTYQALYELPQP-- 457
PAT4 AVSSSTLALILPPLVEILTFSEHYNIWMLKNIISIAFTGVVGFLLGTYITVEEIIYPTP 480
      : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
PAT1 -----NAPIFINSTCAFI--- 476
PAT2 -----DSHPFSNSTTFVR--- 483
PAT3 -----ISHSMANSTGVHA--- 470
PAT4 KVVAGTPQSPFLNLNSTCLTSGLK 504
      * * *

```

AVFPMILW	ROSSO	Piccoli + Idrofobici (inclusi aromatici -Y)
DE	BLU	Acidi
RHK	ROSA	Basici
STYHCNGQ	VERDE	Idrossilati + Ammine + Basici + N + Q
Altri	GRIGIO	

	PAT1 Acc. no.: NP_510968			
PAT1 Acc. no.: NP_510968	100 %	PAT2 Acc. no.: NP_861441		
PAT2 Acc. no.: NP_861441	68 %	100 %	PAT3 Acc. no.: NP_861439	
PAT3 Acc. no.: NP_861439	60 %	55 %	100 %	PAT4/ Acc. no.: NP_689526
PAT4 Acc. no.: NP_689526	51 %	48 %	46 %	100 %

Fig. 25 Allineamento delle sequenze amminoacidiche di hPAT1, hPAT2, hPAT3 e hPAT4 e relative percentuali di similarità.

Le sequenze amminoacidiche delle quattro proteine sono state ottenute interrogando la banca dati *Entrez Gene* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>) ed allineate utilizzando il programma *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) che ha anche fornito il grado di omologia delle sequenze in esame in termini di percentuale di similarità.

4.3 Analisi del trascritto e del gene codificante per la proteina hPAT4

Determinata la sequenza proteica, utilizzando il programma tBLASTn è stato possibile ottenere, sempre dalla Banca Dati, il corrispondente cDNA. Quest'ultimo è di 2493 bp e mostra alle estremità, a monte e a valle, due regioni non tradotte, rispettivamente, di 97 bp e 881 bp. Nella regione non tradotta all'estremità 3' è evidente la caratteristica sequenza consenso di poliadenilazione (AATAAA) posta 15 nucleotidi a monte della coda di poli(A) (Fig. 26).

```

1  ccctccgggc aggggaggta ggccctgggccc tgacgcccggc cagcagcggg cgggagagtg
61 agcaactcggg cggcggcgctc ctggagacccc gcgagagatg gaagcggcgg cgacgcccggc
121 ggctgcccggg gcgccgagggc gcgaggagct agatatggat gtaatgaggg ccttgataaa
181 tgagcagaat tttgatggga catcagatga agaacatgag caagagcttc tgcctgttca
241 gaagcattac caacttgatg atcaagaggg catttcattt gtacaaaactc ttatgcaact
301 tcttaaagga aatattggaa ctggcctttt aggacttcca ttggcaataa aaaatgcagg
361 catagtgcctt ggaccaatca gccttgtggt tataggaatt atttctgttc actgtagtga
421 catattggta cgttgcaatc actttctatg tctgaggttt aaaaagtcaa catttagtga
481 tagtgacact gtgagctttg ctatggaaat gagtccctgg agttgtcttc agaagcaagc
541 agcatggggg cggagtgtgg ttgacttttt tctgggtgata acacagctgg gattctgtag
601 tgtttatatt gtcttcttag ctgaaaatgt gaaacaagt catgaaggat tctctggagag
661 taaagtgttt atttcaaata gtaccaatcc atcaaaccct tgtgagagaa gaagtgttga
721 cctaaggata tataatgctt gctttcttcc atttataatt cttttggctc tcattcgtga
781 actaaagaat ctatttggac ttccattcct tgccaacggt tccatggctg tcagctctgt
841 gataatttac cagtatgttg tcaggaacat gccagatccc cacaaacttc caatagtggc
901 tgggtggaag aaatacccac tcttttttgg tactgctgta tttgcttttg aaggcatagg
961 agtggtcctt ccactggaaa accaaatgaa agaatcaaag cgtttccctc aagcgttgaa
1021 tattggcatg gggattgtta caactttgta tgtaacatta gctactttag gatatagtg
1081 tttccatgat gaaatcaaag gcagcataac tttaaatctt ccccaagatg tatggttata
1141 tcaatcagtg aaaattctat attcctttgg catttttggg acatattcaa ttcagttcta
1201 tgttccagca gagatcatta tccttgggat cacatccaaa tttcatacta aatggaagca
1261 aatctgtgaa tttgggataa gatccttctt ggttagtatt acttgtgccc gagcaattct
1321 tattcctcgt ttagacattg tgatttctct cgttggagct gtgagcagca gcacattggc
1381 cctaactcctg ccacttttgg ttgaaattct tacattttcg aaggaacatt ataatatatg
1441 gatggctctg aaaaaatatt ctatagcatt cactggagtt gttggcttct tattaggtac
1501 atataaact gttgaagaaa tatattatcc tactcccata gttgtagctg catctccaa
1561 gagtcccttt ctaaatgtga attcaacatg cttaacatct ggtttgaat agttaaagca
1621 gaatcatgag tcttctattt ttgtccatt tctgaaaatt atcaagataa ctagtaaaat
1681 acattgctat atacataaaa atggttaaaa actctgtttt ctttggcagc atattaatat
1741 tttggaagta atcataactc ttaccagta gtggtaaac tatgaaaaat ccttgctttt
1801 aagtgttagc aatagttcaa aaaattaagt tctgaaaatt gaaaaatta aaatgtaaaa
1861 aaattaaaga ataaaaatc ttctattatt cttttatctc agtaagaaat accttaacca
1921 agttatctct cttttatgct actcttttgc cactcacttg agaacagaa aggattcaa
1981 caataagaga ataaaaaag aacatgtata acaaaaagct ctctccagat catccctg
2041 aatgccaaag taaactttat gtacagtgtg aaaaaaaaaa atctcagttg tgtttttatt
2101 agccaaattc taatgattgg ctctggaag tatagaaac tccattaac ataataaag
2161 catcagaaaa ttgcaaacac tagaattaat ttacactct aatggtagtt gatcttcata
2221 gtcaagaggg cctgttcaa atcatgactt agtgtttcaa tgaatttga aaaggactt
2281 taaaacttat ccagtgaac tccttgttt ttcgtcagag gaaaaggagg cctagaagg
2341 ttaagtaact tggctgagac cactcagcct tgagatcaag aaaacctaact cttttgactc
2401 ccaggccagg atgttttatt tctcacatca tgtccaagaa aaagataaa ttatgttcag
2461 cttaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa

```

Fig. 26 cDNA di hPAT4.

Il codone di inizio e quello di stop sono indicati in rosso e sono compresi nell'*Open Reading Frame* (ORF) di 1515 bp. L'UTR in 5' (97 bp) è evidenziata in verde mentre l'UTR in 3' (853 bp) in celeste. Infine, è possibile osservare in fucsia il segnale di poliadenilazione e la coda di poliA (ventotto A).

Partendo dalla sequenza completa del CDNA ed utilizzando il programma DNA STRIDER è stato possibile ottenere i “moduli di lettura aperti” (*open reading frame* o ORF). Tra questi ne è stato individuato uno di 1515 bp da cui è stata dedotta la corrispondente sequenza proteica di 504 amminoacidi con un peso molecolare di circa 58 kDa (Fig. 27).

```

H2N-MEAAATPAAAGAARREELDMDVMRPLINEQNFDG
TSDEEHEQEELLVQKHQQLDDQEGISFVQTLMHLLKGNI
GTGLLGLPLAIKNAGIVLGPISLVFIGIISVHCMHILV
RCSHFLCLRFKKSTLGYSDTVSFAMEVSPWSCLOKQAA
WGRSVVDFFLVITQLGFCSVYIVFLAENVKQVHEGFLE
SKVFISNSTNSSNPCERRSVDLRIYMLCFLPFIILLVF
IRELKNLFLVLSFLANVSMASLVIIYQYVVRNMPDPHN
LPIVAGWKKYPLFFGTAVFAFEGIGVVLPLENQMKESK
RFPQALNIGMGIVTTLYVTLATLGYMCFHDEIKGSITL
NLPQDVWLYQSVKILYSFGIFVTYSIQFYVPAEIIIPG
ITSKFHTKWKQICEFGIRSFLVSITCAGAILIPRLDIV
ISFVGAVSSSTLALILPPLVEILTFKSKEHYNIWMVLKN
ISIAFTGVVGFLLGTYITVEEIIYPTPKVVAGTPQSPF
LNLNSTCLTSGLK-COOH

```

Fig. 27 Sequenza amminoacidica della proteina hPAT4.

Con l'ausilio del programma *Mac Vector*, inoltre, è stato costruito il profilo idropatico secondo l'algoritmo di Kyte-Doolittle [30]. I risultati ottenuti, riportati in figura 15, hanno evidenziato la presenza nella sequenza amminoacidica di 9 probabili regioni idrofobiche (presumibilmente α -eliche inserite nella membrana lisosomiale) intervallate da segmenti idrofilici (Fig. 28). Tale struttura topografica è in accordo con quella degli altri membri della famiglia AAAP.

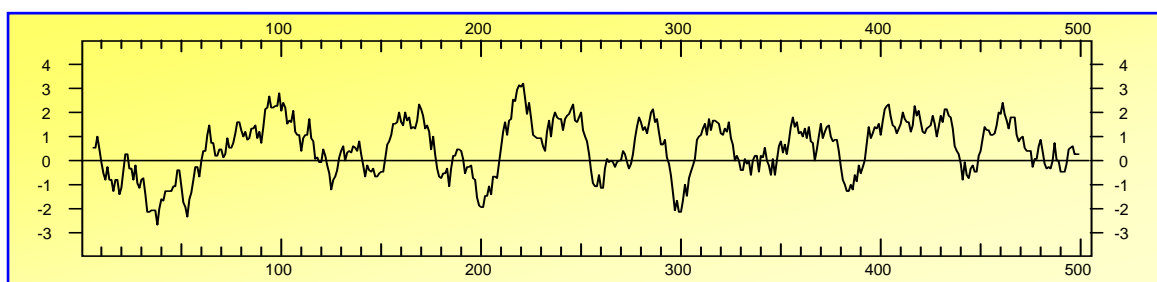


Fig. 28 Profilo di idropaticità di hPAT4 secondo l'algoritmo di Kyte-Doolittle ottenuto utilizzando il programma *Mac Vector*.

Quando la curva assume valori positivi indica porzioni di sequenza idrofobiche, quando assume valori negativi indica porzioni di sequenza idrofiliche.

In Banca dati è stata trovata anche la posizione del corrispondente gene. Inaspettatamente rispetto ai tre geni umani, *Slc36-a1* -*a2* -*a3*, che formano un *cluster* sul cromosoma 5q33.1, *Slc36-a4* è localizzato sul cromosoma 11q21. Il gene di 50246 bp è costituito da 11 regioni esoniche separate da 10 regioni introniche (Fig. 29). Le dimensioni degli esoni, dal primo all'undicesimo, sono di 55 bp, 124 bp, 91 bp, 89 bp, 96 bp, 85 bp, 228 bp, 99 bp, 170 bp, 170 bp, 308 bp mentre quelle degli introni, partendo dall'estremità 5', sono di 11963 bp, 1170 bp, 1535 bp, 1019 bp, 809 bp, 12625 bp, 1927 bp, 3042 bp, 8428 bp, 5263 bp.

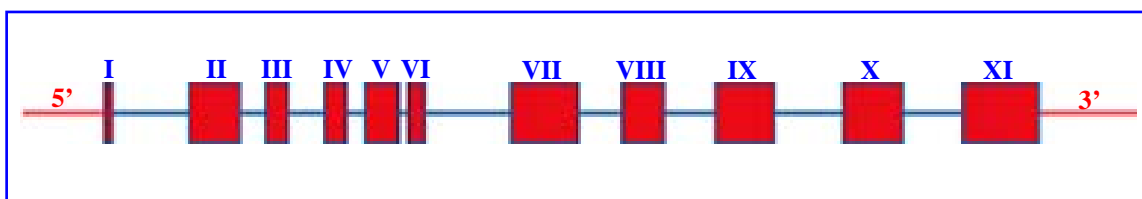


Fig. 29 Struttura del gene *Slc36-a4*.

4.4 Distribuzione tissutale della proteina mediante analisi di RT-PCR

La distribuzione tissutale delle quattro isoforme umane è stata analizzata mediante reazioni di PCR condotte su retrotrascritti umani di RNA totali di vari tessuti (RT-PCR). Nelle reazioni di PCR sono stati utilizzati 200 ng di retrotrascritto. La RT-PCR è stata condotta usando una coppia di *primer* scritti sulla base della sequenza del corrispondente cDNA disponibile in banca dati (descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.2). Tali *primer* sono stati scelti nelle regioni di minor omologia con le altre tre isoforme. Come controllo dell'integrità degli RNA è stata utilizzata la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (G3PDH). I risultati ottenuti mostrano che hPAT1 è presente in tutti i tessuti analizzati, essa è inoltre abbondantemente espressa in cervello seguita da una discreta espressione in intestino tenue, milza e rene. hPAT2 è invece espressa abbondantemente in rene e muscolo scheletrico e in minima quantità in cuore. hPAT3 è esclusivamente espressa in testicoli. hPAT4, come l'isoforma 1, ha una distribuzione ubiquitaria con un maggior livello di espressione in rene e cervello (Fig. 30).

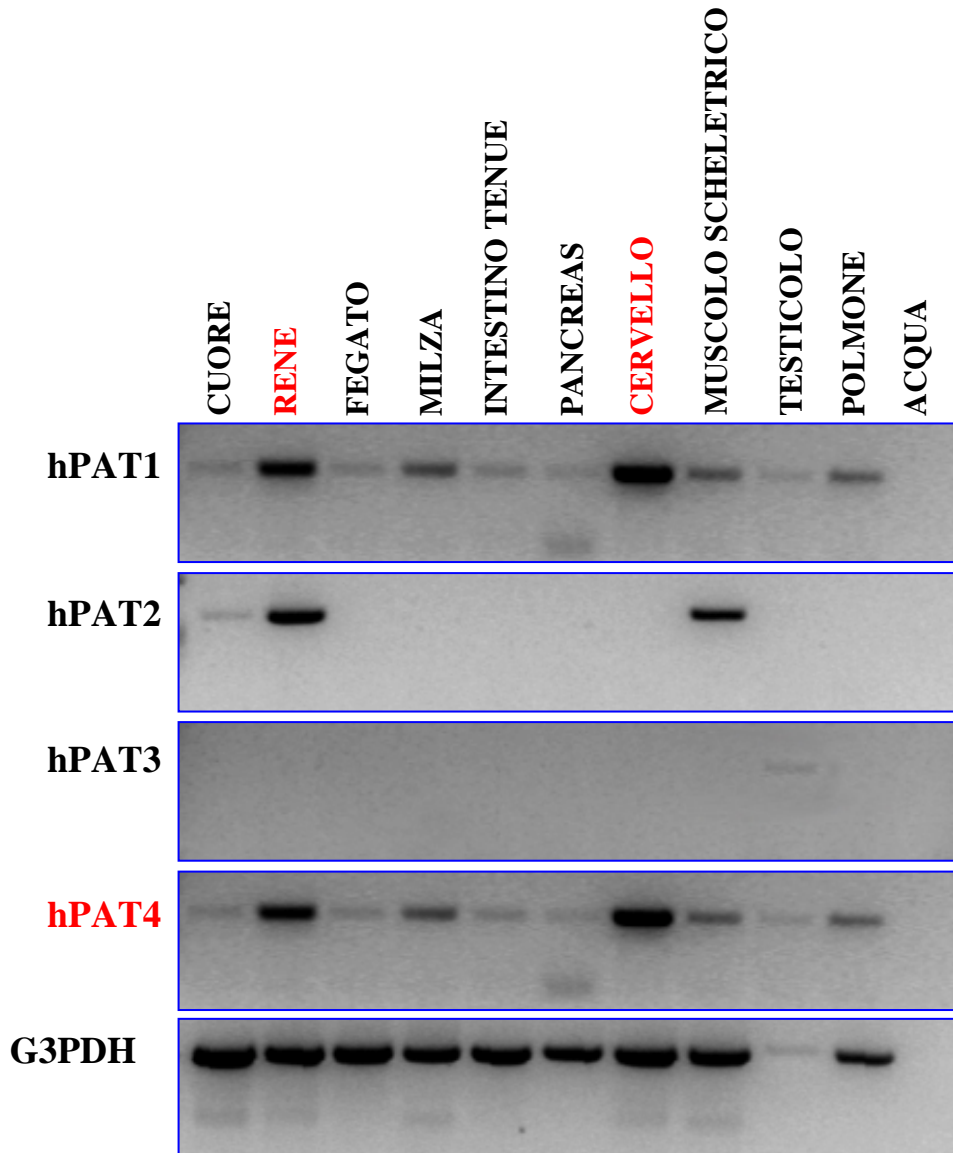


Fig. 30
RT-PCR degli mRNA codificanti per hPAT1-4 e dell'mRNA della G3PDH.

4.5 Amplificazione dei cDNA

Sulla base della sequenza del cDNA di PAT4, presente in banca dati, sono stati costruiti 2 *primer*, *forward* e *reverse* (come descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.3), necessari per la reazione di PCR condotta su cDNA di rene, uno dei due tessuti dove è stata riscontrata maggiore espressione genica.

Al *primer forward*, contenente l'ATG iniziale, è stata aggiunta la sequenza nucleotidica riconosciuta dall'endonucleasi di restrizione *Bam HI* mentre al *reverse* il sito di riconoscimento dell'enzima *Hind III*.

Per verificare l'avvenuta reazione di amplificazione del cDNA di PAT4, un'aliquota del prodotto di PCR è stata caricata su un gel di agarosio all'1%. In figura 31 pannello A, è evidente una banda di amplificazione dell'altezza attesa di 1500 bp, dedotta dal confronto con il *marker 1 kb Ladder* caricato nel pozzetto adiacente.

La sequenza codificante per CIC è stata amplificata a partire dal cDNA, ottenuto dalla retrotrascrizione dell'mRNA di fegato di *anguilla argentina*), utilizzando due *primer*, *forward* e *reverse*, disegnati sulla base dell'ORF (*Open Reading Frame*) disponibile in banca dati (come descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.3).

Al *primer forward*, contenente l'ATG iniziale, è stata aggiunta la sequenza nucleotidica riconosciuta dall'endonucleasi di restrizione *Bam HI* mentre al *reverse* il sito di riconoscimento dell'enzima *Eco RI*.

Per verificare l'avvenuta amplificazione della sequenza nucleotidica codificante per CIC, ancora una volta un'aliquota del prodotto di PCR è stata caricata su un gel di agarosio allo 1% .

In figura 31 pannello B, è evidente una banda di amplificazione dell'altezza attesa di 894 bp, dedotta dal confronto con il *marker 1 kb Ladder* caricato nel pozzetto adiacente.

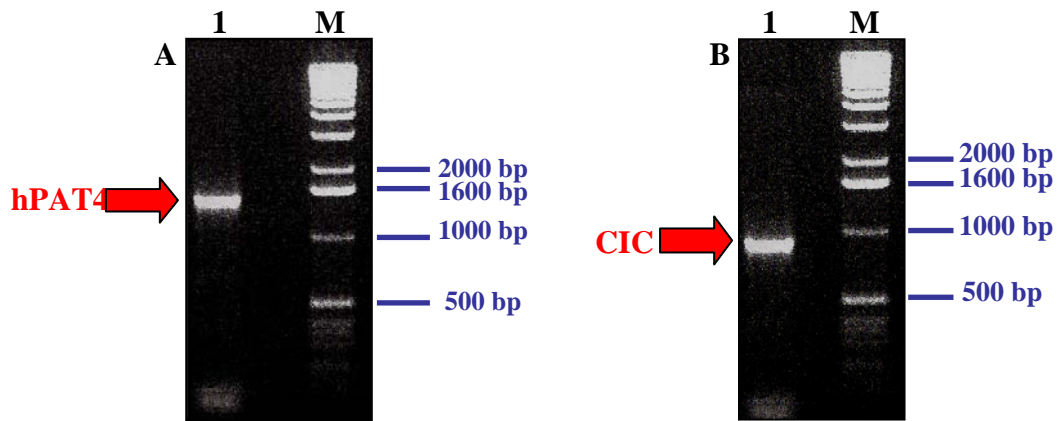


Fig. 31 Elettroforesi su gel di agarosio degli amplificati di PCR.

Pannello A

M: marker 1 *Kb Ladder*.

1: amplificato di PCR del cDNA codificante per la proteina hPAT4.

Pannello B

M: marker 1 *Kb Ladder*.

1: amplificato di PCR del cDNA codificante per la proteina CIC.

4.6 Costruzione dei plasmidi ricombinanti

Il frammento di DNA, codificante per la proteina hPAT4, estratto dal gel è stato digerito con gli enzimi di restrizione *Bam HI* ed *Hind III* e ligato nel vettore di trasferimento pBlueBac4.5/V5-His anch'esso digerito con le stesse endonucleasi. Il plasmide ricombinante ottenuto, pBlueBac-PAT4/V5-His, è stato utilizzato per trasformare cellule di *E. coli* del ceppo TG1 (Fig. 32).

Il frammento di DNA, codificante per la proteina CIC, estratto dal gel è stato digerito con gli enzimi di restrizione *Bam HI* ed *Eco RI* e ligato nel vettore di trasferimento pBlueBac4.5/V5-His anch'esso digerito con le stesse endonucleasi. Il plasmide ricombinante ottenuto, pBlueBac-CIC/V5-His, è stato utilizzato per trasformare cellule di *E. coli* del ceppo TG1.

In figura 32 è riportato una schema generale di ligazione.

Le cellule che hanno ricevuto il plasmide sono state selezionate su piastre contenenti ampicillina.

Per valutare le colonie positive è stata effettuata un'estrazione veloce del DNA plasmidico, sottoposto, successivamente, a corsa elettroforetica su gel di agarosio (risultati non mostrati). Sono state paragonate, quindi, le altezze delle bande e valutati

positivi, cioè plasmidi contenenti realmente l'inserto, quelli la cui banda risultava superiore rispetto a quella del plasmide senza inserto usato come riferimento. I plasmidi ricombinanti, infatti, migrano meno velocemente rispetto al plasmide vuoto (come descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.13).

Da tutte le colonie stimate positive è stato estratto il DNA plasmidico e sottoposto ad analisi di sequenza per verificare la presenza di eventuali mutazioni introdotte durante l'amplificazione del cDNA.

Solo i plasmidi contenenti il cDNA della proteina hPAT4 ed il cDNA codificante per la proteina CIC privi di mutazione sono stati utilizzati per la trasfezione delle cellule di insetto di *Spodoptera frugiperda* della linea cellulare Sf9.

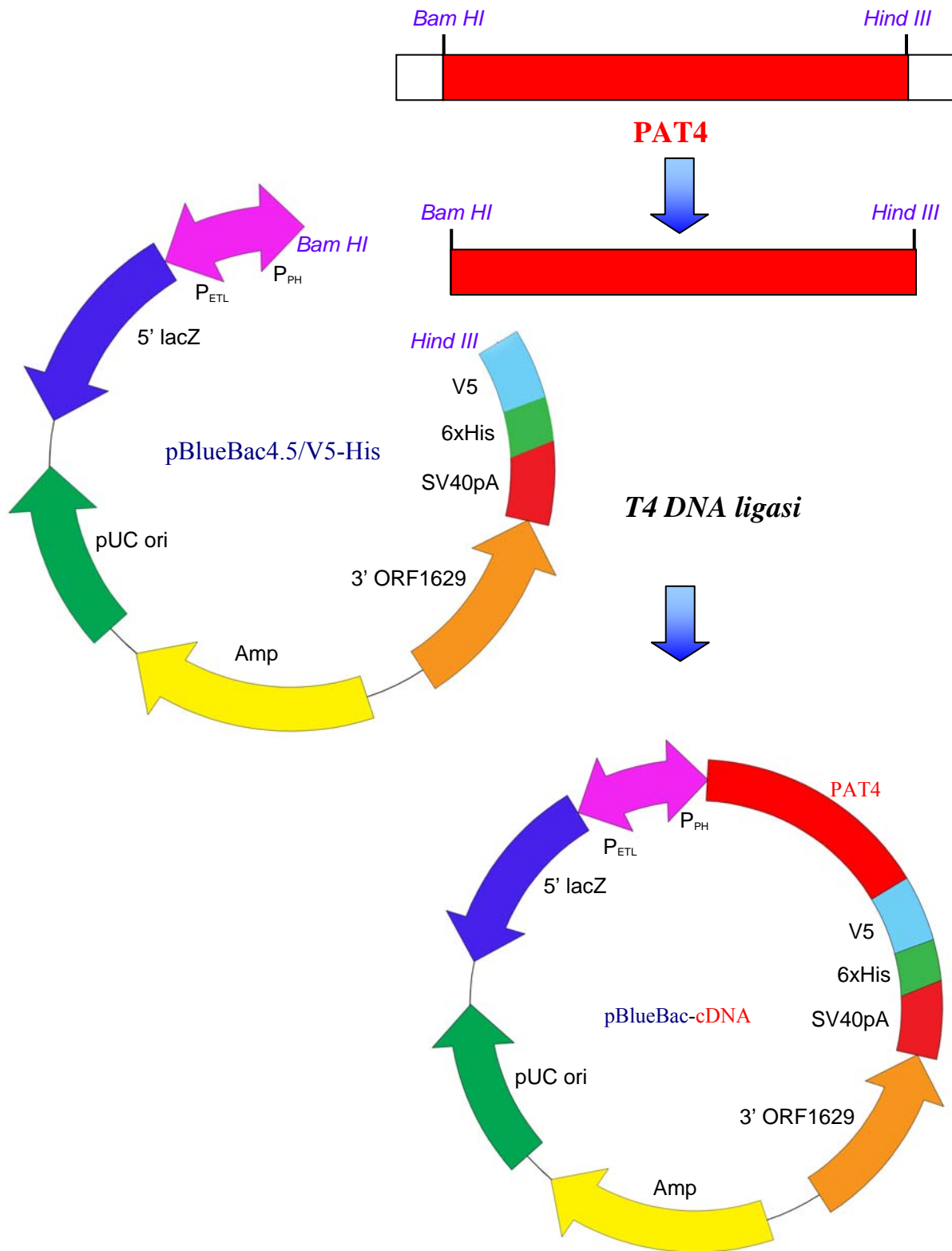


Fig. 32 Schema della reazione di ligazione.

Dopo digestione del plasmide pBlueBac4.5/V5-His e del cDNA da clonare, con l'ausilio dell'enzima *T4 ligasi*, si è ottenuto il plasmide ricombinante pBlueBac-cDNA.

4.7 Produzione del baculovirus ricombinante

I baculovirus ricombinanti PAT4/V5-His e CIC/V5-His sono stati ottenuti per ricombinazione sito specifica tra il DNA virale linearizzato (Bac-N-Blue™ DNA) e i costrutti pBlueBac-PAT4/V5-His e pBlueBac-CIC/V5-His rispettivamente (come descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.17).

Il DNA virale contiene la porzione 5' dell'ORF1629 e la porzione 3' del gene reporter lacZ (come descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.16).

Il vettore ricombinante presenta, invece, la porzione 3' dell'ORF1629 e la porzione 5' del gene reporter lacZ e contiene il cDNA codificante per le proteine di interesse sotto il controllo del promotore forte della poliedrina (come descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.7).

In seguito alla co-trasfezione si verifica la ricombinazione omologa, a livello dell'ORF1629 e del gene lacZ, tra il DNA linearizzato di baculovirus e il costrutto complementare portando all'inserimento del cDNA di hPAT4 o di CIC assieme al promotore, nel locus virale della poliedrina (Fig. 33).

In questa maniera sono stati ottenuti i due virus ricombinanti PAT4/V5-His e CIC/V5-His.

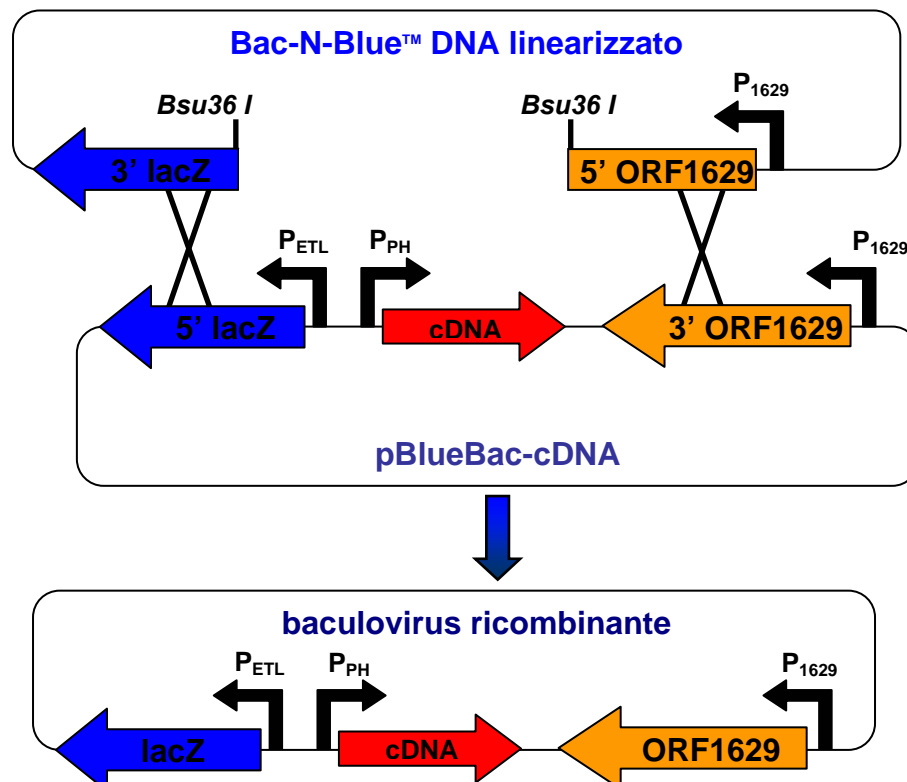


Fig. 33 Ricombinazione omologa tra il Bac-N-Blue™ DNA linearizzato e il costrutto ricombinante

La conseguente ricostituzione dell'*Open Reading Frame* 1629 consente la replicazione del virus ricombinante.

Dopo 3 giorni dalla co-trasfezione è stato recuperato il sovrantante contenente il virus, conservato a 4°C ed analizzato successivamente mediante saggio delle placche.

Le cellule *Sf9*, invece, sono state nuovamente incubate per 48 ore a 27°C con 2 ml di TNM-FH e poi osservate al microscopio ottico a contrasto di fase (Fig. 34).

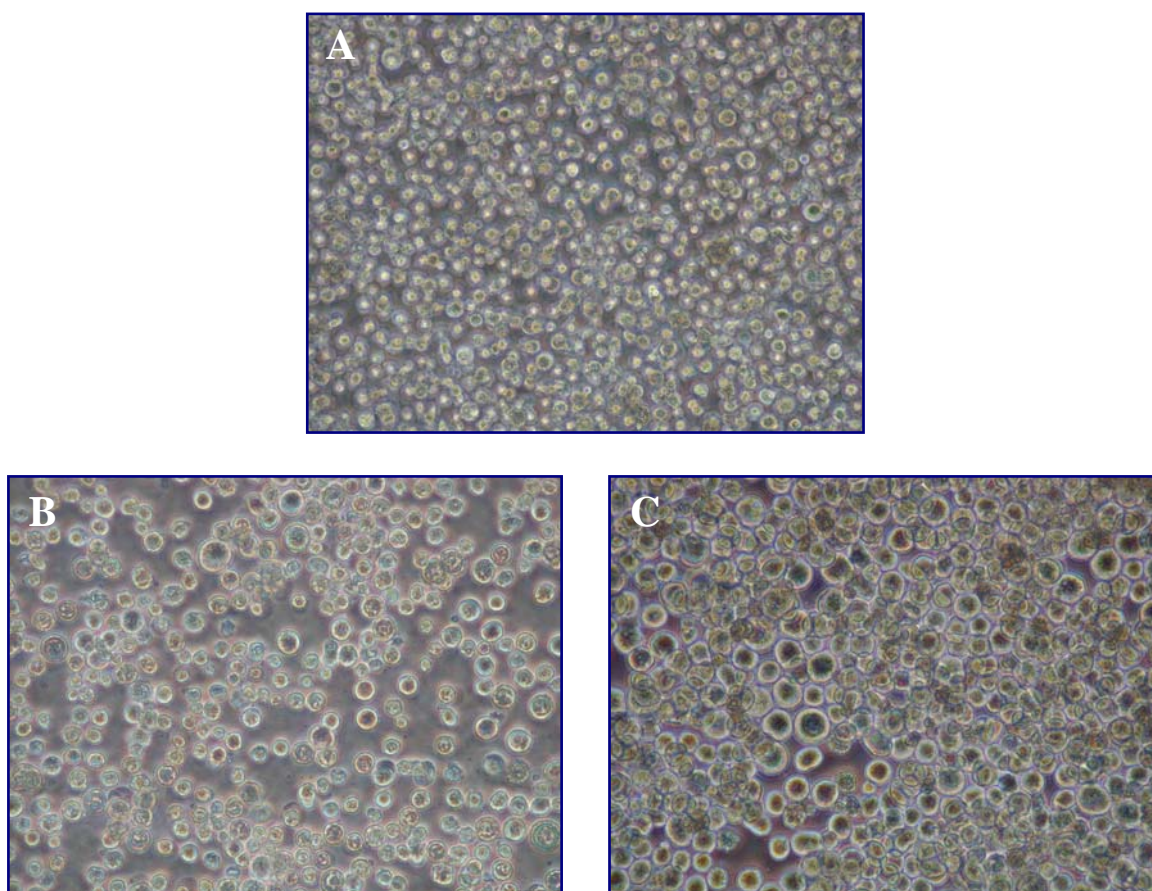


Fig. 34 Cellule di *Spodoptera frugiperda* al microscopio ottico a contrasto di fase (*Nikon eclipse E600*). **Pannello A:** cellule *Sf9* non trasfettate. **Pannello B:** cellule *Sf9* infettate dal baculovirus ricombinante. **Pannello C:** cellule *Sf9* infettate dal baculovirus *wild-type* (Bac-N-Blue™ DNA circolare).

Confrontando cellule *Sf9* di controllo non trasfettate (Fig. 34, pannello 1) e cellule *Sf9* infettate dal baculovirus ricombinante (Fig. 34, pannello 2) sono evidenti i seguenti cambiamenti morfologici:

- aumento del 25-50% del diametro;
- aumento delle dimensioni del nucleo;

- interruzione della crescita;
- presenza di numerosi vacuoli;
- lisi;
- distacco dal fondo della piastrina.

La differente morfologia fornisce, inoltre, un metodo visivo per distinguere le cellule infettate dal virus ricombinante da quelle infettate dal virus *wild-type*. Queste ultime, come mostrato in figura 34, pannello 3, presentano nel nucleo dei corpi scuri di forma poligonale, ovvero virioni incastrati in una matrice proteica cristallina (il cui maggiore componente è la poliedrina) che conferisce loro un aspetto rifrattivo e li protegge dall'ambiente esterno favorendo la replicazione del virus *wild-type* rispetto al virus ricombinante. Questo processo di *screening* è semplificato dal gene *lacZ* che, ricostituitosi in seguito alla ricombinazione omologa, determina, in presenza del substrato cromogeno X-Gal, placche ricombinanti di colore blu, quindi, facilmente visualizzabili.

Esperimenti dello tipo sono stati effettuati utilizzando il virus ricombinante CIC/V5-His.

4.8 Stima del titolo virale attraverso saggio delle placche

Per conoscere la quantità di virus da utilizzare per overesprimere la proteina è necessario determinarne il titolo virale. A tale scopo, cellule *Sf9* sono state infettate con diluizioni seriali di baculovirus ricombinante, da 10^{-2} a 10^{-8} , e ricoperte con un *monolayer* di agarosio all'1% (come descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.18).

Utilizzare una piccola quantità di virus è utile per infettare cellule isolate. Ogni cellula infetta lisa e rilascia virioni che vanno ad infettare le cellule vicine, che a loro volta lisano, producendo dell'altro virus. In questo modo si forma una placca di lisi, che in presenza di X-Gal, appare di colore azzurro (Fig.35).

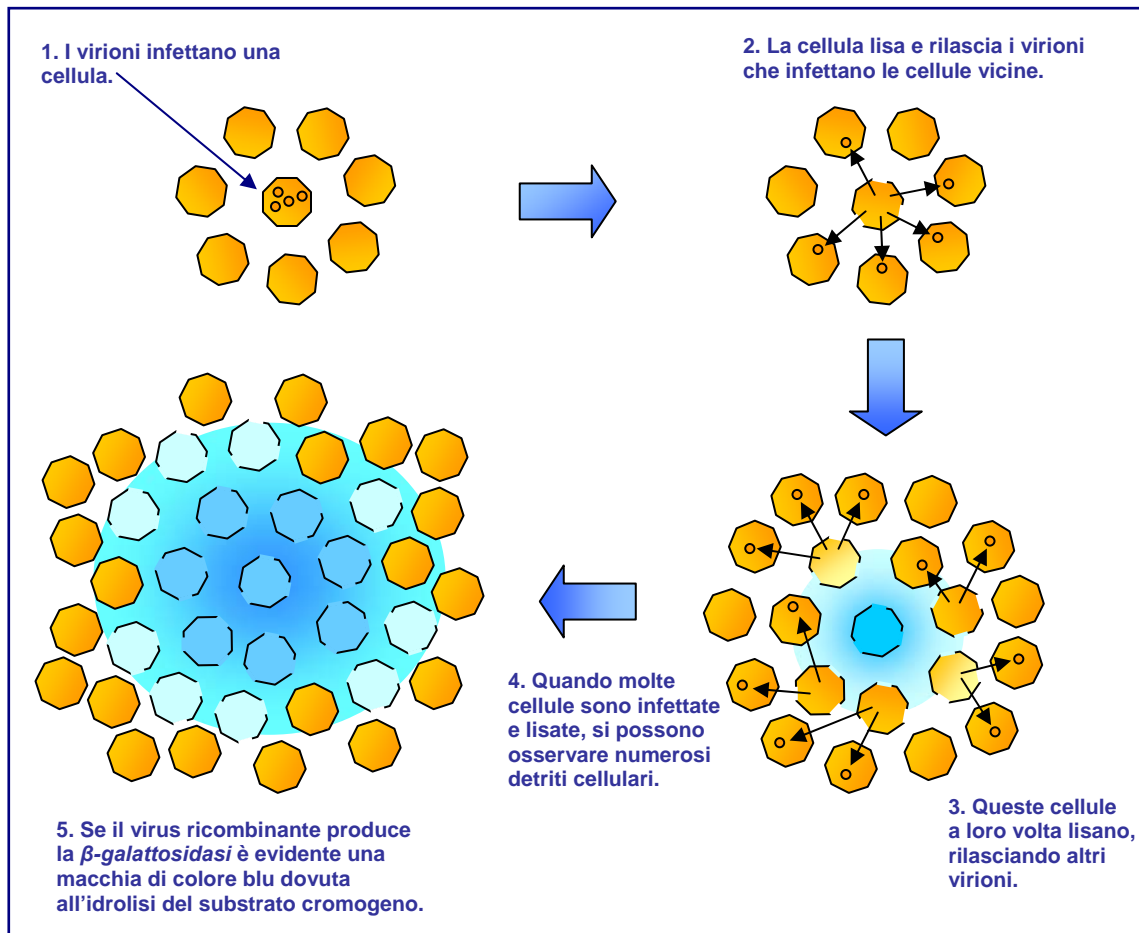


Fig 35 Formazione di una placca virale.

Nel primo saggio effettuato sul baculovirus ricombinate PAT4/V5-His, soltanto le diluizioni virali 10^{-2} e 10^{-3} hanno portato, dopo 6 giorni di incubazione, alla formazione di placche blu. Da esso è stato dedotto un basso titolo virale, dell'ordine di 10^3 . Usando una pipetta *Pasteur* sterile è stato penetrato l'agarosio in modo da rimuovere il *monolayer* di cellule contenente la placca ricombinante, successivamente incubata con cellule *Sf9* fino a completa lisi cellulare (come descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.19). Il sovrinatante recuperato è stato analizzato mediante un nuovo saggio delle placche. Questa volta, dopo 6 giorni di incubazione, è stata riscontrata la formazione di placche blu anche con le diluizioni virali 10^{-4} e 10^{-5} , come mostrato in figura 36 pannelli A e B. In questo modo è stato determinato un nuovo titolo virale dell'ordine di 10^5 . Nella figura 36 pannello C è inoltre evidente l'assenza di placche blu su una piastrina di controllo in cui cellule *Sf9* non sono state infettate con il baculovirus ricombinante, ma solo ricoperte dal *monolayer* di agarosio. Nuove amplificazioni virali e relativi saggi delle placche sono stati effettuati fino al raggiungimento di un titolo

virale di 10^8 , valore normalmente utilizzato per overesprimere le proteine. Questo è il nostro *stock* P-1 da cui, come descritto in *Materiali e Metodi* par.4.21, è stato preparato lo *stock*, in larga scala, ad alto titolo virale P-3.

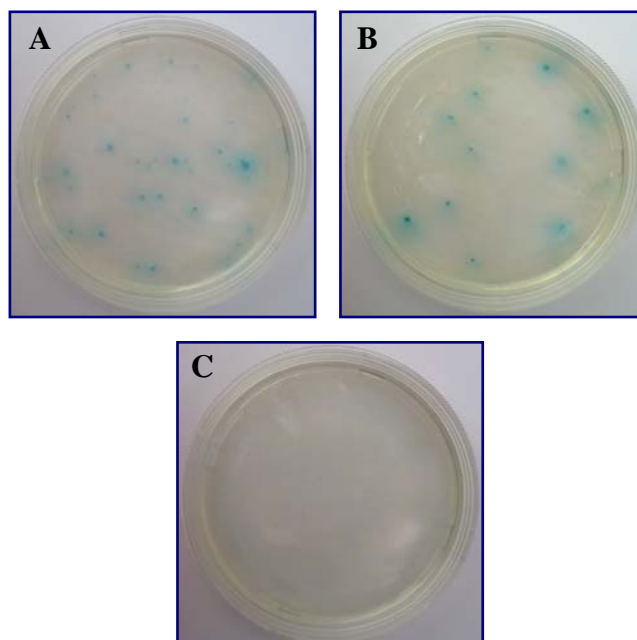


Fig 36 Saggio delle placche.

Pannello A: cellule *Sf9* infettate con baculovirus ricombinante diluito 1:10000.

Pannello B: cellule *Sf9* infettate con baculovirus ricombinante diluito 1:100000.

Pannello C: cellule *Sf9* controllo non infettate.

Esperimenti dello stesso tipo sono stati effettuati utilizzando il virus ricombinante CIC/V5-His, permettendoci di determinare il titolo virale. Attraverso diversi cicli di amplificazione virali e relativi saggi delle placche, anche in questo caso, è stato ottenuto uno *stock* virale P-1 puro, con titolo dell'ordine di 10^8 , da cui, come descritto sopra, per il virus ricombinate PAT4/V5-His, è stato preparato lo *stock*, in larga scala, ad alto titolo virale, P-3.

4.9 Analisi del baculovirus ricombinante mediante PCR

Per verificare che i virus ricombinanti ottenuti, da utilizzare nei successivi studi di espressione, contenessero rispettivamente il gene codificante per le proteine di

interesse e non fossero contaminati da virus *wild-type*, è stato estratto il DNA virale e sottoposto ad analisi di PCR (come descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.20).

Poiché i *primer* utilizzati nelle reazioni di amplificazioni si appaiano alle regioni fiancheggianti il *locus* della poliedrina, se viene amplificato il DNA *wild-type* si ottiene un frammento di 839 bp, mentre se viene amplificato il DNA virale ricombinante si ottiene un frammento di maggiori dimensioni, 2000 bp. Quest'ultimo è dato, infatti, dalla somma tra il cDNA codificante per la proteina in esame e la porzione del plasmide che si è inserita per ricombinazione omologa nel genoma del baculovirus, avente peso molecolare di 525 bp.

In un primo esperimento è stato amplificato il DNA virale ricombinante codificante la proteina PAT4/V5-His. Gli amplificati ottenuti sono stati analizzati su gel di agarosio all'1% e i risultati sono mostrati in figura 37. Abbiamo sottoposto ad analisi di PCR sia il virus con titolo virale di 10^3 (linea 1) che quello di 10^8 (linea 2). Le due bande a diversa intensità, visibili in linea 1, stanno ad indicare che vi è una combinazione di virus ricombinante (2000 bp) e di più abbondante virus *wild-type* (839 bp). In linea 2, invece, è evidente solo la banda del peso molecolare di 2000 bp, corrispondente al baculovirus ricombinante. Questo risultato sottolinea come successivi saggi delle placche ed infezioni in cellule *Sf9* abbiano portato ad ottenere il virus ricombinante puro e con un elevato il titolo.

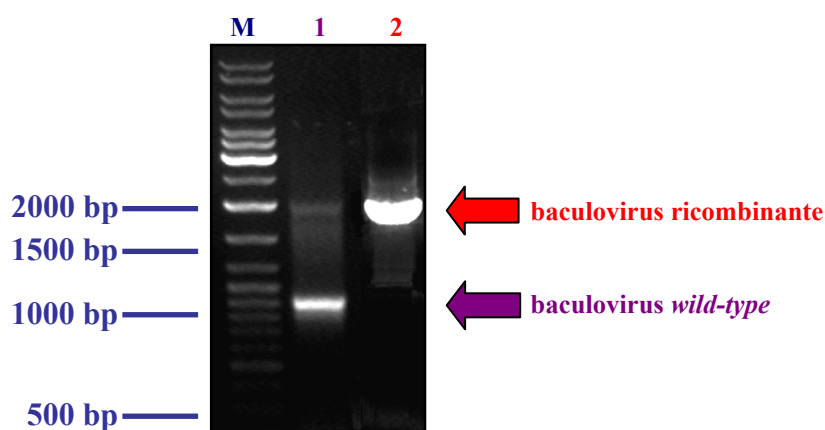


Fig. 37 Elettroforesi su gel di agarosio del DNA virale PAT4/V5-His.

M: marker 1 kb Ladder.

Linea 1: amplificato del DNA estratto dal baculovirus ricombinante PAT4/V5-His con un titolo virale di 10^3
 Linea 2: amplificato del DNA estratto dal baculovirus ricombinante PAT4/V5-His con un titolo virale di 10^8

In un secondo esperimento è stato amplificato il DNA virale ricombinante codificante la nostra proteina di controllo CIC/V5-His.

Nell'analisi del baculovirus ricombinante CIC/V5-His, qualora venisse amplificato il DNA virale ricombinante si otterrebbe un frammento di 1419 bp dato dalla somma della sequenza codificante per CIC, 894 bp, e della porzione del plasmide di 525 bp che si è inserita per ricombinazione omologa nel genoma del baculovirus. Gli amplificati ottenuti sono stati caricati su un gel di agarosio all'1% e i risultati sono mostrati in figura 38, (linea 1 amplificati relativi al DNA virale con basso titolo, 10^4 ; linea 2 amplificati relativi al DNA virale con titolo 10^8).

Le due bande a diversa intensità, in linea 1, indicano una contaminazione del virus ricombinante (1419 bp) da parte del virus *wild-type* (839 bp). In linea 2, invece, è visibile solo la banda del peso molecolare di 1419 bp, corrispondente al baculovirus ricombinante, che sottolinea, ancora una volta, come successivi saggi delle placche ed infezioni in cellule *Sf9* abbiano portato ad amplificare il virus ricombinante a discapito di quello *wild-type*, permettendo, inoltre, di aumentare il titolo virale.

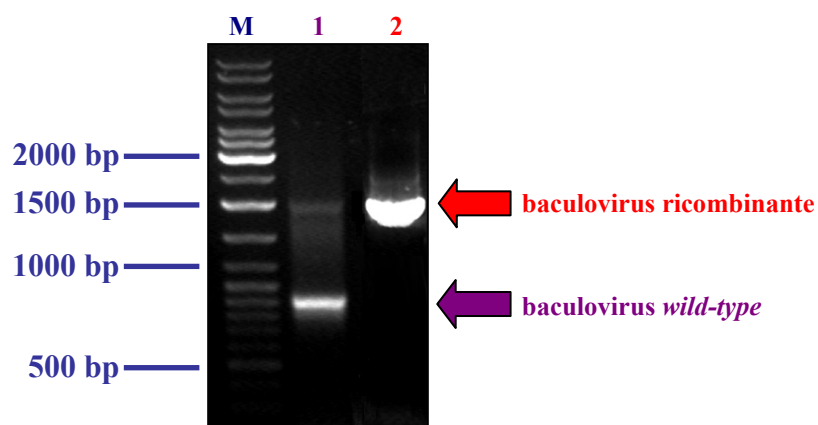


Fig. 38 Elettroforesi su gel di agarosio del DNA virale CIC/V5-His

M: marker 1 kb Ladder.

Linea 1: amplificato del DNA estratto dal baculovirus ricombinante CIC/V5-His con un titolo virale di 10^3

Linea 2: amplificato del DNA estratto dal baculovirus ricombinante CIC/V5-His con un titolo virale di 10^8 .

4.10 Studi di espressione delle proteine ricombinanti

4.10.1 SDS-PAGE ed analisi di Western blot

Per verificare, in via preliminare, l'espressione delle proteine hPAT4/V5-His e CIC/V5-His, cellule *Sf9* sono state infettate rispettivamente con il baculovirus ricombinante PAT4/V5-His e CIC/V5-His (MOI 5, il più basso raccomandato per

l'overespressione proteica, come descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.22); cellule *Sf9* non infette sono state utilizzate come controllo. Dopo 72 ore dall'infezione, le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione e lisate con SDS al 10%. I lisati cellulari ottenuti sono stati analizzati mediante SDS-PAGE. In figura 39 pannello A, sono riportati i pattern proteici relativi ai lisati cellulari ottenuti da cellule *Sf9* non infette (linea 1) e da cellule *Sf9* infette con il baculovirus ricombinante hPAT4/V5-His (linea 2). In nessuno dei due lisati è evidente l'espressione della proteina hPAT4/V5-His. Gli stessi campioni, pertanto, sono stati sottoposti ad analisi di *Western Blot* ed immunodecorati con l' anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo V5, sequenza eterologa di 14 amminoacidi fusa alla regione C-terminale della proteina in esame. Come mostrato in figura 39, pannello B, solo nel lisato ottenuto da cellule infette è evidente una banda di espressione del peso molecolare apparente di 58 kDa, che corrisponde alla proteina ricombinante hPAT4/V5-His.

La colorazione del gel con *Coomassie Brilliant Blue* non consente, infatti, di apprezzare l'espressione di hPAT4/V5-His perché la sua quantità è percentualmente molto piccola rispetto a tutte le proteine presenti nei lisati cellulari; per poterla evidenziare è, dunque, necessario un metodo più sensibile come l'analisi di *Western blot*.

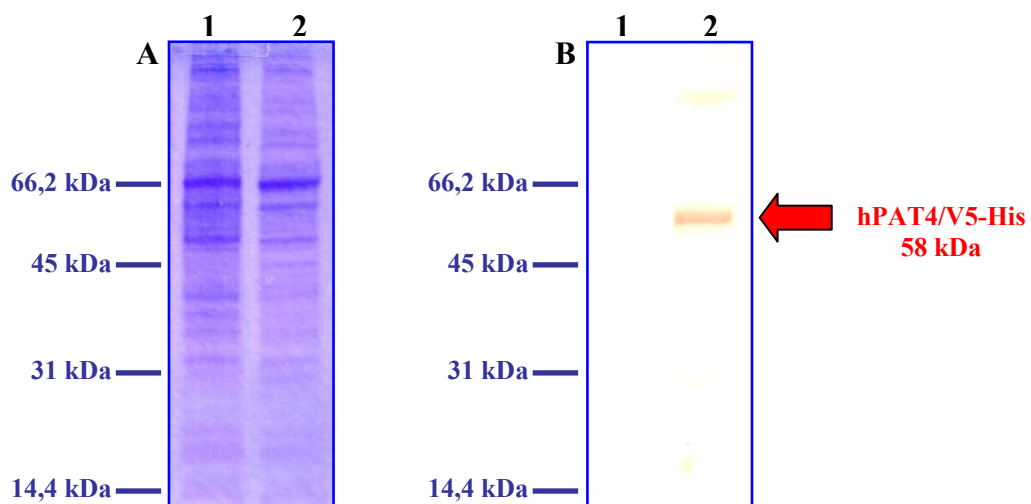


Fig 39

Pannello A: SDS-PAGE dei lisati cellulari ottenuti da cellule *Sf9* controllo ed infette.

Colorazione con *Coomassie Brilliant Blue*.

1: lisato cellulare di cellule *Sf9* non infette

2: lisato cellulare di cellule *Sf9* infette con il virus ricombinante PAT4/V5-His.

Pannello B: analisi di *Western blot* dei lisati cellulari ottenuti da *Sf9* controllo ed infette.

Immunodecorazione con l'anticorpo anti-V5 (1:5000).

1: lisato cellulare di cellule *Sf9* non infette

2: lisato cellulare di cellule *Sf9* infette con il virus ricombinante PAT4/V5-His.

Anche l'espressione della proteina CIC/V5-His è stata evidenziata solo mediante analisi di *Western blot*.

In figura 40 pannello A, sono visibili i lisati cellulari ottenuti da cellule *Sf9* non infettate, e quelli relativi a cellule *Sf9* infettate con il baculovirus ricombinante CIC/V5-His, sottoposti ad SDS-PAGE. Anche in questo caso la colorazione con *Coomassie Brilliant Blue* non ha consentito di apprezzare l'espressione della proteina CIC/V5-His perché la sua quantità è percentualmente molto piccola rispetto a tutte le proteine presenti nei lisati cellulari. Anche in questo caso, pertanto, gli stessi campioni sono stati quindi, nuovamente, immunodecorati con anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo V5. Come mostrato in figura 40, pannello B, solo nel lisato ottenuto da cellule infette è evidente una banda di espressione del peso molecolare apparente di 34 kDa, che corrisponde alla proteina ricombinante CIC/V5-His.

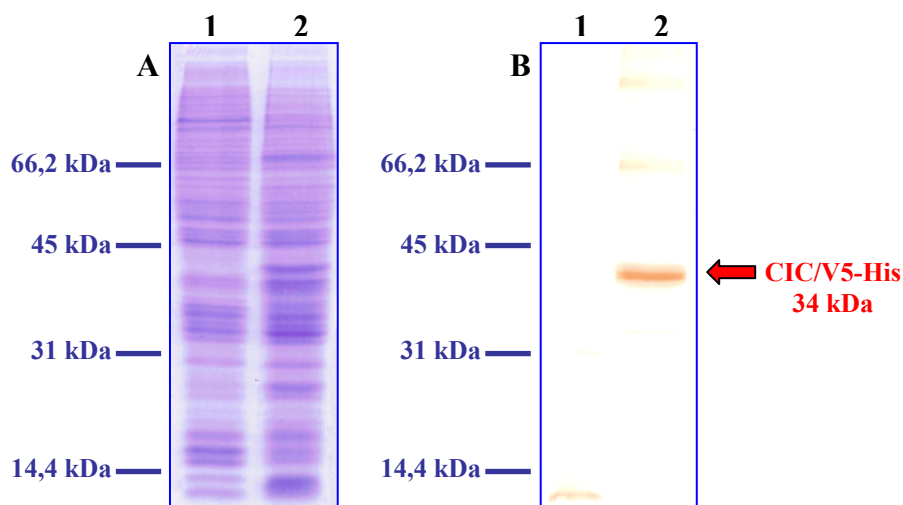


Fig 40

Pannello A: SDS-PAGE dei lisati cellulari ottenuti da cellule *Sf9* controllo ed infette con CIC/V5-His.

Colorazione con *Coomassie Brilliant Blue*.

1: lisato cellulare di cellule *Sf9* non infette

2: lisato cellulare di cellule *Sf9* infettate con il virus ricombinante CIC/V5-His.

Pannello B: relativa analisi di *Western blot*.

Immunodecorazione con l'anticorpo anti-V5 (1:5000).

1: lisato cellulare di cellule *Sf9* non infette

2: lisato cellulare di cellule *Sf9* infettate con il virus ricombinante CIC/V5-His.

4.10.2 Analisi di immunofluorescenza indiretta

Per un'ulteriore conferma dell'avvenuta espressione proteica, sono stati condotti esperimenti di immunofluorescenza indiretta (come descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.23) sia su cellule *Sf9* infettate con baculovirus ricombinante che su cellule *Sf9* non infette, utilizzate come controllo.

Nell'immunofluorescenza indiretta un anticorpo non marcato si lega all'antigene, di cui si vuole evidenziare la presenza, e si ha la formazione di un complesso antigene-anticorpo. A questo complesso si lega, a sua volta, un anticorpo secondario marcato con sostanze fluorescenti (fluorofori o fluorocromi). Il complesso ternario formatosi può essere osservato al microscopio a fluorescenza. In questo esperimento, è stato utilizzato l'isotiocianato di tetrametilrodamina (TRITC), fluorocromo che assorbe a 550 nm ed emette fluorescenza a 580 nm, nella regione rosso-arancio.

A tale scopo due diverse colture di cellule *Sf9* sono state infettate rispettivamente con il baculovirus ricombinante PAT4/V5-His e CIC/V5-His, entrambi con MOI 5 (par.4.22). Dopo 48 ore dall'infezione le cellule, fissate e permeabilizzate, sono state incubate con l'anticorpo primario monoclonale anti-V5, diretto contro l'epitopo V5. La successiva incubazione con un anticorpo secondario anti-mouse, TRITC-coniugato, ha consentito la rilevazione della proteina di interesse al microscopio a fluorescenza, confermandone l'espressione nelle cellule di insetto (Fig. 41 pannello A e B rispettivamente). Al contrario, in cellule *Sf9* non infettate non è stata rilevata alcuna fluorescenza (risultato non mostrato). L'integrità strutturale delle cellule è stata monitorata mediante microscopia a contrasto di fase (Fig. 41, pannello C).

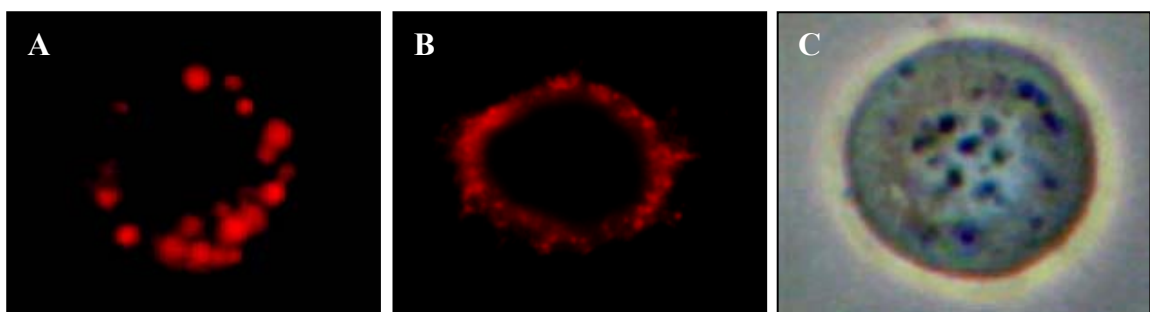


Fig. 41 Espressione delle proteine ricombinanti in cellule di *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*). L'espressione in cellule *Sf9* è stata analizzata mediante immunofluorescenza. La rivelazione è stata effettuata con l'anticorpo anti-V5 e l'anticorpo secondario anti-mouse TRITC-coniugato (fluorescenza rossa).

Pannello A: cellule *Sf9* infettate con baculovirus ricombinante PAT4/V5-His.

Pannello B: cellule *Sf9* infettate con baculovirus ricombinante CIC/V5-His.

Pannello C: contrasto di fase (DIC: *differential interference contrast*).

4.11 Localizzazione subcellulare in cellule Sf9

Per confermare che le proteine in esame, espresse in cellule Sf9, mantenessero nel nuovo sistema eterologo la loro distribuzione nativa, sono stati condotti studi di localizzazione subcellulare tramite tecniche di immunofluorescenza indiretta e di fluorescenza diretta. In questo esperimento, per la prima, è stato utilizzato un anticorpo secondario coniugato al fluorocromo IsoTioCianato di Fluoresceina (FITC) che subisce la massima eccitazione a 490 nm e dà la massima emissione a 517 nm, emettendo una fluorescenza verde.

Per la seconda, sono stati utilizzati marcatori fluorescenti organello-specifico: il *LysoTracker Red DND-99*, il *Mitotraker Red CMXRos* ed il *DAPI*.

Il *LysoTracker Red DND-99*, che assorbe ad un valore λ di 577 ed emette fluorescenza a 589 nm, è un fluorocromo rosso-arancio legato ad una base debole, solo parzialmente protonata a pH neutro. Il *LysoTracker* può, perciò, permeare liberamente la membrana ed entrare negli organelli sferici acidi, quali i lisosomi. Una volta all'interno, viene protonato dall'ambiente acido e trattenuto, poiché la carica positiva acquisita non ne permette l'ulteriore passaggio attraverso la membrana. La colorazione con il *LysoTracker* è, dunque, irreversibile. Inoltre sono stati effettuati esperimenti utilizzando il colorante DAPI (massimo di eccitazione: 340 nm; massimo di emissione: 488 nm) è un composto che si lega preferenzialmente alle basi AT del DNA conferendo una colorazione blu ai nuclei cellulari.

Due diverse colture di cellule Sf9, cresciute su *coverslip*, sono state infettate, per 48 ore, con il baculovirus ricombinante PAT4/V5-His (MOI 5), quindi incubate rispettivamente con *LysoTracker* 75 nM per 30 minuti e con il DAPI per 5 minuti. Entrambi i *coverslips* sono stati trattati con formaldeide, allo scopo di fissare le cellule, queste ultime sono state poi permeabilizzate poi con Triton X-100, marcate con l'anticorpo primario monoclonale, anti-V5 e con uno secondario anti-mouse FITC-coniugato. Infine le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza.

I risultati ottenuti sono riportati in figura 42. Nei pannelli A e D la fluorescenza verde dovuta alla fluoresceina isotiocianato coniugata all'anticorpo secondario rivela l'espressione della proteina hPAT4/V5-His, nel pannello B la fluorescenza rossa, emessa dal *LysoTracker* evidenzia i lisosomi, nel pannello E il DAPI conferisce un colore azzurro ai nuclei. Nei pannelli C ed F è evidenziata l'*overlay* delle immagini.

Solo nel pannello C e non in quello F si ha una completa sovrapposizione delle immagini che conferma una localizzazione esclusivamente lisosomiale della proteina oggetto di studio.

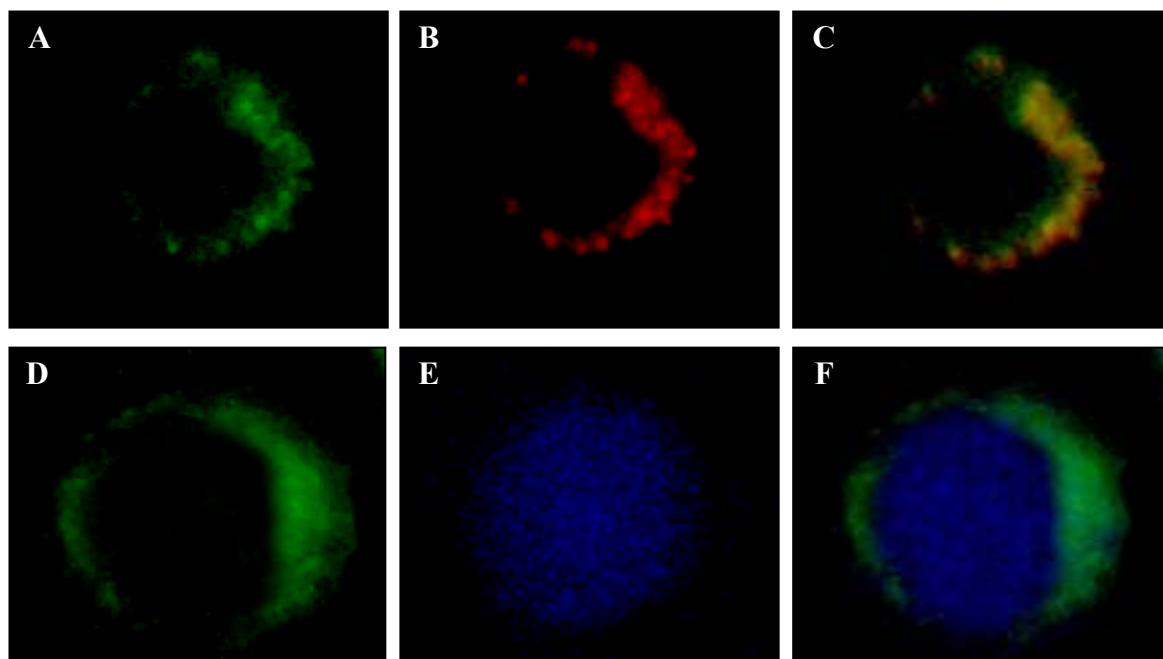


Fig. 42 Localizzazione subcellulare mediante immunofluorescenza indiretta e fluorescenza diretta.
Pannello A, D: Cellule *Sf9* infette con PAT4/V5-His marcate con un anticorpo anti-mouse FITC-coniugato.
Pannello B: Cellule *Sf9* infette marcate con *LisoTracker*.
Pannello C: *Overlay* di A e B.
Pannello E: Cellule *Sf9* infette marcate con DAPI.
Pannello F: *Overlay* di D ed E.

Esperimenti analoghi sono stati effettuati per la localizzazione della proteina CIC, ma in questo caso come colorante specifico del *network* mitocondriale è stato usato il *Mitotraker Red CMXRos* (massimo di eccitazione: 579 nm; massimo di emissione: 599 nm), fluorocromo rosso-arancio che legandosi ai lipidi colora la membrana mitocondriale. Come colorante nucleare è stato utilizzato ancora una volta il DAPI.

I risultati ottenuti sono riportati in figura 43. Nei pannelli A e D la fluorescenza verde dovuta alla Fluoresceina Isotiocianato coniugata all'anticorpo secondario rivela l'espressione di CIC/V5-His, nel pannello B la fluorescenza rossa, emessa dal *Mitotraker*, consente di visualizzare i mitocondri, mentre nel pannello E il DAPI conferisce un colore azzurro ai nuclei. Sovrapponendo le immagini, solo nel pannello C,

e non in quello F le colorazioni coincidono confermando la localizzazione esclusivamente mitocondriale della proteina oggetto di studio.

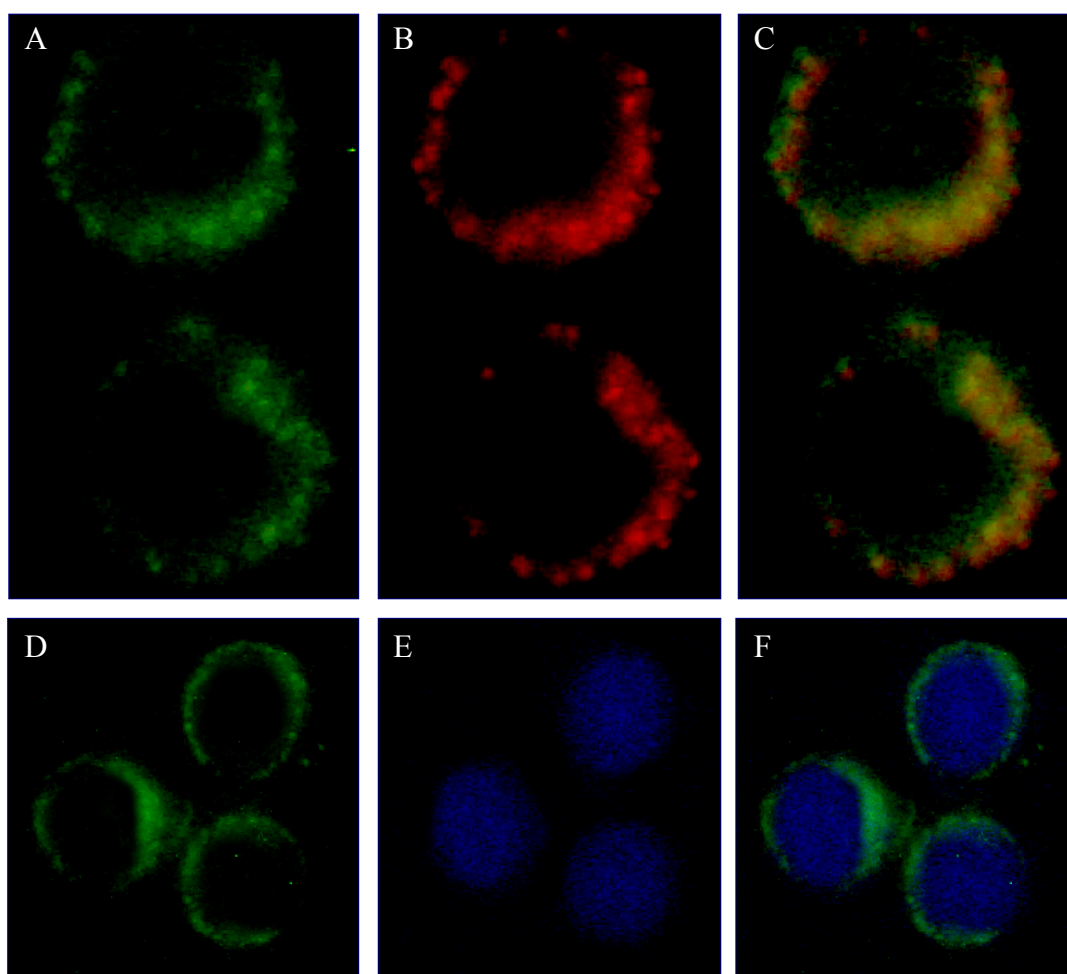


Fig. 43 Localizzazione subcellulare mediante immunofluorescenza indiretta e fluorescenza diretta.

Pannello A, D: Cellule *Sf9* infette con CIC/V5-His marcate con un anticorpo anti-mouse FITC-coniugato.

Pannello B: Cellule *Sf9* infette marcate con *MitoTracker*.

Pannello C: *Overlay* di A e B.

Pannello E: Cellule *Sf9* infette marcate con DAPI.

Pannello F: *Overlay* di D ed E.

Questi esperimenti di microscopia hanno, quindi, confermato l'avvenuta espressione della proteina hPAT4/V5-His e della proteina CIC/V5-His, in cellule di insetto della linea cellulare *Sf9*, a livello lisosomiale e mitocondriale rispettivamente.

A questo punto si è proceduto all'estrazione dei lisosomi e dei mitocondri (par. 4.25) da cellule infettate con i due diversi virus ricombinante e da cellule non infettate, usate come controllo.

I lisati lisosomiali sono stati sottoposti ad SDS-PAGE e colorati con *Coomassie Brilliant Blue*. In figura 44 pannello A, è mostrato il gel di poliacrilammide dei lisati ottenuti da cellule infettate con PAT4/V5-His (linea 2) e da cellule non infettate (linea 1). Analogamente a quanto osservato per i lisati cellulari, anche in questo caso, i *pattern* proteici non hanno evidenziato alcuna differenza. Solo l'analisi di *Western blot* utilizzando l'anticorpo diretto contro l'epitopo V5, figura 44 pannello B, ha evidenziato una banda di immunodecorazione del peso molecolare di circa 58 kDa, corrispondente alla proteina hPAT4/V5-His, nell'estratto lisosomiale delle cellule *Sf9* infettate (linea 2). Non è stata evidenziata la presenza di proteina nei lisati lisosomiali di cellule non infettate (linea 1).

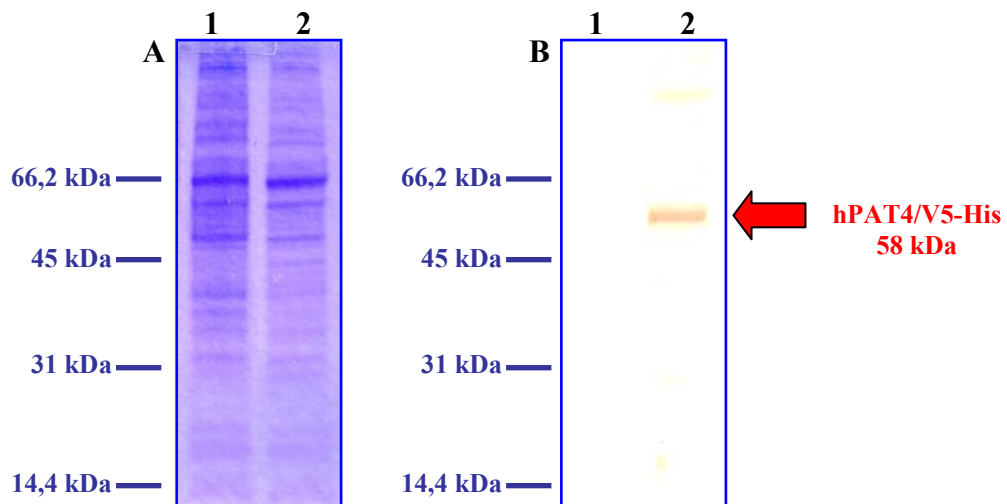


Fig 44

Pannello A: SDS-PAGE dei lisati lisosomiali ottenuti da *Sf9* controllo ed infette con PAT4/V5-His. Colorazione con *Coomassie Brilliant Blue*.

1: lisato cellulare di cellule *Sf9* non infette

2: lisato cellulare di cellule *Sf9* infettate con il virus ricombinante PAT4/V5-His.

Pannello B: analisi di *Western blot* dei lisati cellulari ottenuti da *Sf9* controllo ed infette.

Immunodecorazione con l'anticorpo anti-V5 (1:6000).

1: lisato cellulare di cellule *Sf9* non infette

2: lisato cellulare di cellule *Sf9* infettate con il virus ricombinante PAT4/V5-His.

Anche nel caso dei lisati mitocondriali di cellule *Sf9* infettate con il baculovirus ricombinante CIC/V5-His è stato possibile evidenziare l'espressione della proteina solo mediante analisi di *Western blot* (figura 45 pannello B, linea 2). I lisati mitocondriali di cellule *Sf9* infettate e non, sottoposti ad SDS-PAGE avevano infatti rivelato un *pattern* proteico paragonabile, (figura 45 pannello A , linee 2 ed 1 rispettivamente).

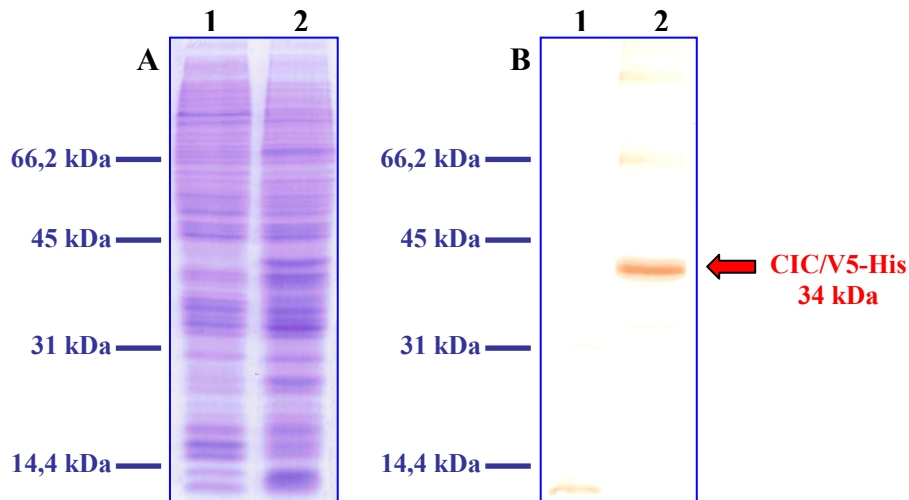


Fig 45

Pannello A: SDS-PAGE dei lisati mitocondriali ottenuti da *Sf9* controllo ed infette con CIC/V5-His.

Colorazione con *Coomassie Brilliant Blue*.

1: lisato mitocondriale di cellule *Sf9* non infette

2: lisato mitocondriale di cellule *Sf9* infettate con il virus ricombinante CIC/V5-His.

Pannello B: relativa analisi di *Western blot*.

Immunodecorazione con l'anticorpo anti-V5 (1:6000).

1: lisato mitocondriale di cellule *Sf9* non infette

2: lisato mitocondriale di cellule *Sf9* infettate con il virus ricombinante CIC/V5-His.

4.12 Determinazione delle condizioni ottimali di espressione proteica

Prima di procedere all'overespressione della proteina di interesse in grandi quantità è opportuno stabilire le condizioni ottimali di infezione.

Pertanto cellule *Sf9* sono state infettate con il baculovirus ricombinante PAT4/V5-His da 0 a 120 ore con una molteplicità di infezione di 5, 7 e 10. Da ogni prova sono stati recuperati e lisati i lisosomi; i campioni ottenuti sono stati sottoposti ad analisi di *Western Blot*.

La membrana di nitrocellulosa ottenuta relativa ai campioni recuperati dalle cellule infettate con il baculovirus ricombinante PAT4/V5-His è riportata in figura 46 pannello A.

Dall'analisi della membrana di nitrocellulosa, non è possibile evidenziare alcuna banda di espressione nelle linee 1-6 corrispondenti agli estratti lisosomiali di cellule *Sf9* a 0 e a 24 ore dall'infezione. Dopo 48 ore di infezione le bande di espressione ottenute, con i tre MOI testati, sono di lieve intensità (linee 7-8-9). Ciò, probabilmente, si verifica perché una piccola quantità di virus ed il ridotto tempo di

incubazione non consentono un'espressione sincrona della proteina in tutte le cellule. A 96 ore dopo l'infezione (linee 13-14-15) si osservano, invece, bande di maggiore intensità, più intense anche rispetto a quelle relative alle 120 ore di infezione (linee 16-17-18), senza distinzione di MOI. Una quantità eccessiva di virus e un tempo prolungato di infezione conducono, infatti, alla lisi delle cellule prima che la proteina di interesse si possa accumulare. Dall'indagine è, invece, emerso che per un'ottimale overespressione di hPAT4/V5-His è opportuno infettare le cellule *Sf9* per 72 ore con una molteplicità di infezione 10 (linee 10-11-12). Questa prima stima soggettiva è stata confermata dall'analisi densitometrica della membrana di nitrocellulosa.

Tale indagine è stata effettuata esprimendo in percentuale i valori di intensità delle bande ottenute dopo lettura densitometrica, per ogni MOI e riportandoli in un grafico, in funzione del tempo di infezione (figura 46 pannello B).

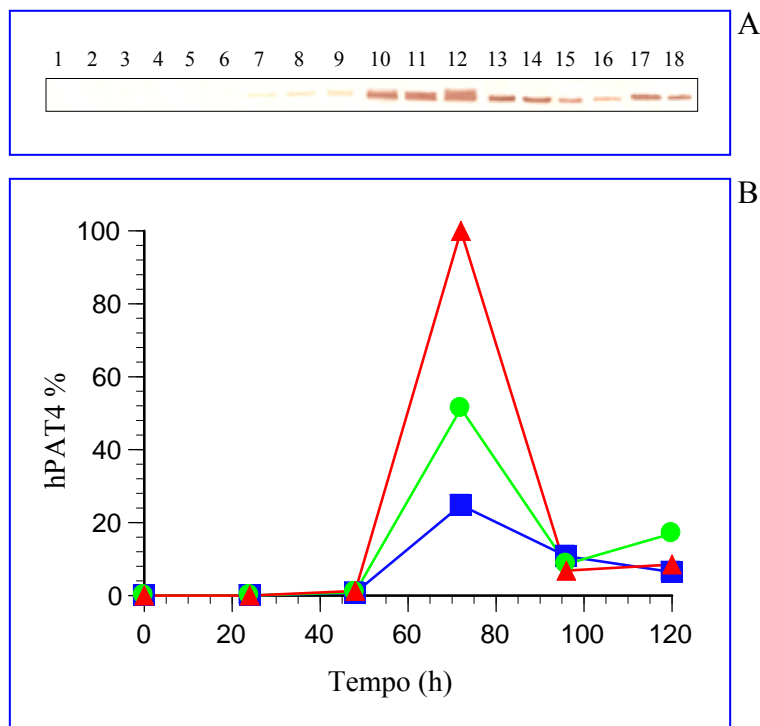


Fig. 46 Time course per l'overespressione ottimale della proteina ricombinante hPAT4/V5-His.

Pannello A) Analisi quantitativa in lisati lisosomiali della proteina ricombinante ottenuta infettando cellule *Sf9* a differenti tempi e differenti MOI. Linea 1-3: MOI 5, 7, 10 – 0 h. Linea 4-6: MOI 5, 7, 10 – 24 h. Linea 7-9: MOI 5, 7, 10 – 48 h. Linea 10-12: MOI 5, 7, 10 – 72 h. Linea 13-15: MOI 5, 7, 10 – 96 h. Linea 16-18: MOI 5, 7, 10 – 120 h.

Pannello B) Corrispondente analisi densitometrica. ▲ MOI 10. ● MOI 7 ■ MOI 5.

Per avere ulteriore conferma del MOI e del tempo da utilizzare per ottenere un'overespressione della proteina sono stati effettuati esperimenti di

immunofluorescenza indiretta. Pertanto, cellule *Sf9* sono state infettate per 72 ore, a tutti e tre i MOI (5, 7, 10) e dopo fissazione e permeabilizzazione, sono state incubate con l'anticorpo primario monoclonale anti-V5 e successivamente con un anticorpo secondario anti-mouse TRITC-coniugato. I risultati ottenuti (Fig. 47, pannello A) hanno permesso di valutare la percentuale di infezione, come numero di cellule fluorescenti sul totale di cellule osservate a contrasto di fase. Il valore ottenuto è stato riportato, sul grafico in figura 47 pannello B, in funzione del valore della molteplicità di infezione. Ancora una volta è stato dimostrato che per ottenere una quantità ottimale di proteina espressa occorre lavorare con un molteplicità di infezione pari a 10.

Inaspettatamente risultati paragonabili sono stati ottenuti da esperimenti dello stesso tipo utilizzando il baculovirus ricombinante CIC/V5-His. Anche per questo virus è stato valutato che per avere l'overespressione della proteina è necessario utilizzare una molteplicità di infezione pari a 10 (MOI 10).

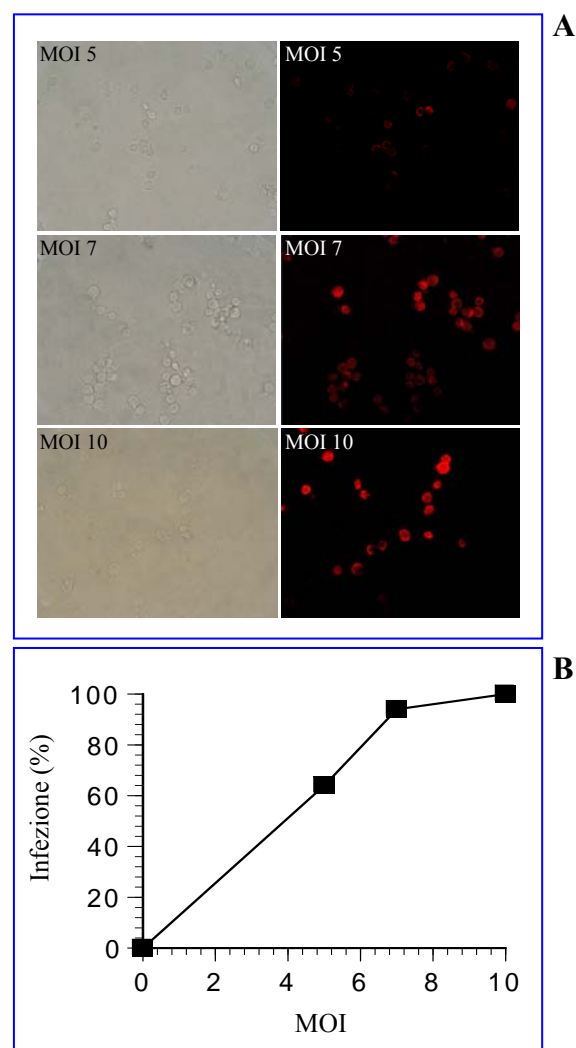


Fig. 47 Analisi quantitative della relazione tra il MOI e il numero di cellule

Pannello A: Cellule *Sf9* infettate con PAT4/V5-His al MOI indicato sono state fissate a 72 h post-infezione e soggette ad immunofluorescenza.

Pannello B: Relazione tra il MOI e la percentuale d'infezione [(numero di cellule colorate/numero di cellule totali) x 100].

4.13 Solubilizzazione delle proteine ricombinanti

Per poter caratterizzare strutturalmente e funzionalmente una proteina è necessario estrarla dalla membrana in cui essa si trova, cioè solubilizzarla. La solubilizzazione deve essere effettuata adoperando detergenti efficienti, ma non denaturanti^[99]. Una buona solubilizzazione è un aspetto cruciale per la purificazione di una proteina di membrana, *step* necessario per la caratterizzazione funzionale.

Per la solubilizzazione della proteina ricombinante hPAT4/V5-His sono stati effettuati esperimenti utilizzando come detergenti TX-100, TX-114, DDM ed OG. alla concentrazione del 2%. Identiche quantità di lisosomi (come descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.31.1) sono stati trattati per 30 minuti a 4°C con 2% di TX-100, di TX-114, di OG e di DDM. I campioni sono stati, quindi, centrifugati a 12000 rpm, 4°C per 15 minuti.

Gli estratti lisosomiali ed i pellet, ottenuti dopo centrifugazione, sono stati sottoposti ad SDS-PAGE ed analisi di *Western blot* utilizzando l'anticorpo diretto contro l'epitopo V5 (diluizione 1:5000). Nessuno dei tre detergenti utilizzati si è rivelato efficiente per la solubilizzazione della proteina (dati non mostrati). Al fine di ottenere risultati migliori, abbiamo condotto la solubilizzazione, con le stesse concentrazioni di detergente, *over-night*, a 4°C e sotto continua e costante agitazione magnetica.

Anche in questo caso i campioni ottenuti sono stati sottoposti ad SDS-PAGE ed analisi di *Western blot* utilizzando l'anticorpo diretto contro l'epitopo V5 (diluizione 1:5000).

I risultati ottenuti, riportati in figura 48, hanno evidenziato una banda di immunodecorazione del peso molecolare relativo di 58 kDa solo in corrispondenza delle linee 3, 5, 7 e 9 relative ai pozzetti in cui erano stati caricati i pellet lisosomiali ottenuti dopo solubilizzazione con 2% di TX-100, TX-114, OG e DDM. La stessa banda di immunodecorazione è presente anche in linea 1 relativa al lisato lisosomiale. Nessuna banda è stata, invece, osservata nelle linee 2, 4, 6 e 8 corrispondenti ai pozzetti in cui erano stati caricati gli estratti lisosomiali degli stessi campioni.

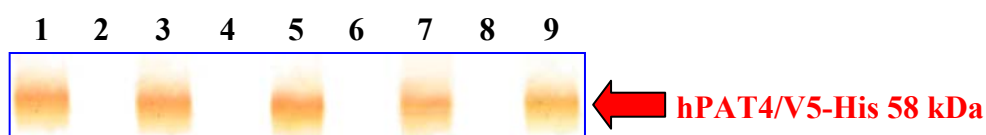


Fig. 48 Solubilizzazione della proteina ricombinante hPAT4 con diversi detergenti non ionici.

Immunodecorazione con anticorpo anti-V5 1:5000.

- 1: lisato lisosomiale di cellule *Sf9* infettate con il virus ricombinante PAT4/V5-His.
- 2: estratto lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione con TX-100 2%.
- 3: pellet lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione con TX-100 2%.
- 4: estratto lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione con TX-114 2%.
- 5: pellet lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione con TX-114 2%.
- 6: estratto lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione con DDM 2%.
- 7: pellet lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione con DDM 2%.
- 8: estratto lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione con OG 2%.
- 9: pellet lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione con OG 2%.

Gli esperimenti sopra riportati ci hanno portato a stabilire che TX-100, TX-114, DDM ed OG non sono detergenti efficaci per la solubilizzazione di proteine lisosomiali. Tale conclusione è stata confermata dal fatto che i suddetti detergenti sono risultati inefficaci nella solubilizzazione anche a concentrazioni elevate, 3% e 4%, (risultati non mostrati).

Abbiamo pertanto condotto ulteriori esperimenti, allo scopo di valutare la capacità di solubilizzazione di altri detergenti, quali: Triton X-101, CHAPS, C₁₂E₈ e L-DAO, utilizzati alla concentrazione del 2%.

Anche in questo caso la solubilizzazione di identiche quantità di lisosomi è stata condotta *over-night* a 4°C sotto continua e costante agitazione magnetica.

L'estratto ed il pellet lisosomiale, ottenuti dopo centrifugazione, sono stati, nuovamente, sottoposti a SDS/PAGE ed analisi di *Western blot* utilizzando l'anticorpo diretto contro l'epitopo V5 (diluizione 1:5000). I risultati ottenuti, riportati in figura 49, hanno evidenziato una banda di immunodecorazione in corrispondenza della linea relativa ai pozzetti caricati con il lisato lisosomiale (linea 1), con i pellet lisosomiali ottenuti dalle prove di solubilizzazione con tutti e quattro i detergenti testati (linea 3, 5, 7 e 9) e con l'estratto ottenuto in seguito a solubilizzazione con L-DAO al 2% (linea 8). Nessuna banda è stata osservata in corrispondenza degli estratti ottenuti dopo solubilizzazione con gli altri tre detergenti testati (linea 2, 4, e 6).

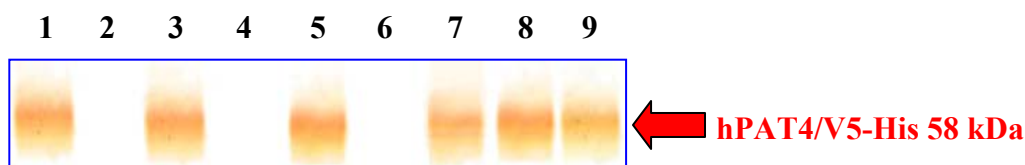


Fig. 49 Solubilizzazione della proteina ricombinante hPAT4/V5-His con diversi detergenti non ionici.

Immunodecorazione con anticorpo anti-V5 1:5000.

- 1: lisato lisosomiale di cellule *Sf9* infettate con il virus ricombinante PAT4/V5-His.
- 2: estratto lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione con TX-101 2%.
- 3: pellet lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione con TX-101 2%.
- 4: estratto lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione con CHAPS 2%.
- 5: pellet lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione con CHAPS 0 2%.
- 6: estratto lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione con C₁₂E₈ 2%.
- 7: pellet lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione con C₁₂E₈ 2%.
- 8: estratto lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione con L-DAO 2%.
- 9: pellet lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione con L-DAO 2%.

Quanto ottenuto sperimentalmente ha evidenziato che solo l'L-DAO è un detergente efficace per la solubilizzazione di proteine lisosomiali estratte da membrane di cellule *Sf9*.

Successivamente, è stato effettuato un *time course* di solubilizzazione, allo scopo di valutare la solubilizzazione in funzione del tempo di incubazione del campione con il detergente. Da questi esperimenti è emerso che il detergente L-DAO al 2% (Fig. 50) riesce a solubilizzare la proteina hPAT4, seppur in piccole quantità, già dopo 30 minuti, una solubilizzazione ottimale si ottiene protraendo, l'incubazione per 2 ore o *over-night*. Dall'analisi di *Western blot* è stata infatti osservata una banda di immunodecorazione del peso di 58 kDa, relativa alla proteina hPAT4/V5-His nelle linee corrispondenti ai pozzetti caricati con gli estratti relativi ai campioni trattati con L-DAO al 2% per 30 minuti (Fig. 50, linea 1), 2 ore o *over-night* (Fig. 50, linee 3 e 5).

Pertanto abbiamo deciso di effettuare gli studi successivi di purificazione e

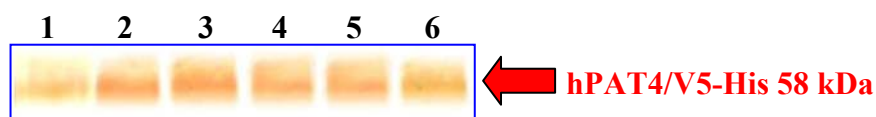


Fig. 50 Time course della solubilizzazione delle proteine ricombinante hPAT4/V5-His.

Immunodecorazione con anticorpo anti-V5 1:5000.

- 1: estratto lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione per 30 minuti con L-DAO 2%.
- 2: pellet lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione per 30 minuti con L-DAO 2%.
- 3: estratto lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione per 2 ore con L-DAO 2%.
- 4: pellet lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione per 2 ore con L-DAO 2%.
- 5: estratto lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione *over-night* ore con L-DAO 2%.
- 6: pellet lisosomiale ottenuto in seguito a solubilizzazione *over-night* ore con L-DAO 2%.

caratterizzazione funzionale con la proteina solubilizzata per 2 ore con L-DAO al 2%. Un tempo di contatto maggiore con il detergente, potrebbe, infatti, denaturare la proteina, rendendola non funzionale.

Analoghi esperimenti di solubilizzazione sono stati condotti sulla proteina di controllo CIC. In questi esperimenti sono stati utilizzati i detergenti non-ionici, quali TX-100, DDM ed OG. TX-100 è un detergente efficace per la purificazione del *carrier* mitocondriale del citrato^[94], DDM ed OG sono stati scelti in quanto efficaci per la solubilizzazione di proteine ricombinanti estratte da cellule *Sf9*^[100].

Identiche quantità di mitocondri (come descritto in Materiali e Metodi, par.3.31.2) sono stati trattati per 30 minuti a 4°C con ciascun detergente al 2%, il campione è stato, quindi, centrifugato a 12000 rpm, 4°C per 15 minuti.

Gli estratti ed i pellet mitocondriali, ottenuti dopo centrifugazione, sono stati sottoposti ad SDS-PAGE e successive analisi di *Western blot* utilizzando l'anticorpo diretto contro l'epitopo V5 (diluizione 1:5000). L'analisi della membrana di nitrocellulosa (Fig. 51) ha evidenziato una banda di immunodecorazione relativa alla proteina CIC in corrispondenza delle linee relative ai pozzetti caricati con gli estratti mitocondriale dei campioni trattati con TX-100 e DDM (Fig. 51, linee 2 e 4). Questi risultati ci hanno permesso di stabilire che TX-100 e DDM sono detergenti efficaci per la solubilizzazione della proteina mitocondriale CIC, mentre l'OG non è un detergente efficace per la solubilizzazione di tale proteina, infatti non è stata osservata alcuna banda di immunodecorazione nella linea relativa al pozzetto caricato con l'estratto del campione trattato con il detergente OG (Fig. 51, linea 5).

Non è stato osservato miglioramento nella solubilizzazione dopo incubazione dei mitocondri con i tre detergenti testati per 2 ore o *over-night* (risultati non mostrati).

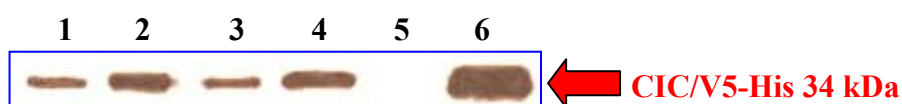


Fig. 51 Solubilizzazione della proteina ricombinante CIC/V5-His con diversi detergenti non ionici.

Immunodecorazione con anticorpo anti-V5 1:5000.

1: estratto mitocondriale ottenuto in seguito a solubilizzazione con TX-100 2%.

2: pellet mitocondriale ottenuto in seguito a solubilizzazione con TX-100 2%.

3: estratto mitocondriale ottenuto in seguito a solubilizzazione con DDM 2%.

4: pellet mitocondriale ottenuto in seguito a solubilizzazione con DDM 2%.

5: estratto mitocondriale ottenuto in seguito a solubilizzazione con OG 2%.

6: pellet mitocondriale ottenuto in seguito a solubilizzazione con OG 2%.

Abbiamo voluto verificare se alla migliore solubilizzazione con TX-100 e DDM corrispondesse anche una buona attività di trasporto.

Pertanto è stata valutata l'attività di trasporto degli estratti proteici ottenuti dopo solubilizzazione della frazione mitocondriale (come descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.33) isolata da cellule *Sf9* non infette e da cellule *Sf9* infettate con baculovirus ricombinante. La solubilizzazione è stata condotta utilizzando i tre diversi detergenti: Triton X-100, DDM ed OG al 2% per 30 minuti, 2 ore ed *over-night*. In tutte le prove, la quantità di mitocondri di partenza è stata tale da avere una concentrazione finale di 2 mg/ml. (come descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.31.2).

Gli estratti proteici sono stati quindi inseriti in un sistema artificiale di membrane (liposomi) secondo uno schema generale di ricostituzione.

Per ciascuno di essi è stata valutata l'attività di trasporto.

I risultati ottenuti riportati in figura 52 hanno evidenziato il più alto valore di attività di trasporto dopo solubilizzazione dei mitocondri con TX-100 dopo 30 minuti; una riduzione del 50% dell'attività è stata riscontrata protraendo la solubilizzazione per 2 ore. Invece, dopo solubilizzazione *over-night* è stata evidenziata un'attività di trasporto trascurabile.

La solubilizzazione con DDM ha determinato, già dopo 30 minuti, un dimezzamento dell'attività della proteina rispetto a quella osservata dopo solubilizzazione con TX-100; negli estratti mitocondriale ottenuti dopo solubilizzazione con OG l'attività di trasporto riscontrata è stata invece trascurabile sia a 30 minuti, 2 ore ed *over-night*.

Pertanto i successivi studi di purificazione e di caratterizzazione funzionale della proteina CIC ricombinante espressa in cellule di insetto sono stati effettuati utilizzando la proteina solubilizzata con TX-100 al 2% per 30 minuti.

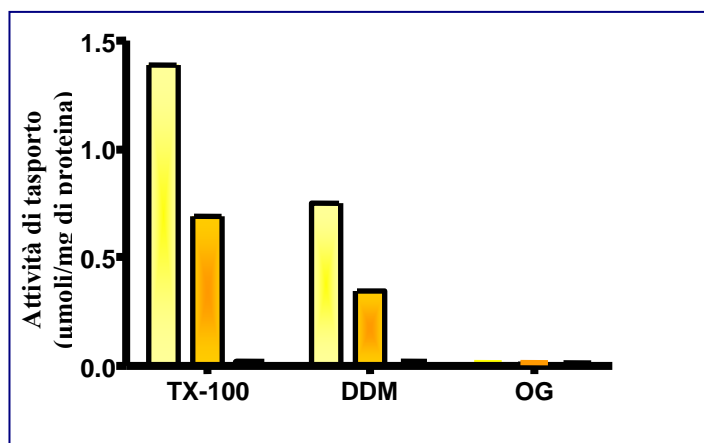


Fig. 52 Attività di trasporto della proteina ricombinante CIC/V5-His solubilizzata con diversi detergenti non ionici a diversi tempi.

L'attività di trasporto è stata valutata solubilizzando la proteina per 30 minuti (banda gialla), 2 ore (banda arancio) ed *over-night* (banda nera) in presenza dei detergenti non- ionici. La reazione di scambio è stata fatta partire aggiungendo [^{14}C]citrato 0.5 mM ai proteoliposomi ricostituiti con la proteina ricombinante CIC/V5-His e stoppata dopo 10 minuti. I risultati sono la media di tre esperimenti.

4.14 Purificazione della proteina ricombinante CIC/V5-His mediante cromatografia di affinità su colonna al Ni^{2+}

La presenza all'estremità carbossi-terminale di una coda di 6 istidine permette la purificazione delle proteine ricombinanti mediante cromatografia di affinità su colonna Ni^{2+} -NTA Agarosio (come descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.32). Tale tecnica si distingue dalle altre metodiche cromatografiche e da tecniche quali l'elettroforesi e la centrifugazione, poiché per la separazione, non sfrutta le differenti proprietà fisiche delle molecole, ma è basata sulla specificità di interazioni biologiche. Essa può quindi garantire, almeno in teoria, una purificazione completa della sostanza in un unico passaggio, pur partendo da miscele complesse. Per poter applicare tale metodo cromatografico è necessario che il materiale da separare si leghi reversibilmente ad uno specifico ligando. Infatti, questo tipo di cromatografia sfrutta la capacità della proteina di essere chelata dallo ione metallico Ni^{2+} , grazie alla presenza dei sei residui di istidina all'estremità C-terminale.

Nelle corrette condizioni sperimentali, l'eluizione di una miscela complessa contenente il composto da purificare, attraverso la colonna cromatografia in cui è impaccato il ligando, determina solo il legame tra il composto in esame ed il ligando.

Tutte le altre sostanze vengono, invece, allontanate mediante lavaggi successivi ed il composto di interesse può essere poi recuperato per spiazzamento dal ligando.

Per purificare all'omogeneità la proteina ricombinante CIC/V5-His, 500 µg di mitocondri isolati dalle cellule infettate con il baculovirus ricombinante sono stati solubilizzati con la soluzione A (NaCl 30 mM; Pipes 10 mM, pH 7,0; TX-100 2%; PMSF 0,1 mM), ed incubati per 20 minuti a 4°C con la resina Ni²⁺-NTA Agarosio, pre-equilibrata. Il complesso "estratto-resina Ni-NTA Agarosio" è stato quindi impaccato nella colonna cromatografica (come descritto in *Materiali e Metodi*, par. 3.3 ed eluita con soluzioni caratterizzate da differenti concentrazioni di sali (in modo tale da variare, diminuendola, la forza ionica), detergente e basse concentrazioni di Imidazolo, allo scopo di rimuovere i legami proteici aspecifici (soluzioni B-F). L'eluizione della proteina è stata, invece, ottenuta aggiungendo alla resina una soluzione caratterizzata da un'alta concentrazione di Imidazolo (100 mM) (soluzione G), che permette di staccare la proteina ricombinante dalla colonna cromatografica.

E' stata, quindi, effettuata una SDS-PAGE dei seguenti campioni:

- estratto proteico mitocondriale;
- *pass-through* (ossia il primo eluato, ottenuto quando è stata impaccata la resina nella colonna);
- successive frazioni di eluizione.

Al termine della corsa elettroforetica il gel di poliacrilammide è stato colorato con il metodo del *Silver Staining*, che è più sensibile e consente di apprezzare anche concentrazioni proteiche molto basse (fino a 0.1 ng).

I risultati ottenuti, riportati in figura 53, hanno mostrato la presenza di intense bande proteiche (peso molecolare apparente compreso tra 66 kDa e 15 kDa), in corrispondenza delle linee relative ai pozzetti caricati con l'estratto mitocondriale e del *pass-through* (Fig 53, pannello A linee 1, 2 e 3 rispettivamente). Le frazioni eluite mediante aggiunta dei tamponi di lavaggio (gradiente di imidazolo compreso fra 10 mM e 20 mM) non hanno evidenziato bande proteiche di 34 kDa (Fig. 53, linee 3 e 4): ciò indica che queste soluzioni sono servite solo a rimuovere dalla resina proteine legate debolmente e in modo aspecifico. Invece, in corrispondenza della frazione ottenuta in seguito all'aggiunta sulla colonna del tampone di eluizione (concentrazione di imidazolo 100 mM) è stata rilevata una banda proteica del peso molecolare atteso di circa 34 kDa (Fig. 53, linea 5).

Per verificare che la banda proteica eluita corrispondesse alla proteina ricombinante CIC di *Anguilla anguilla*, è stata eseguita un'analisi di *Western blot* delle diverse frazioni raccolte dalla colonna (Fig. 53 Pannello B), utilizzando l'anticorpo anti-V5 (diluizione 1:5000). Anche in questo caso l'analisi ha rivelato una banda di immunodecorazione di 34 kDa a conferma di quanto già osservato nel gel. Tale banda è stata evidenziata solo nelle linee relative ai pozzetti in cui erano stati caricati rispettivamente l'estratto mitocondriale e la frazione eluita dalla colonna con la soluzione di imidazolo 100 mM (Fig. 53, pannello B, linee 1, 2 e 5).

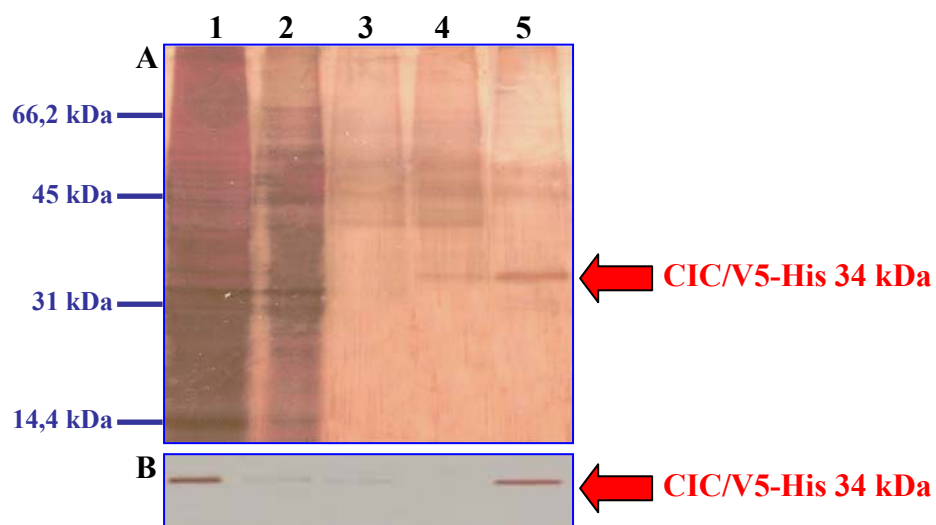


Fig. 53
Pannello A: Analisi mediante SDS-PAGE delle frazioni eluite dalla colonna Ni²⁺-NTA Agarosio.
 1: estratto proteico mitocondriale ;
 2: *pass-through*;
 3-4: frazione eluita dalla colonna dopo il primo e l'ultimo lavaggio con la soluzione F;
 5: frazioni eluite dalla colonna dopo l'aggiunta della soluzione G.
Pannello B: relativa analisi di *Western blot*.

Prove di attività sono state condotte anche sul *carrier* purificato mediante cromatografia di affinità su colonna Ni²⁺-NTA Agarosio. La proteina purificata all'omogeneità e funzionalmente ricostituita nei liposomi ha mostrato un incremento di circa 55 volte dell'attività di trasporto rispetto a quella misurata sulla proteina solubilizzata dai mitocondri estratti da cellule infettate con il baculovirus ricombinante (Tab. IV).

Tabella IV
Analisi dell'attività di trasporto

<i>Campione</i>	<i>Proteina (mg)</i>	<i>Attività specifica</i>	<i>Attività totale</i>	<i>Aumento attività della proteina purificata</i>
Estratto mitocondriale da cellule <i>Sf9</i> non infette	1.57	0.0397	62.3	-
Estratto mitocondriale da cellule <i>Sf9</i> infette	1.32	1.436	1895.5	-
CIC/V5-His purificato	0,0052	78.98	410.69	55

Attività di trasporto del citrato nei liposomi ricostituiti con la proteina ricombinante CIC/V5-His.

Il [¹⁴C]-citrato 0.5 mM è stato aggiunto al tempo zero ai proteoliposomi contenenti citrato 20 mM. La reazione di scambio è stata bloccata dopo 10 minuti.

L'attività di trasporto è espressa come $\mu\text{mol}/10\text{min} \times \text{mg}$ di proteina (attività specifica) e $\text{nmol}/10\text{min}$ (attività totale). I valori riportati in tabella sono la media di 4 esperimenti.

Inoltre, i valori riportati in tabella confermano l'elevato livello di espressione della proteina ricombinate CIC/V5-His nelle cellule *Sf9* infettate con il baculovirus ricombinante. Nei mitocondri estratti da cellule *Sf9* infettate con il baculovirus ricombinante è stata rivelata un'attività specifica pari a $1.436 \mu\text{mol}/10\text{min} \times \text{mg}$ di proteina, valore molto più alto rispetto a quello evidenziato per i mitocondri estratti da cellule *Sf9* non infette. Per questi ultimi infatti è stata misurata una attività specifica pari a $0.0397 \mu\text{mol}/10\text{min} \times \text{mg}$ di proteina.

Il rapporto tra l'attività specifica valutata per la proteina ricombinante isolata dai mitocondri di cellule infettate e quella riscontrata per le cellule non infette è di circa 36:1, paragonabile a quello esistente tra il valore di attività riscontrato per la proteina ricombinante e quello evidenziato per i mitocondri estratti da fegato di *Anguilla anguilla*. Come riportato in letteratura per questi ultimi è stata riscontrata un'attività specifica pari a $0.0421 \mu\text{mol}/10\text{min} \times \text{mg}$ di proteina.

4.15 Caratterizzazione cinetica di CIC/V5-His

Dopo aver ottimizzato le condizioni di solubilizzazione, sono stati condotti studi di caratterizzazione cinetica sulla proteina ricombinate CICV5-His purificata.

Inizialmente sono stati effettuati esperimenti di *time course* valutando l'ingresso di citrato nei proteoliposomi, in funzione del tempo.

La proteina ricombinante catalizza uno scambio tra citrato interno 20 mM e [^{14}C]-citrato esterno 0.5 mM con una cinetica del primo ordine con una costante cinetica, k , pari a 0.097 min^{-1} . Tale cinetica presenta una fase lineare nel primo minuto di trasporto e raggiunge la saturazione dopo 20 minuti di scambio, a cui corrisponde una velocità pari a $129.59 \mu\text{mol/mg}$ di proteina (Fig. 54).

La velocità iniziale dell'*uptake* di citrato, data dal prodotto della costante k e della quantità di citrato incorporata all'equilibrio è $12.57 \mu\text{mol/min} \times \text{mg}$ di proteina.

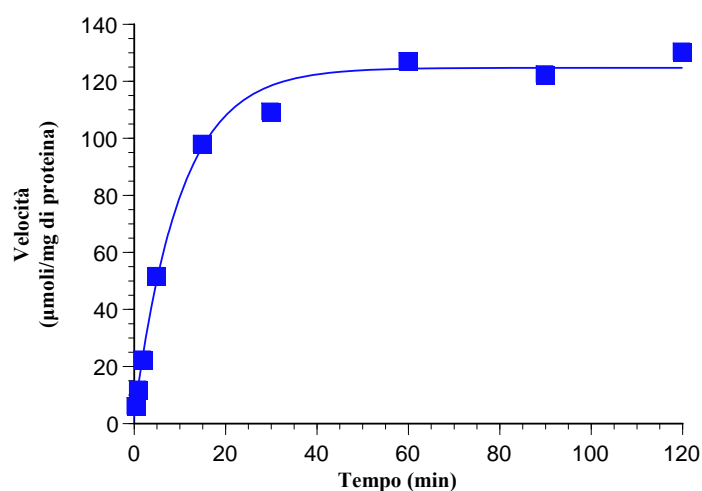


Fig. 54

Time-Course del trasporto del citrato nei liposomi ricostituiti con il CIC/V5-His ricombinante.

Il [^{14}C]-citrato 0.5 mM è stato aggiunto al tempo zero ai proteoliposomi contenenti citrato 20 mM. La reazione di scambio è stata bloccata ai tempi indicati in figura con l'aggiunta dell'inibitore 1,2,3 BTA. Sull'asse delle ascisse sono indicati i tempi ai quali è stato bloccato lo scambio. Sulle ordinate è riportata, invece, l'attività di trasporto espressa in μmol di substrato trasportato per mg di proteina nell'intervallo di tempo.

Esperimenti di *time course*, eseguiti su proteoliposomi ottenuti in assenza di substrato hanno evidenziato attività di trasporto nulla (risultati non mostrati). Ciò indica che il *carrier* non funziona con un meccanismo di tipo uniport ma di tipo antiport.

Anche nel caso in cui la proteina, dopo essere stata solubilizzata, è stata bollita, ed incorporata nei liposomi, non è stato osservato trasporto di substrato radioattivo all'interno (risultati non mostrati).

Siamo passati, quindi, a determinare l'affinità del *carrier* per il substrato trasportato, cioè la K_m per il citrato. Per questa determinazione è stato eseguito un esperimento di trasporto del substrato utilizzando il [^{14}C]citrato esterno a diverse concentrazioni in presenza di concentrazione interna saturante di citrato (20 mM). Il tempo di scambio,

per la determinazione della K_m , è stato di 30 secondi, valore che ricade nella fase lineare del trasporto.

Il valore della K_m si ottiene per estrapolazione matematica. Il grafico riportato in figura 55 mostra la linearizzazione secondo *Lineweaver-Burk* della K_m . Nel grafico è riportato sull'asse delle ascisse il reciproco della concentrazione del substrato espressa in 1/mM (1/S) e sull'asse delle ordinate il reciproco della velocità (1/V) di trasporto espressa come 1/(μ mol di substrato trasportato/mg di proteina per 1 minuto).

I valori di K_m e V_{max} determinati sono stati rispettivamente $68 \pm 0.1 \mu\text{M}$ e $14.28 \pm 1.7 \mu\text{mol/min per mg di proteina}$. Tali valori rappresentano la media di cinque esperimenti indipendenti, effettuati nelle medesime condizioni.

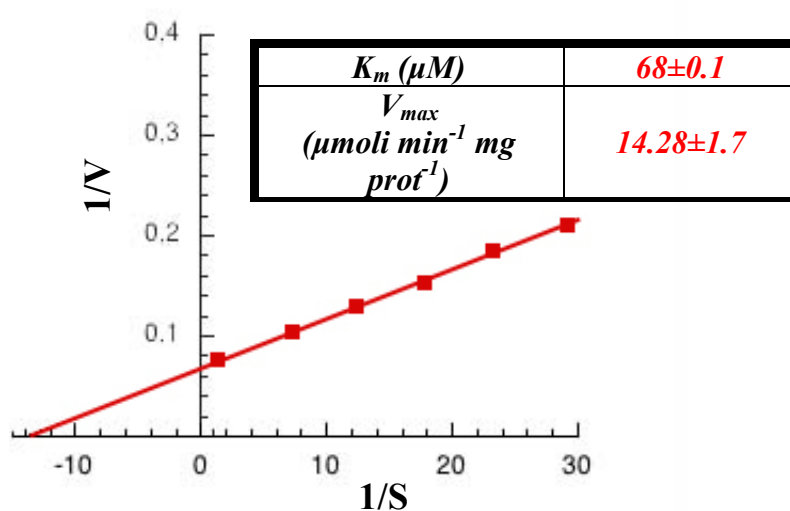


Fig.55 Grafico secondo Lineweaver-Burk della K_m della proteina ricombinante CIC/V5-His.

Sul grafico è riportata l'inverso della velocità di reazione, cioè 1/(mmoli di substrato trasportato/g di proteina per 1 minuto), in funzione dell'inverso della concentrazione di substrato (1/mM).

Dall'intercetta sull'asse delle ascisse ($-1/K_m$) si ricava il valore della K_m , mentre dall'intercetta sull'asse delle ordinate ($1/V_{max}$), si ricava il valore di V_{max} .

Il tempo di scambio è stato di 30 secondi.

Nella tabella sono riportati i valori di K_m e V_{max} calcolati.

Infine è stato valutato quali substrati, oltre al citrato, fossero trasportati. Infatti perché una proteina di membrana possa essere definita "proteina di trasporto" deve possedere una specificità di substrato. Questa proprietà indica che ogni proteina deve essere in grado di catalizzare il trasporto di un solo specifico substrato o di un suo isomero strutturale.

Lo studio della specificità di substrato del *carrier* degli acidi tricarbossilici è stato condotto misurando il trasporto di [^{14}C]-citrato in proteoliposomi in cui erano stati incorporati diversi substrati interni, a concentrazione saturante (20 mM finale).

La reazione di scambio è stata fatta partire con l'aggiunta all'esterno di [^{14}C]-citrato 70 μM ed è stata bloccata dopo 1 minuto con 1,2,3-benzentricarbossilato (1,2,3-BTA) 20 mM.

Come è possibile osservare in Tabella V il *carrier* così ricostituito i trasporta con elevata efficienza oltre al citrato (la cui attività di scambio è da considerarsi valore di riferimento), anche il treo-isocitrato, il malato ed il fosfoenolpiruvato. Quest'ultimo con un valore superiore al riferimento stesso.

Incorporando, infine, substrati specifici per altri *carrier* mitocondriali, come fosfato, chetoglutarato e glutammato, è stato possibile evidenziare come l'attività di trasporto si annulli quasi completamente.

Gli esperimenti successivi sono stati mirati a saggiare la sensibilità agli inibitori. Gli inibitori sono molecole che interferiscono con l'attività di trasporto di una proteina *carrier* rallentando o bloccando completamente la reazione di scambio. Sono stati utilizzati reagenti specifici per amminoacidi, in grado di inibire l'attività di trasporto della proteina, legandosi alle catene laterali degli stessi, qualora questi svolgano un ruolo fondamentale durante la catalisi. Tali amminoacidi potrebbero essere determinanti o per il mantenimento della corretta conformazione della proteina durante l'evento catalitico o per la loro diretta partecipazione alla costituzione del sito di legame.

Gli esperimenti sono stati condotti sul *carrier* purificato e ricostituito nei proteoliposomi. Prima dell'inizio della reazione di scambio gli inibitori sono stati aggiunti all'esterno dei proteoliposomi a tempi e concentrazioni opportune. La successiva aggiunta di [^{14}C]-citrato 70 μM ha dato il via alla reazione di scambio, che è stata bloccata dopo 1 minuto.

I reagenti dei gruppi tiolici sono stati aggiunti due minuti prima del substrato marcato, gli altri inibitori insieme al substrato marcato.

Gli inibitori *Mersalyl*, HgCl_2 e p-idrossimercuribenzoato sono stati utilizzati con una concentrazione finale pari a 0,1 mM; 1,2,3-benzentricarbossilato, 1,2,4-benzentricarbossilato e 1,3,5-benzentricarbossilato avevano invece una concentrazione finale pari a 2 mM. La concentrazione finale di piridossal-5'-fosfato e di batofenantrolina è stata pari a 10 mM, mentre la carbossiatratilosside aveva, invece, una concentrazione finale pari a 5 μM .

I risultati ottenuti, riportati in tabella, sono espressi come % dell'attività di trasporto residua, calcolata in presenza di uno specifico inibitore, rispetto a quella del *carrier* non inibito.

Una totale inibizione dell'attività di scambio del *carrier* è stata osservata con concentrazioni molto basse di reagenti organo-mercuriali, quali Mersalyl, p-idrossimercuribenzoato e HgCl₂. Risultati paragonabili sono stati ottenuti con batofenantrolina.

Mersalyl e HgCl₂, sono reagenti specifici per i residui di cisteina. Sulla base dei risultati ottenuti, si può confermare la presenza di uno o più residui di cisteina determinanti per l'attività di trasporto del CIC/V5-His ricombinante.

Inoltre il trasporto del substrato è risultato quasi completamente inibito da 1,2,3-benzentricarbossilato (analogo del citrato) ma non dai suoi isomeri strutturali 1,2,4-benzentricarbossilato e 1,3,5 benzentricarbossilato.

Una notevole riduzione dell'attività di trasporto è stata osservata incubando i proteoliposomi con piridossal-5'-fosfato, reagente specifico per la lisina. In questo modo è stata dimostrata l'importanza di residui basici per il corretto funzionamento del *carrier*.

Non è stata riscontrata alcuna diminuzione di attività incubando i proteoliposomi con la carbossiatratilosside, potente inibitore del *carrier* mitocondriale dell'ADP/ATP [101].

Tabella V.
Specificità di substrato e sensibilità agli inibitori della proteina ricombinante CIC/V5-His ricostituita nei liposomi

<i>Substrato interno (20 mM)</i>	<i>Inibitori</i>	<i>Attività di trasporto (%)</i>
Citrato		100
treo-Isocitrato		103
Fosfoenolpiruvato		115
L-Malato		97
Fosfato		1
2-Chetoglutarato		2
Glutammato		1
ATP		1
Citrato	Mersalil (0.1 mM)	1
Citrato	p-idrossimercuriobenzoato (0.1 mM)	1
Citrato	HgCl ₂ (0.1 mM)	1
Citrato	Batofenantrolina (10 mM)	1
Citrato	Piridossal-5'-fostato (10 mM)	15
Citrato	1,2,3-benzentricarbossilato (2 mM)	4
Citrato	1,2,4-benzentricarbossilato (2 mM)	74
Citrato	1,3,5-benzentricarbossialto (2 mM)	69
Citrato	Carbossiatrattiloside (5 μM)	93

I risultati ottenuti sono stati confermati da 3 successivi esperimenti indipendenti condotti nelle stesse condizioni. L'attività di trasporto dei vari substrati è stata espressa in %, assumendo come valore di riferimento l'attività di scambio ottenuta quando all'interno dei proteoliposomi è presente come substrato il citrato (scambio omologo citrato_{int}/citrato_{est}).

Le proprietà di trasporto, le caratteristiche cinetiche, la specificità di substrato e la sensibilità agli inibitori determinate nei precedenti esperimenti, dimostrano chiaramente che il *carrier* ricombinante corrisponde al *carrier* mitocondriale degli acidi tricarbossilici caratterizzato dai mitocondri di fegato dell'anguilla argentina.

Questi esperimenti, inoltre, ci hanno permesso di confermare che il BEVS è un sistema di espressione in grado di produrre elevate quantità di proteina dotata di caratteristiche cinetico-funzionali simili alla proteina nativa. Pertanto abbiamo intrapreso studi di caratterizzazione cinetica del trasportatore lisosomiale umano PAT4, espresso con questo sistema.

Tali studi richiedono come *step* preliminare la purificazione della proteina espressa.

4.16 Purificazione della proteina ricombinante PAT4/V5-His mediante cromatografia di affinità su colonna al Ni²⁺

La purificazione di hPAT4/V5-His è stata effettuata in maniera analoga a quella descritta precedentemente per la proteina ricombinante CIC/V5-His, utilizzando, però, come detergente L-DAO. I risultati ottenuti sono riportati in figura 56.

Nel pannello A della figura 56 è rappresentato una SDS-PAGE colorata in *Silver staining* del lisato lisosomiale (linea 1) ottenuto da cellule *Sf9* infettate con il baculovirus ricombinante, dell'estratto proteico (linea 2) ottenuto dopo solubilizzazione dei lisosomi, del *pass-through* (linea 3), delle frazioni raccolte dopo eluizione con i tamponi di lavaggio (linee 4-8) e della frazione raccolta dopo l'aggiunta del tampone di eluizione (linea 9). La colorazione con il *Silver* ha evidenziato la presenza di intense bande proteiche (peso molecolare apparente compreso tra 66 kDa e 15 kDa) nelle linee 1, 2, 3 e 4 e di un'intensa banda proteica pura del peso molecolare apparente di 58 kDa solo in corrispondenza della linea 9. Nelle linee 5 e 6, invece, non è stata evidenziata la presenza di una banda proteica del peso relativo di 58 kDa. La verifica che la banda proteica del peso molecolare relativo di 58 kDa corrispondesse alla proteina hPAT4/V5-His è stata effettuata mediante un'analisi di *Western blot* delle diverse frazioni raccolte dalla colonna (Fig. 56, pannello B).

Anche in questo caso l'analisi ha rivelato una banda di immunodecorazione di 58 kDa nella linea 9, corrispondente al pozzetto in cui era stata caricata la frazione raccolta dopo l'aggiunta del tampone di eluizione, e nelle linee 1 e 2 corrispondenti alle corse elettroforetiche del lisato lisosomiale ottenuto dalle cellule *Sf9* infettate ed all'estratto proteico dei lisosomi solubilizzati.

Questi esperimenti hanno confermato che la proteina hPAT4/V5-His è stata purificata all'omogeneità. Studi futuri saranno mirati, in primo luogo, alla determinazione della specificità di substrato e della caratterizzazione cinetica.

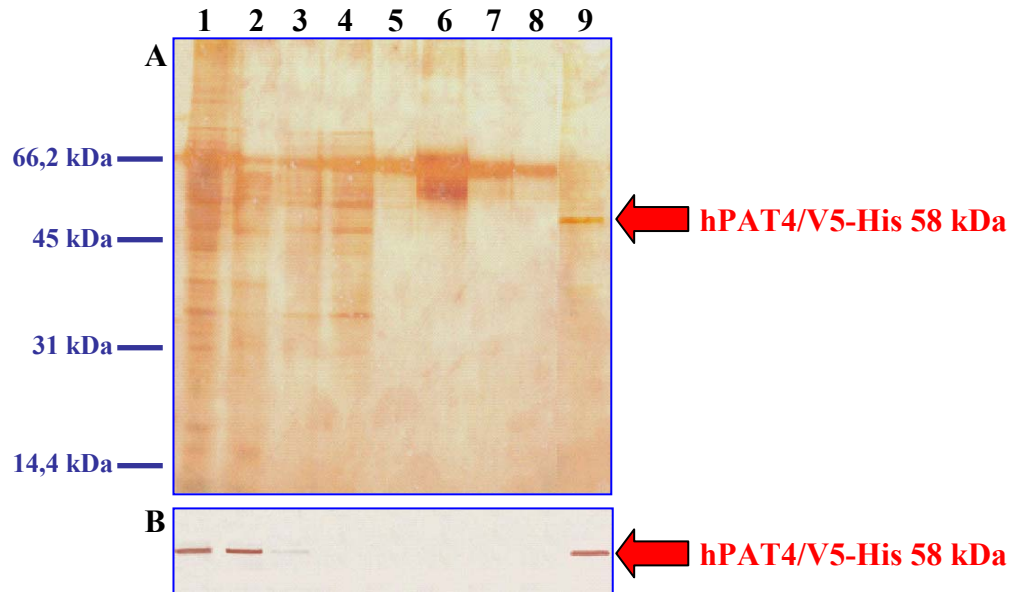


Fig. 56: Purificazione della proteina hPAT4/V5-His mediante cromatografia di affinità su colonna al Ni^{2+} -NTA Agarosio.

Pannello A: Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE e colorate con il metodo del *Silver staining*.

1: lisato lisosomiale ottenuto da cellule *Sf9* infettate con il baculovirus ricombinante;

2: estratto proteico ricavato dalla solubilizzazione di lisosomi parzialmente purificati;

3: *pass-through*;

4-8: frazioni eluite dalla colonna dopo lavaggio con le soluzioni B-F;

9: frazione eluita dalla colonna dopo l'aggiunta della soluzione G.

Pannello B: relativa analisi di *Western blot*.

5. CONCLUSIONI

I lisosomi, organuli citoplasmatici, presenti nella maggior parte delle cellule dei vertebrati e degli invertebrati costituiscono il sistema digestivo di ogni cellula in quanto gli enzimi idrolitici che essi contengono degradano le sostanze nutritive assimilate (proteine, lipidi, carboidrati ed acidi nucleici) nelle loro componenti.

Amminoacidi, zuccheri, nucleosidi, ioni e vitamine, prodotti dalla digestione, vengono traslocati nel *citosol* grazie a specifici sistemi di trasporto la cui importanza fisiologica è sottolineata dalle malattie legate ad un loro non corretto funzionamento. L'accumulo di macromolecole non digerite porta, infatti, all'aumento delle dimensioni e del numero di questi organelli creando danni alla cellula e quindi anomalie cliniche. La membrana lisosomiale, pertanto, non deve essere considerata una semplice barriera meccanica con la funzione di separare l'ambiente interno acido da quello neutro citoplasmatico, ma ha un ruolo fisiologico importante dovuto alle numerose proteine in grado di catalizzare il trasporto di nucleosidi, ioni, vitamine ed amminoacidi.

Data la rilevanza biologica, nelle cellule animali, di molecole come gli amminoacidi, ci siamo interessati dei sistemi di trasporto che ne catalizzano il passaggio dal lume lisosomiale al citoplasma dove vengono ulteriormente metabolizzati o utilizzati a fini biosintetici. Notevole interesse ha suscitato nel nostro gruppo di ricerca la famiglia delle proteine PAT (*proton-coupled amino acid transport*): hPAT1, hPAT2, hPAT3, hPAT4.

In particolare, oggetto di questo lavoro è stato lo studio del trasportatore lisosomiale, orfano di substrato, hPAT4. Questa proteina è presente in piccole quantità nel tessuto di origine, ma poiché gli studi di caratterizzazione cinetica e funzionali richiedono grandi quantità della proteina, è stato necessario ricorrere all'espressione in un organismo eterologo. Dopo aver tentato senza successo l'espressione di hPAT4 in cellule di batteri e di lievito, abbiamo deciso di utilizzare il *Baculovirus Expression Vector System* (BEVS) perché rappresenta uno dei più potenti e versatili sistemi, oggi disponibili, per overesprimere sia proteine di membrana che proteine solubili. Questo sistema garantisce, infatti, un corretto *folding* e tutte le modificazioni post-traduzionali che permettono di ottenere una proteina ricombinante biologicamente attiva e con caratteristiche simili, se non del tutto identiche, alla controparte nativa.

Abbiamo inoltre deciso di esprimere con il BEVS, come proteina di controllo, il *carrier* degli acidi tricarbossilici (citrato) di mitocondri di fegato di *Anguilla anguilla*

(CIC); questa proteina è stata ben studiata, la caratterizzazione cinetica della forma overespressa con il BEVS, ci permetterà, quindi, di valutare le potenzialità del sistema.

In primo luogo, mediante reazioni di PCR condotte su retrotrascritti umani di RNA totali (RT-PCR) abbiamo determinato la distribuzione tissutale di hPAT4, che ha mostrato una distribuzione ubiquitaria, con più alti livelli di espressione in rene e cervello. Siamo partiti, quindi, da cDNA di rene per ottenere, mediante reazione di PCR, il cDNA di interesse che dopo ligazione, nel vettore di trasferimento pBlueBac4.5/V5-His, è stato co-trasfettato in cellule di insetto (*Spodoptera frugiperda*) della linea cellulare *Sf9* con il DNA linearizzato di baculovirus.

Dal cDNA di fegato di *Anguilla anguilla* è stata, invece, amplificata la sequenza codificante per CIC. Anche questa sequenza è stata, successivamente, digerita, ligata nel vettore di trasferimento pBlueBac4.5/V5-His e co-trasfettata con il DNA linearizzato di baculovirus, in cellule di insetto di *Spodoptera frugiperda*.

Dopo aver distinto le cellule di insetto infettate dal virus ricombinate da quelle non infette mediante osservazione al microscopio e successivo saggio delle placche, abbiamo verificato che il baculovirus ricombinante ottenuto non fosse contaminato da virus *wild-type*.

Con successive infezioni e relativi saggi delle placche i virus ricombinanti sono stati amplificati ottenendo alla fine un titolo virale di 10^8 , ottimale per gli studi di overespressione.

A questo punto, siamo passati all'espressione proteica di entrambe le proteine, verificata sia mediante analisi di *Western blot*, su lisati cellulari di cellule *Sf9* infettate con i rispettivi virus ricombinanti e su cellule *Sf9* non infettate, sia tramite immunofluorescenza indiretta. Entrambe le metodiche hanno confermato la presenza delle proteine di nostro interesse solo nelle cellule infettate dal baculovirus ricombinante.

E' noto che elevati livelli di espressione di una proteina di membrana possono determinarne l'accumulo in particelle extramembranose, non corrispondenti a quelle native.

Per controllare che le proteine hPAT4/V5-His e CIC/V5-His di anguilla mantenessero rispettivamente la loro distribuzione lisosomiale e mitocondriale, nel nuovo sistema eterologo, sono stati effettuati studi di localizzazione subcellulare, mediante tecniche di immunofluorescenza diretta, usando fluorocromi organello-specifico. Per i lisosomi abbiamo utilizzato il fluoroforo *LysoTracker Red DND-99*, mentre per la colorazione del *network* mitocondriale è stato utilizzato il *MitoTracker Red*

CMXRos. Questi esperimenti hanno confermato la localizzazione esclusivamente lisosomiale della proteina hPAT4/V5-His e la localizzazione esclusivamente mitocondriale della proteina CIC/V5-His.

Prima di procedere all'overespressione delle due proteine in grandi quantità abbiamo stabilito le condizioni ottimali di infezione, *step* necessario per poter passare dalla fase di espressione a quella di overespressione. I risultati ottenuti hanno evidenziato che, per un'ottimale overespressione delle proteine hPAT4/V5-His e CIC/V5-His di anguilla, è necessario infettare le cellule *Sf9* per 72 ore con una molteplicità di infezione (MOI) pari a 10. Questo risultato è stato confermato sia mediante analisi di *Western blot* che di immunofluorescenza indiretta.

Utilizzando queste condizioni siamo riusciti, quindi, ad overesprimere la proteina oggetto di studio e la proteina da noi usata come controllo.

Dal momento che gli studi di caratterizzazione cinetica di una proteina espressa prevedono, in primo luogo, l'estrazione dalla membrana (solubilizzazione) e la purificazione all'omogeneità, negli esperimenti successivi abbiamo utilizzato differenti detergenti non denaturanti in modo da non alterare le caratteristiche funzionali delle proteine ricombinanti.

Per la proteina hPAT4/V5-His abbiamo ottenuto una ottimale solubilizzazione con Laurildimetilamina-N-ossido (L-DAO) al 2%, per 2 ore; TX-100 al 2% e per 30 minuti è risultato, invece, il sistema di solubilizzazione efficace per il *carrier* mitocondriale ricombinante CIC/V5-His.

La proteina CIC/V5-His solubilizzata è stata, successivamente, purificata all'omogeneità, mediante cromatografia di affinità su colonna al Ni²⁺-NTA Agarosio, e caratterizzata cinematicamente, allo scopo di valutare le potenzialità del sistema di espressione eterologo.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che la proteina ricombinante catalizza il trasporto di citrato con una cinetica del primo ordine che presenta una fase lineare nel primo minuto e raggiunge la saturazione dopo 20 minuti. I valori di K_m e V_{max} determinati sono stati rispettivamente $68 \pm 0.1 \mu M$ e $14.28 \pm 1.7 \mu mol/min$ per mg di proteina. Il *carrier* ha mostrato un'elevata efficienza di trasporto, oltre che di citrato, anche di treo-isocitrato, L-malato e fosfoenolpiruvato. Inoltre il trasporto del substrato è risultato quasi completamente inibito da 1,2,3-benzentricarbossilato, Mersalyl, p-idrossimercuribenzoato, HgCl₂ e batofenantrolina. Una riduzione dell'attività di trasporto è stata osservata anche in presenza di piridossal-5'-fosfato.

Le proprietà di trasporto, la determinazione dei parametri cinetici, la specificità di substrato e la sensibilità agli inibitori hanno chiaramente dimostrato che la proteina ricombinante corrisponde al *carrier* mitocondriale degli acidi tricarbossilici caratterizzato dai mitocondri di fegato di *Anguilla anguilla*.

Questi risultati ci hanno portato ad affermare che il *Baculovirus Expression Vector System* ha permesso di ottenere la proteina CIC/V5-His in grandi quantità e con caratteristiche cinetico-funzionali paragonabili alla proteina nativa.

Determinate le potenzialità del sistema, la proteina oggetto del nostro studio, hPAT4/V5-His è stata purificata all'omogeneità, allo scopo di intraprendere, in futuro, studi mirati alla determinazione del substrato trasportato, delle costanti cinetiche V_{max} e K_m , della specificità di substrato, della sensibilità agli inibitori e dell'eventuale influenza di un gradiente protonico o di un potenziale di membrana sull'attività di trasporto.

Si potrà così cercare di capire se un mal funzionamento di tale trasportatore sia associato ad una patologia lisosomiale orfana.

BIBLIOGRAFIA

1. Cardellini, P., Ciani, F., Ciarcia, G., Cirotto, C., Desantis, S., Dini, L., Fasulo, S., Franceschini, V., Labate, M., Laforgia, V., Longo, M., Mauceri, A.R., Serra, G., Tagliafierro, G. e Vallarano, M. (2004) *Citologia & Istologia* (Idelson Gnocchi eds), 122-123.
2. Rosati, P. and Colombo, R. (1997) *La cellula*, (Edi-Ermes eds), 200-222.
3. Aquila, H., Link, T.A., and Klingenberg, H., (1985) *EMBO J* 4 : 2369-2376.
4. Bouillaud, F., Weissenbach, J., and Riquier, D., (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 1487-1490.
5. De Marcos Lousa, C., Trézéguet, V., Dianoux, A.C., Brandolin, G., Lauquin, G.J.M. (2002) *Biochemistry* 41:14412–14420.
6. Dolce, V., Scarcia, P., Iacopetta, D., Calmieri, F. (2004) *FEBS Lett.* 579 N°3: 633-637.
7. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. *Biologia molecolare della cellula, II edizione italiana condotta sulla IV edizione americana.* Zanichelli.
8. Walker, J. E. and Runswick, M. J. (1993). *J. Bioenerg. Biomembr.* 25, 435-446.
9. Dolce, V., Iacobazzi, V., Palmieri, F., Walzer, J.E. (1994) *Biol. Chem.* 269 (14):10451-60.
10. Palmieri, F. (2004) *Pflugers Arch.* 447:689-709.
11. Agrimi, G., Di Noia MA, Marobbio CM, Fiermonte G, Lasorsa FM, Palmieri F. (2004) *J Biol Chem* 379 (Pt1): 183-190.
12. Fiermonte, G., De Leonardis, F., Todisco S, Palmieri L, Lasorsa FM and Palmieri F (2004) *J Biol Chem* 279: 30722-30730.
13. Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trezeguet, V., Lauquin, G.J., Brandolin, G. (2003) *Nature* 426 (6962): 39-44.
14. Maloney, P.C. (1990) *Res. Microbiol.* 141: 374-383.
15. Palmieri, F., *Biochimica et Biophysica Acta* (2008) 1777: 564–578.
16. de Voer, G., Peter, D., Taschner, P.E.M. (2008) *Biochimica et Biophysica Acta*, 433-446.
17. de Duve, C. (1959) *Subcellular particles* (Hayashi, T., ed.), 128-159.
18. de Duve, C. (1983) *Eur. J. Biochem.*, 137: 391-397.

19. Castino, R., Démoz, M. and Isidoro, C. (2003) *J. Mol. Recognit.* 16: 337-348.
20. Ge-Hong Sun-Wada, Yoh Wada, and Masamitsu Futai, (2003) *Cell structure and function* 28: 455-463.
21. Griffiths, G. (2002) *Semin. Cell Dev. Biol.* 13: 279-284.
22. Kornfeld, S. and Mellman, I. (1989) *Annu. Rev. Cell Biol.* 5: 483-525.
23. Hirota, Y., Masuyama, N., Kuronita, T., Fujita, H., Himeno, M. and Tanaka, Y. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314: 306-312.
24. Eskelinen, E.L., Tanaka, Y. and Saftig, P. (2003) *Trends Cell Biol.* 13: 137-145.
25. Sagné, C., Gasnier, B. (2008) *J. Inherit. Metab. Dis.* 31: 258-266.
26. Chen, J.W., Cha, Y., Yuksel K.U., Gracy R.W. and August, J.T. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 8754-8758.
27. Jack, D.L., Paulsen, I.T., Saier, M.H. (2000) *Microbiology* 146: 1797-1814.
28. Rubio-Aliaga, I., Boll, M., Vogt Weisenhorn, D.M., Foltz, M., Kottra, G. and Daniel, H. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 2754-2760.
29. G.B. Young, D.L., Jack, D.W., Smith, M.H., Saier, J. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1415: 306-322.
30. McIntire, S.L., Reimer, R.J., Schuske, K., Edwards, R.H., Jorgensen, E.M., (1997) *Nature* 389 870-876.
31. Sagnè, C., El Mestikawy, S., Isambert, M.F., Hamon, M., Henry, J.P., Giros, B., Gasnier, B., (1997) *FEBS Lett* 417 : 177-183.
32. Mackenzie, B., Erickson, J.D. (2004) *Pflugers Arch.*, 447, 784-795.
33. Baird, F.E., Pinilla-Tenas, J.J., Ogilvie, W.L., Ganapathy, V., Hundal, H.S. and Taylor, P.M. (2006) *Biochem. J.*, 397, 369-375.
34. Russnak, R., Konczal, D., McIntire, S.L., (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 23849-23857
35. Chen, Z., Fei, Y.J., Anderson, C.M.H., Wake, K.A., Miyauchi, S., Huang, W., Thwaites, D.T. and Ganapathy, V. (2003a) *J. Physiol.*, 546: 349-361.
36. Boll, M., Daniel, H. and Gasnier, B. (2004) *Pflugers Arch.* 447: 776-779.
37. Sagnè, C., Agulhon, C., Ravassard, P., Darmon, M., Hamon, M., El Mestikawy, S., Gasnier, B., and Giros, B., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7206-7211.
38. Boll, M., Foltz, M., Rubio-Aliaga, I., Kottra, G., Daniel, H. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 22966-22973.
39. Wellner, D., Meister, A. (1981) *Annu. Rev. Biochem.* 50: 911-968.
40. Chen, Z., Kennedy, D.J., Wake, K.A., Zhuang, L., Ganapathy, V. And Thwaites, D.T. (2003b) *Biochem. Biophys. Res. Commun* 304: 747-754.

41. Boll, M., Foltz, M., Rubio-Aliga, I., and Daniel, H. (2003) *Genomics* 82: 47-56.
42. Persson, H.L., Kurz, T., Eaton, J.W., and Brunk, U.T. (2005) *Biochem. J.* 389: 877-884.
43. Kennedy, D.J., Gatfield, K.M., Winpenny, J.P., Ganapathy, V. and Thwaites, D.T. (2005) *British Journal of Pharmacology* 144, 28-41.
44. Glunde, K., Guggino, S., E., Solaiyappan, M., Pathak, A., P., Ichikawa, Y. and Bhuiwalla, Z., M. (2003) *Neoplasia*, Vol. 5, No. 6, pp.533-545.
45. Ono, K., Kim, S.O., Han, J., *Mol Cell Biol* 2003 23: 665-76.
46. Brunk UT, Neuzil J, Eaton JW. (2001) *Redox Rep.* 6: 91-7.
47. Fehrenbacher, N., Jaattela, M., *Cancer Res.* (2005) 65: 2993-2995.
48. Nixon, R.A. (2005) *Neurobiol. Aging.* 26: 373-382.
49. Mohamed, M., Sloane, B.F. (2006) *Nat. Rev. Cancer* 6: 764-775.
50. Kroemer, G., Jaattela, M. (2005) *Nat. Rev. Cancer* 5: 886-897.
51. Wraith J.E. (2004) *Curr. Paediatr.* 14: 389-393.
52. Tardy, C., Andrieu-Abadie, N. Salvayre, R. and Levade, T. (2003) *Neurochemical Research* 29: 871-880.
53. Drake, F.H., Dodds, R.A., James, I.E., Connor, J.R., Debouck, C., Barthlow, R., Hastings, G. and Gowen, M. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 12511-12516.
54. Wilcox W.R. (2004) *J. Pediatr.* 144: S3-S14.
55. Caillaud C., Poenaru L. (2000) *Biomed. Pharmacother.* 54: 505-512.
56. Meikle P.J., Hopwood J.J., Clague A.E., Carey W.F. (1999) *JAMA* 281: 249-254.
57. Kalatzis, V., Nevo, N., Cherqui, S., Gasnier ,B., Antignac, C., (2004) *Human Molecular Genetics* 13:1361-1371.
58. Cox, T., Lachmann, R., Hollak, C. et al. (2000) *Lancet* 335: 1481-1485.
59. Barranger, J.A., Rice, E.R., Swaney, P. (1999) *Neurochem.* 24: 601-615.
60. Massotte, D. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, 1610, 77-89.
61. Ganapathy and Leibach F.H., (1991) *Curr Opin Cell Biol* 3: 695-701.
62. Patterson, R.M., Selkirk, J.K. and Merrick, A. (1995) *Environmental Health Perspectives* 105:7-8.
63. Aumiller, J.J., Hollister J.R. and Jarvis, D.L. (2006) *Protein Expr. Purif.*, 47: 571-590.
64. Sanai, K., Takahashi, K., Nakamura, K., Takahashi, M., Ishigaki, M., Sakuma, T., Toga, H., Suzuki, T. and Voelker, D.R. (2005) *Biol. Chem.*, 386: 143-153.

65. Blanco, G., Hatfield, W.R., Minor, N.T., Sanchez, G., Koster, J.C., DeTomaso, A.W. and Mercer, R.W. (1997) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 834: 88-96.
66. Guerini, D., Pan, B. and Carafoli, E. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278: 38141-38148.
67. Asmann, Y.W., Dong, M. and Miller, L.J. (2004) *Regul. Pept.*, 123: 217-223.
68. Filppula, S., Yaddanapudi, S., Mercier, R., Xu, W., Pavlopoulos, S. and Makriyannis, A. (2004) *J. Pept. Res.*, 64: 225-236.
69. Weber, C.C., Cai, H., Ehrbar, M., Kubota, H., Martiny-Baron, G., Weber, W., Djonov, V., Weber, E., Mallik, A.S., Fussenegger, M., Frei, K., Hubbell, J.A. and Zisch, A.H. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280: 22445-22453.
70. Strosberg, A.D. and Guillaume, J.L. (2000) *Methods Mol. Biol.*, 126: 207-214.
71. Janne, O.A., Palvimo, J.J., Kallio, P., Mehto, M., Xie, Y.B. and Sui, Y.P. (1993) *Clin. Chem.*, 39: 346-352.
72. Clay, W.C., Condreay, J.P., Moore, L.B., Weaver, S.L., Watson, M.A., Kost, T.A. and Lorenz, J.J. (2003) *Assay Drug Dev. Technol.*, 1: 801-810.
73. Suzuki, Y.A. and Lonnerdal, B. (2004) *Biometals*, 17: 301-309.
74. Smith, G.E., Ju, G., Ericson, B.L., Moschera, J., Lahm, H.W., Chizzonite, R. and Summers, M.D. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82: 8404-8408.
75. Ding, H., Griesel, C., Nimtz, M., Conradt, H.S., Weich, H.A. and Jager, V. (2003) *Protein Expr. Purif.*, 31: 34-41.
76. Nuntaprasert, A., Mori, Y., Fujita, K., Yoneda, M., Miura, R., Tsukiyama-Kohara, K. and Kai, C. (2005) *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 28: 17-35.
77. Nuntaprasert, A., Mori, Y., Fujita, K., Yoneda, M., Miura, R., Tsukiyama-Kohara, K. and Kai, C. (2005) *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 28: 103-120.
78. Wu, D., Murakami, K., Liu, N., Konishi, M., Muneta, Y., Inumaru, S., Kokuho, T. and Sentsui, H. (2004) *Microbiol. Immunol.*, 48: 471-476.
79. Muneta, Y., Nagaya, H., Minagawa, Y., Enomoto, C., Matsumoto, S. and Mori, Y. (2004) *Biotechnol. Lett.*, 26: 1453-1458.
80. Ruttanapumma, R., Nakamura, M. and Takehara, K. (2005) *J. Vet. Med. Sci.*, 67: 25-28.
81. Wu, D., Murakami, K., Liu, N., Inoshima, Y., Yokoyama, T., Kokuho, T., Inumaru, S., Matsumura, T., Kondo, T., Nakano, K. and Sentsui, H. (2002) *Cytokine*, 20: 63-69.
82. Nagaya, H., Kanaya, T., Kaki, H., Tobita, Y., Takahashi, M., Takahashi, H., Yokomizo, Y. and Inumaru, S. (2004) *J. Vet. Med. Sci.*, 66: 1395-1401.

83. Jayakumar, A., Cataltepe, S., Kang, Y., Frederick, M.J., Mitsudo, K., Henderson, Y., Crawford, S.E., Silverman, G.A. and Clayman, G.L. (2004) *Methods*, 32: 177-184.
84. Petchampai, N., Boonsaeng, V., Wallace, J.C. and Jitrapakdee, S. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 316: 177-181.
85. Cadel, S., Gouzy-Darmon, C., Petres, S., Piesse, C., Pham, V.L., Beinfeld, M.C., Cohen, P. and Foulon, T. (2004) *Protein. Expr. Purif.*, 36: 19-30.
86. Patnaik, D., Chin, H.G., Esteve, P.O., Benner, J., Jacobsen, S.E. and Pradhan, S. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279: 53248-53258.
87. Abo, Y., Hagiya, A., Naganuma, T., Tohkairin, Y., Shiomi, K., Kajiura, Z., Hachimori, A., Uchiumi, T. and Nakagaki, M. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 322: 814-819.
88. Mologni, L., Sala, E., Riva, B., Cesaro, L., Cazzaniga, S., Redaelli, S., Marin, O., Pasquato, N., Donella-Deana, A. and Gambacorti-Passerini, C. (2005) *Protein. Expr. Purif.*, 41: 177-185.
89. Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987) *Methods in Enzymol.* 155, 335-350.
90. Maniatis, T., Fritsh, E.F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning: A Laboratory Manual* (Cold spring Harbor laboratory).
91. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
92. Wilson K., Walker J. (2000) *Metodologia Biochimica*, Raffaello Cortina Editore.
93. Palmieri, F., Indiveri, C., Bisaccia, F., and Iacobazzi, V. (1995) *Methods Enzymol.* 260, 349-369.
94. Bisaccia, F., De Palma, A., and Palmieri, F. (1989) *Biophys. Acta* 977, 171-176.
95. Claves, D., and Azzi, A. (1989) *J. Biol. Chem.*, 264, 14627-14630.
96. Capobianco, L., Bisaccia, F., Micheal, A., Sluse, F.S., and Palmieri, F. (1995) *FEBS Lett* 357, 297-300.
97. Kaplan, (2001) *J. Membr Biol* 268, 13682-90.
98. Carrisi, C., Madeo, M., Morciano, P., Dolce, V., Cenci, G., Cappello, A.R., Mazzeo, G., Iacopetta, D. and Capobianco, L. (2008) *J. Biochem.* 144, 389-392.
99. Havelaar, A.C., Mancini, G.M.S., Beerens, C.E.M.T., Souren, R.M.A. and Verheijen, F.W. (1998) *J. Bio. Chem.*, 273: 34568-34574.
- 100 Hung, Y.H., Layton. M.J., Voskoboinik, I., Mercer, J.F. and Camakaris, J. (2007) *Biochem J* 401, 569-579.
- 101 Kramer, R. and Klingenberg, M. (1979) 18, 4209-4215.

PARTECIPAZIONI A CONGRESSI

IJB

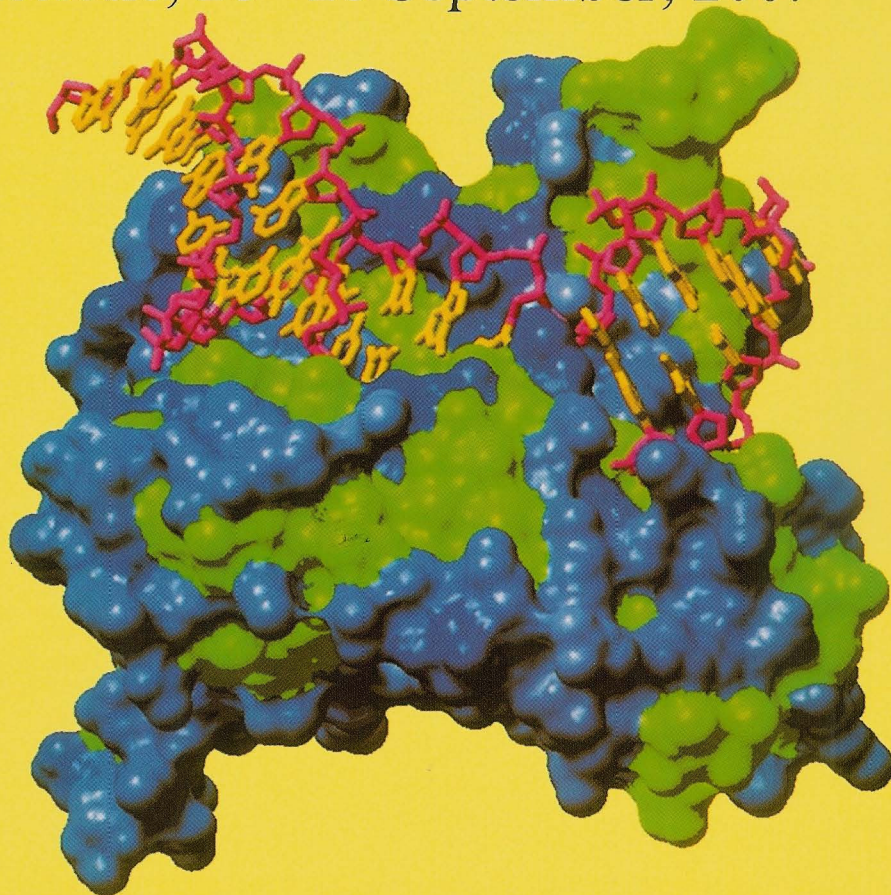
*the Italian Journal
of Biochemistry*

Vol. 56 n. 3 September 2007

Special Issue:

SIB 2007

Riccione, 26 - 28 September, 2007



12.09

HOMOLOGOUS EXPRESSION AND SUBCELLULAR LOCALIZATION STUDIES ON TRANSPORTER BELONGING TO NEW FAMILY OF YEAST PROTEINS MEDIATING BIDIRECTIONAL VACUOLAR AMINO ACID TRANSPORT

D. Iacopetta¹, C. Carrisi², M. Madeo¹, G. Mazzeo¹, A. R. Cappello¹, L. Capobianco², L. Dini², V. and Dolce¹

¹Dip. Farmaco Biologico, Università della Calabria, Italy

²Dip. di Scienze e Tecnologie Biologiche e Ambientali, Università del Salento, Italy

Introduction. The vacuole of *S.cerevisiae* is involved in enzymatic degradation of proteins and homeostatic control of solutes as ions and amino acids. This organelle support many carrier-mediated transport systems. Several amino acid transport systems have been described in purified vacuoles but the responsible proteins have yet to be identified. Sequence analysis of the *S.cerevisiae* genome has predicted 7 yeast proteins (AVT1-7) related to the neuronal GABA-glycine vesicular transporters (1). AVT1-3-4-7 mediate amino acid transport in vacuoles; no vacuolar amino acid transport role is assigned to proteins AVT2-5-7. Aims of this work are the AVT2p overexpression in *S.cerevisiae* and its subcellular localization, since preliminary data showed that this protein probably localizes to endoplasmic reticulum (1).

Methods. In order to express AVT2p, the ORF (YEL064C) was amplified by PCR from *S.cerevisiae* genomic DNA. A his-tag useful for the successive purification was added at the coding sequences of protein. The resulting cDNA was cloned into the pYES vector behind the inducible Gal-Cyc promoter and overexpressed in *avt2Δ* yeast strains. This cDNA devoid of his-tag was cloned into the pUG35 vector in frame with the yEGFP. The GFP fusion construct obtained was used for intracellular localization study.

Results. His-tagged AVT2p was overexpressed in *avt2* yeast strains and purified by Ni+agarose chromatography. The purified protein had an apparent molecular mass of about 53 kDa. The electron microscopy analysis demonstrated that the overproduction of AVT2p, in yeast cell, does not determine morphological modifications on the structure of intracellular membranes.

AVT2p-GFP expressing cells showed a green fluorescence of the vacuolar network. With the vacuole specific dye, FM 4-64, the same cell showed a pattern of fluorescence coinciding with the vacuole. The overlapping images confirmed the vacuolar localization of AVT2p. Fluorescent DNA stain (DAPI) experiments showed no stacks of paired membranes closely associated with the nuclear envelope (karmellae).

Conclusions. Our results asses the AVT2p localization. Moreover the overexpressed and purified protein will be used to further functional characterization.

References

1. Russnak, R. et al. (2001) *J. Biol Chem* 276,23849-23857

12.10

IDENTIFICATION OF THE MITOCHONDRIAL NAD⁺ TRANSPORTER IN *Saccharomyces cerevisiae*

S. Todisco¹, G. Agrimi¹, A. Castegna¹, F. Palmieri¹

¹Dept. of Pharmaco-Biology, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, University of Bari, Bari, Italy

The *S. cerevisiae* gene products YIL006W and YEL006W, now called Ndt1p and Ndt2p, display a high degree (70%) of homology and possess the characteristic features of the mitochondrial carrier family (1). However, their function is not known yet. Ndt1p and Ndt2p were overexpressed in *E. coli*, purified and reconstituted in phospholipids vesicles to measure their transport properties. Strains lacking Ndt1p and Ndt2p (or one of these proteins) were tested for their growth rate on non-fermentable carbon sources. The mitochondrial extracts were submitted to mass spectrometry analysis to evaluate the NAD⁺ and NADH levels and used to determine the activity of the mitochondrial enzymes PDH and ACDH. GFP-Ndt1p and GFP-Ndt2p were used to establish their subcellular localization.

The reconstituted Ndt1p catalyzed the uptake of NAD⁺ into liposomes with high substrate specificity. Yeast strain lacking Ndt1p had reduced levels of mitochondrial NAD⁺ and NADH and reduced activity of the mitochondrial NAD⁺-requiring enzymes PDH and ACDH compared to the wild type strain. The knock-out of YEL006W (*ndt2Δ*) exhibited the same results. The double deletant strain (*ndt1Δndt2Δ*) showed a more pronounced decrease in NAD⁺ and NADH levels in mitochondria and a delayed growth on non-fermentable carbon sources compared to the wild type and the single deletant strains. Subcellular localization studies through GFP-tagging confirmed that both the gene products are targeted to mitochondria. Ndt2p expressed in *E. coli* was inactive upon reconstitution into liposomes. The activities of the two NAD⁺-synthesizing enzymes, NAD⁺ synthetase and NAMN/NMN adenyltransferase, were confirmed to be absent in the mitochondria.

Taken together, these data demonstrate that Ndt1p and its isoform Ndt2p are mitochondrial carriers responsible for the uptake of NAD⁺ into mitochondria.

Reference

1. F. Palmieri., G. Agrimi, E. Blanco, A. Castegna, M.A. Di Noia, V. Iacobazzi, F.M. Lasorsa, C.M. Marobbio, L. Palmieri, P. Scarcia, S. Todisco, A. Voza, J. Walker (2006) Identification of mitochondrial carriers in *Saccharomyces cerevisiae* by transport assay of reconstituted recombinant proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1757, 1249-1262.

14.21

STRUCTURE, EXPRESSION IN Baculovirus SYSTEM, TISSUE DISTRIBUTION AND SUBCELLULAR LOCALIZATION OF A PUTATIVE HUMAN PROTON-COUPLED AMINO ACID TRANSPORTER (hPAT4)

D. Iacopetta¹, M. Madeo¹, C. Carrisi², G. Mazzeo¹, L. Capobianco², A. R. Cappello¹, C. Bucci², V. and Dolce¹

¹Dip. Farmaco Biologico, Università della Calabria, Italy

²Dip. di Scienze e Tecnologie Biologiche e Ambientali, Università del Salento, Italy

Introduction. The amino acid/auxin permease (AAAP) family is one of the largest families of amino acid transporters identified so far. Three different subfamilies of the AAAP transporters have been identified in mammals; the third mammalian AAAP subfamily is represented by the PAT1 to PAT4 (1). PAT3 and PAT4 are orphan transporters, whereas PAT1 and PAT2 are characterized as electrogenic amino acid/proton cotransporters. In this report the structural features of human PAT4 cDNA, the organization of pat4 gene, the mRNA tissue distribution and the protein subcellular localization were investigated. Moreover, the hPAT4 cDNA was over-expressed in baculovirus infected Sf9 cells and the recombinant protein was purified.

Materials and methods. The coding region for the hPAT4 was amplified from human kidney cDNA by PCR, cloned into the pBlueBac 4.5/his baculo transfer vector, over-expressed in Sf9 cells and purified by affinity chromatography. The tissue distribution of PAT family was performed by RT-PCR analysis. The subcellular localization was investigated by using Western blot analysis.

Results. The hPAT4 cDNA is 2493bp long (NM_152313) with a 1515bp ORF coding for a protein of 504 amino acids. The gene, consisting of at least 11 exons, is located on chromosome 11q2. The tissue distribution of mRNAs for PAT1-4 showed that PAT1 gene is expressed ubiquitously but in very abundant amounts in kidney, small intestine, spleen and brain; the PAT2 gene is expressed only in heart, kidney and skeletal muscle; the PAT3 gene is expressed in very low amount only in testis; the PAT4 is expressed ubiquitously but in very abundant amounts in kidney and brain. A Western blot analysis conducted on Percoll-density gradient fractions, showed a lysosomal localization of the PAT4 protein. The hPAT4 recombinant protein over-expressed in baculovirus infected Sf9 cells was purified, the purified protein was homogeneous with an apparent molecular weight of 59 kDa.

Conclusions. Our preliminary results showed that PAT4 is a lysosomal transporter protein expressed prevalently in brain and kidney. Currently, in order to understanding its metabolic role are in progress study of functionally characterization.

1. Boll M. et al. (2004) *Plugers Arch.*, 447.776-779.

14.22

THE DIFFERENTIAL BIOCHEMICAL PROPERTIES OF NICOTINAMIDE MONONUCLEOTIDE ADENYLYL - TRANSFERASE ISOZYMES ENABLE TO DETERMINE THEIR RELATIVE EXPRESSION LEVELS

S. Scotti¹, M. Di Stefano¹, F. Cimadamore¹, L. Sorci¹, F. Mazzola¹, G. Magni¹

¹Istituto di Biotecnologie Biochimiche, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy

Background. Nicotinamide mononucleotide adenylyl-transferase (NMNAT) activity catalyzes the final step of NAD⁺ biosynthesis. In humans, three isozymes differing for the oligomeric state, subcellular localization and catalytic properties have been identified and characterized: NMNAT1 is hexameric and is localized in the nucleus, NMNAT2 is a golgian monomeric protein, while NMNAT3 is tetrameric and mitochondrial. To date, there is no information on the relative contribution of NMNAT isozymes to NAD⁺ formation. We recognized, however, that these isozymes might be discriminated in experiments based on their distinctive substrate utilization and sensitivity to different metal ions (1).

Objective. We developed an unambiguous biochemical assay that allowed us to discriminate the activity of the three isozymes and to determine their relative amounts in cell line and tissue extracts.

Methods. NMNAT activity was measured by a HPLC-based assay in the presence of different metal ions as well of alternative substrates.

The isozyme specific mRNA levels were determined by RT real-time PCR.

Results. Discrimination between recombinant purified NMNAT1 and NMNAT2 has been achieved on the basis of their different sensitivity to ZnCl₂ and MgCl₂, whereas the mitochondrial isozyme is unique in that it is also able to use ITP as substrate.

We next demonstrated that this approach was valid for discriminating the amounts of the three isozymes in different cell extracts, in which they are not simultaneously present and do not contribute equally to NAD⁺ formation. For example, while NMNAT1 is ubiquitously expressed, NMNAT2 predominates in brain and NMNAT3 is present in liver.

The mRNA expression profiles validate our protocol, in that in the cell lines and tissues analyzed the distinctive presence or absence of each isozymes perfectly matched.

Conclusions. To our knowledge this is the first report on the development of a protocol aiming at the identification of the specific contribution to NAD⁺ biosynthesis of NMNAT isozymes in the cell.

References

1. Sorci L, Cimadamore F, Scotti S, Petrelli R, Cappellacci L, Franchetti P, Orsomando G and Magni G. *Biochemistry* 2007;46:4912-4922.

PUBBLICAZIONI

Identification of the *Drosophila melanogaster* Mitochondrial Citrate Carrier: Bacterial Expression, Reconstitution, Functional Characterization and Developmental Distribution

Chiara Carrisi^{1,†}, Marianna Madeo^{1,2,†}, Patrizia Morciano³, Vincenza Dolce², Giovanni Cenci³, Anna Rita Cappello², Giancarlo Mazzeo², Domenico Iacopetta² and Loredana Capobianco^{1,*}

¹Department of Biological and Environmental Sciences and Technologies, University of Salento, Lecce, Italy;

²Department of Pharmaco-Biology, University of Calabria, Arcavacata di Rende, Cosenza, Italy; and

³Department of Basic and Applied Biology, University of L'Aquila, L'Aquila, Italy

Received May 9, 2008; accepted May 27, 2008; published online May 31, 2008

The mitochondrial carriers are a family of transport proteins that shuttle metabolites, nucleotides and cofactors across the inner mitochondrial membrane. The genome of *Drosophila melanogaster* encodes at least 46 members of this family. Only four of them have been characterized: the two isoforms of the ADP/ATP translocase, the brain uncoupling protein and the carnitine/acylcarnitine carriers. The transport functions of the remainders cannot be assessed with certainty. One of them, the product of the gene CG6782, shows a fairly close sequence homology to the known sequence of the rat mitochondrial citrate carrier. In this article the fruit fly protein coding by the CG6782 gene has been functionally characterized by over-expression in *Escherichia coli* and reconstitution into liposomes. It shows to have similar transport properties of the eukaryotic mitochondrial citrate carriers previously biochemically characterized. This indicates that in addition to the protein sequence conservation, insect and mammalian citrate carriers are also significantly related at the functional level suggesting that *Drosophila* may be used as model organism for the study of mitochondrial solute transporter. The *DmCIC* expression pattern throughout development was also investigated; the transcripts were detected at equal levels in all stages analysed.

Key words: citrate carrier, *Drosophila melanogaster*, metabolite transporter, mitochondria, transport.

Abbreviations: BAT, Bathophenanthroline; BTA, benzenetricarboxylic acid; *DmCIC*, *Drosophila melanogaster* citrate carrier; PIPES, 1,4-piperazinediethanesulfonic acid; PLP, Pyridoxal 5'-phosphate; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction.

The tricarboxylate (or citrate) carrier (CIC) is a transport protein of the inner mitochondrial membrane, which belongs to the mitochondrial carrier family [for review see (1)]. The CIC catalyses the transport of citrate in exchange for a tricarboxylate, a dicarboxylate (L-malate) or phosphoenolpyruvate (2–4). This carrier protein plays a central role in intermediary metabolism because it supplies the cytosol with acetyl units (deriving from the transported citrate) necessary for the de novo fatty acid and cholesterol biosyntheses (5). The CIC has been kinetically characterized in eukaryotes (6–8) and its primary structure has been determined (7, 9–11). However, the functional characterization of this particular mitochondrial solute carrier in model organisms is still missing.

In this study, we have examined the proteins encoded on the genome of *Drosophila melanogaster* for members of the mitochondrial carrier family, and we have

identified 46 members (data not shown). One of them, encoded by gene CG6782 (<http://www.flybase.org>), displays a high identity (*i.e.* 62%) to the rat citrate carrier protein. We therefore have expressed and characterized the protein encoded by this sequence, afterwards named *DmCIC*. In the present article, we report (i) the expression and purification of large quantities of the fruit fly *DmCIC*, (ii) the functional characterization of the over-expressed *DmCIC* following its incorporation into liposomes and (iii) an expression profile of *DmCIC* by RT-PCR analysis in different developmental stages. To our knowledge, this report presents the first information on the molecular properties of the fruit fly *DmCIC* and a definitive identification of its gene.

MATERIALS AND METHODS

Computer Search for *DmCIC*—The proteins annotated in the FlyBase were compared with the rat sequence of the mitochondrial citrate carrier (P32089) with the aid of the program blastp.

Construction of the Expression Plasmid Coding for Mature *DmCIC*—Total RNA was extracted from Oregon

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: +39(0)832298864, Fax: +39(0)832298626,

E-mail: loredana.capobianco@unile.it

†These two authors contributed equally to this work.

R adult flies using RNeasy Mini Kit (Quiagen) and reverse transcribed as described in (12). The mature coding region for the *DmCIC* was amplified from first strand cDNA (100 ng) by polymerase chain reaction with nucleotides 164–180 and 1011–1036 of the fruit fly transcript CG6782-RA. The product was cloned into the NdeI-HindIII sites of the expression vector pET-21b that it had been previously modified by cloning into HindIII-XhoI sites a cDNA sequence coding for a V5 epitope followed by six histidines (pET-21b/V5/His). Transformants of *Escherichia coli* TG1 cells were selected and screened. The absence of the stop codon in the reverse primer sequence led to the expression of the *DmCIC* with carboxy-terminal V5- and His6-epitope tag. The *DmCIC* protein was overexpressed in *E. coli* in BL21 (DE3). Inclusion bodies were isolated and *DmCIC* was purified by centrifugation and Ni⁺-NTA-agarose affinity chromatography as described (13).

Reconstitution into Liposomes and Transport Assays—The recombinant protein in sarkosyl was reconstituted into liposomes in the presence of substrates as described (14). External substrate was removed on Sephadex G-75. Transport at 25°C was started by adding [¹⁴C]citrate (from Amersham) to proteoliposomes and terminated by addition of 20 mM 1,2,3-BTA. In controls, inhibitor was added with the labelled substrate. All transport measurements were carried out at the same internal and external pH values (PIPES 10 mM, pH 7.0). Finally, the external substrate was removed, and the radioactivity in the liposomes was measured (14).

RNA Isolation and Semiquantitative RT-PCR—Total RNA was isolated from wild-type Oregon R embryos, larvae, pupae and adult flies using RNeasy Mini Kit (Qiagen). Fifty nanograms of RNA were reverse transcribed and amplified using Access RT-PCR System kit (Promega). The *twinstar* (*tsr*) gene was used as an internal control. The sense and antisense gene-specific primers were as follows: *DmCIC*, sense CTGTCCCATCGCCACTTCA, anti sense CTATAGCCACTTACCCATTGC; *tsr*, sense TTGTTTCGTGA AA, antisense ATACGTGTTTCC. The PCR products were analysed by 1% agarose gel electrophoresis. Band intensities were quantified using Quantity One 1-D Analysis Software (Biorad, Hercules, CA).

Other Methods—Proteins were analysed by SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue dye or transferred to nitrocellulose membranes. The amount of pure *DmCIC* was estimated by laser densitometry of stained samples using carbonic anhydrase as a protein standard. The amount of protein incorporated into liposomes was measured as described previously (12). Western blotting was carried out with mouse anti-V5 monoclonal antibody as described previously (15).

RESULTS AND DISCUSSION

Bacterial Expression of Recombinant *DmCIC*—By screening *Drosophila melanogaster* non-redundant databases with the rat CIC (P32089), a gene CG6782 encoding for the putative fruit fly citrate carrier, *DmCIC*, was found.

The multiple clustalW alignment (data not shown) of the the *DmCIC* with mature citrate carrier of rat and silver eel, which N-terminal sequences were determined

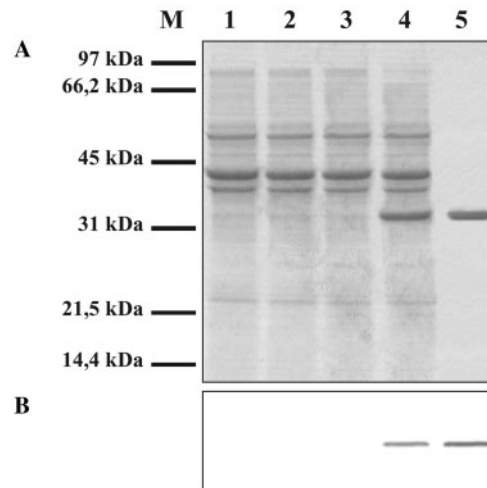


Fig. 1. Expression in *E. coli* and purification of the *DmCIC*. Proteins were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie-blue dye (A) or transferred to nitrocellulose and immunodecorated with mouse anti-V5 monoclonal antibody (B). Lanes M, markers (Phosphorylase b, Serum albumin, Ovalbumin, Carbonic anhydrase, Trypsin inhibitor and Lysozyme); lanes 1–4, *E. coli* BL21(DE3) containing the expression vector, without (Panels A and B, lanes 1 and 3) and with the coding sequence for *DmCIC* (Panels A and B, lanes 2 and 4). Samples were taken at the time of induction (lanes 1 and 2) and 4 h later (lanes 3 and 4). The same number of bacteria was analysed in each sample. Lane 5, purified *DmCIC* (5 micrograms) originating from bacteria shown in lane 4.

by direct sequence of purified native proteins (9, 11), shows that the mature *DmCIC* starts with residues ADSG, indicating that fruit fly *DmCIC* is processed between residues 26 and 27.

The mature *DmCIC* was overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) at high levels (see Fig. 1A, lane 4). The protein was not detected in bacteria harvested immediately before induction of expression (Fig. 1A, lanes 1 and 2), nor in cells harvested after induction and transformed with empty vector (Fig. 1A, lane 3). The purified protein showed a single band when analysed by SDS-PAGE (Fig. 1A, lane 5), with an apparent molecular mass of about 33 kDa. Its identity was confirmed by western blot analysis using mouse anti-V5 monoclonal antibody (Fig. 1B, lanes 4 and 5).

Functional Characterization of *DmCIC*—The *DmCIC* recombinant protein was reconstituted into liposomes and the uptake of 1 mM [¹⁴C]citrate was measured either as uniport (in the absence of internal citrate) or as exchange (in the presence of 20 mM citrate). The uptake of citrate by exchange followed a first order kinetics (rate constant 0.147/min; initial rate, 9.25 μmol/min/mg of protein) with isotopic equilibrium being approached exponentially (14). In contrast, no [¹⁴C]citrate uptake was observed without internal substrate, demonstrating that *DmCIC* does not catalyse unidirectional transport (uniport) but only an exchange of substrates (data not shown). The exchange reaction was completely inhibited by 1,2,3-BTA. If the solubilized protein was boiled before the incorporation into liposomes no uptake of labelled external substrate into proteoliposomes was observed.

Similarly, no citrate/citrate exchange was detected when sarkosyl-solubilized material from bacterial cells, either lacking the expression vector for *DmCIC* or harvested immediately before induction of expression, was reconstituted into liposomes. Furthermore, the proteoliposomes did not catalyse homoexchange activities for phosphate, glutamate, aspartate, ornithine, ADP and ATP (internal concentration, 20 mM; external concentration, 1 mM).

The substrate specificity of recombinant *DmCIC* was extensively investigated by measuring the uptake of [¹⁴C]citrate into proteoliposomes preloaded with various substrates. As shown in Fig. 2, the highest activities were observed in the presence of internal *cis*-aconitate, threo-isocitrate, phosphoenolpyruvate and L-malate. Some activity was also observed with succinate. Furthermore, no significant exchange activity was found using *trans*-aconitate, or substrates of other mitochondrial carriers, like phosphate, 2-oxoglutarate, glutamate and ATP. These results indicate clearly that radioactive citrate is transported into proteoliposomes containing *DmCIC*, only in exchange for an internal counter-substrate.

The sensitivity of the reconstituted citrate/citrate exchange to externally added inhibitors was investigated (Fig. 3). The 1,2,3-BTA was more effective than its structural isomers 1,2,4-BTA and 1,3,5-BTA. The activity of the recombinant protein was markedly inhibited by PLP and BAT (known inhibitors of several mitochondrial carriers) as well as by thiol reagents (methylmercuric chloride and mercuric chloride), whereas a much higher amount of *N*-ethylmaleimide was required for a partial inhibition. The different inhibitory potency of these SH reagents can be explained, at least in part, by taking into account the microenvironment surrounding the reactive cysteine(s). Therefore, the binding of such reagents with a specific SH-group could be differently affected by amino acid residues surrounding it. *DmCIC* was inhibited slightly by impermeable dicarboxylate analogues butylmalonate and phenylsuccinate, which are known to be powerful inhibitors of the dicarboxylate and oxoglutarate carriers, respectively (2).

The transport characteristics of the recombinant *DmCIC* and the effects of inhibitors on transport are in agreement with those determined for rat and silver eel mitochondrial CIC (3, 8, 16).

The kinetic constants of the recombinant purified CIC were determined by measuring the initial transport rate at various external [¹⁴C]citrate concentrations, in the presence of a constant saturating internal concentration (20 mM) of citrate. The K_m and V_{max} values (measured at 25°C) were $132 \pm 0.8 \mu\text{M}$ and $11.75 \pm 0.133 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, respectively (four experiments). The activity was calculated by taking into account the amount of CIC recovered in the proteoliposomes after reconstitution. The half-saturation constant of citrate of *DmCIC* is similar than that determined for the tricarboxylate carrier of rat liver (3, 16) while is higher than those determined for yeast and silver eel CIC (7, 8).

From its high sequence identity with rat CIC, transport properties and kinetic characteristics there is no doubt that the fruit fly *DmCIC* is the mitochondrial citrate carrier protein and that the *Drosophila melanogaster*

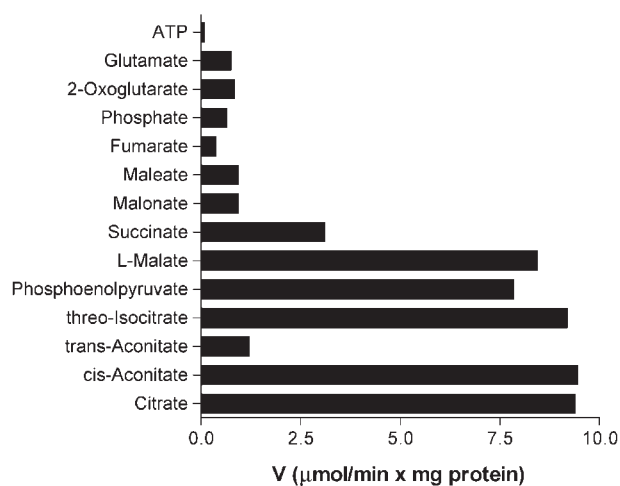


Fig. 2. Dependence of *DmCIC* activity on internal substrate. Proteoliposomes were preloaded internally with various substrates (20 mM). Transport was started by adding 150 μM [¹⁴C]citrate to proteoliposomes reconstituted with *DmCIC*, and stopped after 1 min. Similar results were obtained in at least three independent experiments.

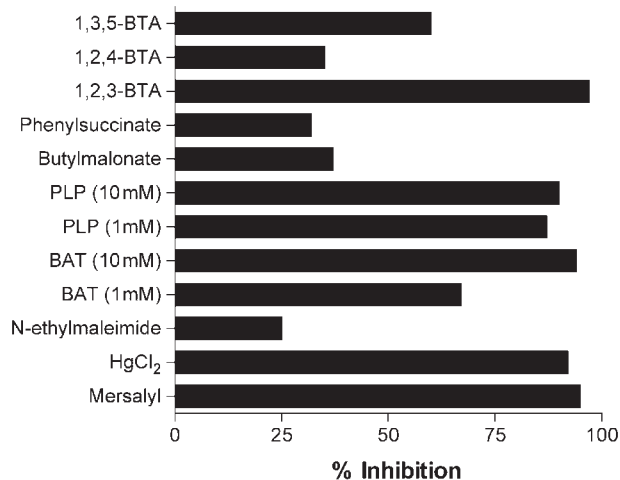


Fig. 3. Effect of inhibitors on the [¹⁴C]citrate/citrate exchange by *DmCIC*. Transport was started by adding [¹⁴C]citrate (final concentration 150 μM) to proteoliposomes containing 20 mM citrate. Thiol reagents were added 2 min before the labelled substrate, the other inhibitors together with labelled substrate. The final concentrations of inhibitors were 0.1 mM (methylmercuric chloride, *p*-hydroxymercuribenzoate and HgCl₂), 10 mM (BAT and PLP), 1 mM (BAT, PLP and *N*-ethylmaleimide), 2 mM (1,2,3-BTA; 1,2,4-BTA; 1,3,5-BTA). The control value for uninhibited citrate uptake was 9.455 μmol/min/mg protein. The data represent means of at least four independent experiments.

could be used as model organism for the studies of mitochondrial solute transporters.

RT-PCR—To determine the expression levels of *DmCIC*, we performed a RT-PCR analysis on mRNAs from wild-type embryos, larvae, pupae and adults (Fig. 4). This analysis revealed that *DmCIC* appears to be equally transcribed at each stage suggesting that its expression is required during the fruit fly development.

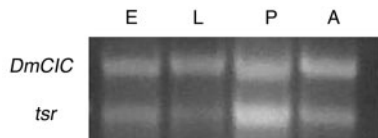


Fig. 4. **Expression of *DmCIC* during development.** RT-PCR for *DmCIC* and *tsr* (internal control) was carried out on RNAs obtained from Oregon R embryos (E), larvae (L), pupae (P) and adults (A). Quantification of 1.3 kb *DmCIC* products relative to *tsr* in each stage has revealed that the levels of *DmCIC* transcripts do not significantly differ during development.

REFERENCES

1. Palmieri, F. (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.* **447**, 689–709
2. Palmieri, F., Stipani, I., Quagliariello, E., and Klingenberg, M. (1972) The kinetics of citrate uptake by malate-loaded mitochondria were measured using the inhibitor stop method and analysed for possible carrier mechanisms. *Eur. J. Biochem.* **26**, 587–594
3. Bisaccia, F., De Palma, A., and Palmieri, F. (1989) Identification and purification of the tricarboxylate carrier from rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **977**, 171–176
4. Zara, V., Iacobazzi, V., Siculella, L., Gnoni, G.V., and Palmieri, F. (1996) Purification and characterization of the tricarboxylate carrier from eel liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 508–513
5. Conover, T.E. (1987) Does citrate transport supply both acetyl groups and NADPH for cytoplasmic fatty acid synthesis? *Trends Biochem. Sci.* **12**, 88–89
6. Bisaccia, F., De Palma, A., Prezioso, G., and Palmieri, F. (1990) Kinetic characterization of the reconstituted tricarboxylate carrier from rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1019**, 250–256
7. Kaplan, R.S., Mayor, J.A., Gremse, D.A., and Wood, D.O. (1995) High level expression and characterization of the mitochondrial citrate transport protein from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **270**, 4108–4114
8. Zara, V., Palmieri, L., Franco, M.R., Gnoni, G.V., and Palmieri, F. (1998) Kinetics of the reconstituted tricarboxylate carrier from eel liver mitochondria. *J. Bioenerg Biomembr.* **30**, 555–563
9. Kaplan, R.S., Mayor, J.A., and Wood, D.O. (1993) The mitochondrial tricarboxylate transport protein. cDNA cloning, primary structure, and comparison with other mitochondrial transport proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 13682–13690
10. Iacobazzi, V., Lauria, G., and Palmieri, F. (1997) Organization and sequence of the human gene for the mitochondrial citrate transport protein. *DNA Seq.* **7**, 127–139
11. Zara, V., Dolce, V., Capobianco, L., Ferramosca, A., Papatheodorou, P., Rassow, J., and Palmieri, F. (2007) Biogenesis of eel liver citrate carrier (CIC): negative charges can substitute for positive charges in the presequence. *J. Mol. Biol.* **365**, 958–967
12. Dolce, V., Scarcia, P., Iacopetta, D., and Palmieri, F. (2005) A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Lett.* **579**, 633–637
13. Dolce, V., Fiermonte, F., Runswick, M.J., Palmieri, F., and Walker, J.E. (2001) The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in toxicity of nucleoside antivirals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 2284–2288
14. Fiermonte, G., Walker, J.E., and Palmieri, F. (1993) Abundant bacterial expression and reconstitution of an intrinsic membrane-transport protein from bovine mitochondria. *Biochem. J.* **294**, 293–299
15. Capobianco, L., Bisaccia, F., Michel, A., Sluse, F.E., and Palmieri, F. (1995) The N- and C-termini of the tricarboxylate carrier are exposed to the cytoplasmic side of the inner mitochondrial membrane. *FEBS Lett.* **357**, 297–300
16. Kaplan, R.S., Mayor, J.A., Johnston, N., and Oliveira, D.L. (1990) Purification and characterization of the reconstitutively active tricarboxylate transporter from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **265**, 13379–13385